



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y MEDIO AMBIENTE



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL

Programa de Doctorado "Biología Agraria y Acuicultura"

Tesis Doctoral

**Uso de agentes de control y protección biológica
frente a nemátodos del género *Meloidogyne* en
cultivos protegidos bajo plástico**

María Elena Flor Peregrín

Granada, 2013

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: María Elena Flor Peregrín
D.L.: GR 1893-2013
ISBN: 978-84-9028-587-9

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL
Programa de Doctorado "Biología Agraria y Acuicultura"

**USO DE AGENTES DE CONTROL Y PROTECCIÓN BIOLÓGICA
FRENTE A NEMÁTODOS DEL GÉNERO *MELOIDOGYNE* EN
CULTIVOS PROTEGIDOS BAJO PLÁSTICO**

por

María Elena Flor Peregrín

Memoria de Tesis Doctoral para optar al grado de Doctora por la
Universidad de Granada

Fdo. María Elena Flor Peregrín
Licenciada en Ciencias Biológicas y en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Directores de la Tesis Doctoral,

Fdo. Vanessa Martos Núñez
Dra. en Farmacia
Facultad de Ciencias
Universidad de Granada

Fdo. Miguel Talavera Rubia
Dr. en Ciencias Biológicas
IFAPA Centro Camino de Purchil
Junta de Andalucía, Granada

Granada, 2013

La doctoranda, María Elena Flor Peregrín, y los directores de la tesis, Miguel Talavera Rubia y Vanessa Martos Núñez, garantizamos al firmar esta tesis doctoral que, el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y, hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, a 10 de Enero de 2013

Director/es de la Tesis

Fdo.: Miguel Talavera Rubia

Doctoranda

Fdo.: Vanessa Martos Núñez

Fdo.: María Elena Flor Peregrín

Este trabajo se ha realizado, en primer lugar, gracias a la concesión de una beca predoctoral dentro del programa de ayudas para la Formación de Personal Investigador del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), BOE 308, 26 de diciembre de 2006, Resolución de 1 de diciembre de 2006.

El Ministerio de Educación y Ciencia, Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria y los fondos FEDER de la Unión Europea contribuyeron a la financiación de los ensayos realizados a través de los proyectos y convenios: INIA-AT06-006-C7-3, INIA-RTA2006-00016-00-00, MICINN-AGL2009-13027-C02-02, INIA-CC09-074 e INIA-RTA2010-00017-C02-01.

Agradecimientos

En estas líneas quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han ayudado a que esta tesis doctoral vea la luz. En este tiempo he convivido con personas valiosas de las que he aprendido mucho, tanto a nivel profesional como personal y, es por ello que, quiero mostrarles mi gratitud.

Al Dr. Miguel Talavera Rubia, director de esta tesis, por su orientación, conocimientos, consejos y confianza en mí. Gracias porque todo ello ha sido fundamental para la realización de este trabajo.

A la Dra. Vanessa Martos Núñez, tutora-directora de esta tesis y amiga. Muchas gracias, porque desde el momento en que se iluminó en mi mente tu nombre, para formar parte de este trabajo, conté contigo incondicionalmente. Por tu amabilidad, apoyo, cariño y disponibilidad siempre. Es recíproco.

A la Dra. Rosario Azcón Aguilar de EEZ-CSIC, Granada, tutora de mi trabajo de investigación del master. Gracias Charo por su apoyo y consejos, y por proporcionarme gran parte de los inóculos utilizados. De sus charlas, siempre enriquecedoras, me llevo la experiencia transmitida y su cariño en cada palabra.

Al Dr. Pablo Castillo de IAS-CSIC, Córdoba, por su inestimable ayuda en la identificación de las especies; y a la Dra. Magda Galeano y los técnicos de campo de Koppert Biological Systems en Almería, por la asistencia técnica en campo y laboratorio durante los muestreos nematológicos, en las fincas del área de cultivos hortícolas protegidos de Almería.

A la Dra. Elisa Suárez Rey, a la que siempre tendré un cariño especial por ser la persona con la que, de su mano, comencé en el mundo de la investigación. Confió en mí y disfruté muchísimo trabajando a su lado. Su apoyo, nuestras risas compartidas y su amistad han sido elementos muy valiosos.

Quiero agradecer al Dr. Paul De Ley y a la Dra. Irma Tandingan De Ley, de la Universidad de California, Riverside, USA. Por enseñarme, personalmente, mis primeros pasitos en identificación y en biología molecular. Gracias por su sencillez y por tratarme como una más de su grupo de trabajo. Y gracias a toda la buena gente que conocí tan lejos

de casa y que hicieron mis estancias más agradables, incluidos mi trocito de España en Estados Unidos, Antonio y Laura.

A mis compañeros del IFAPA, Antonio, Mercedes, Tomás, Manolo, Teresa, Paqui, Araceli, Eugenio, María del Mar, María José, Olga, Adriana y Ascen, por haber compartido conmigo tantas vivencias, buenos y no tan buenos momentos, por interesarse por mí, estar ahí, y por haberme acompañado en todo este tiempo que tan rápido ha pasado, en parte, gracias a vuestra compañía. A todos os aprecio y os tengo mucho cariño.

A M^a Dolores, María y Juan José por la asistencia técnica en campo y laboratorio.

A mis compañeros del CSIC, sé que puedo contar con vosotros.

Y gracias también a mis amigos/as, por el apoyo que habéis demostrado, por las risas y la amistad que me brindáis.

No quiero olvidar mi agradecimiento a Esther López. No son necesarias muchas palabras, solo una, gracias.

Y una gratitud inmensa y especial a mi familia. Todo esto también es vuestro. Mis padres, Pepi y Ramón, los pilares de mi vida, personas buenas y nobles, con un corazón enorme y unos valores extraordinarios. Sin vuestro apoyo y fuerza no hubiera llegado hasta aquí. Ojalá estuvierais conmigo para siempre. Mis hermanos, José Ramón y Antonio, porque siempre se han preocupado por mí y me han cuidado. Y a una persona especial, Dani, por su comprensión, paciencia, generosidad y apoyo incondicional.

Finalmente, gracias a todas aquellas personas que se han interesado por el progreso y finalización de esta tesis.

A mis padres

“Lo importante en ciencia no es tanto obtener nuevos hechos como descubrir nuevas formas de pensar sobre ellos”

William Lawrence Bragg (1890-1971)

Publicaciones y aportaciones a Congresos relacionadas con la Tesis

Publicaciones científicas

- Especies de *Meloidogyne* y su distribución en los cultivos hortícolas protegidos de Almería
Autores: E. Flor-Peregrín, M. Talavera, T. Salmerón, M. Chiroso-Ríos, M. Blanco y S. Verdejo-Lucas

Revista: Agrícola Vergel 361: 376-381

Año: 2012
- Las enfermedades causadas por nemátodos (*Meloidogyne* spp.) en los cultivos hortícolas bajo abrigo de Almería: visión de los asesores técnicos
Autores: E. Flor-Peregrín, M. Talavera, S. Sayadi, M. Chiroso-Ríos, T. Salmerón y S. Verdejo-Lucas

Revista: Agrícola Vergel 359: 290-294

Año: 2012
- Use of poultry manure combined with soil solarization as a control method for *Meloidogyne incognita* in carnation
Autores: J. M. Melero-Vara, C. J. López-Herrera, M. J. Basallote-Ureba, A. M. Prados, M. D. Vela, F. J. Macías, E. Flor-Peregrín y M. Talavera

Revista: Plant Disease 96(7): 990-996

Año: 2012
- Perception of the impact of root-knot nematode-induced diseases in horticultural protected crops of south-eastern Spain
Autores: M. Talavera, S. Sayadi, M. Chiroso-Ríos, T. Salmerón, E. Flor-Peregrín y S. Verdejo-Lucas

Revista: Nematology 14(5): 517-527

Año: 2012

- Ensayos en campo para la comparación de métodos de control de *Meloidogyne* spp. en cultivos de flor cortada del sudoeste español

Autores: M.D. Vela, J.M. Melero, C. López, M.J. Basallote, E. Flor-Peregrín y M. Talavera

Revista: Actas Portuguesas de Horticultura 19: 186-196

Año: 2011

Congresos

- Autores: M. Talavera, S. Sayadi, E. Flor-Peregrín y S. Verdejo-Lucas
Título: Incidencia de *Meloidogyne* spp. en cultivos hortícolas protegidos del sudeste español

Tipo de Participación: Comunicación Oral

Congreso: "XVI Congreso Nacional Sociedad Española de Fitopatología"

Publicación: Abstracts del Congreso

Lugar de Celebración: Málaga (España)

Fecha: 2012

- Autores: M.D. Vela, J.M. Melero, C. López, M.J. Basallote, E. Flor-Peregrín y M. Talavera

Título: Ensayos en campo para la comparación de métodos de control de *Meloidogyne* spp. en cultivos de flor cortada del sudoeste español

Tipo de Participación: Comunicación Oral

Congreso: "V Jornadas Ibéricas de Horticultura Ornamental"

Publicación: Abstracts del Congreso

Lugar de Celebración: Faro (Portugal)

Fecha: 2011

- Autores: E. Flor-Peregrín, R. Azcón y M. Talavera
Título: Estudio comparativo de los efectos bioprotectores de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. combinados con *Glomus* spp. sobre el nematodo agallador y crecimiento del tomate
Tipo de Participación: Comunicación Póster
Congreso: IX Congreso SEAE "Calidad y Seguridad Alimentaria"
Publicación: Abstracts del Congreso
Lugar de Celebración: Lérida (España)
Fecha: 2010

- Autores: E. Flor-Peregrín, R. Azcón, T. Salmerón y M. Talavera
Título: Biological protection conferred by *Glomus* spp. and *Bacillus megaterium* against *Meloidogyne incognita* in tomato and pepper
Tipo de Participación: Comunicación Póster
Congreso: 5th Meeting of the IOBC Working Group "Induced Resistance in Plants against Insects and Diseases" "Chances and Limits"
Publicación: IOBC Boletín
Lugar de Celebración: Granada (España)
Fecha: 2009

ÍNDICE

| | |
|---------------------------------|-------|
| Índice | I |
| Índice de tablas y figuras..... | XI |
| Abreviaturas..... | XXI |
| Prólogo | XXVII |
| Resumen..... | XXXI |

| | |
|--|----------|
| Introducción | 1 |
| 1. Horticultura protegida en Andalucía | 3 |
| 1.1. Horticultura protegida en el sudeste andaluz..... | 4 |
| 1.2. Cultivos protegidos de flor cortada en el sudoeste andaluz | 8 |
| 2. Nemátodos fitoparásitos | 8 |
| 3. Control y manejo de nemátodos fitoparásitos | 14 |
| 3.1. Medidas preventivas y de cuarentena..... | 15 |
| 3.2. Medidas pre-plantación..... | 16 |
| 3.2.1. Métodos culturales | 16 |
| 3.2.2. Inundación del terreno | 17 |
| 3.2.3. Desinfección por vapor de agua o agua a elevada temperatura..... | 18 |
| 3.2.4. Solarización del suelo..... | 18 |
| 3.2.5. Biofumigación y enmiendas orgánicas | 19 |
| 3.2.6. Control químico con nematicidas fumigantes..... | 20 |
| 3.2.7. Control químico con nematicidas no-fumigantes..... | 21 |
| 3.2.8. Control químico con extractos vegetales y aceites esenciales..... | 21 |
| 3.2.9. Resistencia | 22 |
| 3.2.10. Control biológico | 23 |
| 3.2.10.1. Rizobacterias..... | 25 |
| 3.2.10.2. <i>Pasteuria penetrans</i> | 28 |
| 3.2.10.3. Hongos antagonistas de nemátodos | 29 |
| 3.2.10.4. Hongos formadores de micorrizas arbusculares (AMF)..... | 33 |
| 3.2.10.5. Interacciones entre microorganismos edáficos | 35 |
| 3.3. Medidas post-plantación..... | 36 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3.1. Fertilización y nutrición vegetal | 37 |
| 3.3.2. Aplicación de nematicidas durante el cultivo | 37 |
| Justificación del trabajo | 39 |
| Objetivos | 43 |
| Material y métodos general | 47 |
| 1. Técnicas nematológicas básicas..... | 49 |
| 1.1. Extracción de nemátodos del suelo..... | 49 |
| 1.1.1. Homogenización del suelo..... | 49 |
| 1.1.2. Método de las bandejas de Whitehead..... | 49 |
| 1.1.3. Método de tamizado, decantación y centrifugación..... | 50 |
| 1.2. Estimación del índice de agallas en las raíces..... | 52 |
| 1.3. Extracción de nemátodos de las raíces | 53 |
| 2. Análisis estadísticos | 53 |
| Capítulo I. Evaluación de la incidencia de las enfermedades causadas por <i>Meloidogyne</i> en cultivos hortícolas protegidos de Almería..... | 55 |
| 1. Material y métodos..... | 57 |
| 1.1. Encuesta sobre percepción de la incidencia de <i>Meloidogyne</i> spp. en los cultivos hortícolas protegidos de Almería | 57 |
| 1.2. Muestreo nematológico en los cultivos hortícolas protegidos de Almería..... | 60 |
| 1.3. Análisis estadísticos..... | 61 |
| 2. Resultados..... | 62 |
| 2.1. Encuesta sobre percepción de la incidencia de <i>Meloidogyne</i> spp. en los cultivos hortícolas protegidos de Almería | 62 |
| 2.2. Muestreo nematológico en los cultivos hortícolas protegidos de Almería..... | 65 |
| 3. Discusión | 70 |

Capítulo II. Determinación del efecto del uso combinado de AMFs y agentes antagonistas de nemátodos en el patosistema Tomate-*Meloidogyne incognita*.....75

| | |
|--|----|
| 1. Material y Métodos..... | 77 |
| 1.1. Diseño experimental..... | 77 |
| 1.1.1. Ensayo 1. Efectos de la micorrización e inoculación con bacterias..... | 78 |
| 1.1.2. Ensayo 2. Efectos de la micorrización e inoculación con <i>T. harzianum</i> | 79 |
| 1.1.3. Ensayo 3. Efectos de la micorrización y aplicación al suelo de extractos vegetales y aceites esenciales | 81 |
| 1.2. Material utilizado..... | 82 |
| 1.2.1. Material Vegetal | 82 |
| 1.2.2. Contenedores..... | 83 |
| 1.2.3. Sustratos y suelos..... | 84 |
| 1.2.4. Inóculos de hongos formadores de micorrizas arbusculares (AMF)..... | 84 |
| 1.2.5. Inóculos de rizobacterias (PGPR) | 85 |
| 1.2.6. Inóculo de <i>Pasteuria penetrans</i> | 85 |
| 1.2.7. Inóculo de <i>Trichoderma harzianum</i> | 86 |
| 1.2.8. Extractos vegetales y Aceites esenciales..... | 86 |
| 1.2.9. Inóculo de nemátodos fitoparásitos (<i>Meloidogyne incognita</i>)..... | 87 |
| 1.3. Desarrollo de los ensayos | 88 |
| 1.4. Recogida de datos | 91 |
| 1.4.1. Medición del contenido en clorofila de las hojas..... | 91 |
| 1.4.2. Medición de la temperatura de la cubierta vegetal..... | 92 |
| 1.4.3. Biomasa..... | 93 |
| 1.4.4. Micorrización | 93 |
| 1.4.5. Índice de agallas..... | 95 |
| 1.4.6. Densidades de nemátodos en raíces | 95 |
| 1.4.7. Densidades de nemátodos en suelo..... | 96 |
| 1.4.8. Índice de eficacia Abbott | 97 |
| 1.5. Análisis estadísticos..... | 97 |
| 2. Resultados..... | 98 |

| | |
|---|-----|
| 2.1. Ensayo 1. Efectos de la micorrización e inoculación con bacterias sobre el patosistema Tomate- <i>M. incognita</i> | 98 |
| 2.1.1. Ensayos en tomate cv. Durinta | 98 |
| 2.1.2. Ensayos en tomate cv. Josefina..... | 112 |
| 2.2. Ensayo 2. Efectos de la micorrización e inoculación con <i>T. harzianum</i> sobre el patosistema Tomate- <i>M. incognita</i> | 127 |
| 2.2.1. Ensayos en tomate cv. Durinta | 127 |
| 2.2.2. Ensayos en tomate cv. Josefina..... | 137 |
| 2.3. Ensayo 3. Efectos de la micorrización y aplicación al suelo de extractos vegetales y aceites esenciales sobre el patosistema Tomate- <i>M. incognita</i> | 148 |
| 2.3.1. Ensayos en tomate cv. Durinta | 148 |
| 2.3.2. Ensayos en tomate cv. Josefina..... | 166 |
| 3. Discusión | 184 |
| 3.1. Ensayo 1. Efectos de la micorrización e inoculación con bacterias sobre el patosistema Tomate- <i>M. incognita</i> | 184 |
| 3.1.1. Efectos sobre el crecimiento y la productividad vegetal..... | 185 |
| 3.1.1.1. Efectos de los nemátodos..... | 185 |
| 3.1.1.2. Efectos de los AMFs..... | 186 |
| 3.1.1.3. Efectos de las bacterias | 187 |
| 3.1.1.4. Efectos de la interacción AMF × Bacterias..... | 189 |
| 3.1.2. Efectos sobre la micorrización..... | 191 |
| 3.1.2.1. Efectos de los nemátodos..... | 192 |
| 3.1.2.2. Efectos de los AMFs..... | 192 |
| 3.1.2.3. Efectos de las bacterias | 193 |
| 3.1.3. Efectos sobre la población de nemátodos..... | 194 |
| 3.1.3.1. Efectos de los AMFs..... | 194 |
| 3.1.3.2. Efectos de las bacterias | 195 |
| 3.1.3.3. Efectos de la interacción AMF × Bacterias | 198 |
| 3.2. Ensayo 2. Efectos de la micorrización e inoculación con <i>T. harzianum</i> sobre el patosistema Tomate- <i>M. incognita</i> | 199 |
| 3.2.1. Efectos sobre el crecimiento y la productividad vegetal..... | 200 |
| 3.2.1.1. Efectos de los nemátodos..... | 201 |

| | |
|---|-----|
| 3.2.1.2. Efectos de los AMFs..... | 202 |
| 3.2.1.3. Efectos del hongo <i>T. harzianum</i> | 202 |
| 3.2.1.4. Efectos de la interacción AMF × <i>T. harzianum</i> | 203 |
| 3.2.2. Efectos sobre la micorrización..... | 204 |
| 3.2.2.1. Efectos de los nemátodos..... | 204 |
| 3.2.2.2. Efectos de los AMFs..... | 205 |
| 3.2.2.3. Efectos del hongo <i>T. harzianum</i> | 205 |
| 3.2.3. Efectos sobre la población de nemátodos..... | 206 |
| 3.2.3.1. Efectos de los AMFs..... | 207 |
| 3.2.3.2. Efectos del hongo <i>T. harzianum</i> | 207 |
| 3.2.3.3. Efectos de la interacción AMF × <i>T. harzianum</i> | 209 |
| 3.3. Ensayo 3. Efectos de la micorrización y aplicación al suelo de extractos vegetales y aceites esenciales sobre el patosistema Tomate- <i>M. incognita</i> | 211 |
| 3.3.1. Efectos sobre el crecimiento y la productividad vegetal..... | 212 |
| 3.3.1.1. Efectos de los nemátodos..... | 213 |
| 3.3.1.2. Efectos de los AMFs..... | 213 |
| 3.3.1.3. Efectos de los extractos vegetales y los aceites esenciales | 214 |
| 3.3.1.4. Efectos de la interacción AMF × Extractos vegetales y aceites esenciales..... | 215 |
| 3.3.2. Efectos sobre la micorrización..... | 215 |
| 3.3.2.1. Efectos de los nemátodos..... | 215 |
| 3.3.2.2. Efectos de los AMFs..... | 216 |
| 3.3.2.3. Efectos de los extractos vegetales y los aceites esenciales | 216 |
| 3.3.2.4. Efectos de la interacción AMF × Extractos vegetales y aceites esenciales..... | 217 |
| 3.3.3. Efectos sobre la población de nemátodos..... | 217 |
| 3.3.3.1. Efectos de los AMFs..... | 218 |
| 3.3.3.2. Efectos de los extractos vegetales y los aceites esenciales | 219 |
| 3.3.3.3. Efectos de la interacción AMF × Extractos vegetales y aceites esenciales..... | 221 |
| 3.4. Discusión general sobre los efectos de la inoculación con <i>M. incognita</i> | 225 |

| | |
|---|-----|
| 3.4.1. Efectos sobre el crecimiento y productividad vegetal del tomate en los tres ensayos..... | 225 |
| 3.4.2. Efectos sobre las variables de micorrización en los tres ensayos..... | 225 |
| 3.5. Discusión general sobre el efecto de la micorrización | 226 |
| 3.5.1. Efectos sobre el crecimiento y productividad vegetal del tomate en los tres ensayos..... | 226 |
| 3.5.2. Efectos sobre las poblaciones de <i>M. incognita</i> en los tres ensayos | 226 |

Capítulo III. Evaluación del uso combinado de la solarización y la aplicación al suelo de gallinaza para el control de *M. incognita* en cultivos de clavel protegidos bajo plásticos227

| | |
|---|-----|
| 1. Material y Métodos..... | 229 |
| 1.1. Localización del estudio..... | 229 |
| 1.2. Inoculación del suelo con <i>M. incognita</i> | 230 |
| 1.3. Diseño experimental..... | 231 |
| 1.4. Aplicación de los tratamientos al suelo..... | 233 |
| 1.4.1. Aplicaciones de gallinaza fresca o peletizada..... | 233 |
| 1.4.2. Aplicación de Telopic c-35 EC ®..... | 234 |
| 1.5. Manejo del cultivo..... | 235 |
| 1.6. Valoración de la incidencia y severidad de la enfermedad, infestaciones y productividad del clavel..... | 235 |
| 1.7. Valoración de las densidades de población de nemátodos en suelo | 236 |
| 1.8. Análisis estadísticos..... | 237 |
| 2. Resultados..... | 238 |
| 2.1. Efecto de los tratamientos del suelo sobre la incidencia y severidad de la enfermedad, infestaciones y producciones de clavel..... | 238 |
| 2.1.1. Experimento 1 (2005-2006)..... | 240 |
| 2.1.2. Experimento 2 (2007-2008)..... | 240 |
| 2.1.3. Experimento 3 (2009-2010)..... | 241 |
| 2.2. Efecto de los tratamientos del suelo sobre las densidades de población de <i>Meloidogyne</i> en suelo..... | 241 |
| 2.2.1. Experimento 1 (2005-2006)..... | 242 |
| 2.2.2. Experimento 2 (2007-2008)..... | 243 |

| | |
|--|------------|
| 2.2.3. Experimento 3 (2009-2010) | 243 |
| 2.3. Correlación de densidades de población de nemátodos en suelo, incidencia de la enfermedad y producciones de clavel..... | 243 |
| 3. Discusión | 245 |
| Conclusiones..... | 249 |
| Bibliografía | 253 |

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Superficie cultivada, rendimiento, producción, precio percibido por el agricultor y valor económico en origen de los principales cultivos hortícolas protegidos en el sudeste andaluz.....6

Tabla 2. Principales géneros de nemátodos fitoparásitos en España. Síntomas y cultivos .12

Tabla 3. Productos basados en extractos vegetales en los que se indica algún efecto frente a nemátodos fitoparásitos.....22

Tabla 4. Efectos de diversas rizobacterias sobre enfermedades causadas por *Meloidogyne* spp.....27

Tabla 5. Efectos de diversos hongos del suelo sobre enfermedades causadas por *Meloidogyne* spp.30

Tabla 6. Efectos de diversas especies de AMF sobre enfermedades causadas por *Meloidogyne* spp.34

Tabla 7. Efectos de interacciones entre AMF, hongos antagonistas y bacterias del suelo sobre las enfermedades causadas por *Meloidogyne* spp.36

Tabla 8. Nematicidas permitidos en España durante el cultivo.....37

CAPÍTULO I: Evaluación de la incidencia de las enfermedades causadas por *Meloidogyne* en cultivos hortícolas protegidos de Almería.

Tabla 9. Percepción por los técnicos agrícolas del impacto de las enfermedades inducidas por nemátodos en el área hortícola de Almería, España.....63

Tabla 10. Distribución geográfica de muestras de nemátodos agalladores, cultivo hospedador, tratamientos del suelo y densidades de población en raíces y suelo.66

CAPÍTULO II: Determinación del efecto del uso combinado de AMFs y agentes antagonistas de nemátodos en el patosistema tomate-*Meloidogyne incognita*.

Tabla 11. Tratamientos ensayados para el estudio de la interacción AMF-bacterias en el patosistema Tomate-*M. incognita*.79

Tabla 12. Tratamientos ensayados para el estudio de la interacción AMF-*Trichoderma* en el patosistema Tomate-*M. incognita*.80

| | |
|--|-----|
| Tabla 13. Tratamientos ensayados para el estudio de la interacción AMF-extractos vegetales en el patosistema Tomate- <i>M. incognita</i> | 82 |
| Tabla 14. Densidades de inóculo empleadas por maceta con 500 cm ³ de suelo en los ensayos sobre interacciones AMF-agentes antagonistas de nemátodos en el patosistema Tomate- <i>M. incognita</i> | 88 |
| Tabla 15. Significación estadística del ANOVA multifactorial o los test de Kruskal-Wallis en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Durinta- <i>M. incognita</i> | 99 |
| Tabla 16. Valores de crecimiento vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Durinta- <i>M. incognita</i> | 100 |
| Tabla 17. Valores de productividad vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Durinta- <i>M. incognita</i> | 104 |
| Tabla 18. Valores medios de variables relacionadas con la micorrización en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Durinta- <i>M. incognita</i> | 107 |
| Tabla 19. Significación estadística del ANOVA multifactorial o los test de Kruskal-Wallis en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Josefina- <i>M. incognita</i> | 113 |
| Tabla 20. Valores de crecimiento vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Josefina- <i>M. incognita</i> | 114 |
| Tabla 21. Valores de productividad vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Josefina- <i>M. incognita</i> | 118 |
| Tabla 22. Valores medios de variables relacionadas con la micorrización en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Josefina- <i>M. incognita</i> | 120 |
| Tabla 23. Significación estadística del ANOVA multifactorial o los test de Kruskal-Wallis en el ensayo para el estudio de la interacción AMF- <i>T. harzianum</i> en el patosistema Tomate cv. Durinta- <i>M. incognita</i> | 128 |
| Tabla 24. Valores de crecimiento vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF- <i>T. harzianum</i> en el patosistema Tomate cv. Durinta- <i>M. incognita</i> | 129 |
| Tabla 25. Valores de productividad vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF- <i>T. harzianum</i> en el patosistema Tomate cv. Durinta- <i>M. incognita</i> | 131 |
| Tabla 26. Valores medios de variables relacionadas con la micorrización en el ensayo para el estudio de la interacción AMF- <i>T. harzianum</i> en el patosistema Tomate cv. Durinta- <i>M. incognita</i> | 134 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 27. Significación estadística del ANOVA multifactorial o los test de Kruskal-Wallis en el ensayo para el estudio de la interacción AMF- <i>T. harzianum</i> en el patosistema Tomate cv. Josefina- <i>M. incognita</i> | 138 |
| Tabla 28. Valores de crecimiento vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF- <i>T. harzianum</i> en el patosistema Tomate cv. Josefina- <i>M. incognita</i> | 139 |
| Tabla 29. Valores de productividad vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF- <i>T. harzianum</i> en el patosistema Tomate cv. Josefina- <i>M. incognita</i> | 141 |
| Tabla 30. Valores medios de variables relacionadas con la micorrización en el ensayo para el estudio de la interacción AMF- <i>T. harzianum</i> en el patosistema Tomate cv. Josefina- <i>M. incognita</i> | 143 |
| Tabla 31. Significación estadística del ANOVA multifactorial o los test de Kruskal-Wallis en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Durinta- <i>M. incognita</i> | 149 |
| Tabla 32. Valores de crecimiento vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Durinta- <i>M. incognita</i> | 150 |
| Tabla 33. Valores de productividad vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Durinta- <i>M. incognita</i> | 154 |
| Tabla 34. Valores medios de variables relacionadas con la micorrización en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Durinta- <i>M. incognita</i> | 157 |
| Tabla 35. Significación estadística del ANOVA multifactorial o los test de Kruskal-Wallis en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Josefina- <i>M. incognita</i> | 167 |
| Tabla 36. Valores de crecimiento vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Josefina- <i>M. incognita</i> | 168 |
| Tabla 37. Valores de productividad vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Josefina- <i>M. incognita</i> | 171 |
| Tabla 38. Valores medios de variables relacionadas con la micorrización en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Josefina- <i>M. incognita</i> | 174 |

CAPÍTULO III: Evaluación del uso combinado de la solarización y la aplicación al suelo de gallinaza para el control de *M. incognita* en cultivos de clavel protegidos bajo plásticos.

Tabla 39. Tratamientos aplicados al suelo en una finca infestada por *M. incognita*, antes de la plantación de clavel cv. Pícaro, con indicación de las dosis aplicadas, fechas de plantación y periodos de cosecha..... 232

Tabla 40. Incidencia de la enfermedad, severidad y producción de clavel cv. Pícaro cultivado en un campo infestado por *M. incognita*..... 239

Tabla 41. Densidades de población de *M. incognita* en suelo en diferentes momentos durante los ciclos del clavel cv. Pícaro en tres experimentos. 242

Tabla 42. Coeficientes de correlación lineal entre las densidades de población de *M. incognita* en suelo, incidencia y severidad de la enfermedad producida por los nemátodos agalladores y productividades del clavel cv. Pícaro. 244

FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Área de producción de cultivos hortícolas protegidos de la costa de Almería.4

Figura 2. Estructura del enarenado almeriense.5

Figura 3. Síntomas causados por *Meloidogyne* spp. en raíces de tomate (a) y cultivo de clavel (b).11

MATERIAL Y MÉTODOS GENERAL

Figura 4. Tubos de centrífuga con suspensiones de suelo (a). Centrífuga (b).....51

Figura 5. Índice de agallas de Bridge y Page.....52

CAPÍTULO I: Evaluación de la incidencia de las enfermedades causadas por *Meloidogyne* en cultivos hortícolas protegidos de Almería

Figura 6. Comarcas agrarias hortícolas de la costa de Almería.....57

Figura 7. Cuestionario sobre incidencia de nemátodos fitoparásitos en cultivos hortícolas protegidos de Almería.58

Figura 8. Distribución de las especies de *Meloidogyne* en 54 invernaderos de cultivos hortícolas protegidos (Levante y Poniente) en Almería...65

CAPÍTULO II: Determinación del efecto del uso combinado de AMFs y agentes antagonistas de nemátodos en el patosistema tomate-*Meloidogyne incognita*

| | |
|--|-----|
| Figura 9. Bandeja de germinación de poliestireno..... | 83 |
| Figura 10. Macetas termoformadas de polipropileno..... | 83 |
| Figura 11. Invernadero donde se realizaron los ensayos..... | 88 |
| Figura 12. Disposición de macetas en el invernadero (a) inicio ensayo; (b) mitad ensayo | 89 |
| Figura 13. Medidor SPAD..... | 92 |
| Figura 14. Termómetro de infrarrojos..... | 92 |
| Figura 15. Diferencias en la longitud de la planta entre distintos tratamientos..... | 93 |
| Figura 16. Fragmento de raíz micorrizada (a) y detalle de las estructuras características de los AMFs (arbúsculos) (b)..... | 95 |
| Figura 17. Sistema radicular afectado. | 95 |
| Figura 18. Extracción de nemátodos del suelo. | 96 |
| Figura 19. Valores medios de los índices de agallas en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Durinta- <i>M. incognita</i> | 109 |
| Figura 20. Valores medios de la densidad final de nemátodos por maceta en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Durinta- <i>M. incognita</i> | 110 |
| Figura 21. Valores medios del número de hembras de <i>M. incognita</i> por maceta en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Durinta- <i>M. incognita</i> | 111 |
| Figura 22. Valores medios de eficacia Abbott en la reducción del número de nemátodos en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Durinta- <i>M. incognita</i> | 111 |
| Figura 23. Valores medios de los índices de agallas en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Josefina- <i>M. incognita</i> | 121 |
| Figura 24. Valores medios de la densidad final de nemátodos por maceta en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Josefina- <i>M. incognita</i> , año 1º..... | 122 |

| | |
|--|-----|
| Figura 25. Valores medios de la densidad final de nemátodos por maceta en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Josefina- <i>M. incognita</i> , año 2° | 123 |
| Figura 26. Valores medios del número de hembras de <i>M. incognita</i> por maceta en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Josefina- <i>M. incognita</i> | 124 |
| Figura 27. Valores medios de eficacia Abbott en la reducción del número de nemátodos en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Josefina- <i>M. incognita</i> , año1° | 125 |
| Figura 28. Valores medios de eficacia Abbott en la reducción del número de nemátodos en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Josefina- <i>M. incognita</i> , año2° | 126 |
| Figura 29. Valores medios de los índices de agallas en el ensayo para el estudio de la interacción AMF- <i>T. harzianum</i> en el patosistema Tomate cv. Durinta- <i>M. incognita</i> | 135 |
| Figura 30. Valores medios de la densidad final de nemátodos por maceta en el ensayo para el estudio de la interacción AMF- <i>T. harzianum</i> en el patosistema Tomate cv. Durinta- <i>M. incognita</i> | 136 |
| Figura 31. Valores medios del número de hembras de <i>M. incognita</i> por maceta en el ensayo para el estudio de la interacción AMF- <i>T. harzianum</i> en el patosistema Tomate cv. Durinta- <i>M. incognita</i> | 136 |
| Figura 32. Valores medios de eficacia Abbott en la reducción del número de nemátodos en el ensayo para el estudio de la interacción AMF- <i>T. harzianum</i> en el patosistema Tomate cv. Durinta- <i>M. incognita</i> | 137 |
| Figura 33. Valores medios de los índices de agallas en el ensayo para el estudio de la interacción AMF- <i>T. harzianum</i> en el patosistema Tomate cv. Josefina- <i>M. incognita</i> | 144 |
| Figura 34. Valores medios de la densidad final de nemátodos por maceta en el ensayo para el estudio de la interacción AMF- <i>T. harzianum</i> en el patosistema Tomate cv. Josefina- <i>M. incognita</i> | 145 |
| Figura 35. Valores medios del número de hembras de <i>M. incognita</i> por maceta en el ensayo para el estudio de la interacción AMF- <i>T. harzianum</i> en el patosistema Tomate cv. Josefina- <i>M. incognita</i> | 146 |
| Figura 36. Valores medios de eficacia Abbott en la reducción del número de nemátodos en el ensayo para el estudio de la interacción AMF- <i>T. harzianum</i> en el patosistema Tomate cv. Josefina- <i>M. incognita</i> | 147 |
| Figura 37. Valores medios de los índices de agallas en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Durinta- <i>M. incognita</i> | 159 |

Figura 38. Valores medios de la densidad final de nemátodos por maceta en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita*. 161

Figura 39. Valores medios del número de hembras de *M. incognita* por maceta en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita*. 163

Figura 40. Valores medios de eficacia Abbott en la reducción del número de nemátodos en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita*. 165

Figura 41. Valores medios de los índices de agallas en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Josefina-*M. incognita*. 176

Figura 42. Valores medios de la densidad final de nemátodos por maceta en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Josefina-*M. incognita*. 178

Figura 43. Valores medios del número de hembras de *M. incognita* por maceta en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Josefina-*M. incognita*. 180

Figura 44. Valores medios de eficacia Abbott en la reducción del número de nemátodos en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Josefina-*M. incognita*. 182

CAPÍTULO III: Evaluación del uso combinado de la solarización y la aplicación al suelo de gallinaza para el control de *M. incognita* en cultivos de clavel protegidos bajo plásticos.

Figura 45. Localización del invernadero utilizado en los ensayos. 229

Figura 46. Inoculación del suelo con *M. incognita*. 231

Figura 47. Aplicación de gallinaza al suelo. 233

Figura 48. Aplicación de Telopic c-35 EC®. 234

Figura 49. Manejo del cultivo. 235

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

| | |
|------------------------|---|
| % | Porcentaje |
| <i>A. indica</i> | <i>Azadirachta indica</i> |
| A. Juss. | Adrien-Henri de Jussieu |
| AMF | Hongo formador de micorrizas arbusculares |
| ANOVA | Análisis de la varianza |
| arcsen | Arcoseno |
| <i>A. sativum</i> | <i>Allium sativum</i> |
| atm | Atmósfera |
| <i>B. megaterium</i> | <i>Bacillus megaterium</i> |
| °C | Grados Celsius |
| © | Copyright |
| cm | Centímetro |
| cm ³ | Centímetro cúbico |
| CRBD | Diseño de bloques completamente al azar |
| dS/m | deciSiemens por metro |
| e.g. | <i>exempli gratia</i> |
| F% | Frecuencia de micorrización |
| g | Gramo |
| g | Aceleración de la gravedad |
| GFLV | Virus del entrenudo corto |
| <i>G. intraradices</i> | <i>Glomus intraradices</i> |
| <i>G. mosseae</i> | <i>Glomus mosseae</i> |
| GPS | Sistema de posicionamiento global |
| h | Hora |

| | |
|---------------------|---|
| ha | Hectárea |
| HCl | Ácido clorhídrico |
| J2 | Juvenil de segundo estadio |
| J3 | Juvenil de tercer estadio |
| J4 | Juvenil de cuarto estadio |
| Kg | Kilogramo |
| KOH | Hidróxido de potasio |
| KW | Kruskal-Wallis |
| l | Litro |
| L. | Carlos Linneo |
| Log | Logaritmo |
| LSD | Mínima diferencia significativa |
| m | Metro |
| M% | Intensidad de micorrización |
| m% | Intensidad de la colonización media por fragmento |
| m ² | Metro cuadrado |
| min | Minuto |
| ml | mililitro |
| mm | milímetro |
| µm | micrómetro |
| <i>M. arenaria</i> | <i>Meloidogyne arenaria</i> |
| MgSO ₄ | Sulfato de magnesio |
| <i>M. incognita</i> | <i>Meloidogyne incognita</i> |
| <i>M. javanica</i> | <i>Meloidogyne javanica</i> |
| N | Normalidad |

| | |
|--------------------------|---|
| N | Norte (North) |
| NaOCl | Hipoclorito sódico |
| NB | Nutrient Broth |
| nm | nanómetro |
| ns | No significativo |
| OD | Densidad óptica |
| p | Nivel de significación |
| <i>P. chlamydosporia</i> | <i>Pochonia chlamydosporia</i> |
| PEBD | Polietileno de baja densidad |
| PGPR | Rizobacteria promotora del crecimiento vegetal |
| <i>P. lilacinus</i> | <i>Paecilomyces lilacinus</i> |
| <i>P. penetrans</i> | <i>Pasteuria penetrans</i> |
| <i>P. putida</i> | <i>Pseudomonas putida</i> |
| ® | Marca registrada |
| RLCC | Contenido relativo de clorofila en hoja |
| r.p.m. | Revoluciones por minuto |
| <i>T. harzianum</i> | <i>Trichoderma harzianum</i> |
| <i>T. zygis</i> | <i>Thymus zygis</i> |
| <i>Q. amara</i> | <i>Quassia amara</i> |
| SCAR-PCR | Región amplificada de secuencia caracterizada-Reacción en cadena de la polimerasa |
| sp. | Especie |
| spp. | Especies |
| stAUDPC | Área estandarizada bajo la curva de progreso de la enfermedad |
| ufc | Unidad formadora de colonias |

VIF Film virtualmente impermeable

W Oeste (West)

PRÓLOGO

Esta memoria expone los trabajos realizados por la doctoranda María Elena Flor Peregrín, durante cuatro años de estancia predoctoral en el centro IFAPA Camino de Purchil en Granada.

El IFAPA es un organismo público de investigación que tiene como objetivo contribuir a la modernización de los sectores agrario, pesquero y alimentario de Andalucía, así como a la mejora de su competitividad a través de la investigación, el desarrollo, la transferencia de tecnología y la formación. Estos objetivos generalistas muestran la clara orientación aplicada de la investigación que se lleva a cabo en el IFAPA. Como tal, el trabajo presentado en esta tesis no tiene una orientación básica hacia el avance en el conocimiento de la biología o ecología de los nemátodos fitoparásitos y, aunque estos aspectos se traten de forma colateral, nos hemos centrado, en consonancia con los objetivos de la institución, en los aspectos aplicados de la interacción entre nemátodos fitoparásitos y cultivos en los ecosistemas agrícolas, con el propósito de mejorar las herramientas que el agricultor tiene disponibles para el manejo de las enfermedades causadas por nemátodos fitoparásitos y, en su caso, proporcionarle nuevos métodos o estrategias de control.

Durante esta etapa predoctoral, hemos pretendido, además de realizar una labor investigadora, formar a la candidata en todas las tareas a las que una nematóloga debe enfrentarse en un centro en el que se combina tanto la investigación aplicada, como la extensión agraria. Es por ello que, aunque el tema de investigación de esta tesis doctoral se centró en el estudio de la combinación e interacción entre diversos agentes biológicos y productos naturales para el manejo de las enfermedades causadas por nemátodos del género *Meloidogyne* en hortícolas, también se han llevado a cabo otros trabajos que han permitido a la doctoranda aprender metodologías usadas en la investigación nematológica. Esta formación se ha estructurado en tres niveles:

- a) LABORATORIO. Mediante la práctica de las técnicas usadas rutinariamente en el laboratorio nematológico, como la extracción de nemátodos de suelo y muestras vegetales, su identificación y recuento al microscopio; y el uso de herramientas ofimáticas y de análisis estadístico para el tratamiento de los datos y elaboración y presentación de los resultados.

- b) INVERNADERO. Mediante la realización de ensayos en macetas dentro de un invernadero con condiciones ambientales controladas y la práctica en técnicas de diseño experimental y mantenimiento de cultivos en maceta.
- c) CAMPO. Mediante la realización de ensayos en microparcelas situadas en campo, en fincas experimentales y la práctica en técnicas de diseño experimental y mantenimiento de cultivos en campo.

Con la intención de facilitar su lectura e interpretación, los apartados de material y métodos, resultados y discusión de esta tesis doctoral se presentan agrupados por capítulos independientes, acordes con los tipos de ensayos realizados:

1. Un estudio socio-económico y epidemiológico sobre la incidencia de las enfermedades causadas por *Meloidogyne* en los cultivos hortícolas protegidos de Almería, realizado en colaboración con el grupo de Economía Agraria del IFAPA Camino de Purchil y cuyo componente principal son los trabajos realizados en gabinete y laboratorio. Publicado en *Nematology* 14: 517-527 (2012), factor de impacto SCI 2010: 0,962.
2. Un estudio sobre el efecto de la micorrización en combinación con determinados agentes biológicos y productos naturales sobre las poblaciones de *Meloidogyne incognita* y sobre la productividad vegetal en tomate, basado en tres ensayos con macetas en invernadero en condiciones controladas.
 - 2.1. Efectos de la micorrización e inoculación con rizobacterias sobre el patosistema tomate-*M. incognita*.
 - 2.2. Efectos de la micorrización e inoculación con *Trichoderma harzianum* sobre el patosistema tomate-*M. incognita*.
 - 2.3. Efectos de la micorrización y aplicación al suelo de extractos vegetales y aceites esenciales sobre el patosistema tomate-*M. incognita*.
3. Un estudio sobre el efecto del uso combinado de la solarización y la aplicación al suelo de gallinaza para el control de *M. incognita* en cultivos de clavel protegidos bajo plásticos, basado en ensayos en campo. Publicado en *Plant Disease* 96: 990-996 (2012), factor de impacto SCI 2010: 2,387.

RESUMEN

Andalucía, en el sur de España, es la comunidad autónoma que más aporta a la horticultura nacional, tanto en superficie dedicada (128.021 ha) como en producciones obtenidas, destacando los horticolas protegidos en las provincias de Almería y Granada, la producción de fresón en la provincia de Huelva y el cultivo de flor cortada en Cádiz. La productividad agrícola, competitividad y rentabilidad económica de estos cultivos horticolas bajo plásticos está ampliamente demostrada; sin embargo, la intensificación y la especialización en un reducido número de cultivos de alto valor económico, ha favorecido el aumento en la incidencia y abundancia de plagas y enfermedades que les afectan. En concreto, la extensión de los problemas causados por nemátodos fitoparásitos en España ha coincidido con la intensificación de la agricultura y el desarrollo de los cultivos protegidos.

Los nemátodos “formadores de agallas en raíces” o especies del género *Meloidogyne* son los nemátodos parásitos de plantas que más limitan la producción hortícola. En España, las pérdidas causadas por nemátodos fitoparásitos en horticolas han sido estimadas en torno al 12,0%, pero en el caso de *Meloidogyne* spp. varían entre el 15,0% y el 60,0% de la cosecha, siendo *M. incognita* la especie que causa pérdidas económicas más importantes.

Tradicionalmente, el control de estos patógenos se ha realizado mediante el uso de fumigantes químicos del suelo, como el bromuro de metilo y el 1,3-dicloropropeno. Sin embargo debido a los riesgos ambientales y sanitarios derivados de su aplicación, su utilización se ha prohibido o restringido en los países europeos, limitando el número de alternativas viables para la desinfección del suelo. Durante los últimos años, se han realizado diversos esfuerzos en investigación hacia la búsqueda de otras alternativas de control nematológico, que sean más aceptables desde la perspectiva ambiental. No obstante, hasta el momento, ninguna de estas alternativas ha mostrado una efectividad comparable a la de los nematicidas fumigantes. Por tanto, la investigación, experimentación e integración de diferentes métodos de control de nemátodos fitoparásitos, adaptados a las condiciones agroambientales locales sigue siendo una prioridad en fitopatología.

El objetivo finalista de esta tesis es, por tanto, ampliar y mejorar las herramientas que el agricultor tiene disponibles para el manejo de las enfermedades causadas por nemátodos fitoparásitos, focalizándonos en el control biológico y en fitoquímicos naturales ya que estos métodos son susceptibles de ser incluidos en los sistemas de agricultura integrada y/o ecológica. Para conseguir esta finalidad, el trabajo se estructuró en tres secciones.

1. Se realizó un estudio sobre la percepción del impacto y la incidencia de la enfermedad causada por *Meloidogyne* en cultivos protegidos de la zona costera de la provincia de Almería.

Para ello se efectuó una encuesta entre 120 ingenieros técnicos agrícolas encargados del estado fitosanitario de las explotaciones, para conocer la importancia que los productores atribuyen a las enfermedades inducidas por nemátodos y la valoración que reciben los métodos actuales disponibles de control nematológico. Los resultados mostraron que un 17,7 % de las parcelas en la zona de Almería estaban infestadas por nemátodos agalladores, dentro de ellas un 18,8% de su superficie mostró síntomas de enfermedad causada por nemátodos, por lo que el área total cultivable infestada por *Meloidogyne* se estimó aproximadamente en un 2,0%. Las pérdidas de producción se valoraron en un 31,0% y se consideró que los problemas causados por *Meloidogyne* habían aumentado en los últimos 5 años. La fumigación química del suelo persiste como el tratamiento más frecuente (78,3%) y se valora también como el tratamiento más eficaz frente a la enfermedad causada por *Meloidogyne* spp.

Adicionalmente, se realizó un muestreo nematológico y posterior identificación de las especies de nemátodos agalladores en los cultivos del área y su distribución. La especie más abundante fue *M. javanica*, especialmente en áreas de cultivo de tomate, mientras que en áreas donde predominaban las rotaciones con pimiento la prevalencia de *M. incognita* fue mayor.

2. Se evaluó el potencial antagonista y/o el efecto protector frente a la enfermedad causada por *M. incognita* de *Glomus mosseae*, *Glomus intraradices*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas putida*, *Pasteuria penetrans*, *Trichoderma harzianum*, extractos vegetales de *Allium sativum* y *Quassia amara* y aceites esenciales de *Azadirachta indica* y *Thymus zygis*, frente a *Meloidogyne incognita*, en plantas de tomate cv. Durinta y cv. Josefina. Los ensayos se realizaron en invernadero bajo condiciones controladas, en el IFAPA Centro Camino de Purchil, Granada, entre los años 2007 y 2010.

Las plantas de tomate cv. Josefina mostraron mayor tolerancia que el cv. Durinta frente a la población ensayada de *M. incognita*, ya que redujeron en menor proporción su crecimiento y productividad vegetal.

La población final de nemátodos se vió reducida en las plantas micorrizadas frente a las no micorrizadas y en mayor proporción en las micorrizadas por *G. mosseae*.

La bacteria hiperparásita, *P. penetrans*, fue más eficaz que las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en la reducción de la enfermedad y de las densidades poblacionales de *M. incognita*. *B. megaterium* compensó el efecto negativo sobre el crecimiento vegetal causado por *M. incognita* y proporcionó un mayor efecto supresor sobre el nemátodo, en comparación con la bacteria rizosférica *P. putida*.

La inoculación con *T. harzianum*, y la aplicación de extractos vegetales y aceites esenciales, en tomate cv. Durinta, redujeron las variables relacionadas con la infestación por nemátodos; sin embargo, en el cv. Josefina únicamente redujeron la severidad de la enfermedad. De entre los cuatro fitoquímicos ensayados, el aceite procedente de *A. indica* se presentó como el tratamiento más efectivo en la reducción de la densidad final de nemátodos en plantas de tomate cv. Durinta, mientras que el cv. Josefina, el tratamiento más efectivo en la reducción de la densidad final de nemátodos fue el que combinó *G. mosseae* y extracto de *Q. amara*.

3. Se ensayó la efectividad del uso combinado de la solarización y la aplicación al suelo de gallinaza (sin tratar o peletizada), para el control de *M. incognita* en cultivos de clavel cv. Picaro bajo plástico en invernadero. Se realizaron tres ciclos de cultivo entre 2005 y 2010 en la zona de Chipiona, Cádiz. Entre los diferentes tratamientos aplicados al suelo se incluyeron 1,3-dicloropropeno+cloropicrina, solarización y gallinaza, o combinaciones de ellos. Tras nueve meses de cultivo, se estimaron las densidades de nemátodos en suelo, la incidencia y severidad de la enfermedad y la producción comercial de clavel.

La solarización del suelo aplicada individualmente no proporcionó suficiente control sobre el nemátodo agallador. La fumigación química del suelo, con 1,3-dicloropropeno+cloropicrina, fue el tratamiento más efectivo para reducir las densidades de nemátodos en suelo y para mantener bajos niveles en toda la estación de crecimiento. Aunque la combinación de la solarización del suelo y la gallinaza, sin tratar o peletizada, fue ligeramente menos efectiva en el control del patógeno, las producciones tras nueve meses de crecimiento fueron similares a aquellas obtenidas tras la fumigación química del suelo. Sin embargo, las parcelas tratadas con gallinaza mostraron limitaciones para el control de la enfermedad a largo plazo.

Mediante estos estudios hemos obtenido la percepción del impacto de los problemas nematológicos y la distribución de especies, en cultivos hortícolas protegidos en la zona almeriense, y se ha detectado un posible problema de desinformación que debe solventarse

con la investigación y transferencia de los resultados de esta. Asimismo, aunque han sido escasas las sinergias alcanzadas entre combinaciones de microorganismos y/o fitoquímicos, el efecto positivo logrado nos indica el beneficio de continuar estudiando estos métodos de control biológico e intentar buscar aplicaciones conjuntas de microorganismos y extractos vegetales cuya sinergia sea factible y beneficiosa. Además, se recomiendan las evaluaciones en microparcels para comprobar su efectividad en suelo. También podemos determinar que, la utilización de estiércol procedente de granjas avícolas, como método de control nematológico, requiere más estudios para conseguir una efectividad sostenible. Su eficiencia y los factores adicionales que suponen su bajo coste y la oportunidad de reciclaje de desechos procedentes de estas granjas, hacen atractiva su utilización y futuras investigaciones.

INTRODUCCIÓN

1. HORTICULTURA PROTEGIDA EN ANDALUCÍA

La agricultura ha tenido una importancia relevante en la sociedad andaluza durante siglos. Atendiendo a su uso, en el año 2009 las 8.737.052 ha del territorio andaluz se dividieron en tierras de cultivo (3.607.816 ha), prados y pastizales (1.109.023 ha), terrenos forestales (2.607.676 ha) y otras superficies (1.412.537 ha), lo que indica que el 41,29 % del territorio andaluz está dedicado a la producción agrícola en particular, sin incluir otros sectores productivos primarios como la ganadería o la silvicultura (Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, 2010).

De esta superficie, los grandes grupos de cultivos herbáceos tradicionales como cereales, leguminosas de grano, tubérculos, industriales y forrajeros ocupan la mayor extensión. No obstante, los cultivos hortícolas (hortalizas, flores y ornamentales), a pesar de ocupar tan sólo 128.021 ha, son los más rentables por unidad de superficie, llegando a suponer el 45,3 % de la producción vegetal agrícola en Andalucía durante el año 2009, con un valor nominal en torno a los 3.200 millones de euros (Analistas Económicos de Andalucía, 2009; Durán *et al.*, 2009). Esto es debido a que:

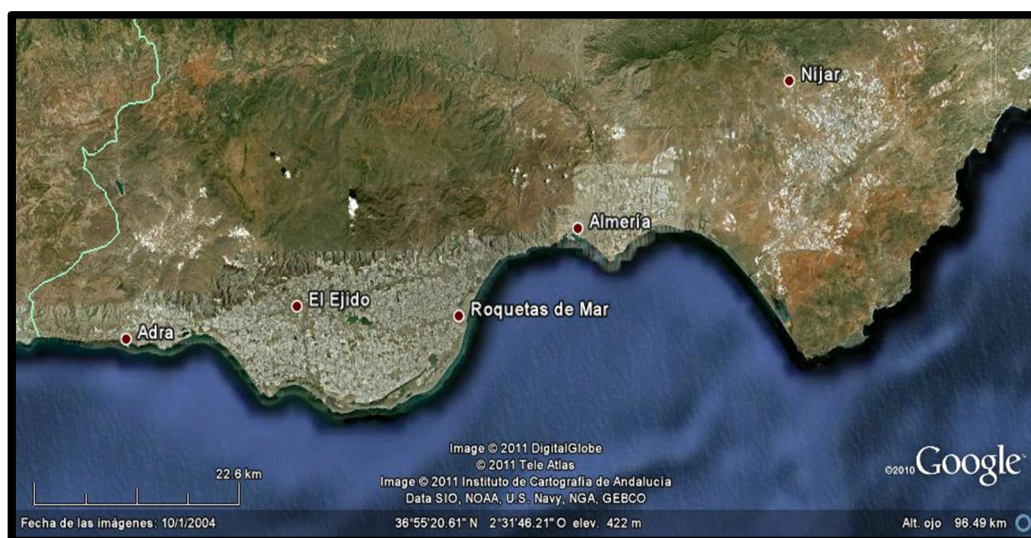
- a) Alcanzan rentabilidad incluso en superficies pequeñas.
- b) Pueden adaptarse a los sistemas de cultivo ecológico, integrado y convencional.
- c) Presentan ciclos de cultivo cortos, lo que permite realizar varias cosechas al año.
- d) El precio que alcanzan en el mercado se halla estrechamente relacionado con la precocidad de la cosecha.

Además, la implantación de innovaciones tecnológicas que permiten el desarrollo de cultivos hortícolas bajo protección (invernaderos), mitiga las limitaciones que el medio físico impone a la producción agrícola y ofrece la posibilidad de prolongar o extender la producción hacia épocas climatológicamente poco favorables, con el fin de atender la demanda continua del mercado (COTEC, 2009). El desarrollo de los materiales plásticos ha sido una de las causas determinantes de la gran expansión de los invernaderos de plástico a nivel mundial. La reducción de costes, en relación con los invernaderos tradicionales de vidrio, permite su uso en condiciones ventajosas de rentabilidad, en muchas áreas de clima mediterráneo durante la estación fría. En Europa, este desarrollo se localizó en las regiones mediterráneas costeras durante la segunda mitad del siglo XX, donde las suaves temperaturas invernales y la estabilidad del clima, derivada de la proximidad del mar, proporcionan unas condiciones muy favorables para el

establecimiento de cultivos de hortalizas de exigencias térmicas medias, cuyos límites podemos cifrar en temperaturas que oscilan entre 12° C (mínimas) y de 32° C (máximas) (Nisen *et al.*, 1988), principalmente tomate, pimiento, pepino, berenjena, judía verde, calabacín, fresón y flor cortada. Actualmente, el sudeste español acoge una de las mayores concentraciones de cultivos hortícolas protegidos bajo plásticos, siendo superada a escala mundial sólo por China y Japón (Castilla, 2007).

Andalucía es la comunidad autónoma que más aporta a la horticultura nacional, tanto en superficie dedicada como en producciones obtenidas, con 128.021 ha dedicadas a dichos cultivos (5.474 ha en secano; 68.133 ha en regadío al aire libre y 54.414 ha en cultivos protegidos), entre los que destacan las 42.000 ha de cultivos hortícolas protegidos en las provincias de Almería y Granada (Figura 1), las 6.500 ha dedicadas a la producción de fresa y fresón en la provincia de Huelva y las 290 ha dedicadas a flor cortada en Cádiz.

Figura 1. Área de producción de cultivos hortícolas protegidos de la costa de Almería.



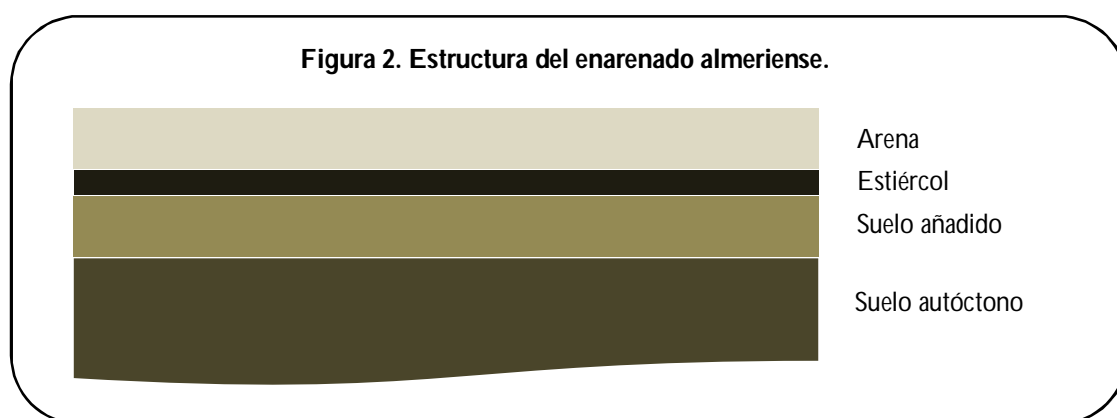
Fuente:(Google Earth ©, 2010)

1.1. HORTICULTURA PROTEGIDA EN EL SUDESTE ANDALUZ

El alto grado de innovación y productividad desarrollado en los últimos años, ha situado a la horticultura como principal sector agrícola de Andalucía y mayor exportador agrícola nacional. La producción total de hortalizas en el año 2009 fue de más de 9.103.100 t, de las cuales el 12% se exporta a países de la Unión Europea cada año. En concreto, en

las costas de las provincias de Almería y Granada se localiza la principal zona de producción hortícola intensiva de España con un valor de la producción comercializada superior a 2.500 millones de euros, (Analistas Económicos de Andalucía, 2009; Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, 2010). Este sistema productivo ha estado en uso por más de 40 años y ha contribuido, significativamente, a la prosperidad de la región. Por tanto, puede ser considerado como un sistema de referencia para el creciente número de zonas en las que se están implantando cultivos hortícolas intensivos protegidos bajo plásticos, tanto en áreas mediterráneas, como en América central y del sur.

Los cultivos protegidos de Almería y Granada se caracterizan por el uso de estructuras de bajo coste, con un reducido consumo de energía, un mínimo control del microclima dentro del invernadero, sistemas de riego localizado y suelos altamente modificados. Aproximadamente el 80% de los cultivos están establecidos sobre un sistema de enarenado, mientras que el 20% restante se encuentra sobre suelos naturales de la zona o sobre sustratos artificiales (Montero *et al.*, 2009). El "enarenado almeriense" consiste en una capa de suelo natural o importado de excavaciones próximas, de naturaleza franco-arcillosa de unos 20 cm de profundidad, sobre la que se incorpora un horizonte orgánico compuesto fundamentalmente de estiércol, a una dosis de 10 kg/m², del que parte se suele mezclar con el suelo y parte se deja sobre él, por último, se incorpora una capa de arena en la superficie de 8-10 cm de espesor (Figura 2).



En cuanto a los sistemas de producción agrícola, según el manejo que se haga del cultivo, principalmente en relación al uso de agroquímicos, actualmente se siguen tres sistemas (Agra-Ceas, 2002):

- a) *Convencional*. Se incide en la aplicación de agroquímicos y uso de la tecnología para el incremento de la productividad vegetal y el beneficio económico.
- b) *Integrado*. Sistema de producción tecnológicamente intensiva en el que se enfatiza por igual la productividad agrícola y la protección del medio ambiente.
- c) *Ecológico*. El uso de agroquímicos no está permitido. Se prioriza el uso sostenible de los recursos naturales.

Los principales cultivos en el área son solanáceas como el tomate, pimiento y berenjena; cucurbitáceas como el pepino, melón, sandía y calabacín; y leguminosas como la judía verde (Céspedes *et al.*, 2009). Datos de producciones y valor de cada cultivo en las provincias de Almería y Granada, durante la campaña 2009-2010, se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Superficie cultivada, rendimiento, producción, precio percibido por el agricultor y valor económico en origen de los principales cultivos hortícolas protegidos en el sudeste andaluz.

| Cultivo | Superficie cultivada (ha) | Rendimiento (kg/ha) | Producción total (Toneladas) | Precio (€/kg) | Valor económico (millones de €) |
|--------------------|---------------------------|---------------------|------------------------------|---------------|---------------------------------|
| Pimiento | 7.738 | 61.228 | 473.780 | 0,6999 | 331,60 |
| Tomate | 10.719 | 89.435 | 958.654 | 0,3240 | 310,60 |
| Pepino | 6.501 | 74.610 | 485.040 | 0,4239 | 205,61 |
| Calabacín | 4.759 | 54.241 | 258.134 | 0,4287 | 110,66 |
| Sandía | 4.501 | 75.095 | 338.001 | 0,2306 | 77,94 |
| Berenjena | 1.879 | 73.488 | 138.084 | 0,4984 | 68,82 |
| Melón | 4.177 | 38.802 | 162.074 | 0,3010 | 48,78 |
| Judía Verde | 1.173 | 16.965 | 19.900 | 1,3402 | 26,67 |

Campaña 2009-2010. Fuente: (Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, 2010)

En general, los cultivos se trasplantan al campo como plantones de seis a ocho semanas de edad, procedentes de viveros especializados, excepto en el caso de la judía verde que se siembra como semilla. Los ciclos de cultivo más comunes son:

- a) Un ciclo de primavera, en el que se realiza la siembra o trasplante en el periodo de diciembre a febrero y en el que se mantiene el cultivo hasta marzo-junio.
- b) Un ciclo de otoño-invierno, que comienza con el trasplante desde final de julio hasta septiembre y en el que se mantiene el cultivo hasta enero-marzo, aunque dependiendo de los precios obtenidos en el mercado, en algunos casos el cultivo, en particular de tomate, se puede prolongar hasta junio.

Aunque el monocultivo de tomate es común, en numerosas ocasiones, ambos ciclos de cultivo se combinan usando diferentes esquemas rotacionales, principalmente alternando solanáceas y cucurbitáceas (Meneses y Castilla, 2009).

La mayoría de las explotaciones reciben asesoramiento técnico por parte de personal cualificado (Ingenieros Técnicos Agrícolas), que son contratados por las cooperativas en las que los agricultores se asocian para comercializar los productos, aunque también existe una pequeña proporción de trabajadores autónomos que se dedican al asesoramiento técnico de las explotaciones de forma independiente. La mayoría de estos técnicos poseen formación universitaria en agronomía y se enfrentan al manejo y control de las plagas y enfermedades habituales en la zona diariamente, por lo que suponen una importante fuente de experiencia e información. Además, en el caso de la protección de cultivos, es también frecuente que el agricultor reciba información de los representantes comerciales de las distintas casas de fitosanitarios establecidas en la zona (Céspedes *et al.*, 2009).

Para paliar los efectos de plagas y enfermedades en los cultivos del sudeste peninsular se recurre principalmente al uso de fitosanitarios, aunque en los últimos cinco años el mercado del control biológico de plagas ha experimentado una fuerte expansión. Los productos más utilizados son los insecticidas (35,4%) y fungicidas (24,5%), siendo de especial interés el uso de nematicidas (15-20%), comparativamente mucho mayor que la media nacional, en la que el consumo de nematicidas no llega al 4-5%. La desinfección del suelo mediante el uso de agroquímicos fumigantes como el 1,3-dicloropropeno o metam-sodio es una práctica cultural generalizada en los monocultivos intensivos y, como tal, más del 80% de los agricultores de la zona que practican monocultivo de tomate reconoce su uso, bien anualmente o bien una vez cada dos o tres años (Céspedes *et al.*, 2009).

Aunque la productividad agrícola, competitividad y rentabilidad económica de los cultivos hortícolas bajo plásticos en el sudeste español está ampliamente documentada (Castilla, 2005), es también de sobra conocido que, la intensificación y el monocultivo o especialización en un reducido número de cultivos de alto valor económico, favorecen el aumento en la incidencia y abundancia de plagas y enfermedades que les afectan (Elad, 1999). En concreto, según Ornat *et al.*, (1999), la extensión de los problemas causados por nemátodos fitoparásitos en España, en particular *Meloidogyne* spp., ha coincidido con la intensificación de la agricultura y el desarrollo de los cultivos protegidos. No obstante, aún

no se dispone de una estimación sistemática de la incidencia de las enfermedades causadas por nemátodos fitoparásitos en los cultivos protegidos del sudeste peninsular.

1.2. CULTIVOS PROTEGIDOS DE FLOR CORTADA EN EL SUDOESTE ANDALUZ

España es el segundo mayor productor de flor cortada dentro de la Unión Europea. El principal cultivo es el clavel (*Dianthus caryophyllus* L.), cultivado principalmente en la provincia de Cádiz, donde un total de 290 ha se utilizan para su producción, con una productividad anual de 38 millones de docenas de tallos y un valor comercial de aproximadamente 68 millones de euros (Analistas Económicos de Andalucía, 2009; Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, 2010). La producción se realiza bajo condiciones de crecimiento protegido en invernaderos de plástico sin calefacción, por lo general de menos de 5000 m². Los esquejes enraizados de clavel se importan desde Holanda, Israel, Italia o de otras regiones españolas, y se plantan desde mitad de junio hasta finales de julio. Los primeros tallos se recolectan desde finales de noviembre, realizándose las siguientes cosechas a intervalos determinados hasta mayo-junio del siguiente año, cuando las temperaturas llegan a ser demasiado elevadas para obtener buena calidad de las flores. En este momento, algunos agricultores rotan con cultivos de primavera-verano (tomate, melón, sandía), mientras otros podan los claveles e interrumpen la cosecha hasta el final del verano, cuando el cultivo se reanuda. En este caso, el cultivo se mantiene en el campo durante dos años (Plaza *et al.*, 2008).

2. NEMÁTODOS FITOPARÁSITOS

Los nemátodos son organismos microscópicos pseudocelomados, no segmentados, vermiformes y con simetría bilateral, con una longitud entre 0,1 y 3 mm y un diámetro unas 20 veces menor que su longitud, aunque algunas especies se tornan redondeadas en sus últimas fases. Tienen una cutícula exterior que es secretada internamente desde la hipodermis. Los músculos se unen longitudinalmente a la hipodermis del nemátodo, permitiéndoles moverse en dirección dorso ventral. Poseen un tubo digestivo compuesto esquemáticamente por esófago, intestino y ano, desde la región cefálica hasta la cola, pero no tienen sistema circulatorio ni respiratorio definidos. Los adultos son fácilmente identificables por la presencia de un sistema reproductor. Casi todas las especies poseen

sexos separados y, por lo general, los machos son más pequeños que las hembras. Las hembras presentan uno o dos ovarios, útero, vagina y vulva y, en ocasiones, son observables una o dos espermatecas donde se almacena el esperma. Los machos se distinguen fácilmente por la presencia de un aparato copulador en la parte posterior del cuerpo. En general, presentan seis etapas en su ciclo de vida: huevo, cuatro estadios juveniles y adultos. Los pasos entre estadios juveniles y hasta adulto están separados por mudas (Decraemer y Hunt, 2006).

Los nemátodos constituyen el grupo más abundante de animales pluricelulares en la tierra, ocupando tanto hábitats acuáticos como terrestres. Existen nemátodos bacterívoros, fungívoros, omnívoros, predadores, parásitos de insectos y parásitos de plantas (fitoparásitos). Es importante decir que, aunque asociemos frecuentemente el término "nemátodos" a patógenos causantes de enfermedades de los cultivos, no todos los nemátodos del suelo son dañinos para la agricultura, sino que también hay nemátodos que juegan un importante papel regulador en los ciclos de nutrientes, así como nemátodos entomopatógenos que son importantes agentes de control biológico de plagas y que, al ser beneficiosos desde un punto de vista agrícola, deberían ser tenidos en cuenta a la hora de la planificación y adopción de medidas de control nematológico en campo.

Los nemátodos parásitos de plantas viven y se mueven en la película acuosa existente en el laberinto de microtúneles del suelo y dentro de los tejidos vegetales. Todos tienen alguna forma de estilete o arpón oral, que les permite perforar la pared de las células de la planta hospedadora para alimentarse. De acuerdo a sus hábitos alimenticios y movilidad se agrupan en:

- a) *Ectoparásitos*. Durante todo el ciclo de vida se mantienen fuera de la raíz y se alimentan de células de la epidermis o células un poco más profundas en la raíz. Tienen la capacidad de moverse hacia nuevos sitios de alimentación (*e.g. Criconemoides, Longidorus, Trichodorus, Tylenchorhynchus, Xiphinema*).
- b) *Endoparásitos migratorios*. Penetran al sistema radical y se alimentan de las células de la raíz a medida que migran (*e.g. Pratylenchus*).
- c) *Endoparásitos sedentarios*. Penetran al sistema radical, pierden la capacidad de moverse y mantienen un sitio activo de alimentación a través de células de la raíz altamente modificadas (*e.g. Meloidogyne, Globodera, Heterodera, Tylenchulus*).

La mayor parte de las pérdidas de producción agrícola que causan los nemátodos está relacionada con su proceso de la alimentación ya que, disminuyen la capacidad de las raíces para captar y transportar nutrientes al resto de la planta, lo que se traduce en un debilitamiento general y en pérdidas de producción. Los nemátodos fitoparásitos pueden producir pérdidas en los cultivos como patógenos por sí mismos, pero también como vectores de otros patógenos (*e.g.* el virus del entrenudo corto o GFLV transmitido por algunas especies de *Xiphinema* en viña) o por la interacción con otros patógenos en enfermedades complejas, como la muerte prematura del melocotonero causada por la interacción de *Pseudomonas syringae* Van Hall y *Criconemoides xenoplax* (Raski) Loof y de Grisse.

Los efectos de los nemátodos fitoparásitos sobre los cultivos se subestiman frecuentemente por agricultores y técnicos agrícolas debido a los síntomas inespecíficos que producen, que suelen confundirse con desordenes nutricionales, estrés hídrico, problemas de fertilidad del suelo, así como con otras infecciones secundarias causadas por hongos y bacterias, cuya entrada puede estar facilitada por la acción del nemátodo. No obstante, estimaciones de diversas fuentes sugieren que los nemátodos parásitos de plantas reducen la producción agrícola mundial entre un 12% y un 20% (Society of Nematologists, 1994; Trudgill y Blok, 2001), lo que representa aproximadamente unos 100.000 millones de dólares anuales (Oka *et al.*, 2000a). Esta estimación de pérdidas sería aún mayor si no se usasen medidas de control nematológico ya que, a menudo se hace después de la aplicación de medidas de control generales, como la desinfección del suelo, lo que implica una percepción reducida de la severidad e incidencia de estas enfermedades entre agricultores y técnicos agrícolas.

A nivel de observación de campo, las enfermedades causadas por nemátodos se suelen manifestar como rodales irregulares de crecimiento pobre, de forma circular o elipsoidal. En planta, los síntomas observables en la parte aérea incluyen atrofia vegetal, pérdida de vigor, clorosis foliar, marchitamiento, caída prematura de las hojas, senescencia y, en el caso de nemátodos que atacan las partes aéreas (*Anguina*, *Aphelenchoides*, *Ditylenchus*), se pueden observar manchas foliares, putrefacciones y distorsiones en cuello y bulbos, así como agallas en las espigas de algunos cereales. En el sistema radical, algunos nemátodos pueden producir síntomas característicos como los nódulos o agallas causadas por *Meloidogyne* (Figura 3), u otros más inespecíficos, como lesiones necróticas y

proliferación de raíces secundarias. La severidad de todos estos síntomas depende de la especie y raza del nemátodo implicado, la susceptibilidad del cultivo hospedador y la densidad de la población de nemátodos en suelo en el momento de la siembra. En general, todos estos síntomas son bastante inespecíficos y podrían estar causados por otros agentes patógenos, por lo que una correcta diagnosis nematológica debe estar basada no sólo en la observación de síntomas atribuibles a nemátodos fitopatógenos sino además, en la confirmación del diagnóstico mediante el aislamiento del nemátodo en laboratorio y la reproducción de los síntomas en el cultivo hospedador, en ensayos controlados siguiendo los postulados de Koch (Coyne *et al.*, 2007).

Figura 3. Síntomas causados por *Meloidogyne* spp. en raíces de tomate (a) y cultivo de clavel (b).



Tabla 2. Principales géneros de nemátodos fitoparásitos en España. Síntomas y cultivos.

| Nemátodo | Síntomas | Cultivos |
|--|---|---|
| <i>Meloidogyne</i> | Agallas en raíces Debilitamiento general de la planta | Cereales, Hortícolas, Frutales, Ornamentales |
| <i>Pratylenchus</i> | Lesiones y destrucción de raíces Debilitamiento general de la planta | Cereales, Hortícolas, Frutales, Ornamentales |
| <i>Globodera, Heterodera</i> | Cuentas de collar en raíces Debilitamiento general de la planta | Cereales, Leguminosas, Patata, Remolacha, Tabaco |
| <i>Ditylenchus</i> | Distorsiones en hojas y bulbos Decoloración de los bulbos | Ajo, Cebolla, Cereales |
| <i>Tylenchulus</i> | Deterioro radicular Debilitamiento general de la planta | Cítricos |
| <i>Xiphinema, Longidorus, Trichodorus, Paratrichodorus</i> | Engrosamientos y necrosis radicular Debilitamiento general de la planta Transmisores de virus | Numerosos cultivos |
| <i>Aphelenchoides</i> | Distorsiones y necrosis en las hojas | Arroz, Fresa, Ornamentales |
| <i>Anguina</i> | Distorsiones en las espigas y granos de los cereales | Cereales y pastos |

Fuente: Talavera, 2004

De todos los nemátodos fitoparásitos, los “formadores de agallas en las raíces” o especies del género *Meloidogyne* son los que más limitan la producción hortícola (Trudgill y Blok, 2001). En España las pérdidas causadas por nemátodos fitoparásitos en hortícolas han sido estimadas en torno al 12% (Bello *et al.*, 1996), pero en el caso de *Meloidogyne* spp. varían entre el 15% y el 60% de la cosecha (Verdejo-Lucas, 1999). Dentro del género *Meloidogyne* han sido descritas más de ochenta especies (Subbotin y Moens, 2006), de las cuales diez son importantes organismos fitopatógenos y cuatro de ellas se encuentran distribuidas en áreas agrícolas de todo el mundo, por lo que se consideran las principales especies de este género. *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood, *Meloidogyne hapla* Chitwood, *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood y *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood, suponen el 95% de todas las citas de enfermedades causadas por nemátodos formadores de agallas en la raíces, siendo *M. incognita* la especie que causa pérdidas más importantes económicamente (Hussey y Janssen, 2002) ya que, es capaz de reproducirse en más de 2000 especies de plantas (Jung y Wyss, 1999). Especies del género *Meloidogyne* han sido descritas parasitando cultivos hortícolas, ornamentales y frutales por toda España (Bello *et al.*, 1996) y particularmente en Andalucía (Andreu-López *et al.*, 1986; Salmerón y

Cabello, 1989; Ornat *et al.*, 1999; Talavera *et al.*, 1999). Los nemátodos del género *Meloidogyne* también están entre los patógenos del clavel más destructivos, causando pérdidas económicas de entre el 10-20% (Cho *et al.*, 1996).

La infestación de la planta por *Meloidogyne* es llevada a cabo por nemátodos en el segundo estadio juvenil (J2), los cuales eclosionan de los huevos en suelo y migran libremente hacia las raíces en respuesta a un estímulo químico procedente de éstas (Gaur *et al.*, 2000). Penetran en las raíces a nivel de la caliptra y migran entre las células corticales hasta alcanzar el cilindro vascular, donde inducen sitios de alimentación en los que varias células dispuestas alrededor de la cabeza del nemátodo incrementan su tamaño para formar las llamadas "células gigantes". Las células del parénquima y del periciclo circundantes se hipertrofian dando lugar a las características agallas o nódulos radiculares. El número y el tamaño de estas agallas dependen de la susceptibilidad del hospedador y de la densidad de población inicial de nemátodos en suelo. Los juveniles establecidos en las raíces se desarrollan hasta adultos. Las hembras permanecen unidas a su sitio de alimentación, donde producen huevos que serán liberados al suelo dentro de una matriz gelatinosa. El número de huevos producido por cada hembra varía según la especie, oscilando entre 50 y 2000 huevos. El ciclo de vida es completado en 4-6 semanas, dependiendo de la temperatura del suelo (Hussey, 1985).

Como fitoparásitos, los nemátodos formadores de agallas afectan al crecimiento y productividad de la planta, debido a la destrucción del tejido vascular de la raíz en los sitios de alimentación, lo que provoca restricciones en el flujo hídrico y de nutrientes (Melakeberhan y Webster, 1993). Este estado nutricional de la planta puede evaluarse durante el cultivo mediante parámetros no destructivos como el contenido de clorofila en las hojas de las plantas (Wood *et al.*, 1992), la temperatura de la cubierta vegetal (Tarkalson y Payero, 2008), la longitud de la planta, el grosor del tallo y la producción de flores y frutos (en número y peso). Al final del ciclo de cultivo, los efectos de los nemátodos fitoparásitos sobre el estado nutricional de la planta se pueden medir también mediante parámetros como la biomasa (peso fresco y peso seco) de la parte aérea y del sistema radical del cultivo, o bien mediante análisis bioquímicos de contenidos en micro y macronutrientes u otros productos metabólicos (Prokarel y Kruchina, 1991).

3. CONTROL Y MANEJO DE NEMÁTODOS FITOPARÁSITOS

Convencionalmente, el control de estos patógenos se ha realizado mediante el uso de fumigantes químicos del suelo, tales como el bromuro de metilo y el 1,3-dicloropropeno + cloropicrina. Sin embargo, la eliminación gradual del bromuro de metilo (United Nations Environment Programme, 1992) y la prohibición europea del 1,3-dicloropropeno, asociado a las restricciones en el uso de otros nematicidas (European Commission, 2007), ha reducido el número de alternativas viables para la desinfección del suelo en los países europeos. Los fumigantes químicos alternativos, tales como el disulfuro de dimetilo, recientemente aprobado por la agencia de protección medioambiental de los Estados Unidos para uso agrícola (Coosemans, 2005; Environmental Protection Agency, 2010), aún no se han registrado en Europa.

Las actuales directivas comunitarias para el control de plagas y enfermedades (European Commission 2009a, 2009b) recomiendan la implementación de procesos de manejo integrado basados en los principios de prevención, reducción del inóculo del patógeno o de las densidades de la población del fitoparásito y tolerancia-resistencia de la planta hospedadora, dando como resultado consecuencias favorables desde el punto de vista económico y medioambiental (Bird, 1981). En el caso de nemátodos fitoparásitos, el principal objetivo del control integrado es, por tanto, conseguir que sus densidades de población en suelo, justo antes de la siembra o trasplante, se mantengan a niveles por debajo de los umbrales de daño, (manejo preventivo), así como minimizar las pérdidas (incidencia y severidad de la enfermedad) durante el cultivo (manejo permanente).

Aunque el control de las enfermedades causadas por nemátodos fitoparásitos, y en particular *Meloidogyne* spp., es particularmente difícil debido a su amplio rango de hospedadores, periodos cortos de generación y alta tasa reproductiva (Trudgill y Blok, 2001), el manejo integrado de *Meloidogyne*, no ha recibido suficiente atención hasta las últimas décadas del siglo XX, debido principalmente a la disponibilidad de fumigantes de amplio espectro, los cuales mantenían las poblaciones de estos fitoparásitos por debajo de los umbrales de daño, en la mayoría de los casos. La prohibición y restricción del uso de fumigantes como el bromuro de metilo (Ozone Secretariat of the United Nations Environment Programme, 2006) o el 1,3-dicloropropeno (European Commission, 2007), como resultado de una mayor preocupación ambiental y sanitaria, ha dirigido los esfuerzos en investigación hacia la búsqueda de otras alternativas de control, que sean más aceptables

desde la perspectiva ambiental, como la rotación de cultivos, el uso de enmiendas orgánicas en procesos de biofumigación, la solarización del suelo, el uso de cultivares resistentes e injertos y la aplicación de agentes biológicos que protejan a la planta hospedadora (protección biológica) o disminuyan las poblaciones del nemátodo fitoparásito (control biológico). No obstante, ninguna de estas alternativas ha mostrado hasta el momento una efectividad comparable a la de los nematicidas fumigantes en el control nematológico, sobre todo cuando las densidades de nemátodos fitoparásitos en suelo son elevadas o cuando se requiere un control prolongado en el tiempo, como en el caso de cultivos de ciclo largo (Talavera, 2004). Es por ello que, la búsqueda de nuevas medidas de control nematológico sigue siendo necesaria en general, mientras que la investigación y experimentación sobre la combinación e integración de varios métodos de control adaptados a las condiciones agroambientales locales, se muestra como prioritaria para el manejo de estos cultivos hortícolas intensivos.

Dependiendo del momento de su aplicación, los métodos para el control y manejo de las enfermedades causadas por nemátodos fitoparásitos pueden ser divididos en tres bloques:

- a) Medidas preventivas y de cuarentena, que eviten la introducción de determinados nemátodos fitoparásitos en campos previamente libres de ellos.
- b) Medidas de control pre-plantación, que reduzcan las densidades de población de nemátodos fitoparásitos en suelo por debajo de los umbrales de daño en el momento de la siembra o trasplante.
- c) Medidas post-siembra o post-trasplante, cuyos objetivos principales son intentar evitar, en la medida de lo posible, la entrada del nemátodo en la planta y, en su caso, compensar o disminuir las pérdidas causadas por ellos.

3.1. MEDIDAS PREVENTIVAS Y DE CUARENTENA

En general, el control nematológico debería ser esencialmente preventivo, porque una vez la planta es parasitada, es imposible eliminar el nemátodo sin destruir también el cultivo hospedador. Por tanto, la prevención frente a la introducción de nemátodos en áreas donde no se encontraban anteriormente debería ser la primera medida de control. Los métodos de prevención y cuarentena utilizan estrategias que restringen el movimiento de plantas y suelos procedentes de áreas infestadas, como el control fronterizo del material

de siembra (semillas, plántones y sustratos), la destrucción de cultivos infestados, la prohibición del uso de cultivos hospedadores en zonas de riesgo o la higienización del material de labranza, y suelen ser implementados por recomendaciones desarrolladas por agencias regionales o nacionales, aunque la implicación de agricultores y técnicos agrícolas es fundamental para su éxito.

3.2. MEDIDAS PRE-PLANTACIÓN

Una vez que los nemátodos han sido detectados en el campo, la acción más efectiva para disminuir las pérdidas causadas por ellos es la reducción de sus densidades de población en suelo, antes de que se establezca el cultivo (Stirling, 2000). Esto se puede conseguir mediante técnicas culturales de manejo del suelo, como el barbecho o la rotación de cultivos, o mediante el uso de métodos específicos de control dirigidos a estadios concretos del ciclo del nemátodo y basados en principios biológicos, físicos o químicos, como el control o protección biológica, la solarización, la biofumigación y la aplicación de productos químicos nematicidas.

3.2.1. MÉTODOS CULTURALES

Se basan principalmente en la reducción de la densidad poblacional de los nemátodos fitoparásitos por inanición, debida a la ausencia de un cultivo hospedador, bien mediante barbecho o bien mediante la rotación con cultivos no hospedadores del nemátodo implicado.

La práctica del barbecho sólo ha resultado satisfactoria cuando es practicado durante al menos uno o dos años antes del establecimiento de un nuevo cultivo. Un barbecho limpio, en el que se practique además un control de las plantas espontáneas es igualmente importante ya que, las especies de *Meloidogyne* tienen un amplio rango de plantas hospedadoras y muchas de estas plantas pueden actuar como reservorios que mantienen, o incluso aumentan, las poblaciones de nemátodos (McSorley *et al.*, 2009). La manipulación del suelo durante el barbecho, puede acelerar la mortalidad de los nemátodos debido a su desecación, o por exposición directa a la luz solar. Cabe destacar que, cuando se seca el suelo con las labores, se produce una reducción de las poblaciones de nemátodos, aunque hay que tener en cuenta que, en los ambientes mediterráneos éstos pueden emigrar a los

horizontes más profundos (Díez y Dusenbery, 1989; Bello *et al.*, 1994), por lo que, las labores posteriores con volteo pueden devolverlos a la superficie. Además, cuando se replanta un cultivo es importante la eliminación de las raíces del cultivo anterior ya que, los nemátodos pueden sobrevivir en los restos de raíces en el subsuelo, donde hay menos fluctuaciones de temperatura y humedad (Tobar *et al.*, 1996).

La rotación de cultivos, consiste en la introducción de cultivos no hospedadores de los nemátodos, evitando la reproducción de estos y, por consiguiente, reduciendo sus densidades en suelo. Dependiendo del nemátodo implicado, cultivos útiles para esta técnica pueden ser determinados cultivares de espárrago, maíz, cebolla, ajo, centeno y soja (Chellemi, 2002; Ploeg, 2007; Ploeg y Edwards, 2007). Las rotaciones con cultivos que liberan compuestos alelopáticos al suelo, como algunas especies de los géneros *Brassica*, *Crotalaria* o *Tagetes*, resultan más efectivas en la reducción de las densidades de poblaciones de nemátodos fitoparásitos en suelo (Ploeg, 2002; Monfort *et al.*, 2007; Marla *et al.*, 2008). En el caso de algunos nemátodos quísticos (*Heterodera* spp. y *Globodera* spp.), que tienen un estrecho rango de hospedadores, puede resultar bastante efectiva (López-Robles *et al.*, 2001). Por el contrario, el control de los nemátodos formadores de agallas en raíces (*Meloidogyne* spp.) mediante esta técnica, es bastante limitado, debido principalmente a la naturaleza polífaga de *Meloidogyne* que estrecha el número de cultivos que pueden ser incluidos en las rotaciones, así como por el relativo bajo valor económico de muchos de aquellos cultivos que no son hospedadores del nemátodo y que si podrían ser incluidos en las rotaciones.

Una variante de la rotación de cultivos, consiste en el uso de cultivos de rápido crecimiento, altamente susceptibles al nemátodo que se desee controlar. Una vez que las plantas han logrado cierto crecimiento, y los nemátodos han penetrado en sus raíces, éstas se eliminan del campo, sacando su sistema radical del suelo, de forma que actúan como "cultivos trampa" que extraen parte de la población de nemátodos fitoparásitos del suelo y disminuyen el nivel de inóculo inicial (Cuadra *et al.*, 1996; Scholte, 2005).

3.2.2. INUNDACIÓN DEL TERRENO

En las regiones donde el agua es abundante, existen equipamientos para el bombeo de agua y, en ciertos monocultivos a gran escala (como por ejemplo las patatas), la técnica de la inundación se considera una práctica útil en el control de nemátodos (Sotomayor *et*

al., 1999). La inundación del terreno, durante 7 a 8 meses, elimina los nemátodos al reducir la cantidad de oxígeno disponible, e incrementando las concentraciones de ácidos orgánicos, metano y sulfuro de hidrógeno que son tóxicos para ellos. Sin embargo, esta alternativa puede originar fenómenos de anaerobiosis que repercuten de forma negativa en la estructura de los suelos, y un mal manejo de esta técnica puede agravar el problema de infestación ya que, el agua es un excelente medio de dispersión para los nemátodos y otros patógenos en el suelo.

3.2.3. DESINFECCIÓN POR VAPOR DE AGUA O AGUA A ELEVADA TEMPERATURA

El calentamiento del suelo a temperaturas entre 70 y 100 °C, por medio de vapor, puede usarse para desinfestar el suelo en instalaciones que dispongan de sistemas de calefacción. La temperatura del suelo y la duración del tratamiento térmico determinan si la eliminación es total (esterilización: pocos minutos a 90-100 °C), o si ocurre solo parcialmente (pasteurización: mezcla de vapor y aire a 70-80 °C).

Aunque el uso de vapor es efectivo en el control de nemátodos, y de un amplio rango de patógenos del suelo, uno de sus mayores inconvenientes es el elevado coste económico que se requiere en infraestructura cuando este vapor es aplicado en campo, además de la cuidadosa preparación del suelo para permitir que el vapor penetre en su interior, a lo que también habría que sumar el coste adicional del combustible y agua necesarios. Por tanto, solo se aplica en cultivos de elevada rentabilidad económica (Greco, 2000) y en la eliminación de nemátodos del material vegetal en vivero.

3.2.4. SOLARIZACIÓN DEL SUELO

La solarización del suelo consiste en el calentamiento, mediante la radiación solar, de un suelo labrado, humedecido y cubierto con un acolchado de polietileno transparente (100-200 galgas). Su mayor ventaja es el control simultáneo de malas hierbas, plagas y patógenos del suelo (Stapleton, 2000; Gamliel y Katan, 2009). No obstante, ha sido menos efectivo en el control de nemátodos parásitos de plantas, y en particular de *Meloidogyne* spp., ya que la movilidad de estos parásitos les permite encontrar refugio en capas más profundas del suelo, donde las temperaturas no alcanzan el umbral letal (Díez y Dusenbery, 1989). En una etapa posterior, tras la siembra, estos nemátodos son capaces de re-colonizar

el suelo e infestar a las plantas hospedadoras (Stapleton y Heald, 1991; Wang y McSorley, 2008). Además, cuando la estación de siembra y crecimiento se solapa con el periodo óptimo de solarización del suelo, durante los meses más calurosos del año, la efectividad de este método se reduce debido a que, la duración del periodo de solarización no alcanza el mínimo requerido. Sus principales limitaciones son la dependencia climática, la larga duración del tratamiento (de 40 a 60 días), y el hecho de que la temperatura necesaria para eliminar los patógenos (40-45°C) raras veces alcanza profundidades mayores de los primeros 10 cm de superficie (Bello *et al.*, 2000). Debido a que la solarización es un proceso pasivo y dependiente de las condiciones climáticas del momento, se ha sugerido su integración con otras técnicas de control, para maximizar su eficacia en el control de patógenos (Oka *et al.* 2007).

3.2.5. BIOFUMIGACIÓN Y ENMIENDAS ORGÁNICAS

La viabilidad de los fitopatógenos en el suelo se compromete por la descomposición de enmiendas orgánicas ricas en nitrógeno, mediante la liberación de tóxicos volátiles, como el amonio y el ácido nitroso (Lazarovits *et al.*, 2005). La acción fumigante de estas sustancias volátiles juega un importante papel en la reducción de las densidades de las poblaciones de nemátodos fitoparásitos, además de estimular la actividad de enemigos naturales y mejorar la estructura y fertilidad del suelo (Bello *et al.*, 2003). Tradicionalmente, la mayoría de cultivos han recibido materia orgánica, como medida para mejorar las estructura y fertilidad del suelo, pero a partir del uso de residuos agro-industriales en descomposición y en diversas mejoras en el método de incorporación de estos al suelo, con el objetivo de retener los gases fumigantes producidos, la técnica ha pasado a considerarse como una alternativa efectiva para el control de patógenos, y a denominarse biofumigación (Matthiesen y Kirkegaard, 1993; Bello *et al.*, 2004).

Entre las distintas fuentes de materia orgánica efectivas en el control de nemátodos, se incluyen residuos sólidos procedentes de semillas oleaginosas, serrín, caña de azúcar y remolacha (Bello *et al.*, 2003). El efecto de la adición de estas enmiendas orgánicas al suelo se incrementa cuando poseen compuestos alelopáticos con efecto nematicida, como es el caso de los glucosinatos e isotiocianatos de especies de los géneros *Brassica* o *Tagetes* (Piedra-Buena *et al.*, 2006).

Esta estrategia combinada con la solarización del suelo, que se conoce como biosolarización y consiste en el uso de un film plástico transparente que limita la emisión de gas a la atmósfera e incrementa la temperatura del suelo, ha mostrado una mayor eficacia en el control de fitopatógenos (Gamliel *et al.*, 2000; Ros *et al.*, 2008).

3.2.6. CONTROL QUÍMICO CON NEMATICIDAS FUMIGANTES

La fumigación del suelo con productos químicos ha sido una de las técnicas más efectivas de control nematológico hasta la actualidad, aunque sólo puede aplicarse antes de la siembra debido a su alta fitotoxicidad. Los fitosanitarios fumigantes son químicos volátiles que se liberan en el interior del suelo mediante inyección, formulaciones líquidas emulsificadas vía irrigación, o como gránulos que al descomponerse generan gases que tienen un efecto letal sobre los patógenos. El éxito de la fumigación depende del método de aplicación, la dosis y la temperatura y humedad del suelo (McKenry, 1978).

Los fumigantes químicos de amplio espectro, como el bromuro de metilo o el 1,3-dicloropropeno han sido, desde los años 50, el principal método de control de nemátodos (Oka *et al.*, 2000a; Giannakou y Karpouzias, 2003). No obstante, su uso implica riesgos sanitarios y ambientales ya que, debido a su efecto biocida inespecífico, producen interferencias indeseables con otros procesos ecológicos beneficiosos en suelo y atmósfera. Todo ello ha llevado a la prohibición internacional del uso del bromuro de metilo, la exclusión del 1,3-dicloropropeno de la lista de fitosanitarios permitidos en la Unión Europea y a la limitación del uso de otros fumigantes, a través de las legislaciones europea y nacional (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2002; European Commission, 2007). En la actualidad, los únicos fumigantes del suelo incluidos dentro de los fitosanitarios autorizados para su uso frente a nemátodos en la Unión Europea, son el Dazomet (Basamid ®) y el metam-sodio, (Arapam ®, Laisol ®, Metam-Na ®, Vapam ®,...), mientras que otros se encuentran en revisión, o bien excluidos aunque con uso permitido en determinados cultivos temporalmente, como en el caso del 1,3-dicloropropeno (Agrocelhone ®; Drafolone ®; Telone ®, Telopic ®) (European Commission, 2009a, 2009b).

3.2.7. CONTROL QUÍMICO CON NEMATICIDAS NO-FUMIGANTES

Existen dos grupos principales de nematicidas no fumigantes, los carbamatos (carbofuran, oxamilo) y los organofosforados (etoprofos, fenamifos, terbufos, cadusafos). Estos productos son letales para los nemátodos por contacto directo, aunque una vez que se aplican al suelo, y a partir de los ocho centímetros de profundidad, su acción es mayoritariamente debida a efectos subletales en el comportamiento, nematostáticos, estimulación de la eclosión de huevos y desorientación de los nemátodos (Chitwood, 2002).

Se necesitan aplicaciones repetidas en el tiempo para mantener las poblaciones por debajo de los umbrales de daño, reduciéndolas hasta un 90%, pero no llegando a erradicar el problema (Ferris *et al.*, 2004) ya que, teniendo en cuenta los plazos de seguridad establecidos, generalmente entre 60 y 90 días, muchos de estos productos ven limitada su aplicación al momento de pre-siembra. La eficacia de estos nematicidas se ve también influenciada por diversos factores como la solubilidad del producto, la textura del suelo, la cantidad de materia orgánica presente en él y la degradación cuando las poblaciones microbianas son capaces de metabolizarlos (Olthof y Townshend, 1991).

Su uso se encuentra restringido en algunas regiones por la posibilidad de contaminación de las aguas subterráneas. En la Unión Europea, actualmente solo están autorizados como nematicidas: Etoprofos (Mocap[®], Sanimul[®]), Fenamifos (Nemacur[®]), Fostiazato (Nemathorin[®]) y Oxamilo (Vydate[®]) (European Commission, 2009a, 2009b).

3.2.8. CONTROL QUÍMICO CON EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITES ESENCIALES

Las plantas son una importante fuente de pesticidas de origen natural. Muchos componentes con actividad nematicida han sido encontrados en plantas, incluyendo alcaloides, diterpenos, ácidos grasos, glucosinatos, isotiocianatos, fenoles, poliacetilenos, sesquiterpenos y derivados tienilos (Gommers, 1981; Chitwood, 2002; Kim *et al.*, 2008). Debido a su baja toxicidad en mamíferos, que son biodegradables, multifuncionales, no persistentes en el medio ambiente y de bajo precio en su producción, la posibilidad de desarrollar aceites esenciales para uso en protección de cultivos sería un método atractivo para el manejo de enfermedades (Bharadwaj y Sharma, 2007).

El rango de plantas con actividad nematicida, cuyos extractos o aceites han sido testados en los últimos años incluye *Carum carvi*, *Mentha rotundifolia*, *Origanum vulgare*

(Oka *et al.* 2000a,b), *Inula viscosa* (Oka *et al.*, 2001), *Calotropis procera* (Reina *et al.* 2002), *Artemisia vulgaris* (Costa *et al.* 2003), *Tamarindus indica*, *Cassia siamea*, *Isobertlinia doka*, *Dolnix regia*, *Cassia sieberiana* (Bello *et al.*, 2006), *Tagetes erecta* (Natarajan *et al.* 2006), *Avicennia marina* (Tariq *et al.*, 2007), *Chromolaena odorata* (Thoden *et al.*, 2007), *Ruta graveolens* (Sasanelli *et al.* 2007), *Azadirachta indica* (Javed *et al.*, 2007, 2008), *Phyllanthus niruri* (Shakil *et al.*, 2008), *Eugenia caryophyllata* (Zouhar *et al.*, 2009), *Chamaespartium tridentatum* (Barbosa *et al.*, 2010), *Baccharis* spp. (Sosa *et al.* 2012), *Ailanthus altissima* (Caboni *et al.*, 2012) y *Verbesina encelioides* (Oka, 2012).

Una lista de extractos vegetales con actividad frente a nemátodos, procedentes de más de 100 especies diferentes de plantas fue recopilada por Akhtar y Mahmood (1994). Algunos de ellos se encuentran comercializados actualmente en España como promotores del crecimiento vegetal, aunque en sus etiquetas y publicidad informan de una actividad protectora frente a nemátodos fitoparásitos (Tabla 3).

Tabla 3. Productos basados en extractos vegetales en los que se indica algún efecto frente a nemátodos fitoparásitos.

| Extracto o aceite esencial | Nombre comercial | Referencias |
|--|---|---|
| <i>Azadirachta indica</i> | Bio-Agromed [®] , Neem a oil [®] , Proneem [®] | Agbenin <i>et al.</i> , 2005; Javed <i>et al.</i> , 2007, 2008; Ntalli <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Phytolacca</i> | Humsoil [®] | Di Vito <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Sesamum</i> | Lider [®] , Nematon EC [®] | Tanda <i>et al.</i> , 1989 |
| <i>Tagetes</i> | Nemafin [®] | Natarajan <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Quillaja saponaria</i> | Nema-Q [®] , QL Agri 35 [®] | San Martín y Magunacelaya, 2005 |
| Mezclas de extractos de: <i>Allium</i> , <i>Artemisia</i> , <i>Avicennia</i> , <i>Dolnix</i> , <i>Calotropis</i> , <i>Carum</i> , <i>Cassia</i> , <i>Chromolaena</i> , <i>Equisetum</i> , <i>Isobertlinia</i> , <i>Mentha</i> , <i>Origanum</i> , <i>Quassia</i> , <i>Tamarindus</i> , <i>Thymus</i> , <i>Ruta</i> , etc. | Bio-Agromed [®] , Bioplasma "N" [®] , Nemakill [®] , Nematik [®] , Nemature [®] , Philonemat [®] | Agbenin <i>et al.</i> , 2005; Bello <i>et al.</i> , 2006; Costa <i>et al.</i> , 2003; Oka <i>et al.</i> , 2000a,b; Reina <i>et al.</i> , 2002; Sasanelli <i>et al.</i> , 2007; Tariq <i>et al.</i> , 2007; Thoden <i>et al.</i> , 2007; Urban <i>et al.</i> , 2008; Zouhar <i>et al.</i> , 2009 |

3.2.9. RESISTENCIA

Los cultivares con genes de resistencia a nemátodos constituyen una de las principales alternativas para el control de nemátodos fitoparásitos ya que, reducen eficazmente la tasa de multiplicación del nemátodo en comparación con plantas

susceptibles, permitiendo el cultivo en campos infestados sin pérdidas significativas de productividad (Rich y Olson, 1999; Augustin *et al.*, 2002; Sorribas *et al.*, 2005). El gen Mi.1 en tomate confiere resistencia a *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica* (Roberts y Thomason, 1989), que son las especies más comunes en los cultivos hortícolas protegidos en España (Verdejo-Lucas *et al.*, 2002; Robertson *et al.*, 2006).

No obstante, las poblaciones de nemátodos pueden reproducirse e incrementar sus densidades incluso en tomates resistentes portadores del gen Mi.1 (Sorribas y Verdejo-Lucas, 1994; Talavera *et al.*, 2009), lo cual puede ser atribuido bien a una inhibición de la expresión del gen Mi.1 causada por altas temperaturas del suelo (Dropkin, 1969), o por la existencia de poblaciones virulentas capaces de superar la resistencia proporcionada por el gen Mi.1 (Noling, 2000). Estas poblaciones virulentas aparecen naturalmente en campo en ausencia de exposiciones previas a tomate resistente (Kaloshian *et al.*, 1996; Ornat *et al.*, 2001), pero también pueden ser seleccionadas por una exposición repetida de la población de nemátodos a variedades portadoras del gen Mi.1 (Verdejo-Lucas *et al.*, 2009).

Una desventaja adicional, del uso de variedades resistentes como método de control nematológico, es la escasa adaptabilidad de éstas a las exigencias del mercado. No obstante este problema puede ser superado mediante la utilización del injerto de variedades demandadas por el mercado sobre patrones resistentes. La utilización de injertos de tomate en España se encuentra actualmente en expansión (Leonardi y Romano, 2004), principalmente con los objetivos de incrementar el vigor de la planta y obtener frutos de tamaño homogéneo prolongados en el tiempo, pero también como un método de control frente a diversos patógenos, mediante la utilización de patrones resistentes.

Por otra parte, también se han descrito casos de resistencia inducida por agentes biológicos o químicos en tomate frente a *M. arenaria* y *M. incognita* (Siddiqui y Shaukat, 2004a; Dababat y Sikora, 2007; Tomczak *et al.*, 2009). La resistencia inducida es aquella que presenta una planta, en principio susceptible a un patógeno, tras ser expuesta previamente al mismo patógeno, otro organismo o agente químico inductor.

3.2.10. CONTROL BIOLÓGICO

Se define en un sentido amplio como, la utilización de organismos vivos para la reducción del daño producido por una plaga o para la reducción en la severidad y/o

incidencia de una enfermedad (Meyer, 2003; Siddiqui, 2006), y abarca el fortalecimiento del control natural, la introducción de especies no nativas y el uso de plaguicidas derivados de animales, plantas, hongos, bacterias, virus y minerales (Cooping, 2001).

Aunque centenares de agentes de control biológico han sido comercializados mundialmente para el manejo de plagas y enfermedades de los cultivos agrícolas (Paulitz y Belanger, 2001), cuando el objetivo son los nemátodos fitoparásitos aún hay muy pocos agentes de control biológico disponibles comercialmente. Esto se debe fundamentalmente a las dificultades encontradas para su reproducción masiva y formulación comercial y a los resultados inconsistentes obtenidos en su aplicación en campo (Meyer y Roberts, 2002). No obstante, la integración de tácticas culturales y biológicas puede tener un impacto adicional sobre el rendimiento y sostenibilidad de los cultivos, más allá del impacto sobre los nemátodos, debido a la mejora de las características físicas, químicas y biológicas del suelo.

El suelo es un recurso natural dinámico en el que conviven millones de organismos vivos como artrópodos, anélidos, nemátodos, algas, hongos y bacterias. Todos estos organismos realizan diversas funciones y participan en interacciones que permiten el mantenimiento de los ciclos biogeoquímicos en el suelo (Coleman *et al.*, 2004). Entre estas funciones, algunos organismos compiten, inhiben, depredan o parasitan a los nemátodos fitoparásitos y, por tanto reducen sus densidades (Kerry, 2000). Entre ellos, algunas bacterias de los géneros *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, o *Pasteuria* (Walia *et al.*, 2000) y especies de hongos de los géneros *Aspergillus*, *Cylindrocarpon*, *Dactylella*, *Hirsutella*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pochonia* y *Verticillium* (Walia y Vats, 2000; Butt *et al.*, 2001; Eapen *et al.*, 2005; Singh y Mathur, 2010a), ejercen un efecto depresor directo sobre las poblaciones de nemátodos fitoparásitos por lo que pueden ser considerados como agentes de "control biológico". Por otra parte, ciertos microorganismos rizosféricos pueden establecer una relación beneficiosa con la planta hospedadora del nemátodo, que permite reducir los síntomas de la enfermedad causada por estos, por lo que pueden ser considerados como agentes de "protección biológica", principalmente algunas rizobacterias (PGPR) (Wenke *et al.*, 2010), hongos endófitos (Sikora *et al.*, 2008) y hongos formadores de micorrizas arbusculares (AMF) (Barea *et al.*, 1996; Facelli *et al.*, 2009).

3.2.10.1. Rizobacterias

Los productos metabólicos de aquellas bacterias que colonizan la rizosfera influyen tanto en el crecimiento vegetal como en los microorganismos que la habitan, entre ellos los nemátodos (Siddiqui y Mahmood, 2001; Siddiqui y Shaukat, 2003a). Del total de rizobacterias que han sido identificadas, aproximadamente un 7-10% muestran potencial antagonista frente a nemátodos mediante diversos mecanismos (Tabla 4) (Burkett-Cadena *et al.*, 2008). No obstante, el potencial antagonista dentro de este grupo es probablemente mayor, ya que un 90% de ellas aún no han sido estudiadas o cultivadas. La planta, debido a las exudaciones vegetales, cambia la composición física y química del suelo en la rizosfera (Griffiths *et al.*, 1999; Revsbech *et al.*, 1999; Xu, 2000) pudiendo afectar la habilidad de las rizobacterias para colonizar esta zona Ma *et al.* (2001).

Los mecanismos para inhibición de patógenos incluyen competición por ion férrico, difusión de productos volátiles (Siddiqui, 2006) y competición por el nicho ecológico (Duffy, 2001). Por otra parte, también debe ser tenido en cuenta como mecanismo implicado en la tolerancia al nemátodo, los efectos estimulantes de la nutrición y de inducción de resistencia adquirida en planta, producidos por la inoculación de algunas rizobacterias (PGPR). Estos incluyen, fijación de nitrógeno, incremento en la disponibilidad de nutrientes en la rizosfera, liberación de fitohormonas o estimulación de los efectos beneficiosos de otros simbioses (Glick, 1995; Vessey, 2003; Siddiqui, 2006).

El género *Bacillus* incluye una importante variedad de especies Gram-positivas, con propiedades antagonistas sobre varios patógenos. Son buenas secretoras de metabolitos, como el antibiótico oligomicina (Kim *et al.*, 1999), fáciles de cultivar y altamente eficientes para el control de plagas y enfermedades (Berg y Hallmann, 2006). La capacidad de *Bacillus* spp. de formar esporas que sobreviven y permanecen metabólicamente activas bajo condiciones adversas (Rodgers, 1989), las hace apropiadas para la formulación de productos viables y estables para el control biológico. En particular, *Bacillus megaterium* De Bary, ha sido citado como supresor de las enfermedades causadas por nemátodos del género *Meloidogyne* (El-Hadad *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2010). Esta bacteria es endofítica y reside dentro de los espacios apoplásticos de la planta hospedadora, en la unión de las raíces laterales a la raíz primaria (O'Callaghan *et al.*, 2001) o, raramente, en los espacios intracelulares (An *et al.*, 2001). Esto le confiere la capacidad para competir por el nicho ecológico, siendo este un mecanismo de inhibición de patógenos especialmente relevante

frente a los nemátodos agalladores. McCully (2001) argumentó que las fracturas originadas durante la eliminación de plantas del suelo son responsables de la aparición de estas zonas de entrada bacteriana alrededor de las uniones de las raíces laterales y que, en raíces intactas, estos lugares de entrada no existen debido a que las células corticales de la raíz sellan estas zonas de unión (Peterson y Moon, 1993). Algunas PGPR endofíticas presentan actividades celulasa y pectinasa (Kovtunovych *et al.*, 1999; Verma *et al.*, 2001) beneficiosas para la colonización radical, sin embargo, las capas celulares fuertemente suberizadas y/o lignificadas suponen una barrera frente a las bacterias (McCulley, 2001). La aplicación conjunta de estas bacterias y de los hongos formadores de micorrizas arbusculares puede facilitar la entrada bacteriana a la raíz, ya que algunas bacterias pueden utilizar a otros organismos como vectores para conseguir el acceso a los espacios apoplásticos del hospedador. Paralelamente, *B. megaterium* es capaz de aumentar el crecimiento vegetal y de modificar la arquitectura de la raíz, inhibiendo el crecimiento de la raíz primaria y provocando simultáneamente un aumento de los pelos radiculares y de las raíces secundarias (López-Bucio *et al.*, 2007). Además, se ha demostrado que produce varios metabolitos volátiles con actividad nematicida frente a *M. incognita* (Huang *et al.*, 2010) y, en experimentos en maceta, se han mostrado efectos reductores de la reproducción de *M. incognita* y del agallamiento sobre plantas de tomate (Singh y Siddiqui, 2010).

Diversas rizobacterias del género *Pseudomonas* también muestran antagonismo frente a las poblaciones de nemátodos fitoparásitos, a través de la producción de compuestos bacterianos con actividad nematicida o nematostática como, sideróforos, ácido cianhídrico y antibióticos (Hamdan *et al.*, 1991; Nielsen y Sorensen, 2003; Berg y Hallmann, 2006; Lee *et al.*, 2011). Además, se ha comprobado que, en algunos casos, inducen resistencia en las plantas (Kloepper y Ryu, 2006). Esta actividad dual de los inóculos de *Pseudomonas* la presentan como una rizobacteria con gran potencial para la bioprotección y el biocontrol de nemátodos fitopatógenos (Siddiqui y Shaukat, 2003a). Concretamente, *Pseudomonas putida* Trevisan es una bacteria de colonización rizosférica, que puede colonizar la rizosfera, la superficie de la raíz o incluso los espacios intercelulares superficiales (Andrews y Harris, 2000; McCulley, 2001), y ha sido citada en la literatura como supresora de las enfermedades causadas por *Meloidogyne* spp. (Aalten *et al.*, 1998; Akhtar y Siddiqui, 2009).

Tabla 4. Efectos de diversas rizobacterias sobre enfermedades causadas por *Meloidogyne* spp.

| PGPR | Efectos descritos | Referencias |
|------------------------------------|---|---|
| <i>Azospirillum brasilense</i> | Reducción agallamiento y reproducción | Siddiqui y Mahmood, 2001; Siddiqui, 2004 |
| <i>Azotobacter chroococcum</i> | Reducción agallamiento y reproducción | Siddiqui y Mahmood, 2001; Siddiqui y Mahmood, 2003; Siddiqui, 2004 |
| <i>Bacillus cereus</i> | Producción de metabolitos nematocidas Reducción agallamiento y reproducción | Hoffmann-Hergarten <i>et al.</i> , 1998; Oliveira <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Bacillus circulans</i> | Producción de metabolitos nematocidas | El-Hadad <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>Bacillus firmus</i> | Inhibición movilidad de J2s Reducción agallamiento y reproducción | Terefe <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Bacillus megaterium</i> | Inhibición eclosión de huevos Producción de metabolitos nematocidas Reducción agallamiento y reproducción | Al-Rehiyani <i>et al.</i> , 1999; Oliveira <i>et al.</i> , 2007; Padgham y Sikora, 2007; El-Hadad <i>et al.</i> , 2010; Huang <i>et al.</i> , 2010; |
| <i>Bacillus pumilus</i> | Inhibición eclosión de huevos Producción de metabolitos nematocidas Reducción agallamiento y reproducción | Oliveira <i>et al.</i> , 2007; Siddiqui <i>et al.</i> , 2007; Akhtar y Siddiqui, 2008b |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Reducción agallamiento y reproducción | Hoffmann-Hergarten <i>et al.</i> , 1998; De Araujo y Marchesi, 2009 |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> | Producción de metabolitos nematocidas Reducción agallamiento y reproducción | Chen <i>et al.</i> , 2000; Khyami-Horani <i>et al.</i> , 2003; Oliveira <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Enterobacter asburiae</i> | Producción de metabolitos nematocidas | Oliveira <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | Producción de metabolitos nematocidas | Oliveira <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Paenibacillus illinoisensis</i> | Inhibición eclosión de huevos | Jung <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Paenibacillus lentimorbus</i> | Reducción agallamiento y reproducción | Son <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Paenibacillus macerans</i> | Producción de metabolitos nematocidas | Oliveira <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Paenibacillus polymyxa</i> | Inhibición eclosión de huevos Producción de metabolitos nematocidas Reducción agallamiento y reproducción | Son <i>et al.</i> , 2009; El-Hadad <i>et al.</i> , 2010; Siddiqui <i>et al.</i> , 2007; Khan <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Producción de metabolitos nematocidas Reducción agallamiento y reproducción | Ali <i>et al.</i> , 2002; Siddiqui y Ehteshamul-Haque, 2001 |
| <i>Pseudomonas alcaligenes</i> | Inhibición eclosión de huevos Reducción agallamiento y reproducción | Siddiqui <i>et al.</i> , 2007; Akhtar y Siddiqui, 2008b |
| <i>Pseudomonas chlororaphis</i> | Producción de metabolitos nematocidas | Lee <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | Reducción agallamiento y reproducción | Aalten <i>et al.</i> , 1998; Siddiqui y Mahmood, 1998; Siddiqui y Mahmood, 2001; Siddiqui <i>et al.</i> , 2001; Siddiqui, 2004 |
| <i>Pseudomonas oryzihabitans</i> | Reducción agallamiento y reproducción | Vagelas <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Pseudomonas putida</i> | Inhibición eclosión de huevos Reducción agallamiento y reproducción | Aalten <i>et al.</i> , 1998; Siddiqui <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Pseudomonas straita</i> | Reducción agallamiento y reproducción | Siddiqui y Sing, 2005; Akhtar y Siddiqui, 2008a |
| <i>Rhizobium</i> sp. | Inhibición eclosión de huevos Reducción agallamiento y reproducción | Siddiqui y Mahmood, 2001; Siddiqui y Sing, 2005; Siddiqui <i>et al.</i> , 2007; Akhtar y Siddiqui, 2008a |

3.2.10.2. *Pasteuria penetrans*

Las especies del género *Pasteuria* son bacterias Gram-positivas, formadoras de endosporas y parásitos obligados, asociadas únicamente con hospedadores invertebrados (Sayre, 1993). Están ampliamente distribuidas en el mundo y parasitan a más de 300 hospedadores pertenecientes a 117 géneros de invertebrados y nemátodos (Atibalentja *et al.*, 2004). Se han descrito varias especies de *Pasteuria* que se diferencian por la preferencia de hospedador, sus características de desarrollo y la talla y forma del esporangio y endosporas. *Pasteuria ramosa* Metchnikoff parasita las pulgas de agua del género *Daphnia* (Ebert *et al.*, 1996). Otras especies son parásitas de nemátodos, *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre y Starr de *Meloidogyne* spp., *Pasteuria thornei* Sayre y Starr de *Pratylenchus* spp. y *Pasteuria nishizawae* Sayre de *Heterodera* spp. y *Globodera* spp. (Sayre y Starr, 1989).

La especie más estudiada como agente de control biológico de nemátodos ha sido *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre y Starr, ya que es un hiperparásito obligado de *Meloidogyne* (Tzortzakakis *et al.*, 1997; Chen y Dickson, 1998; Davies, 2005; Davies, 2009). Las endosporas de *P. penetrans* se adhieren a la cutícula de los estadios juveniles del nemátodo (J2s), cuando estos se mueven a través del suelo. Cuando los J2s penetran en la raíz de la planta y comienzan a alimentarse, los ciclos de vida del nemátodo y de la bacteria se acoplan, de forma que el desarrollo del nemátodo, desde J2 a adulto, coincide con la multiplicación de la bacteria en el interior del cuerpo del nemátodo y la formación de millones de nuevas endosporas. El ciclo de vida se completa en aproximadamente 35 días a 30° C (Stirling, 1981). Alrededor de 2×10^6 endosporas maduras son liberadas cuando un nemátodo hembra se rompe, cerrando así su ciclo biológico. De esta forma una única planta podría liberar 10^7 - 10^8 endosporas al suelo (Preston *et al.*, 2003; Darban *et al.*, 2004).

Las bases para su potencial como agente de control biológico descansan en el hecho de que la multiplicación de la bacteria se produce dentro del pseudoceloma de los nemátodos infectados, lo que ocasiona la mortalidad de adultos y una pérdida de fecundidad de los supervivientes. Además, la movilidad de los juveniles y su capacidad de penetración en las raíces también se reduce cuando el número de esporas adheridas a un juvenil es superior a 20, por lo que su capacidad de infestación disminuye (Stirling, 1984; Darban *et al.*, 2005a, b). Diversos factores abióticos como la temperatura (Stirling, 1981; Hatz y Dickson, 1992; Ko *et al.*, 1995; Giannakou *et al.*, 1999), el riego (Davies *et al.*, 1991; Dabiré *et al.*, 2007) y el pH, composición iónica y textura del suelo (Davies *et al.*, 1988;

Ahmed, 1990; Afolabi *et al.*, 1995; Mateille *et al.*, 1995; Orui, 1997; Dabiré y Mateille, 2004) influyen decisivamente en el desarrollo bacteriano (Spaull, 1984; Davies *et al.*, 1990; Oostendorp *et al.*, 1990; Mateille *et al.*, 1995), la producción de esporas y la habilidad de éstas para dispersarse, adherirse e infectar a los juveniles de *Meloidogyne* (Stirling *et al.*, 1990; Chen y Dickson, 1997, 1998). La razón por la que *Pasteuria* no requiere nutrientes del suelo podría explicarse porque, la bacteria sobrevive en el suelo como estructura de resistencia (Williams *et al.*, 1989; Bird *et al.*, 1990). Paralelamente, el parásito posee una gran ventaja sobre los nematocidas y es la posibilidad de incrementar la densidad de esporas sin coste adicional. El aumento de esporas en el suelo ocurre de forma natural, por la desintegración de hembras infectadas, o artificialmente, tras la incorporación de raíces secas pulverizadas al final de cada ciclo de cultivo (Tzortzakakis *et al.*, 1997).

Sin embargo, el carácter de parásito obligado de *P. penetrans* puede limitar su aplicabilidad ya que, por una parte mantiene una relación densidad-dependiente con su nemátodo hospedador (Verdejo-Lucas, 1992; Ciancio, 1995), por lo que la dependencia de un número mínimo de nemátodos para su supervivencia puede restarle eficacia como método de control y, por otra, la imposibilidad de cultivarla *in vitro*, fuera de su nemátodo hospedador, dificulta su producción a escala comercial.

Stirling y Wachtel (1980) desarrollaron un método de producción *in vivo* en plantas de tomate infectadas con la bacteria y el nemátodo, en el que las raíces de las mismas se dejan secar al aire y se pulverizan, utilizando ese polvo como inóculo bacteriano. Las esporas así producidas mantienen su virulencia para el nemátodo en situaciones de campo (Stirling, 1984; Tzortzakakis *et al.*, 1999). No obstante, el método es demasiado caro para la producción de endosporas de la bacteria a gran escala. Actualmente, *P. penetrans* aún no ha sido producida en masa *in vitro*, aunque se ha conseguido la reproducción *in vitro* de otras especies de *Pasteuria* por Pasteuria Bioscience (Hewlett *et al.* 2009).

3.2.10.3. Hongos antagonistas de nemátodos

Más de 60 géneros y 170 especies de hongos del suelo han sido asociados a nemátodos parásitos de plantas (Siddiqui y Mahmood, 1996), pero sólo unos pocos reúnen las características deseables para ser considerados como posibles agentes de control biológico (Tabla 5) (Kim y Riggs, 1992):

- a) Altamente antagonistas de las poblaciones de nemátodos fitoparásitos objetivo.
- b) Inocuos para plantas y otros animales no objetivo de biocontrol.
- c) Cultivables en medios artificiales.
- d) Que crezcan en rangos de pH y temperatura próximos a los del suelo.
- e) Identificables y con mecanismos de acción conocidos.
- f) Posibilidad de ser producidos masivamente para su comercialización.

Tabla 5. Efectos de diversos hongos del suelo sobre enfermedades causadas por *Meloidogyne* spp.

| Hongo | Efecto | Referencia |
|-----------------------------------|---|---|
| <i>Acremonium strictum</i> | Parasitismo de huevos Producción de metabolitos nematocidas Reducción agallamiento y reproducción | Goswami <i>et al.</i> , 2008 Singh y Mathur, 2010a Singh y Mathur, 2010b |
| <i>Arthrobotrys dactyloides</i> | Parasitismo de formas móviles | Stirling y Smith, 1998 |
| <i>Aspergillus niger</i> | Inhibición eclosión de huevos Producción de metabolitos nematocidas | Siddiqui y Akhtar, 2009b |
| <i>Aspergillus terreus</i> | Reducción agallamiento y reproducción | Singh y Mathur, 2010b |
| <i>Dactylella oviparasitica</i> | Parasitismo de huevos y adultos | Olatinwo <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | Inducción de resistencia en planta | Adekunle y Akinsanmi, 2005; Sikora <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Monacrosporium lysipagum</i> | Reducción agallamiento y reproducción | Khan <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Muscodora albus</i> | Producción de metabolitos nematocidas | Riga <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Myrothecium verrucaria</i> | Producción de metabolitos nematocidas | Twomey <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Paecilomyces lilacinus</i> | Parasitismo de huevos Producción de metabolitos nematocidas | Hewlett <i>et al.</i> , 1988; Kiewnick y Sikora, 2006 |
| <i>Pochonia chlamydosporia</i> | Parasitismo de huevos Producción de metabolitos nematocidas | Stirling y Smith, 1998; Sorribas <i>et al.</i> , 2003; Verdejo-Lucas <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> | Producción de metabolitos nematocidas | Kwok <i>et al.</i> 1992 |
| <i>Sclerotium rolfsii</i> | Inducción de resistencia en planta | Adekunle y Akinsanmi, 2005 |
| <i>Trichoderma asperellum</i> | Reducción agallamiento y reproducción | Affokpon <i>et al.</i> , 2011a |
| <i>Trichoderma brevicompactum</i> | Reducción agallamiento y reproducción | Affokpon <i>et al.</i> , 2011a |
| <i>Trichoderma harzianum</i> | Parasitismo de huevos y juveniles Producción de metabolitos nematocidas Reducción agallamiento y reproducción | Goswami <i>et al.</i> , 2008; Sahebani y Hadavi, 2008; Sharon <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>Trichoderma pseudokoningii</i> | Producción de metabolitos nematocidas | Chen <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Verticillium leptobactrum</i> | Parasitismo de huevos y juveniles | Regaieg <i>et al.</i> , 2011 |

Según su mecanismo de acción (Stirling y Smith, 1998; Kiewnick y Sikora, 2006) se pueden agrupar en cuatro tipos:

- a) Productores de toxinas o enzimas nematocidas. *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) Qué. produce una toxina que inmoviliza a los nemátodos (Kwok *et al.*, 1992); y en otros hongos se ha descrito la producción de quitinasas y otras enzimas capaces de digerir la cutícula de los huevos de nemátodos (Gortari y Hours, 2008).

- b) Atrapadores de nemátodos. Capturan nemátodos vermiformes mediante órganos especiales que se forman en las hifas, como trampas adhesivas o anillos constrictores. *Arthrobotrys* y *Monacrosporium* (Stirling y Smith, 1998; Khan *et al.*, 2006).
- c) Endoparásitos. Utilizan sus esporas para infectar el interior de los nemátodos. Estas esporas pueden ser móviles, como las zoosporas de *Catenaria anguillulae* Sorokin, o inmóviles y adhesivas como los conidios de *Drechmeria coniospora* (Drechsler) Gams y Jansson o *Hirsutella rhossiliensis* Minter y Brady.
- d) Parásitos de huevos y formas sedentarias como *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson y *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Gams y Zare.

Entre todos ellos, *P. lilacinus*, *P. chlamydosporia* y varias especies del género *Trichoderma* han sido los más frecuentemente citados y estudiados como antagonistas de nemátodos fitoparásitos.

P. lilacinus es un hongo saprófito, filamentoso y habitante común del suelo, que ha mostrado prometedores resultados como agente efectivo de biocontrol (Olivares-Bernabeu y López-Llorca, 2002; Khan *et al.*, 2006; Rumbos *et al.*, 2006), ya que es un parásito facultativo de huevos de nemátodos y, en ocasiones, es capaz de infectar estados móviles o sedentarios de los nemátodos agalladores de las raíces (Cannayane y Sivakumar, 2001). Las esporas del hongo se adhieren a la cutícula de los estados vermiformes de los nemátodos cuando estos migran a través del suelo, resultando posteriormente en hembras infectadas, que tienen una reproducción escasa o nula y mueren finalmente ya que, el hongo se alimenta del contenido del cuerpo del nemátodo. Se cultiva fácilmente *in vitro*, es un buen competidor de la rizosfera y ataca los huevos de diferentes especies de nemátodos. Presenta como principales limitaciones para uso en control biológico que requiere altas temperaturas del suelo y la aplicación de un alto número de propágulos (10^6 por g de suelo) para un control de nemátodos fitoparásitos (Mendoza *et al.*, 2007). Además, recientemente ha sido citado como el agente causal de un tipo de queratitis en humanos (Malecha *et al.*, 2006). Está siendo particularmente estudiada la raza 251, para la cual ya existe una formulación comercial disponible (Kiewnick, 2004; Brand *et al.*, 2004), cuya especificidad de hospedador es baja. Se puede usar antes de la siembra, en el trasplante o una vez que el cultivo está establecido. Actualmente está comercialmente disponible en distintos países como Australia, Colombia, Alemania o Suráfrica y, recientemente, en España.

P. chlamydosporia es un parásito facultativo de huevos de nemátodos, que ha sido considerado como potencial agente de control biológico de nemátodos formadores de agallas. Tiene como ventajas que crece fácilmente *in vitro* y produce esporas de resistencia que sobreviven en suelo durante una temporada del cultivo. Tiene como limitaciones que los tratamientos de semillas son inefectivos y que su eficacia depende de las densidades de nemátodos y de la planta hospedante (Kerry y Crump, 1998; Verdejo-Lucas *et al.*, 2003). Los aislados de *P. chlamydosporia*, incluso aquellos provenientes de un mismo suelo, deben ser cuidadosamente seleccionados ya que, estos pueden diferir marcadamente en su crecimiento, esporulación *in vitro*, virulencia, competitividad saprofita y competencia en la rizosfera. Solo aquellos aislados que sean capaces de crecer en la rizosfera de las plantas seleccionadas, producir clamidosporas e infectar huevos de nemátodos son capaces de controlar poblaciones de nemátodos formadores de agallas (Sorribas *et al.*, 2003).

Las especies del género *Trichoderma* son hongos micófagos facultativos y no patógenos de plantas que se encuentran distribuidos a nivel mundial, especialmente en hábitats con un alto contenido de materia orgánica o desechos vegetales en descomposición. *Trichoderma* se utiliza para el control de un amplio número de patógenos del suelo dada su versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación (Dababat y Sikora, 2007; Affokpon *et al.*, 2011a). Para conseguir una efectividad en el control de patógenos es necesario que la especie de *Trichoderma* seleccionada colonice el sustrato en primer lugar, o al mismo tiempo que el patógeno, ya que estos hongos desarrollan lo que se conoce como "nicho ecológico", por lo que es muy difícil que otro organismo patógeno puede colonizar la misma porción de suelo (Howell, 2003). Así mismo, *Trichoderma* también es capaz de estimular el crecimiento vegetal. La respuesta de crecimiento de las plantas causada por este hongo depende de su habilidad para sobrevivir y desarrollarse en la rizosfera (Kleifeld y Chet, 1992), siendo un posible mecanismo para el incremento del crecimiento vegetal la estimulación de la transferencia de nutrientes desde suelo a la raíz. La estimulación del crecimiento y la productividad debida a *Trichoderma* podría parecer contraproducente, ya que simultáneamente inducen resistencia en planta lo cual es energéticamente muy caro para ésta. Sin embargo, muchos hongos inductores de resistencia incrementan tanto el crecimiento de la parte aérea como del sistema radical (Harman *et al.*, 2004).

La especie *Trichoderma harzianum* Rifai ha sido estudiada y utilizada como fungicida biológico en agricultura (Mohandas *et al.*, 2010; Srivastava *et al.*, 2010), además estimula el

crecimiento en las plantas y se ha citado para biocontrol de nemátodos por su rápido crecimiento y abundante producción de conidios (Pandey *et al.*, 2003; Dababat y Sikora, 2007; Goswami y Tiwari, 2007; Goswami *et al.*, 2008). Los principales mecanismos de acción sugeridos para desplazar al fitopatógeno son parasitismo, hidrólisis enzimática, antibiosis y la destacada característica de competencia rizosférica directa por espacio y nutrientes (Harman *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2004). De ellos todos, excepto la competencia, pueden estar potencialmente involucrados en el proceso de biocontrol de los nemátodos ya que este hongo no penetra en las raíces (Sharon *et al.*, 2001), aunque es capaz de colonizar la superficie de la raíz causando cambios en el metabolismo vegetal e induciendo una respuesta de resistencia localizada o sistémica (Martínez-Medina *et al.*, 2009). En el caso particular de control de nemátodos fitoparásitos, *T. harzianum* exhibe la capacidad de envolver al nemátodo en micelio y producir metabolitos que actúan como nematicidas. También secreta enzimas, fitohormonas, vitaminas (que estimulan el crecimiento radical), produce antibióticos y solubiliza nutrientes aumentando su disponibilidad para la planta. Esta colonización radicular por el hongo, frecuentemente, estimula el crecimiento de la raíz, el ingreso y uso de nutrientes, la resistencia al estrés y la productividad del cultivo (Rey *et al.*, 2000; Howell, 2003; Harman *et al.*, 2004; Pocasangre *et al.*, 2004).

3.2.10.4. Hongos formadores de micorrizas arbusculares (AMF)

Los hongos formadores de micorrizas constituyen una parte esencial de los ecosistemas agrarios ya que, forman simbiosis mutualistas con más del 80% de las plantas vasculares terrestres, incluyendo cultivos herbáceos, arbustos y árboles. Estas simbiosis estimulan el crecimiento de la planta hospedadora, a través de la modificación física y/o química de la rizosfera, lo cual se traduce en una mayor disponibilidad de nutrientes, especialmente fósforo y zinc, y mayor tolerancia al estrés (Cantrell y Linderman, 2001). Según su estructura y relaciones morfológicas con la planta hospedadora se distinguen endomicorrizas y ectomicorrizas, y dentro de las primeras las más importantes en agricultura son las que al colonizar la raíz vegetal, desarrollan unas estructuras características (vesículas y arbusculos) que les dan el nombre de hongos formadores de micorrizas arbusculares (AMF) (Mitchell, 1993; Smith y Read, 2008). Los AMFs presentan alrededor de 150 especies conocidas (Brussaard *et al.*, 2001), distribuidas en 7 géneros, de los cuales *Glomus* es el más extendido con alrededor de 90 especies.

Los AMFs participan también en numerosas interacciones con otros organismos del suelo (Barea *et al.*, 1996; Facelli *et al.*, 2009) y se han citado efectos protectores de la micorrización frente a diversos fitopatógenos (Azcón-Aguilar y Barea, 1996; Linderman, 2000; Ryan *et al.*, 2003; Demir y Akkopru, 2005), entre ellos nemátodos del género *Meloidogyne* (Tabla 6) (Gera-Hol y Cook, 2005). Aunque en la mayoría de estudios, en el caso de las enfermedades causadas por *Meloidogyne*, se ha descrito una reducción del agallamiento y de la reproducción del nemátodo asociada a la micorrización, los niveles de colonización de la raíces por AMFs no se correlacionan siempre con la capacidad de protección biológica por lo que, el grado de protección ofrecido por la simbiosis micorriza-planta hospedadora frente a nemátodos presenta una gran variabilidad que depende de la especie y cultivar de la planta cultivada, hongos micorrícicos y nemátodos, así como de las condiciones de cultivo y ambientales (Azcón-Aguilar *et al.*, 2002).

Tabla 6. Efectos de diversas especies de AMF sobre enfermedades causadas por *Meloidogyne* spp.

| AMF | Efecto | Referencias |
|----------------------------|---|--|
| <i>Acaulospora laevis</i> | Reducción agallamiento y reproducción | Nagesh <i>et al.</i> , 1999b; Labeena <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Gigaspora margarita</i> | Reducción agallamiento y reproducción | Cofcewicz <i>et al.</i> , 2001; Labeena <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Glomus aggregatum</i> | Menor severidad de los síntomas en planta Reducción agallamiento y reproducción | Habte <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>Glomus caledonium</i> | Menor severidad de los síntomas en planta Reducción agallamiento y reproducción | Elsen <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Glomus coronatum</i> | Reducción agallamiento y reproducción | Diedhiou <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Glomus deserticola</i> | Menor severidad de los síntomas en planta Reducción agallamiento y reproducción | Rao <i>et al.</i> , 1997a; Rao y Gowen, 1998; |
| <i>Glomus etunicatum</i> | Reducción agallamiento y reproducción | Bhagawati <i>et al.</i> , 2000; Cofcewicz <i>et al.</i> , 2001; Waceke <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>Glomus intraradices</i> | Menor severidad de los síntomas en planta Reducción de la penetración en raíces Reducción agallamiento y reproducción | Pinochet <i>et al.</i> , 1997; Habte <i>et al.</i> , 1999; Jothi y Sundarababu, 2000; Calvet <i>et al.</i> , 2001b; Zhang <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Glomus fasciculatum</i> | Menor severidad de los síntomas en planta Reducción agallamiento y reproducción | Mishra y Shukla, 1997; Nagesh <i>et al.</i> , 1999a; Labeena <i>et al.</i> , 2002; Rao <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Glomus fulvum</i> | Menor severidad de los síntomas en planta | Jothi y Sundarababu, 2000 |
| <i>Glomus macrocarpum</i> | Menor severidad de los síntomas en planta Reducción agallamiento y reproducción | Elsen <i>et al.</i> , 2002; Labeena <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Glomus mosseae</i> | Menor severidad de los síntomas en planta Reducción agallamiento y reproducción | Jaizme-Vega <i>et al.</i> , 1997; Nagesh y Reddy, 1997; Reddy <i>et al.</i> , 1998; Habte <i>et al.</i> , 1999; Bhat y Mahmood, 2000; Jothi y Sundarababu, 2000; Talavera <i>et al.</i> , 2001; Elsen <i>et al.</i> , 2002; Affokpon <i>et al.</i> , 2011b |

En particular, las especies *Glomus fasciculatum* (Thaxt.) Gerd. y Trappe, *Glomus intraradices* Schenck y Smith y *Glomus mosseae* (Nicol. y Gerd.) Gerd. y Trappe han sido los más frecuentemente citados y estudiados como antagonistas de nemátodos fitoparásitos.

En cuanto a los mecanismos que participan en esta protección biológica, aún no están totalmente caracterizados. Azcón-Aguilar *et al.* 2002 argumentan que, la “protección biológica” efectiva contra los patógenos de la raíz, concedida por los AMFs, es probablemente consecuencia de varios mecanismos indirectos ya que, los AMFs no interactúan directamente con los patógenos a través de antagonismo, antibiosis o parasitismo. En la literatura, Azcón-Aguilar y Barea (1996) y Harrier y Watson (2004) proponen varios mecanismos:

- a) Compensación del daño por el mejor estado nutricional del hospedador.
- b) Cambios anatómicos y morfológicos del sistema radicular que dificultan la penetración del patógeno.
- c) Competición por los sitios de colonización e infestación.
- d) Competición por los fotosintatos.
- e) Deposición en la rizosfera de metabolitos nematocidas y nematostáticos.
- f) Cambios en las poblaciones microbianas del suelo.
- g) Activación de la respuesta de defensa de la planta. Resistencia inducida.

3.2.10.5. Interacciones entre microorganismos edáficos

En el medio natural los microorganismos del suelo no se relacionan con la planta y los nemátodos de una forma aislada, sino que se presentan simultáneamente y en continua interacción entre ellos y con el medio ambiente. Desde el punto de vista de la protección del cultivo frente a las enfermedades puede no haber interacción entre diferentes microorganismos, o bien resultar en efectos positivos (interacciones aditivas y sinérgicas) o negativos (interacciones antagónicas) (Meyer y Roberts, 2002). En principio sería razonable pensar que, organismos que utilicen diferentes mecanismos de control (e.g. parasitismo de huevos *vs.* resistencia inducida) pudiesen mostrar efectos aditivos o sinérgicos (Siddiqui y Akhtar, 2009c). No obstante, y debido a que diferentes mecanismos de protección y control pueden ser influenciados de forma diferente por las condiciones medioambientales, es posible que bajo ciertas condiciones, un mecanismo pueda compensar otro de forma que se manifiesten como antagónicos (Guetsky *et al.*, 2002) (Tabla 7).

Tabla 7. Efectos de interacciones entre AMF, hongos antagonistas y bacterias del suelo sobre las enfermedades causadas por *Meloidogyne* spp.

| Microorganismos | Interacción | Referencias |
|---|--------------------|--|
| <i>Aspergillus</i> - <i>Pseudomonas</i> | positiva | Siddiqui <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Glomus</i> - <i>Bacillus</i> | nula o positiva | Akhtar y Siddiqui 2008b; Marulanda-Aguirre <i>et al.</i> , 2008; Jaizme-Vega <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Glomus</i> - <i>Fusarium</i> | nula | Diedhiou <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Glomus</i> - <i>Paecilomyces</i> | nula o positiva | Al-Raddad, 1995; Rao <i>et al.</i> , 1998; Rumbos <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Glomus</i> - <i>Pasteuria</i> | positiva | Rao y Gowen, 1998; Talavera <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Glomus</i> - <i>Pochonia</i> | positiva | Rao <i>et al.</i> , 1997a |
| <i>Glomus</i> - <i>Pseudomonas</i> | positiva | Siddiqui y Mahmood, 1998; 2001; Akhtar y Siddiqui, 2008a; 2008b |
| <i>Glomus</i> - <i>Rhizobium</i> | positiva | Akhtar y Siddiqui, 2008a; Reimann <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Glomus</i> - <i>Trichoderma</i> | nula o negativa | Martínez <i>et al.</i> , 2004; Masadeh <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Paecilomyces</i> - <i>Bacillus</i> | positiva | Siddiqui y Mahmood, 1993; Anastasiadis <i>et al.</i> , 2008; Siddiqui y Akhtar 2009c |
| <i>Paecilomyces</i> - Cianobacterias | negativa | Hashem y Abo-Elyousr, 2011 |
| <i>Paecilomyces</i> - <i>Monacrosporium</i> | positiva | Khan <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Paecilomyces</i> - <i>Pseudomonas</i> | nula positiva | Siddiqui <i>et al.</i> , 2000; Siddiqui y Akhtar, 2008b; 2009a; Hashem y Abo-Elyousr, 2011 |
| <i>Paecilomyces</i> - <i>Pasteuria</i> | positiva | Dube y Smant, 1987 |
| <i>Pochonia</i> - <i>Bacillus</i> | positiva | Siddiqui y Akhtar, 2009c |
| <i>Pochonia</i> - <i>Pseudomonas</i> | positiva | Siddiqui y Akhtar, 2008b; 2009a |
| <i>Pseudomonas</i> - Cianobacterias | negativa | Hashem y Abo-Elyousr, 2011 |
| <i>Pseudomonas</i> - <i>Fusarium</i> | negativa | Siddiqui y Shaukat, 2003b |
| <i>Pseudomonas</i> - <i>Pasteuria</i> | positiva | Duponnois <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>Trichoderma</i> - <i>Acremonium</i> | positiva | Goswami <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Trichoderma</i> - <i>Bacillus</i> | positiva | Siddiqui y Akhtar, 2009c |
| <i>Trichoderma</i> - <i>Pseudomonas</i> | positiva | Siddiqui y Shaukat, 2004b; Siddiqui y Akhtar, 2008b, 2009a |

3.3. MEDIDAS POST-PLANTACIÓN

Una vez que el cultivo está infestado, no existen métodos para una eliminación total de nemátodos. Por tanto, estas medidas son de tipo paliativo, y los esfuerzos van dirigidos a minimizar las pérdidas y disminuir las poblaciones finales de nemátodos en suelo.

3.3.1. FERTILIZACIÓN Y NUTRICIÓN VEGETAL

Una correcta fertilización y riego pueden compensar parcialmente la pérdida en absorción de nutrientes causadas por los nemátodos e incluso reducir las poblaciones de nemátodos fitoparásitos (Pettigrew, 2003). Algunos productos comerciales, que contienen mezclas de nutrientes, hacen uso de este efecto compensador para anunciarse como efectivos frente a las enfermedades causadas por los nemátodos, como son Nematem[®] y Nematmyel[®].

3.3.2. APLICACIÓN DE NEMATICIDAS DURANTE EL CULTIVO

Algunos nematicidas tienen permitido su uso durante el cultivo, al no presentar graves efectos fitotóxicos. No obstante, su incorporación a la planta, en caso de que presenten efectos sistémicos, limita su uso ya que, los productos agrícolas cosechados pueden presentar residuos peligrosos para la salud del consumidor. Por ello se establecen los plazos de seguridad que garantizan que, en el momento de la cosecha del fruto, los niveles de residuos se encuentren por debajo de unos límites permitidos. Actualmente se permiten en España tres nematicidas durante el cultivo, aunque a efectos prácticos, debido a los extensos plazos de seguridad, su uso queda limitado a la aplicación en pre-plantación en muchos cultivos hortícolas (Tabla 8).

Tabla 8. Nematicidas permitidos en España durante el cultivo.

| Principio activo | Nombres comerciales | Plazo de seguridad |
|------------------|---|--------------------|
| Etoprofos | Sanimul [®] , Mocap [®] | 7-60 días |
| Fenamifos | Nemacur [®] | 60días |
| Oxamilo | Vydate [®] | 14-90 días |

Fuente: Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, 2010

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Los nemátodos parásitos de plantas causan importantes pérdidas de producción en cultivos hortícolas, industriales, ornamentales y frutales en Andalucía. La prohibición de los nematicidas fumigantes y las restricciones en el uso de otros nematicidas, consecuencia de la nueva legislación europea y nacional, ha planteado un nuevo escenario en el que el control y manejo de las enfermedades inducidas por nemátodos fitoparásitos no presenta una opción clara, como hasta ahora era la desinfección química del suelo.

A pesar de la relevancia de las enfermedades causadas por nemátodos y el actual debate sobre las alternativas para desinfección de suelos, aún no se ha realizado una evaluación científica del estado nematológico de los cultivos hortícolas protegidos en el sudeste andaluz, que permita conocer el estado fitosanitario de estos en relación a los nemátodos fitopatógenos, así como las medidas que técnicos agrícolas y agricultores utilizan actualmente para su control. Por ello, en este trabajo se pretende, en primer lugar, evaluar la incidencia de las enfermedades causadas por nemátodos fitoparásitos en la zona costera de la provincia de Almería mediante dos aproximaciones:

- a) Una encuesta entre técnicos encargados del estado fitosanitario de las explotaciones, a fin de conocer la importancia que los productores y técnicos de campo atribuyen a las enfermedades inducidas por nemátodos y, hasta qué punto creen que los métodos de control de nemátodos actualmente disponibles son eficaces.
- b) Un muestreo nematológico en campo, a fin de identificar los nemátodos fitoparásitos causantes de enfermedades en cultivos hortícolas protegidos, y su distribución en la zona costera de la provincia de Almería.

Por otra parte, la prohibición o limitación en el uso de fitosanitarios hace imprescindible el desarrollo de nuevos métodos de control de nemátodos fitopatógenos, que amplíen el abanico de métodos disponibles para el manejo de estas enfermedades en campo y permitan mantener los actuales estándares de calidad y producción. Además, cualquier nuevo método de control de fitopatógenos propuesto, debe adecuarse a los altos estándares de seguridad ambiental y sanitaria exigidos por las autoridades europeas, nacionales y autonómicas. En resumen, se necesitan métodos de control de nemátodos fitoparásitos eficaces, ambiental y sanitariamente seguros, sostenibles y viables económicamente y, por tanto, susceptibles de ser incluidos dentro de los protocolos de la agricultura integrada y/o ecológica. En este camino se encuentran la protección y el control

biológico ya que, minimizan la generación de residuos y efectos adversos para el medioambiente.

Aunque con los conocimientos existentes es difícil establecer la selección de un agente de control biológico que sea efectivo por sí sólo en la supresión o disminución de las densidades poblacionales de nemátodos, especialmente en el relativamente corto periodo de un ciclo reproductivo, el uso conjunto de varios microorganismos antagonistas, que utilicen estrategias biológicas diferentes frente a la enfermedad causada por *Meloidogyne* spp., puede permitir incrementar la eficacia general en el control de nemátodos y merece estudios más profundos e integrados, a fin de establecer las condiciones idóneas que permitan una reducción de la incidencia y/o severidad de las enfermedades causadas por *Meloidogyne* spp.

En este trabajo, se pretende evaluar la capacidad antagonista frente a nemátodos de varios microorganismos rizosféricos, a fin de identificar aquellos de mayor potencial para su utilización en programas de control biológico, teniendo en cuenta sus posibilidades de comercialización. Así como, comprobar si la utilización conjunta de agentes que inducen una resistencia general de la planta (efecto bioprotector sobre la planta) más agentes que parasiten a los nemátodos fitopatógenos reduciendo sus densidades en el suelo y, por tanto, su potencial patógeno (efecto de biocontrol sobre las poblaciones de nemátodos), proporciona una mayor efectividad en el control nematológico.

Por último, y en relación al control de las enfermedades causadas por *Meloidogyne* spp. a nivel de campo, se han realizado estudios de campo comparando el uso de la solarización del suelo en combinación con las enmiendas de gallinaza, con los métodos químicos para el control de estos patógenos en flor cortada, (clavel). Teniendo en cuenta la disponibilidad de esta enmienda orgánica en la zona de cultivo del clavel, por la presencia de un número suficiente de granjas de pollo de engorde o de gallinas ponedoras, nuestro objetivo en este trabajo fue comparar la efectividad de aplicaciones repetidas de este método orgánico con la fumigación química del suelo actual estándar usando 1,3-dicloropropeno + cloropicrina sobre las poblaciones de *Meloidogyne* en suelo, el desarrollo de las agallas radicales en el clavel, y valorar el efecto de ambos métodos sobre la incidencia de la enfermedad y la productividad en ensayos en campo.

OBJETIVOS

El objetivo finalista de este trabajo consiste en la búsqueda y ensayo de medidas de control nematológico, principalmente basadas en el control biológico, compatibles con la agricultura integrada y ecológica, en varios cultivos hortícolas y ornamentales protegidos bajo plásticos en condiciones controladas y de campo. Este objetivo se concreta en cuatro objetivos particulares:

1. Evaluar la incidencia y severidad de las enfermedades ocasionadas por nemátodos fitoparásitos, el porcentaje del área infestada y la eficacia de los métodos de control nematológico en áreas de cultivos hortícolas protegidos del sudeste español.
2. Investigar el efecto supresor de diversos microorganismos antagonistas y métodos alternativos de control frente a *M. incognita* en tomate.
 - 2.1. Evaluar el potencial antagonista y/o el efecto protector de los hongos formadores de micorrizas arbusculares *Glomus mosseae* y *Glomus intraradices* en cultivares de tomate frente a *M. incognita*.
 - 2.2. Evaluar el potencial antagonista y/o el efecto protector de las bacterias rizosféricas PGPR *Bacillus megaterium* y *Pseudomonas putida* en cultivares de tomate frente a *M. incognita*.
 - 2.3. Evaluar el potencial antagonista y/o el efecto protector de la bacteria *Pasteuria penetrans* en cultivares de tomate frente a *M. incognita*.
 - 2.4. Evaluar el potencial antagonista y/o el efecto protector del hongo *Trichoderma harzianum* en cultivares de tomate frente a *M. incognita*.
 - 2.5. Estimar los efectos de formulaciones comerciales a base de extractos vegetales y aceites esenciales en cultivares de tomate frente a *M. incognita*.
3. Identificar sinergias positivas entre microorganismos rizosféricos y otros métodos alternativos de control, en relación a la reducción de las poblaciones de nemátodos y al efecto protector sobre las plantas hospedadoras.
 - 3.1. Evaluar las posibles interacciones entre hongos formadores de micorrizas arbusculares (*G. intraradices* y *G. mosseae*) y la bacteria *Bacillus megaterium*.
 - 3.2. Evaluar las posibles interacciones entre hongos formadores de micorrizas arbusculares (*G. intraradices* y *G. mosseae*) y la bacteria *Pseudomonas putida*.

- 3.3. Evaluar las posibles interacciones entre hongos formadores de micorrizas arbusculares (*G. intraradices* y *G. mosseae*) y la bacteria *Pasteuria penetrans*.
 - 3.4. Evaluar las posibles interacciones entre hongos formadores de micorrizas arbusculares (*G. intraradices* y *G. mosseae*) y el hongo *Trichoderma harzianum*.
 - 3.5. Evaluar las posibles interacciones entre hongos formadores de micorrizas arbusculares (*G. intraradices* y *G. mosseae*) y extractos vegetales o aceites esenciales.
-
4. Ensayar la combinación de otros métodos alternativos de control, como son la solarización del suelo y la aplicación de una enmienda orgánica (estiércol de gallina), para el control de *Meloidogyne* en cultivos de clavel bajo plástico en condiciones de campo.

MATERIAL Y MÉTODOS GENERAL

1. TÉCNICAS NEMATOLÓGICAS BÁSICAS

A continuación se detallan las técnicas nematológicas básicas utilizadas de forma general en el conjunto de ensayos de esta tesis. No obstante, cada capítulo consta, además, de una sección propia de material y métodos en la que se explican las técnicas particulares realizadas para los ensayos correspondientes a ese capítulo.

1.1. EXTRACCIÓN DE NEMÁTODOS DEL SUELO

1.1.1. HOMOGENIZACIÓN DEL SUELO

Previamente a la extracción de los nemátodos presentes en las muestras de suelo, éstas deben tamizarse y homogenizarse en el laboratorio, como se describe a continuación:

1. Se rompen los terrones y grumos del suelo con cuidado, para evitar dañar algunos nemátodos que son bastante sensibles a la manipulación.
2. Se tamiza el suelo, sobre un plástico o bandeja, a través de un cedazo con apertura de malla entre 2 y 4 cm, para eliminar piedras y restos vegetales.
3. El suelo tamizado se mezcla y homogeniza mediante el procedimiento del cuarteo y montón. Para ello, se hace un montón con el suelo y se divide en 4 partes, que se mezclan en diagonal, es decir, la parte superior derecha con la parte inferior izquierda y la parte superior izquierda con la inferior derecha hasta formar un nuevo montón. Se repite el procedimiento entre 3 y 5 veces.
4. Se extiende la muestra de suelo sobre la superficie del plástico o bandeja y con una espátula o cuchara, se toman al azar, pequeñas porciones de suelo hasta completar en un recipiente la cantidad requerida para las submuestras, 250 o 500 cm³ de suelo, de las que se extraerán los nemátodos.

1.1.2. MÉTODO DE LAS BANDEJAS DE WHITEHEAD

(Whitehead y Hemming, 1965)

1. Se preparan tamices con malla metálica que sirvan de soporte a un filtro de celulosa de doble capa.
2. La muestra de suelo se esparce sobre el filtro de celulosa sostenido por el tamiz.

3. El tamiz con la muestra de suelo se encaja en una bandeja contenedora, de forma que su fondo quede sujeto a unos 0,5 cm del fondo de la bandeja.
4. Se añade agua a la bandeja hasta que el nivel de agua humedezca y cubra la capa de suelo.
5. Se deja el tamiz en la bandeja durante siete días, para permitir la migración de los nemátodos del suelo al agua a través del filtro de celulosa. Es preciso revisar el nivel de agua periódicamente, a fin de que el tamiz con el suelo esté siempre en contacto con el agua y evitar así la desecación de la muestra.
6. Al final del periodo establecido se levanta el tamiz y se deja escurrir sobre la bandeja.
7. Finalmente, se lava la suspensión de nemátodos contenida en la bandeja sobre un vaso de precipitado de 50 a 200 ml.
8. Se concentra la suspensión de nemátodos en un volumen de 2 a 10 ml para su posterior observación y recuento.
9. Los recuentos de nemátodos se realizan en placas de recuento, bajo la lupa binocular o el microscopio, y se expresan como número de nemátodos por 250 o 500 cm³ de suelo.

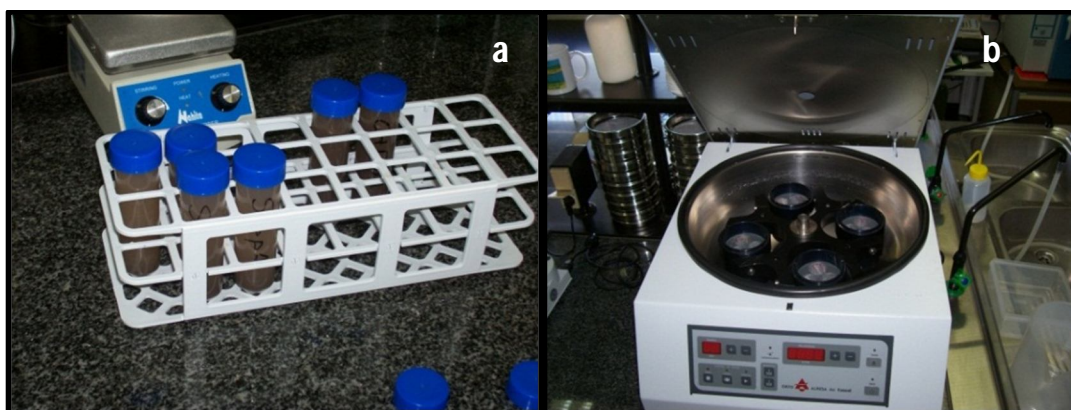
1.1.3. MÉTODO DE TAMIZADO, DECANTACIÓN Y CENTRIFUGACIÓN

(Cobb, 1918; Coolen, 1979)

1. La muestra de suelo mezclada, se suspende en un cubo (A) de 10 litros de capacidad con aproximadamente 6 l de agua.
2. Se agita la suspensión con una espátula para separar los nemátodos de las partículas del suelo, y se deja reposar durante 30 segundos para permitir que las partículas más grandes del suelo sedimenten.
3. A continuación se pasa toda la suspensión a través de un tamiz de 500 µm sobre otro cubo (B) y se descartan los restos y sedimentos que quedan en el cubo (A) y el material grueso que queda retenido en el tamiz de 500 µm ya que, todos los nemátodos deberían haber pasado a través del tamiz al cubo (B).
4. Se agita la suspensión contenida en el cubo (B) y se pasa lentamente por un tamiz de 50 µm de apertura de malla, sobre un cubo (C). Se rellena de nuevo el cubo (B) con agua y se repite esta operación dos veces más.

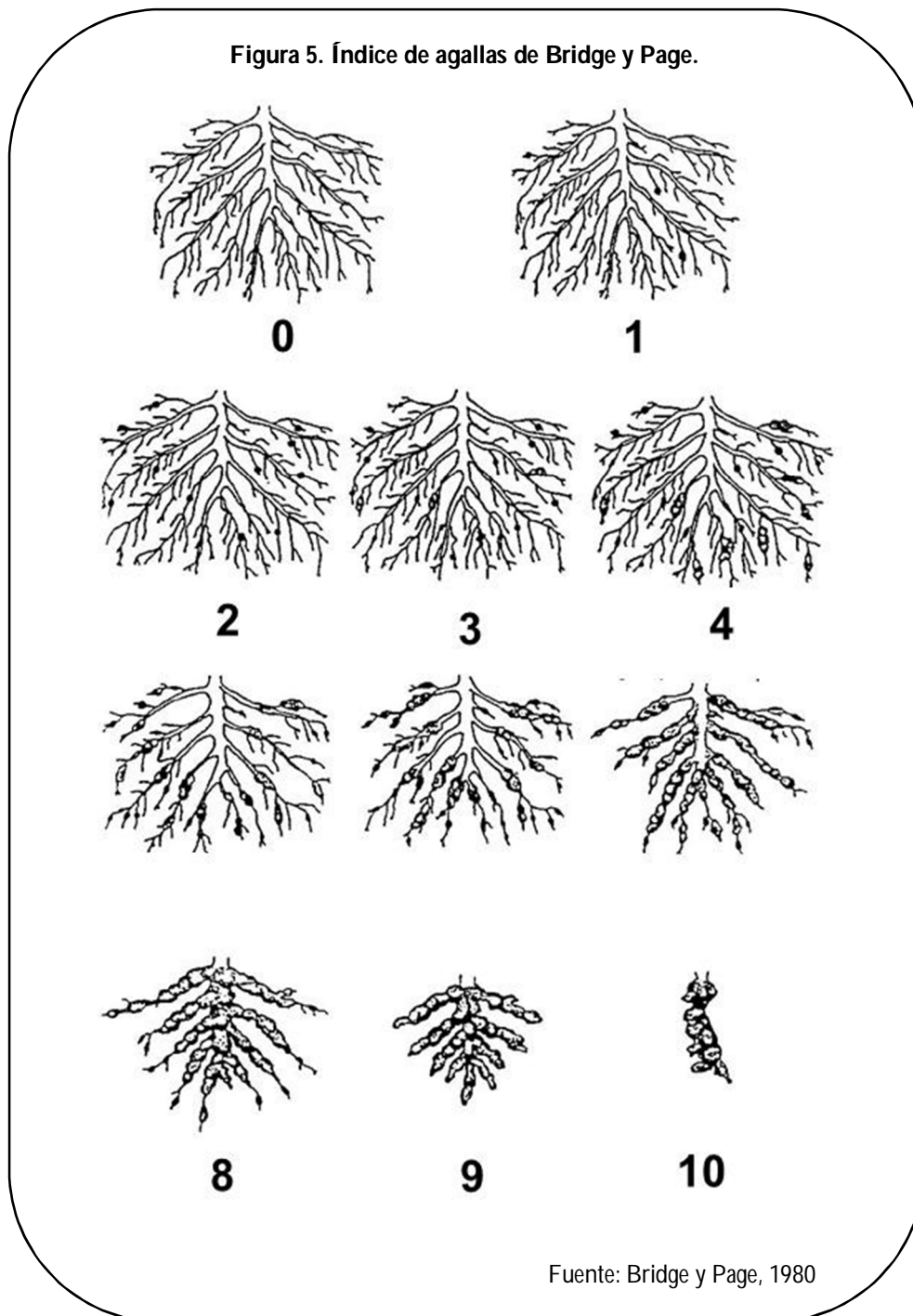
5. Los residuos retenidos en el tamiz se concentran en la parte inferior del tamiz, con la ayuda de un frasco lavador, y de ahí se enjuagan sobre tubos de centrifuga de 50 ml (Figura 4a).
6. Se agita la suspensión en los tubos de centrifuga y se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 4 minutos (Figura 4b). Los nemátodos quedan sedimentados en el fondo del tubo junto con el suelo; en el sobrenadante queda el agua y algunos restos orgánicos, que se eliminan decantando con cuidado.
7. Se añade una solución de $MgSO_4$ con densidad 1,18 g por l al mismo tubo que contiene los nemátodos y el suelo sedimentado, y se resuspende el sedimento, agitando el tubo enérgicamente.
8. Se centrifuga de nuevo a 3000 r.p.m. durante 4 minutos. Los nemátodos flotan ahora en la suspensión y las partículas de suelo se depositan en el fondo del tubo.
9. Se vierte el sobrenadante contenido en el tubo sobre un tamiz de 50 μm , con cuidado de no romper el pellet de sedimento.
10. Se recuperan los nemátodos lavando rápidamente el tamiz sobre un vaso de precipitado de 50 a 200 ml, para evitar que se plasmolice y deformen debido a la presión osmótica ejercida por las sales.
11. Se concentra la suspensión de nemátodos en un volumen de 2 a 10 ml para su posterior observación y recuento.
12. Los recuentos de nemátodos se realizan en placas de recuento, bajo la lupa binocular o el microscopio, y se expresan como número de nemátodos por 250 o 500 cm^3 de suelo.

Figura 4. Tubos de centrifuga con suspensiones de suelo (a). Centrifuga (b).



1.2. ESTIMACIÓN DEL ÍNDICE DE AGALLAS EN LAS RAÍCES

La severidad de los síntomas causados por *Meloidogyne* en el sistema radicular se estimó mediante la observación del índice de agallas en las raíces infestadas y en una escala de 0 a 10 (0: ninguna agalla; 7: 100% de las raíces presentan agallas; 10: no existe sistema radicular y la planta está muerta) (Figura 5) (Bridge y Page, 1980).



1.3. EXTRACCIÓN DE NEMÁTODOS DE LAS RAÍCES

Las densidades de población de nemátodos en raíces se estimaron en submuestras de 10 o 30 g de raíz, o en todo el sistema radicular cuando el peso era menor a 10 g, mediante el método de batida en solución de hipoclorito sódico (Hussey y Barker, 1973):

1. Las muestras de raíces se cortan en fragmentos de 1-2 cm de longitud y se mezclan cuidadosamente.
2. Las raíces cortadas y mezcladas se colocan en una batidora-licuadora, se agregan 200 ml de solución de hipoclorito sódico al 0,5% y se baten a la velocidad mínima del aparato, durante tres minutos.
3. Se baten de nuevo durante 30 segundos a la velocidad máxima. Se lavan las paredes de la licuadora y se baten durante 30 segundos más.
4. Se vierte la suspensión sobre 2 tamices superpuestos, colocando en la parte superior un tamiz de 150 μm de apertura de malla y en la inferior uno de 20 μm .
5. Se enjuagan los 2 tamices por separado. El material recolectado en el tamiz de 150 μm contiene la mayoría de las hembras, J3s y J4s, mientras que el recolectado en el tamiz de 20 μm contiene principalmente J2s y huevos.
6. Los adultos, juveniles y huevos de *Meloidogyne* se cuentan en placas de recuento y se expresa el resultado por g de raíz.

2. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

En los análisis estadísticos se utilizó el software Statistix 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA ©).

Se realizaron análisis estadísticos descriptivos y exploratorios, incluyendo distribuciones de frecuencia y el cálculo de la tendencia central y las medidas de dispersión, para las distintas variables analizadas.

Los efectos de los distintos factores sobre las variables analizadas y las comparaciones entre tratamientos se realizaron mediante análisis de la variancia paramétrico (ANOVA) o su equivalente no paramétrico (Kruskal-Wallis). Se aplicaron los test de Shapiro-Wilk y Levene para comprobar la normalidad y homocedasticidad de estas variables, respectivamente. Cuando resultaron significativos, los datos numéricos se transformaron mediante $\log(x+1)$ y los porcentajes mediante el arcoseno de la raíz cuadrada del

porcentaje, $\arcsen\sqrt{p}$, y los datos transformados volvieron a someterse a los test de Shapiro-Wilk y Levene. Se utilizaron test estadísticos paramétricos (ANOVA) siempre que se pudo comprobar la homocedasticidad de las variancias y la normalidad de la distribución de los datos, y también en casos de distribuciones no normales cuando el número de casos fue mayor de 50 ($n > 50$), siempre que existiese homocedasticidad entre las variancias. En el resto de los casos, se optó por un análisis de la variancia no paramétrico (Kruskal-Wallis).

Mediante ANOVA multifactorial, en los casos en que fue posible aplicarlo, se pudieron interpretar las interacciones entre factores, y si sus efectos correspondían sólo a la suma de los efectos de los factores principales o bien existía una interacción significativa entre ellos. Esto no fue posible en el caso de los análisis de Kruskal-Wallis, ya que se trata de un análisis de un solo factor (una vía), por lo que para cada factor principal se realizó un análisis de Kruskal-Wallis independiente. Los efectos de la combinación de los factores principales se analizaron considerando cada combinación de factores como un tratamiento individualizado, en sucesivos análisis de Kruskal-Wallis independientes (Thomas y Kiwanga, 1993).

Cuando los valores de la F obtenidos en los ANOVA resultaron significativos, las diferencias entre medias de los distintos grupos o tratamientos fueron comparadas mediante el procedimiento de comparaciones múltiples de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD). Cuando los valores del estadístico de H de Kruskal-Wallis resultaron significativos, las diferencias entre medianas de los distintos grupos o tratamientos fueron comparadas mediante el procedimiento de comparaciones múltiples basadas en el test de Mann-Whitney y la corrección de Bonferroni, para todas las parejas de medianas. Para todos los test se consideró significativo el valor de $P < 0,05$.

CAPÍTULO I

***EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA DE LAS ENFERMEDADES
CAUSADAS POR MELOIDOGYNE EN CULTIVOS HORTÍCOLAS
PROTEGIDOS DE ALMERÍA***

1. MATERIAL Y MÉTODOS

Se evaluó la incidencia de las enfermedades causadas por *Meloidogyne* spp., en la zona costera de la provincia de Almería mediante dos aproximaciones:


- a) Una encuesta entre los técnicos encargados del estado fitosanitario de las explotaciones, a fin de conocer la importancia que los productores atribuyen a las enfermedades inducidas por nemátodos y, hasta qué punto creen que los métodos de control de nemátodos actualmente disponibles son eficaces.
- b) Un muestreo nematológico en campo, a fin de identificar las especies de *Meloidogyne* causantes de enfermedades en cultivos hortícolas protegidos y su distribución.

1.1. ENCUESTA SOBRE PERCEPCIÓN DE LA INCIDENCIA DE *MELOIDOGYNE* SPP. EN LOS CULTIVOS HORTÍCOLAS PROTEGIDOS DE ALMERÍA

A finales del año 2010, se realizó una encuesta con entrevistas personales a técnicos encargados del manejo de enfermedades y plagas en cultivos hortícolas protegidos de dos áreas de la provincia de Almería, una al este, conocida localmente como “Levante”, y la otra al oeste, y conocida como “Poniente” (Figura 6). Antes de las entrevistas, se había distribuido un cuestionario entre estos técnicos con preguntas sobre las características agronómicas de las parcelas asesoradas, el impacto de los nemátodos fitoparásitos en el sistema productivo y el manejo de las enfermedades inducidas por estos (Figuras 7a y 7b).



Figura 7a. Cuestionario sobre incidencia de nemátodos fitoparásitos en cultivos hortícolas protegidos de Almería.



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y PESCA

INCIDENCIA DE NEMATODOS FITOPARÁSITOS EN CULTIVOS HORTÍCOLAS

I. INFORMACIÓN SOBRE PARCELAS ASESORADAS POR TÉCNICOS

- ¿Superficie total y número de parcelas asesoradas por usted?

| | |
|-------------------------|---------------------|
| Superficie total (has): | Número de parcelas: |
|-------------------------|---------------------|
- **Distribución territorial de dichas parcelas.** Poner una o varias cruces en las casillas correspondientes.

| | | |
|------------------|----------|-----------------------------|
| En un municipio. | Indicar: | Repartidas territorialmente |
| En una comarca. | Indicar: | |
- ¿Podría indicar en porcentajes, el tipo de producción en que se encuentran estas parcelas?

| | | |
|-----------------|--------------|--------------|
| Convencional: % | Integrada: % | Ecológica: % |
|-----------------|--------------|--------------|
- ¿Qué cultivos suelen tener en dichas parcelas? Poner una o varias cruces en las casillas correspondientes.

| | | | | |
|--------|-----------|----------|--------|----------------|
| Tomate | Berenjena | Pimiento | Judía | Otros Indicar: |
| Pepino | Calabacín | Melón | Sandía | |
- ¿Qué tipo de rotaciones son las más habituales?

| | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|
| 1ª más habitual | 2ª más habitual | 3ª más habitual |
| - | - | - |

II. IMPACTO DE LOS NEMATODOS EN EL SISTEMA PRODUCTIVO

- ¿Qué número de parcelas o porcentaje, de las que ud. asesora, cree que pueden estar infestadas por nemátodos?


| |
|------------------------------------|
| Número de parcelas infestadas: |
| Porcentaje de parcelas infestadas: |
- Como media dentro de una parcela ¿Qué porcentaje de la superficie del cultivo presenta síntomas de nemátodos?

| |
|---|
| Porcentaje de la superficie de cultivo infestada con nemátodos por parcela: % |
|---|
- ¿Podría valorar en porcentaje las pérdidas de producción que los nemátodos causan en las parcelas infestadas?

| |
|--|
| Porcentaje de pérdidas en producción causadas por nemátodos: % |
|--|
- ¿Ha observado un aumento o disminución de los problemas de nemátodos en los últimos 5 años? Poner una o varias cruces en las casillas correspondientes.

| |
|---|
| Disminuyen |
| Se mantienen estables |
| Aumentó el número de parcelas infestadas |
| Aumentó la intensidad de los ataques |
| Aumentó el tamaño de los rodales infestados |

Figura 7b. Cuestionario sobre incidencia de nemátodos fitoparásitos en cultivos hortícolas protegidos de Almería.



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
 CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y PESCA

INCIDENCIA DE NEMATODOS FITOPARÁSITOS EN CULTIVOS HORTÍCOLAS

III. MANEJO DE LAS ENFERMEDADES CAUSADAS POR NEMATODOS

- Indíquenos, por favor, los tratamientos más habituales que suelen aplicar para nemátodos fitoparásitos en el cultivo y su grado de satisfacción sobre su eficacia.

| Tratamientos contra nemátodos habituales en las parcelas asesoradas por Ud. | Muy satisfecho | Bastante satisfecho | Algo satisfecho | Poco satisfecho | Nada satisfecho |
|---|----------------|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Trat. 1: | | | | | |
| Trat. 2: | | | | | |
| Trat. 3: | | | | | |
| Trat. 4: | | | | | |
| Trat. 5: | | | | | |

- Por favor, puntúe según su experiencia, en una escala de 1 a 5 la eficacia de las siguientes alternativas para el tratamiento de los nemátodos: (1 = Nada eficaz, 5 = Completamente eficaz)

| Posibles tratamientos contra nemátodos | Opinión sobre su eficacia (de 1 a 5) |
|---|--------------------------------------|
| Fumigación del suelo con nematocidas <u>FLUMIGANTES</u> (Agrocelhone ®, Drafol-one ®, Enzone ®, Metam sodo ®, Telone ®, Telopic ®,...) | |
| Tratamientos con nematocidas <u>NO FLUMIGANTES</u> (Mocap ®, Nemacur ®, Sanim u ®, Vydate ®, ...) | |
| Solarización | |
| Biofumigación | |
| Biosolarización | |
| Variedades resistentes | |
| Injertos en patrones | |
| Productos biológicos y fertilizantes (micorrizas, aminoácidos, biorend,...) | |
| Otros. Indicar: | |

IV. ASESORAMIENTO EN CASO ENFERMEDADES CAUSADAS POR NEMATODOS

- Del total de su tiempo dedicado al asesoramiento en dichas parcelas, podrían estimar cuanto le dedica exclusivamente a nemátodos:

| Tiempo dedicado al asesoramiento en nemátodos | Nada | Muy poco | Poco | Bastante | Mucho |
|---|------|----------|------|----------|-------|
| | | | | | |

- ¿Podría valorar el asesoramiento o ayuda proporcionado por parte de la administración en temas relacionados con la lucha contra nemátodos? Poner una cruz en la casilla correspondiente.

| Asesoramiento sobre nemátodos | Muy extenso | Extenso | Suficiente | Insuficiente | Nulo |
|---|-------------|---------|------------|--------------|------|
| Colegios profesionales (ITA, Agrónomos,...) | | | | | |
| Consejería de Agricultura (Sanidad Vegetal) | | | | | |
| OPIs (Universidad, IFAPA, CSIC) | | | | | |
| Empresas y Almacenes de Fitosanitarios | | | | | |

- ¿Podría puntuar en una escala de 1 a 5 su nivel de satisfacción personal en su trabajo diario?

1.2. MUESTREO NEMATOLÓGICO EN LOS CULTIVOS HORTÍCOLAS PROTEGIDOS DE ALMERÍA

La caracterización de las poblaciones de *Meloidogyne*, presentes en el área de cultivos protegidos de Almería, se realizó mediante la toma de muestras de suelo y planta en 54 invernaderos seleccionados dentro de la región. Los campos a muestrear se seleccionaron con la ayuda de técnicos pertenecientes a cooperativas agrícolas y compañías fitosanitarias de la zona, tales como AgrupAlmeria, Agroiris, CASI, Casur, Consumomar, Eurosol, Las Hortichuelas, Koppert, Naturchoice y Naturfresh, en base a:

- a) Historial de problemas nematológicos.
- b) Parcelas características de producción hortícola protegida.
- c) Variedades vegetales representativas.
- d) Facilidad de acceso a los invernaderos.
- e) La buena disposición de los agricultores para participar en el estudio.

Los muestreos se llevaron a cabo desde Abril a Junio de 2010, un periodo elegido por sus condiciones más favorables para la detección nematológica (Talavera, 2011).

Las densidades de población de nemátodos en suelo se estimaron desde muestras compuestas de suelo recogidas con una pala alrededor de las raíces de 10 a 12 plantas infestadas de cada zona a estudiar. Los nemátodos se recuperaron de dos submuestras de 250 cm³ de suelo mezcladas para cada parcela, mediante el método de tamizado, decantación (Cobb, 1918) y posterior centrifugación en gradiente de MgSO₄ con densidad 1,18 g/l (Coolen, 1979) y se contaron en placas de recuento bajo la lupa binocular. El número de nemátodos en suelo se expresó como J2s por 250 cm³ de suelo.

Las raíces infestadas, de las mismas 10 a 12 plantas de cada parcela estudiada, se lavaron para eliminar los restos de suelo y se cortaron en segmentos de 1cm de longitud, mezclándose minuciosamente. Las densidades de población de nemátodos en las raíces se estimaron en submuestras de 10g de raíz, mediante la extracción de huevos por maceración y batida en una solución de hipoclorito sódico (NaOCl) al 0,5% durante 3 min (Hussey y Barker, 1973). Los huevos recogidos se contaron en placas de recuento bajo la lupa binocular y el resultado se expresó como el número de huevos por g de raíces.

La información sobre las variables ambientales, historiales del cultivo y uso de agroquímicos en cada parcela se obtuvo mediante entrevistas con los agricultores. Todas las parcelas fueron geolocalizadas mediante un dispositivo GPS (Garmin 60CSX).

Para la identificación de las especies de nemátodos agalladores de la raíz, se inocularon plantas de tomate susceptible cv. Roma en maceta, con una alícuota de la suspensión de huevos obtenida desde las raíces infestadas que se tomaron en los muestreos. Las plantas se mantuvieron en invernadero hasta la finalización de una generación de nemátodos. Las hembras se separaron de las raíces con la ayuda de un microscopio de disección. Se utilizaron un mínimo de 25 hembras de cada lugar para identificar las especies de nemátodos según su patrón perineal (Hartman y Sasser, 1985), de iso-esterasas (Dalmasso y Bergé, 1978; Esbenshade y Triantaphyllou, 1985) y/o SCAR-PCR (Zijlstra *et al.*, 2000).

1.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

En los análisis estadísticos se utilizó el software Statistix 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL ©). Tras la recopilación de la información de los cuestionarios y del estudio del muestreo de nemátodos, se realizaron análisis estadísticos descriptivos y exploratorios sobre las respuestas obtenidas, incluyendo distribuciones de frecuencia y el cálculo de la tendencia central y las medidas de dispersión para las variables:

- a) Porcentaje de campos infestados por nemátodos.
- b) Porcentaje medio del área dentro de un campo infestado por nemátodos.
- c) Porcentaje del área cultivada infestada por nemátodos.
- d) Porcentaje de pérdidas de productividad inducidas por nemátodos.
- e) Evolución de los problemas nematológicos en los últimos cinco años.
- f) Densidades de nemátodos en suelo y raíces.

Las relaciones entre estas variables cuantitativas y las variables cualitativas: comarca agraria, cultivo hospedador, historial de cultivos, tratamientos nematicidas y especies de *Meloidogyne* se analizaron mediante t-Student, test exacto de Fisher condicional para dos proporciones, Wilcoxon Rank Sum, ANOVA y Kruskal-Wallis, dependiendo del tipo de variable. Para todos los test se consideró significativo el valor de $P < 0,05$.

2. RESULTADOS

2.1. ENCUESTA SOBRE PERCEPCIÓN DE LA INCIDENCIA DE *MELOIDOGYNE* SPP. EN LOS CULTIVOS HORTÍCOLAS PROTEGIDOS DE ALMERÍA

El área media de superficie agrícola supervisada por cada técnico fue de $89,0 \pm 4,1$ ha (media \pm error estándar), distribuida en 109 ± 6 invernaderos cubiertos de plástico con una superficie media de aproximadamente 1 ha. En nuestro estudio, el 37,1% de los campos se localizaron en la zona de Levante y el 62,9% en la de Poniente. Los campos supervisados por cada técnico se localizaron principalmente dentro de una sola de las dos áreas (95,9% de los casos), mientras que sólo en el 4,1% de los casos los técnicos fueron responsables de fincas en las dos áreas de cultivo.

Tomando las dos áreas en conjunto, en la mayor parte de las parcelas se siguió el sistema de cultivo de producción integrada (60,5%), seguido por sistemas de producción convencional (34,7%) y de cultivo ecológico (4,7%). Sin embargo, comparando las dos áreas por separado se encontraron diferencias significativas ya que, en el área de Levante el 53,3% de los sitios se encuentran bajo producción convencional, a diferencia de Poniente, con sólo un 22,6% ($P = 0,0004$). Por el contrario, en el área de Levante el 35,0% de los invernaderos estaban en sistemas de producción integrada, mientras que en Poniente este porcentaje llegó al 75,6% ($P < 0,0001$). En relación al cultivo ecológico, no se encontraron diferencias significativas ($P = 0,0572$) Levante (9,7%) y Poniente un (1,8%).

El principal cultivo en la región, considerada en su conjunto, fue el tomate, seguido en orden descendiente por sandía, pimiento dulce, melón, pepino, calabacín, berenjena y judías verdes. Individualmente, en la zona de Levante el cultivo mayoritario fue también tomate, mencionado por el 100% de los técnicos, seguido por sandía (75,0%), calabacín (41,7%), melón (36,1%), pimiento dulce (27,8%), pepino (19,4%), berenjena (13,9%) y judía verde (2,8%). En cambio, en Poniente, el pimiento dulce fue el cultivo más frecuente, mencionado en el 93,4% de las entrevistas. Además, en Poniente el rango de cultivos fue más amplio ya que pepino, melón, sandía, berenjena, calabacín y tomate se citaron en más del 66,6% de los casos y la judía verde en el 16,4% de las entrevistas.

También se encontraron diferencias entre las dos áreas en el tipo de secuencias de rotación de cultivos utilizadas. En Levante, predominaron el monocultivo del tomate en un 34,8% de los casos y la rotación de tomate-sandía en un 33,3%, seguido por tomate-melón en un 8,7%. En contraste, en la zona de Poniente la rotación pimiento dulce-melón fue la

secuencia más usual (26,8%), seguida por el monocultivo de pimiento dulce (13,4%) y por las rotaciones de pimiento dulce-sandía (11,0%), melón-pepino (9,8%) y tomate-pepino (5,5%). Otros monocultivos como pepino, berenjena, melón, calabacín o sandía y varias combinaciones de cucurbitáceas y solanáceas para rotaciones de cultivos, se citaron en ambas regiones agrícolas con menor frecuencia, menos del 5% de los casos.

La percepción de los técnicos sobre el impacto de *Meloidogyne* en los cultivos hortícolas protegidos de Almería está resumida en la Tabla 9.

Tabla 9. Percepción por los técnicos agrícolas del impacto de las enfermedades inducidas por nemátodos en el área hortícola de Almería, España.

| | Almería | Poniente | Levante | |
|---|----------|----------|----------|---|
| Porcentaje de campos infestados por nemátodos | 17,7±1,8 | 14,7±1,9 | 22,9±3,4 | * |
| Porcentaje medio del área dentro de un campo infestado | 18,8±1,6 | 18,0±1,6 | 20,1±3,1 | |
| Porcentaje del área cultivada infestada por nemátodos | 2,0±0,4 | 1,3±0,2 | 3,1±1,1 | |
| Porcentaje de pérdidas de productividad inducidas por nemátodos | 30,8±2,1 | 30,1±2,7 | 31,9±3,5 | |
| Evolución de los problemas nematológicos en los últimos cinco años | | | | |
| Porcentaje de técnicos que opinan que los problemas nematológicos están decreciendo | 17,5 | 14,8 | 22,2 | |
| Porcentaje de técnicos que opinan que los problemas nematológicos están estables | 44,3 | 45,9 | 41,7 | |
| Porcentaje de técnicos que opinan que los problemas nematológicos están aumentando | 38,1 | 39,3 | 36,1 | |
| Número de campos infestados de nemátodos está incrementando | 25,8 | 24,6 | 27,8 | |
| Síntomas de la severidad de la enfermedad por nemátodos están incrementando | 20,6 | 13,1 | 36,1 | * |
| Tamaño de los rodales infestados dentro de un campo está extendiéndose | 33,0 | 31,1 | 34,3 | |

Porcentajes expresados como medias ± error estándar de la media.

* Valores de Levante y Poniente son diferentes según el test Wilcoxon Rank Sum con nivel significativo a $P < 0,05$

En general, la incidencia de las enfermedades causadas por *Meloidogyne* fue percibida en mayor medida en la zona de Levante que en Poniente ($P = 0,0138$), pero las percepciones de las pérdidas de productividad inducidas por nemátodos fueron similares en ambas regiones agrícolas, con aproximadamente un 30% del total de la cosecha. No se encontraron diferencias significativas entre cultivos o secuencias rotacionales, respecto a la percepción sobre el impacto de los nemátodos en la región.

Un 38,1% de los técnicos consideraron que los problemas nematológicos habían empeorado en los últimos cinco años mientras que, el 44,3% opinaban que los problemas con nemátodos permanecían estables, sin diferencias de opinión entre técnicos de cada área. De entre los que creyeron que el problema de infestación estaba en aumento, el 25,8% lo expresó como un mayor número de campos infestados, el 20,6% como una intensificación de la severidad de los síntomas y un 33,0% como un incremento en el tamaño de los rodales afectados. En el área de Levante, un mayor número de técnicos

pensaron que la severidad de las enfermedades nematológicas estaba intensificándose (36,1%), en comparación con el área de Poniente, que mostró un 13,1% ($P = 0,0183$).

Respecto a los métodos de control nematológico aplicados, el 78,3% de los técnicos admitieron el uso de fumigación del suelo (70,1% con 1,3-dicloropropeno y 8,2% con metam-sodio). La aplicación de nematicidas no fumigantes fue citada por el 59,8% de los entrevistados, la solarización del suelo por el 38,1%, el injerto por el 33,0%, los cultivares resistentes por el 9,3%, los extractos vegetales por el 14,4% y la biofumigación por el 6,2%. Otros productos como aminoácidos, AMFs, *Trichoderma* y nemátodos entomopatógenos se citaron en porcentajes inferiores al 5,0%. La única diferencia en los métodos de control utilizados entre las dos áreas se encontró en la aplicación de los extractos vegetales: 25,0% en Levante frente al 8,2% en Poniente ($P = 0,0240$).

Los técnicos clasificaron también la efectividad de los métodos de control nematológico, en orden descendente: nematicidas fumigantes, técnicas de injerto, cultivares resistentes, nematicidas no fumigantes, biofumigación, solarización del suelo, AMF, aminoácidos, extractos vegetales, nemátodos entomopatógenos y *Trichoderma*. En una escala de eficacia que oscila entre 1 y 5 (1=nada eficaz; 2=apenas eficaz; 3=moderadamente eficaz; 4=bastante eficaz y 5=muy eficaz), el 1,3-dicloropropeno se clasificó como $4,1 \pm 0,1$, el metam sodio como $3,4 \pm 0,1$ y el uso de nematicidas no fumigantes como $2,8 \pm 0,1$. La solarización del suelo individualmente se catalogó como $2,3 \pm 0,1$. Sin embargo, cuando los tratamientos químicos se combinaron con la solarización del suelo, la eficacia se estimó en $4,3 \pm 0,1$ si la combinación se hizo con nematicidas fumigantes y $3,2 \pm 0,1$ con nematicidas no fumigantes. Las técnicas de injerto obtuvieron una eficacia de $3,7 \pm 0,1$ mientras que, el uso de cultivares resistentes se clasificó en $3,3 \pm 0,1$ y la biofumigación en $3,1 \pm 0,1$. La eficacia de los cultivares resistentes se creyó mayor por los técnicos en Poniente ($3,5 \pm 0,1$) que en los de Levante ($2,9 \pm 0,2$) ($P = 0,0495$). Finalmente, la eficacia de la aplicación de productos orgánicos y promotores del crecimiento radical, con valores para AMFs de $2,3 \pm 0,3$, aminoácidos $2,3 \pm 0,5$, extractos vegetales $2,2 \pm 0,2$, nemátodos entomopatógenos $2,0 \pm 0,1$ y *Trichoderma* $1,3 \pm 0,3$, se consideró como insuficiente.

Por último, y en relación a la información nematológica recibida, en una escala de 1 a 5 puntos donde (1=nunca; 2=ocasionalmente; 3=a veces; 4=frecuentemente y 5=la mayoría de las veces), la frecuencia del asesoramiento sobre control de nemátodos ofrecido por los técnicos agrícolas fue de $2,8 \pm 0,1$. La utilidad de la información disponible para los

técnicos, desde varias fuentes, también se valoró en una escala de 1 a 5 (1= muy pobre; 2= pobre; 3= justa; 4= buena; 5= muy buena), donde las organizaciones profesionales agronómicas obtuvieron $1,8\pm 0,1$, los servicios de extensión agrícola e instituciones de investigación $2,0\pm 0,1$ y las compañías fitosanitarias y comerciantes $2,2\pm 0,1$.

2.2. MUESTREO NEMATOLÓGICO EN LOS CULTIVOS HORTÍCOLAS PROTEGIDOS DE ALMERÍA

La distribución de las especies de *Meloidogyne*, en los 54 lugares muestreados, se muestra en la Figura 8 y las coordenadas geográficas de los puntos, cultivos hospedadores, tratamientos en suelo y densidades de población de *Meloidogyne* se muestran en la Tabla 10.

Figura 8. Distribución de las especies de *Meloidogyne* en 54 invernaderos de cultivos hortícolas protegidos (Levante y Poniente) en Almería.

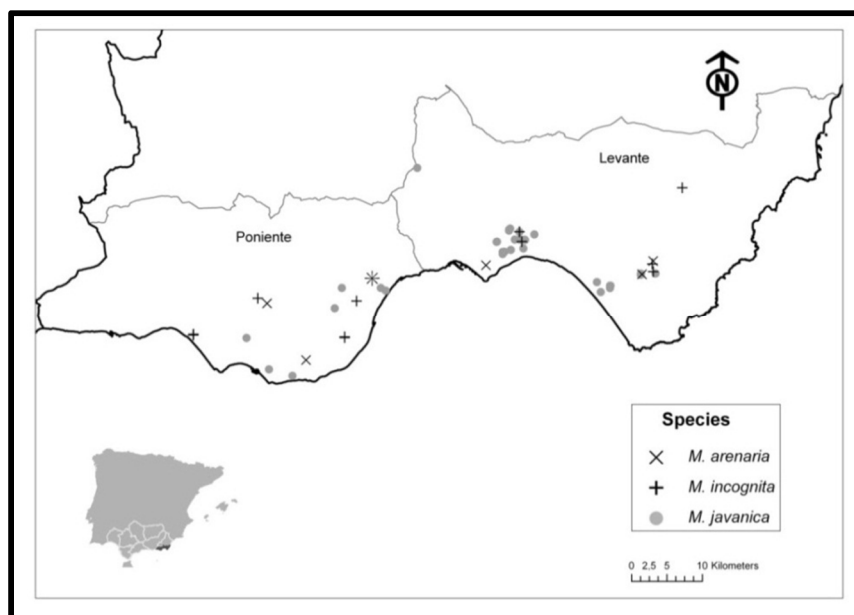


Tabla 10. Distribución geográfica de muestras de nemátodos agalladores, cultivo hospedador, tratamientos del suelo y densidades de población en raíces y suelo.

| Región | Cultivo hospedador | Historial de cultivos | Resistencia ^v | Tratamientos del suelo ^w | Densidades de nemátodos agalladores | | | Coordenadas |
|---------|--------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------|------------------|-----------------------|
| | | | | | Especies ^x | Huevos ^y | J2s ^z | |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Resistente | - | Mj | 19.568 | 4.480 | 36°57'23"N-02°32'02"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Resistente | - | Mj | 24.000 | 4.240 | 36°51'43"N-02°24'31"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Resistente | - | Mj | 38.576 | 2.400 | 36°52'34"N-02°23'20"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Resistente | - | Mj | 22.646 | 1.485 | 36°50'47"N-02°23'57"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Resistente | - | Mj | 47.030 | 6.750 | 36°51'52"N-02°21'50"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Resistente | - | Mj | 45.458 | 9.085 | 36°48'36"N-02°15'00"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Resistente | 1,3-D | Mj | 113.117 | 3.440 | 36°51'44"N-02°24'29"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Resistente | 1,3-D | Mj | 52.730 | 435 | 36°52'39"N-02°23'19"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Resistente | 1,3-D | Mj | 67.394 | 975 | 36°52'39"N-02°23'19"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Resistente | 1,3-D + Fenamifos | Mj | 64.768 | 840 | 36°48'19"N-02°13'46"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Resistente | Fenamifos | Mj | 53.382 | 4.790 | 36°52'16"N-02°20'55"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Resistente | Fenamifos | Mj | 46.240 | 1.760 | 36°50'57"N-02°23'57"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Resistente | MeNa | Mj | 37.436 | 775 | 36°48'19"N-02°13'43"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Resistente | Oxamilo | Mj | 19.030 | 1.200 | 36°51'53"N-02°22'47"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Resistente | Oxamilo | Mj | 42.468 | 365 | 36°47'50"N-02°14'39"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Resistente | SS + 1,3-D | Mj | 34.278 | 520 | 36°49'08"N-02°10'50"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Resistente | SS + 1,3-D + Oxamilo | Ma | 9.828 | 1.920 | 36°49'56"N-02°25'33"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Resistente | SS + 1,3-D + EPN | Mj | 18.658 | 490 | 36°49'13"N-02°10'49"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Resistente | SS + 1,3-D + EPN | Mi | 50.481 | 470 | 36°49'21"N-02°09'39"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Resistente | SS + Fenamifos | Mj | 62.093 | 3.725 | 36°50'54"N-02°23'46"W |

^v Hospedador adecuado para *Meloidogyne*. Resistente = cultivar resistente gen Mi o portainjerto; Susceptible = cultivar susceptible no injertado en portainjerto resistente.

^w 1,3-D: 1,3-dicloropropeno; EPN: nemátodos entomopatógenos; MeNa: Metam-Sodio; RGP: promotores del crecimiento radical; SS: solarización del suelo

^x Ma = *Meloidogyne arenaria*; Mi = *Meloidogyne incognita*; Mj = *Meloidogyne javanica*

^y Número de huevos por g de raíces

^z Número de juveniles por 250 g de suelo

Tabla 10 (continuación). Distribución geográfica de muestras de nemátodos agalladores, cultivo hospedador, tratamientos del suelo y densidades de población en raíces y suelo.

| Región | Cultivo hospedador | Historial de cultivos | Resistencia ^v | Tratamientos del suelo ^w | Densidades de nemátodos agalladores | | | Coordenadas |
|----------|--------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------|------------------|-----------------------|
| | | | | | Especies ^x | Huevos ^y | J2s ^z | |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Resistente | SS + RGP | Mj | 36.736 | 800 | 36°51'53"N-02°22'19"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Resistente | RGP | Mi | 23.424 | 1.450 | 36°51'43"N-02°22'07"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Resistente | RGP | Mj | 27.379 | 1.075 | 36°52'28"N-02°22'20"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Susceptible | - | Mi | 9.080 | 1.260 | 36°52'28"N-02°22'20"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Susceptible | Fenamifos | Mj | 47.974 | 1.835 | 36°51'12"N-02°21'58"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Susceptible | Fenamifos | Ma + Mj | 13.113 | 1.145 | 36°49'10"N-02°10'43"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Susceptible | MeNa | Mj | 960 | 390 | 36°52'43"N-02°23'13"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Susceptible | SS | Mj | 53.163 | 1.315 | 36°51'53"N-02°22'21"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Susceptible | SS + 1,3-D | Mj | 43.423 | 1.275 | 36°51'51"N-02°21'48"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Susceptible | SS + MeNa | Mi | 48.318 | 1.210 | 36°49'56"N-02°09'44"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Susceptible | SS + Extractos vegetales | Mj | 33.578 | 360 | 36°51'50"N-02°22'05"W |
| Levante | Tomate | Monocultivo de tomate | Susceptible | EPN + aceite de Neem | Mj | 41.958 | 1.530 | 36°48'08"N-02°13'46"W |
| Levante | Tomate | Pimiento dulce-Melón | Susceptible | MeNa | Ma | 12.313 | 2.245 | 36°50'10"N-02°09'39"W |
| Levante | Pepino | Tomate-Pepino | Susceptible | SS + NaTC | Mj | 29.677 | 2.570 | 36°51'06"N-02°23'10"W |
| Levante | Pimiento dulce | Pimiento dulce | Susceptible | SS | Ma | 32.860 | 1.860 | 36°42'42"N-02°42'41"W |
| Levante | Sandía | Pimiento dulce- Melón | Susceptible | SS + 1,3-D | Mj | 46.062 | 2.065 | 36°49'13"N-02°09'25"W |
| Poniente | Tomate | Monocultivo de tomate | Resistente | 1,3-D + Fenamifos | Mj | 12.840 | 405 | 36°48'03"N-02°35'05"W |
| Poniente | Tomate | Monocultivo de tomate | Resistente | SS + 1,3-D | Ma + Mi | 17.616 | 240 | 36°48'59"N-02°36'17"W |
| Poniente | Tomate | Monocultivo de tomate | Resistente | SS + 1,3-D | Mj | 14.223 | 590 | 36°48'16"N-02°39'15"W |
| Poniente | Tomate | Monocultivo de tomate | Susceptible | 1,3-D | Mj | 18.080 | 405 | 36°42'00"N-02°46'12"W |

^v Hospedador adecuado para *Meloidogyne*. Resistente = cultivar resistente o portainjerto resistente; Susceptible = cultivar susceptible no injertado en portainjerto resistente.

^w 1,3-D: 1,3-dicloropropeno; EPN: nemátodos entomopatógenos; MeNa: Metam-Sodio; RGP: promotores del crecimiento radical; SS: solarización del suelo

^xMa = *Meloidogyne arenaria*; Mi = *Meloidogyne incognita*; Mj = *Meloidogyne javanica*

^y Número de huevos por g de raíces

^zNúmero de juveniles por 250 g de suelo

Tabla 10 (continuación). Distribución geográfica de muestras de nemátodos agalladores, cultivo hospedador, tratamientos del suelo y densidades de población en raíces y suelo.

| Región | Cultivo hospedador | Historial de cultivos | Resistencia ^v | Tratamientos del suelo ^w | Densidades de nemátodos agalladores | | | Coordenadas |
|----------|--------------------|-------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------|------------------|-------------------------|
| | | | | | Especies ^x | Huevos ^y | J2s ^z | |
| Poniente | Tomate | Monocultivo de tomate | Susceptible | MeNa | Mj | 59.472 | 735 | 36°48'15" N-02°35'33" W |
| Poniente | Tomate | Monocultivo de tomate | Susceptible | SS + 1,3-D | Mi | 1.056 | 2 | 36°47'15" N-02°37'52" W |
| Poniente | Tomate | Berenjena-Pimiento dulce | Susceptible | 1,3-D | Mi | 9.235 | 465 | 36°44'24" N-02°39'00" W |
| Poniente | Tomate | Tomate-Pimiento dulce | Susceptible | - | Mi | 7.890 | 1.145 | 36°44'27" N-02°39'00" W |
| Poniente | Tomate | Tomate-Sandía | Susceptible | SS + Biofumigación | Mj | 8.080 | 1.600 | 36°41'30" N-02°43'58" W |
| Poniente | Berenjena | Monocultivo de berenjena | Susceptible | SS + RGP | Mj | 46.997 | 1.450 | 36°46'43" N-02°39'56" W |
| Poniente | Berenjena | Monocultivo de berenjena | Susceptible | 1,3-D + RGP | Mi | 52.922 | 1.740 | - |
| Poniente | Melón | Pimiento dulce-Melón | Susceptible | Vaporización del suelo | Ma | 17.421 | 330 | 36°47'06" N-02°46'22" W |
| Poniente | Melón | Pimiento dulce-Melón | Susceptible | 1,3-D + Oxamilo | Ma | 807 | 390 | - |
| Poniente | Melón | Pimiento dulce-Melón | Susceptible | Fenamifos + Oxamilo | Mj | 14.075 | 190 | 36°44'24" N-02°48'19" W |
| Poniente | Pimiento dulce | Monocultivo de pimiento dulce | Susceptible | 1,3-D | Mi | 71.133 | 1.005 | 36°47'29" N-02°47'15" W |
| Poniente | Pimiento dulce | Pimiento dulce-Pepino | Susceptible | MeNa | Ma | 989 | 6.056 | 37 47'06" N-02°46'22" W |
| Poniente | Sandía | Pimiento dulce-Melón | Susceptible | 1,3-D + Extractos vegetales | Mi | 20.462 | 650 | 36°44'41" N-02°53'22" W |
| Poniente | Sandía | Pimiento dulce-Melón | Susceptible | 1,3-D + Extractos vegetales | Mi | 14.960 | 1.265 | 36°44'37" N-02°53'23" W |

^v Hospedador adecuado para *Meloidogyne*. Resistente =cultivar resistente o portainjerto resistente; Susceptible = cultivar susceptible no injertado en portainjerto resistente.

^w 1,3-D: 1,3-dicloropropeno; EPN: nemátodos entomopatógenos; MeNa: Metam-Sodio; RGP: promotores del crecimiento radical; SS: solarización del suelo

^xMa = *Meloidogyne arenaria*; Mi = *Meloidogyne incognita*; Mj = *Meloidogyne javanica*

^y Número de huevos por g de raíces

^zNúmero de juveniles por 250 g de suelo

Meloidogyne javanica (Treub) Chitwood se encontró en el 64,8% de los campos, *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood en el 20,4% y *Meloidogyne arenaria* Chitwood en el 11,1%. Solamente se encontraron poblaciones mezcladas en un 3,8% de los campos (*M. arenaria* + *M. incognita* 1,9% y *M. arenaria* + *M. javanica* 1,9%). La distribución geográfica de las especies de *Meloidogyne* fue claramente diferente entre las regiones de cultivo (Figura 8) ya que, la prevalencia de *M. javanica* fue mayor en Levante (80,6%) que en Poniente (38,9%) ($P = 0,0048$). En cambio, la prevalencia de *M. incognita* fue más baja en Levante (11,1%) que en Poniente (44,4%) ($P = 0,0123$) y no se encontraron diferencias significativas en cuanto a las prevalencias de *M. arenaria* en cada área (11,1% en Levante y 22,2% en Poniente) ($P = 0,4179$). Estas prevalencias se asociaron con el cultivo principal dentro de cada área, tomate en Levante y pimiento dulce en Poniente ya que, *M. javanica* apareció con menor frecuencia cuando la secuencia de cultivos incluyó pimiento dulce (16,7%) en lugar de tomate (80,4%) ($P = 0,0001$), mientras que *M. arenaria* apareció con mayor frecuencia en pimiento dulce (41,7%) que en tomate (7,2%) ($P = 0,0104$). La incidencia de *M. incognita* no se relacionó con los cultivos incluidos en las rotaciones ($P = 0,1143$). Si consideramos conjuntamente la distribución de especies de *Meloidogyne* y la susceptibilidad o resistencia del cultivo, *M. javanica* se encontró más frecuentemente sobre raíces de tomate resistente (81,5%) que en susceptible (48,3%) ($P = 0,0128$), pero no se encontraron diferencias para *M. arenaria* ni para *M. incognita*.

Las tres especies de *Meloidogyne* se encontraron en altas densidades de población en numerosos lugares (Tabla 10). Los valores más elevados en el número de huevos por gramo de raíces se encontraron en los lugares infestados con *M. javanica* (38.387 ± 3.623), significativamente mayores que aquellos con *M. arenaria* (12.370 ± 4.382) ($P = 0,0261$), pero no se encontraron diferencias entre estos y *M. incognita* (28.087 ± 7.063). El número de huevos de *Meloidogyne* recuperados desde las raíces, fue también más elevado en Levante (38.033 ± 3.499 huevos por g de raíces) que en Poniente (21.570 ± 4.982) ($P = 0,0047$), y la producción de huevos fue más baja cuando los cultivos de cucurbitáceas se incluyeron en la secuencia de rotación (16.485 ± 4.279), en comparación con el monocultivo de cualquier solanácea o la rotación solanácea-solanácea (36.196 ± 3.368) ($P = 0,0058$). Un modelo similar se observó para las poblaciones de nemátodos recuperadas desde el suelo entre las áreas agrícolas, ya que el número de juveniles por 250 g de suelo fue mayor en Levante (2.015 ± 315) que en Poniente (1.037 ± 319) ($P = 0,0041$).

3. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio se basan en las opiniones de los técnicos agrícolas, más que en las de los agricultores individualmente, dado que son un grupo de personal cualificado con una amplia experiencia en manejo de plagas y enfermedades de los cultivos sobre grandes superficies (aproximadamente 89 ha), por lo que pueden ser considerados como “expertos”. Su conocimiento acumulado proporciona una información valiosa sobre las demandas de investigación o los huecos existentes en la transferencia de tecnología, y podrían ayudar a los gestores implicados en la toma de decisiones en la protección de cultivos frente a nemátodos parásitos de plantas. La mayoría de los técnicos (95,9%) supervisaron los campos dentro de una sola comarca agrícola, bien Levante o bien Poniente, y sólo en el 4,1% de los casos, los técnicos eran responsables de campos en ambas comarcas. Por tanto, la información proporcionada estuvo altamente localizada, tal como los cultivos o las secuencias rotacionales empleadas, lo cual puede, presumiblemente, afectar al grado y extensión de las infestaciones de nemátodos.

La percepción de los técnicos sobre el impacto de los nemátodos, está resumida en la Tabla 9. Aunque el impacto de los nemátodos fue percibido en mayor medida en la comarca de Levante que en Poniente ($P = 0,0138$), la incidencia de *Meloidogyne* percibida para el total de la región fue del 18%, posiblemente infravalorando el problema real dado que varios estudios nematológicos previos han mostrado incidencias que oscilan entre el 20 y el 40% (Talavera *et al.*, 1999; Verdejo-Lucas *et al.*, 2002). Esta baja percepción de la incidencia de *Meloidogyne* está en contradicción con el elevado uso de nematicidas, como se indicó por Céspedes *et al.*, (2009), quienes encontraron que el uso de nematicidas fue más alto en Almería que en otras regiones hortícolas. En general, las percepciones de la extensión de los problemas nematológicos se basan en la observación de los síntomas en planta y el agallamiento en la raíz, más que en el muestreo de nemátodos y en análisis cuantitativos en suelo o planta. Como resultado, las enfermedades causadas por *Meloidogyne* pasan con frecuencia desapercibidas en los campos con bajos a moderados niveles de infestación, donde la observación de las agallas de los nemátodos en las raíces no es obvia hasta el final del cultivo. Existe, por tanto, la necesidad de un estudio nematológico cuantitativo más extenso, para determinar la prevalencia real de *Meloidogyne* en la región.

En relación a las pérdidas de productividad atribuibles a *Meloidogyne*, nuestras estimaciones basadas en la observación de los técnicos, indicaron un valor del 30,8% del rendimiento total. Dado que, el 17,7% de los lugares se estimaron como infestados por

nemátodos, con un área de síntomas del 18,8% por campo, el área total de cultivo infestada por *Meloidogyne* se calculó en un 2%. En base a este número, las pérdidas económicas, calculadas desde el precio recibido por los agricultores en origen, durante la estación 2009-2010 (Tabla 1) (MARM, 2010), se estimó en 1.899.812 € en pimiento, 1.749.761 € en tomate, 918.293 € en pepino, 649.504 € en calabacín, 451.940 € en sandía, 411.313 € en berenjena y 284.498 € en melón. En ausencia del uso de nematicidas, estas pérdidas atribuibles a nemátodos habrían sido mayores, ya que su estimación se realizó, en la mayoría de los casos, tras la aplicación de diversos nematicidas (el 66% de los sitios muestreados habían sido tratados con productos nematicidas en la campaña 2009-2010). Por tanto, los valores estimados en este estudio deberían interpretarse como el límite más bajo del valor económico de pérdidas de rendimiento debidas a *Meloidogyne* en la región. Las pérdidas de productividad también varían entre lugares, estaciones y años, dependiendo principalmente de la susceptibilidad del cultivo, de las densidades de población inicial de los nemátodos y de las condiciones ambientales (como por ejemplo la temperatura). Además, otras externalidades como el impacto medioambiental, los costes de mano de obra, etc., también deberían ser cuantificadas monetariamente. Dado que las percepciones de los técnicos sólo proporcionan datos aproximados sobre las pérdidas de productividad generadas por los nemátodos, se requiere una valoración más precisa de estas pérdidas bajo condiciones de campo.

Los técnicos clasificaron la eficacia de los métodos de control nematológico, en orden descendente como: nematicidas fumigantes, técnicas de injerto-cultivares resistentes, nematicidas no fumigantes, biofumigación, solarización del suelo, hongos formadores de micorrizas arbusculares, aminoácidos, extractos vegetales, nemátodos entomopatógenos y *Trichoderma*.

El 78,3% de los técnicos admitieron el uso de la desinfestación química del suelo con nematicidas fumigantes (70,1% con 1,3-dicloropropeno y 8,2% con metam-sodio) a la que catalogaron entre bastante y muy eficaz. El estudio también reveló que, aunque una mayoría de cultivos son producidos en concordancia con los sistemas de producción integrada, un gran número de agricultores aún continúan con los métodos de producción convencional en la comarca de Levante, donde el monocultivo del tomate está generalizado. En estos monocultivos, la fumigación química del suelo es una práctica común en el control de enfermedades, incluyendo nemátodos (Céspedes *et al.*, 2009).

La aplicación de nematicidas no fumigantes fue mencionada por el 59,8% de los entrevistados y su eficacia, cuando fueron aplicados solos, estuvo cercana a moderada. El uso de la solarización como método de control fue mencionado por el 38,1% de los técnicos, aunque por sí misma fue catalogada como apenas eficaz. Sin embargo, cuando los tratamientos químicos se combinaron con la solarización del suelo, la percepción de la eficacia de ambos se incrementó hasta moderadamente eficaz.

La técnica del injerto se utiliza, fundamentalmente, como un medio para mejorar el vigor de la planta y obtener frutos de tamaño homogéneo durante la producción fuera de temporada, pero también porque los porta-injertos de tomate muestran resistencia a diversos patógenos, entre ellos *Meloidogyne*. El injerto se percibe como una medida bastante extendida en la región (33,0%). En contraste, el uso de cultivares de tomate resistentes, como método de control, no es frecuente en absoluto (9,3%), probablemente debido a que el mercado demanda cultivares específicos que en muchos casos no portan genes de resistencia. La eficacia de estos métodos de control fue percibida como de moderada a bastante eficaz para las técnicas de injerto ($3,7 \pm 0,1$) y el uso de cultivares resistentes ($3,3 \pm 0,1$). Esta percepción es interesante dado que, la resistencia innata de la planta por sí misma debería ser extremadamente efectiva como método de control. Sin embargo, en el caso del tomate, aunque en general las plantas resistentes a nemátodos o los porta-injertos suprimen significativamente la reproducción de estos, los incrementos en la población, a veces, ocurren con ciertas combinaciones de genotipos de plantas y poblaciones de nemátodos (Sorribas *et al.*, 2005; Cortada *et al.*, 2009). En nuestro estudio de campo se encontraron, inesperadamente, elevadas densidades de población de *Meloidogyne* en portainjertos y sobre cultivares de tomate con el gen de resistencia Mi, lo cual sugiere la falta de expresión del gen de resistencia Mi causada por las típicas temperaturas elevadas del suelo (Dropkin, 1969) propias de los invernaderos plásticos o bien la existencia de poblaciones virulentas de nemátodos agalladores capaces de superar este gen resistente, lo cual podría dirigir a la percepción de que, la resistencia a estos nemátodos no proporciona una respuesta satisfactoria a la infestación de *Meloidogyne* en monocultivo de tomate en Almería.

El uso de la biofumigación sólo fue reconocido por un 6,2% de los técnicos. Aunque su eficacia moderada ($3,1 \pm 0,1$) fue comparable a la de los nematicidas no fumigantes, no es aún una medida de control extendida en la región.

El uso de extractos vegetales mostró una extensión considerable entre los técnicos (14,4%), no obstante fueron considerados como apenas eficaces ($2,2 \pm 0,2$), por lo que su extensión se justifica porque con frecuencia estos métodos de control fueron usados en combinación con otros o en sistemas de producción ecológica. Otros productos registrados como promotores del crecimiento radical (aminoácidos, hongos formadores de micorrizas arbusculares, *Trichoderma* y nemátodos entomopatógenos) se citaron en porcentajes inferiores al 5,0% y se consideraron con una eficacia insuficiente.

Meloidogyne javanica fue la especie predominante, seguida por *M. incognita* y *M. arenaria*. A pesar de la baja incidencia de *M. arenaria*, documentada en publicaciones previas (Sanz *et al.*, 1998; López-Pérez *et al.*, 2011), en nuestro estudio esta especie apareció en un 11,1% de los lugares en Levante y en un 22,2% en Poniente, una incidencia significativamente mayor que la documentada previamente. La prevalencia de *M. javanica* fue mayor en Levante que en Poniente a la vez que, la prevalencia de *M. incognita* fue más baja en Levante que en Poniente. Esta diferencia parece ser cultivo-dependiente dado que, *M. javanica* se encontró con menor frecuencia cuando la secuencia de cultivo incluyó pimiento (principal cultivo en Poniente), que cuando estuvo basada en rotaciones con tomate (principal cultivo en Levante). La resistencia de muchos cultivares de pimiento a *M. javanica* ha sido documentada por Robertson *et al.* (2006), quienes encontraron que ninguna de las poblaciones de *M. javanica* aisladas desde los suelos españoles fueron capaces de colonizar cultivares resistentes tales como Charleston Belle, Carolina Wonder y Atlante, o los cultivares susceptibles Capino y Sonar. Hartman y Sasser (1985) también indicaron que, solo el 7% de 311 poblaciones de *M. javanica* estudiadas fueron capaces de parasitar pimiento. El establecimiento de las distintas especies de *Meloidogyne* podría verse influenciado por las rotaciones de cultivos, de forma que los cultivares de pimiento servirían para reducir las poblaciones de *M. javanica* que serían incapaces de reproducirse en ellos y, a la vez, contribuirían a seleccionar poblaciones de *M. arenaria* o *M. incognita* capaces de reproducirse en estos cultivares, aumentando relativamente la incidencia de estas dos últimas especies en la comarca de Poniente, donde las rotaciones con pimiento predominan.

Las tres especies de *Meloidogyne* se encontraron en altas densidades de población en numerosos lugares. El número de huevos de *Meloidogyne* recuperados desde las raíces fue más elevado en Levante que en Poniente, y un modelo similar se observó para las poblaciones de nemátodos recuperadas desde el suelo. Por otra parte, los valores más

elevados en el número de huevos por g de raíces se encontraron en los lugares infestados con *M. javanica* y la producción de huevos fue más baja cuando los cultivos de cucurbitáceas se incluyeron en la secuencia de rotación, lo cual corroboró los resultados previos (Verdejo-Lucas *et al.*, 2002). La influencia de las características reproductivas del nemátodo, unido a la idoneidad del cultivo hospedador o a la especie de nemátodo involucrada, podrían influir en las mayores densidades de población encontradas en Levante, permitiendo que los síntomas de *Meloidogyne* lleguen a ser manifestados más claramente en esta comarca, en comparación con el Poniente. Esto proporcionaría una explicación para las diferencias en la percepción de los técnicos, en cuanto a la severidad de los síntomas de los nemátodos en las dos comarcas.

Existen varias prácticas de manejo que podrían afectar la expansión de las infestaciones de nemátodos y la distribución de las especies de *Meloidogyne* entre los cultivos almerienses como son el monocultivo del tomate, las secuencias de rotación, la plantación en pleno verano a elevadas temperaturas del suelo, una escasez de preparación del suelo antes de la plantación y el uso de plantas resistentes y la selección de poblaciones virulentas. La propagación de la infestación de los nemátodos, dentro de un terreno determinado, es probablemente atribuible al riego cuando los rodales de plantas infestadas generalmente se localizaron con líneas de riego por goteo. El constante tráfico a pie, en un sistema de gran trabajo intensivo, podría también contribuir en algún grado. Los sistemas de enarenado, normalmente, permanecen sin perturbación durante años, de este modo la dispersión de la infestación de los nemátodos de campo a campo es menos probable. Sin embargo, los suelos importados desde lugares de excavaciones locales podrían contribuir más significativamente a la dispersión de las infestaciones nematológicas.

A pesar de que las percepciones de los técnicos documentadas en este estudio han sido útiles, para obtener una aproximación de cómo los problemas nematológicos y la distribución de las especies de *Meloidogyne* se han desarrollado en esta región y, de este modo, prever cómo podría continuar en el futuro próximo, se requieren datos obtenidos desde los experimentos sistemáticos de campo para contrastar estas hipótesis.

CAPÍTULO II

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL USO COMBINADO DE
AMFs Y AGENTES ANTAGONISTAS DE NEMÁTODOS EN EL
PATOSISTEMA TOMATE-*MELOIDOGYNE INCOGNITA***

1. MATERIAL Y MÉTODOS

1.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Los sujetos de estudio fueron el nemátodo *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood, los cultivares de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) Durinta F1 y Josefina y distintos microorganismos edáficos y extractos vegetales.

Los microorganismos y productos antagonistas de nemátodos a ensayar fueron seleccionados en base a dos criterios de aplicabilidad:

- a) Haber sido citados en la literatura científica con algún efecto como antagonistas de nemátodos fitoparásitos del género *Meloidogyne*.
- b) Que se encontraran ya comercializados o próximos a su comercialización, que estuviesen recomendados para el control de otras plagas o enfermedades o simplemente registrados como promotores del crecimiento vegetal.

En concreto se ensayaron:

- a) Hongos formadores de micorrizas arbusculares (AMF):
 - *Glomus intraradices* Shenck y Smith
 - *Glomus mosseae* (Nicol. y Gerdemann) Gerdemann y Trappe
- b) Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR):
 - *Bacillus megaterium* de Bary
 - *Pseudomonas putida* Trevisan
- c) Bacteria hiperparásita de *Meloidogyne*:
 - *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre y Starr
- d) Hongos antagonistas de nemátodos:
 - *Trichoderma harzianum* Rifai
- e) Extractos vegetales y aceites esenciales:
 - *Allium sativum* L. (Ajo)
 - *Quassia amara* L. (Quassia)
 - *Thymus zygis* L. (Tomillo)
 - *Azadirachta indica* A.Juss. (Neem)

Los estudios se basaron en la interacción entre hongos formadores de micorrizas (AMF) y otros agentes y productos antagonistas. Por ser los AMF el producto biológico de aplicación al suelo con un desarrollo comercial más extenso, a través de numerosos productos presentes en el mercado, en todos los ensayos se incluyeron los AMFs, *G. intraradices* y *G. mosseae*. Se realizaron tres ensayos sobre el patosistema tomate-*M. incognita*, para el estudio de las interacciones entre AMFs y otros agentes antagonistas:

- Ensayo 1: AMFs-Bacterias
- Ensayo 2: AMFs-*Trichoderma*
- Ensayo 3: AMFs-Extractos vegetales.

1.1.1. ENSAYO 1. EFECTOS DE LA MICORRIZACIÓN E INOCULACIÓN CON BACTERIAS

Se estudió el efecto de la micorrización con *G. intraradices* o *G. mosseae* (AMF), inoculación con bacterias, *B. megaterium*, *P. putida* o *P. penetrans* y del uso combinado de AMF y bacterias, sobre el crecimiento vegetal en ausencia de nemátodos y sobre el patosistema tomate-*M. incognita*. Se ensayaron 24 tratamientos (Tabla 11).

Los tratamientos se identificaron mediante un código de tres letras en la que la primera letra corresponde a la micorrización, la segunda a la inoculación con bacterias y la tercera a la infestación con *M. incognita*, con los siguientes códigos:

| | |
|----|--|
| Ø: | No inoculación |
| I: | Micorrización por <i>G. intraradices</i> |
| M: | Micorrización por <i>G. mosseae</i> |
| B: | Inoculación con <i>B. megaterium</i> |
| S: | Inoculación con <i>P. putida</i> |
| P: | Inoculación con <i>P. penetrans</i> |
| N: | Infestación con <i>M. incognita</i> |

Tabla 11. Tratamientos ensayados para el estudio de la interacción AMF-bacterias en el patosistema Tomate-*M. incognita*.

| Código | AMF | PGPR | Nemátodo |
|--------|------------------------|----------------------|---------------------|
| [ØØØ] | - | - | - |
| [IØØ] | <i>G. intraradices</i> | - | - |
| [MØØ] | <i>G. mosseae</i> | - | - |
| [ØBØ] | - | <i>B. megaterium</i> | - |
| [IBØ] | <i>G. intraradices</i> | <i>B. megaterium</i> | - |
| [MBØ] | <i>G. mosseae</i> | <i>B. megaterium</i> | - |
| [ØSØ] | - | <i>P. putida</i> | - |
| [ISØ] | <i>G. intraradices</i> | <i>P. putida</i> | - |
| [MSØ] | <i>G. mosseae</i> | <i>P. putida</i> | - |
| [ØPØ] | - | <i>P. penetrans</i> | - |
| [IPØ] | <i>G. intraradices</i> | <i>P. penetrans</i> | - |
| [MPØ] | <i>G. mosseae</i> | <i>P. penetrans</i> | - |
| [ØØN] | - | - | <i>M. incognita</i> |
| [IØN] | <i>G. intraradices</i> | - | <i>M. incognita</i> |
| [MØN] | <i>G. mosseae</i> | - | <i>M. incognita</i> |
| [ØBN] | - | <i>B. megaterium</i> | <i>M. incognita</i> |
| [IBN] | <i>G. intraradices</i> | <i>B. megaterium</i> | <i>M. incognita</i> |
| [MBN] | <i>G. mosseae</i> | <i>B. megaterium</i> | <i>M. incognita</i> |
| [ØSN] | - | <i>P. putida</i> | <i>M. incognita</i> |
| [ISN] | <i>G. intraradices</i> | <i>P. putida</i> | <i>M. incognita</i> |
| [MSN] | <i>G. mosseae</i> | <i>P. putida</i> | <i>M. incognita</i> |
| [ØPN] | - | <i>P. penetrans</i> | <i>M. incognita</i> |
| [IPN] | <i>G. intraradices</i> | <i>P. penetrans</i> | <i>M. incognita</i> |
| [MPN] | <i>G. mosseae</i> | <i>P. penetrans</i> | <i>M. incognita</i> |

Todos los tratamientos fueron replicados cinco veces y repetidos durante los años 2007 y 2008, para cada uno de los dos cultivares de tomate estudiados cv. Durinta F1 y cv. Josefina. Total por año: 240 plantas, 120 de cada cultivar.

1.1.2. ENSAYO 2. EFECTOS DE LA MICORRIZACIÓN E INOCULACIÓN CON *TRICHODERMA HARZIANUM*

Se estudió el efecto de la micorrización con *G. intraradices* o *G. mosseae*, inoculación con el hongo antagonista *T. harzianum* y del uso combinado de la micorrización e inoculación con *T. harzianum*, sobre el crecimiento vegetal en ausencia de nemátodos y sobre el patosistema tomate-*M. incognita*. Se ensayaron 12 tratamientos (Tabla 12).

Los tratamientos se identificaron mediante un código de tres letras en la que la primera corresponde a la micorrización, la segunda a la inoculación con el hongo y la tercera a la infestación por *M. incognita*, con los siguientes códigos:

Ø: No inoculación

I: Planta micorrizada por *G. intraradices*

M: Planta micorrizada por *G. mosseae*

T: Planta inoculada con *T. harzianum*

N: Planta infestada con *M. incognita*

Tabla 12. Tratamientos ensayados para el estudio de la interacción AMF-*Trichoderma* en el patosistema Tomate-*M. incognita*.

| Código | AMF | Hongo antagonista | Nemátodo |
|--------|------------------------|---------------------|---------------------|
| [ØØØ] | - | - | - |
| [IØØ] | <i>G. intraradices</i> | - | - |
| [MØØ] | <i>G. mosseae</i> | - | - |
| [ØTØ] | - | <i>T. harzianum</i> | - |
| [ITØ] | <i>G. intraradices</i> | <i>T. harzianum</i> | - |
| [MTØ] | <i>G. mosseae</i> | <i>T. harzianum</i> | - |
| [ØØN] | - | - | <i>M. incognita</i> |
| [IØN] | <i>G. intraradices</i> | - | <i>M. incognita</i> |
| [MØN] | <i>G. mosseae</i> | - | <i>M. incognita</i> |
| [ØTN] | - | <i>T. harzianum</i> | <i>M. incognita</i> |
| [ITN] | <i>G. intraradices</i> | <i>T. harzianum</i> | <i>M. incognita</i> |
| [MTN] | <i>G. mosseae</i> | <i>T. harzianum</i> | <i>M. incognita</i> |

Todos los tratamientos fueron replicados cinco veces y repetidos durante los años 2009 y 2010, para cada uno de los dos cultivares de tomate estudiados cv. Durinta F1 y cv. Josefina. Total por año: 120 plantas, 60 de cada cultivar.

1.1.3. ENSAYO 3. EFECTOS DE LA MICORRIZACIÓN Y APLICACIÓN AL SUELO DE EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITES ESENCIALES

Se estudió el efecto de la micorrización con especies del género *Glomus* (*G. intraradices* o *G. mosseae*), de la aplicación al suelo de aceites esenciales y extractos vegetales (*Azadirachta indica*, *Allium sativum*, *Thymus zygis* o *Quassia amara*) y de su uso combinado, sobre el crecimiento vegetal en ausencia de nemátodos y sobre el patosistema tomate-*M. incognita*. Se ensayaron 22 tratamientos (Tabla 13).

Los tratamientos se identificaron mediante un código de tres letras en la que la primera corresponde a la micorrización, la segunda a la aplicación del extracto vegetal o aceite esencial y la tercera a la infestación por *M. incognita*, con los siguientes códigos:

Ø: No inoculación

I: Planta micorrizada por *G. intraradices*

M: Planta micorrizada por *G. mosseae*

A: Planta inoculada con extracto vegetal de *Allium sativum*

N: Planta inoculada con aceite esencial de *Azadirachta indica*

Q: Planta inoculada con extracto vegetal de *Quassia amara*

To: Planta inoculada con aceite esencial de *Thymus zygis*

N: Planta infestada con *M. incognita*

Tabla 13. Tratamientos ensayados para el estudio de la interacción AMF-extractos vegetales en el patosistema Tomate-*M. incognita*.

| Código | AMF | Aceite esencial o extracto | Nemátodo |
|--------|------------------------|----------------------------|---------------------|
| [000] | - | - | - |
| [I00] | <i>G. intraradices</i> | - | - |
| [M00] | <i>G. mosseae</i> | - | - |
| [0N0] | - | <i>Azadirachta indica</i> | - |
| [0A0] | - | <i>Allium sativum</i> | - |
| [0T00] | - | <i>Thymus zygis</i> | - |
| [0Q0] | - | <i>Quassia amara</i> | - |
| [00N] | - | - | <i>M. incognita</i> |
| [I0N] | <i>G. intraradices</i> | - | <i>M. incognita</i> |
| [M0N] | <i>G. mosseae</i> | - | <i>M. incognita</i> |
| [0NN] | - | <i>Azadirachta indica</i> | <i>M. incognita</i> |
| [INN] | <i>G. intraradices</i> | <i>Azadirachta indica</i> | <i>M. incognita</i> |
| [MNN] | <i>G. mosseae</i> | <i>Azadirachta indica</i> | <i>M. incognita</i> |
| [0AN] | - | <i>Allium sativum</i> | <i>M. incognita</i> |
| [IAN] | <i>G. intraradices</i> | <i>Allium sativum</i> | <i>M. incognita</i> |
| [MAN] | <i>G. mosseae</i> | <i>Allium sativum</i> | <i>M. incognita</i> |
| [0TON] | - | <i>Thymus zygis</i> | <i>M. incognita</i> |
| [ITON] | <i>G. intraradices</i> | <i>Thymus zygis</i> | <i>M. incognita</i> |
| [MTON] | <i>G. mosseae</i> | <i>Thymus zygis</i> | <i>M. incognita</i> |
| [0QN] | - | <i>Quassia amara</i> | <i>M. incognita</i> |
| [IQN] | <i>G. intraradices</i> | <i>Quassia amara</i> | <i>M. incognita</i> |
| [MQN] | <i>G. mosseae</i> | <i>Quassia amara</i> | <i>M. incognita</i> |

Todos los tratamientos fueron replicados en espacio cuatro veces y repetidos durante los años 2009 y 2010, para cada uno de los dos cultivares de tomate estudiados cv. Durinta F1 y cv. Josefina. Total por año: 176 plantas, 88 de cada cultivar.

1.2. MATERIAL UTILIZADO

1.2.1. MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron semillas de tomate susceptibles a *Meloidogyne* de dos cultivares de uso frecuente en la agricultura local:

- Durinta F1 (Western seeds). Variedad de ramillete de larga vida de forma multilocular, sin acostillado. Resistente a *Verticillium* y *Fusarium*.
- Josefina (Hazera seeds). Variedad tipo cereza suelto de larga vida. No presenta ningún tipo de resistencia.

Todas las semillas fueron esterilizadas en superficie por inmersión en una solución de hipoclorito sódico (NaOCl) al 5% durante 10 minutos y, posteriormente, lavadas varias veces con agua destilada. Tras ello, se dejaron sumergidas en agua destilada durante dos horas antes de ser transferidas a bandejas de germinación con sustrato de turba.

1.2.2. CONTENEDORES

Bandejas de germinación de poliestireno expandido con celdillas de 25 ml de capacidad (Figura 9) para el sustrato de germinación y macetas termoformadas en polipropileno negro de 780 ml de capacidad (12 cm de diámetro x 10,6 cm de altura y 5° de inclinación) para los ensayos con suelo (Figura 10).

Figura 9. Bandeja de germinación de poliestireno.



Figura 10. Macetas termoformadas de polipropileno.



1.2.3. SUSTRATOS Y SUELOS

Sustrato artificial a base de turba rubia de *Sphagnum* (80%) y perlita (20%) para la germinación de las semillas, y suelo del tipo arena limosa (arena 84%: limo 10%: arcilla 6%), cuya textura asegura un buen desarrollo radical y movimiento de los nemátodos, pH 7,7, materia orgánica 0,5% y conductividad eléctrica 3,8 dS/m, para los ensayos en invernadero.

Ambos fueron esterilizados por vapor fluente, sometiendo bolsas de capacidad de 1 litro a dos ciclos de 60 min, separados por 24 horas, en autoclave (120 °C, 1 atm.). Antes de rellenar las bandejas y las macetas con los sustratos y suelos, estos se enfriaron a temperatura ambiente.

1.2.4. INÓCULOS DE HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS ARBUSCULARES (AMF)

Se ensayaron dos especies de hongos formadores de micorrizas arbusculares, *G. intraradices* BEG123 y *G. mosseae* BEG119, ambos procedentes de colección (EEZ-CSIC, Granada). Los inóculos estuvieron formados por suelo rizosférico con esporas, hifas y fragmentos de raíces micorrizadas con una colonización del 75%, producidos en invernaderos usando trébol (*Trifolium repens* L.) y sorgo (*Sorghum tricolor* L. Moench) como plantas hospedadoras y una mezcla de vermiculita:sepiolita (1:1, V:V) como sustrato.

La concentración de los inóculos de AMF se ajustó mediante la técnica de diluciones seriadas (Sieverding, 1991) y se determinó, mediante el número más probable de propágulos de hongos micorrícicos (Porter, 1979), en 125 propágulos de micorrizas por g de sustrato.

Todas las plantas de tomate para los tratamientos con micorrización fueron germinadas en sustrato de turba rubia de *Sphagnum* (80%) y perlita (20%), mezclado con 3 g de inóculo de AMF, (375 propágulos de micorrizas por planta), previamente a su trasplante a maceta en invernadero, ya que se ha descrito que una micorrización previa resulta mucho más efectiva, en el control de las enfermedades causadas por *Meloidogyne*, que una inoculación simultánea con nemátodos (Talavera *et al.*, 2001). Las macetas correspondientes a tratamientos con AMF fueron nuevamente inoculadas con 15 g (1875 propágulos micorrícicos por maceta) de los correspondientes inóculos de hongos micorrícicos, colocando el inóculo bajo las raíces del plantón en el momento del trasplante. Tres semanas después del trasplante, se comprobó microscópicamente la colonización por

el AMF (aproximadamente 40%) en plantas de reserva. A los tratamientos sin AMF se les añadió la misma cantidad de inóculo autoclavado (60 min, 120 °C, 1 atm).

1.2.5. INÓCULOS DE RIZOBACTERIAS (PGPR)

Basándonos en datos como los aportados por Kluepfel *et al.* (2002), donde se reconoce a *Bacillus* y *Pseudomonas* spp. como las principales bacterias en promover el crecimiento vegetal y en reducir el daño causado por fitopatógenos; y en que para que las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) establezcan una relación beneficiosa con la planta necesitan la colonización de ésta (Vessey, 2003), nuestros ensayos incluyeron como PGPR dos cepas autóctonas, una de la bacteria endofítica *B. megaterium* y la otra de la rizosférica *P. putida*, procedentes de la colección de la Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada (Marulanda-Aguirre, 2006). Ambas fueron multiplicadas en medio líquido Nutrient Broth (NB) (8 g por l) en agitación, usando matraces de 250 ml con 50 ml de medio, durante 48 horas a 28°C y durante 72 horas a 37±2 °C, respectivamente. Los cultivos crecidos en dichos caldos nutritivos fueron centrifugados a 4500g durante 5 min a 20°C (Medina *et al.*, 2003; Marulanda-Aguirre *et al.*, 2008). El sobrenadante fue descartado y el sedimento se resuspendió en agua esterilizada. La turbidez bacteriana fue valorada mediante densidad óptica de OD_{560nm}=2,0 representando, aproximadamente, una concentración final de 10⁸ unidades formadoras de colonias (ufc) por ml.

Las plantas con tratamiento de aislado bacteriano recibieron el inóculo sobre las raíces laterales (a una distancia de 1 cm del meristemo de la raíz primaria) (López-Bucio *et al.*, 2007), una semana antes del trasplante a maceta, en dosis de 1 ml (10⁸ ufc) por planta. La misma cantidad de medio autoclavado (20 min, 120 °C, 1 atm) fue añadido a las plantas sin tratamiento bacteriano.

1.2.6. INÓCULO DE *PASTEURIA PENETRANS*

Como inóculo de la bacteria hiperparásita de *Meloidogyne*, *P. penetrans*, se utilizó el producto comercial Pasteuria Nematec[®] procedente de Japón y consistente en polvo de raíces de tomate cargado de endosporas de *P. penetrans*, obtenido según el método de Stirling y Wachtel (1980), y con una concentración de 10⁹ endosporas por g de producto. Se preparó una suspensión acuosa con 5x10⁵ endosporas por ml. Justo antes del trasplante, 50 ml de la suspensión (2,5x10⁷ esporas) se vertieron sobre el suelo contenido en cada maceta. Se utilizó esta concentración de esporas ya que, como documentaron Stirling

(1984), Stirling *et al.* (1990) y Chen *et al.* (1996), esta cantidad proporciona control de las poblaciones de nemátodos agalladores en campo. Además, la aplicación del microorganismo se realizó en ese determinado momento basándonos en el dato documentado por Tzortzakakis *et al.* (1997) donde se expresó que, la aplicación de la bacteria en semilleros no suprimió la multiplicación de los nemátodos después del trasplante en suelos infestados indicando que, el método efectivo de empleo es una aplicación de esporas en el lugar de plantación. Las plantas que no recibieron esporas viables de *P. penetrans* se trataron con una suspensión de esporas que previamente había sido autoclavada (20 min, 120 °C, 1 atm).

1.2.7. INÓCULO DE *TRICHODERMA HARZIANUM*

Se utilizó el producto comercial R-16 Tricofag Agromed[®], que consiste en una suspensión de cepas seleccionadas de *T. harzianum* en medio de cultivo líquido estéril (10^7 ufc por ml). Se preparó una suspensión con 4×10^4 ufc por ml. Justo antes del trasplante, 50 ml de la suspensión (2×10^6 ufc) se mezclaron con el suelo de cada maceta. Hubo una segunda inoculación, una semana después del trasplante, con la misma cantidad de inóculo fúngico, por lo que cada maceta recibió 4×10^6 ufc. Con ello nos aseguramos su establecimiento en la rizosfera, aunque Affokpon *et al.* (2011a) demostraron el rápido asentamiento de los aislados fúngicos en suelo y su persistencia, por al menos ocho semanas tras la aplicación, desestimando la necesidad de repetir aplicaciones. Las plantas que no recibieron *T. harzianum* se trataron con igual volumen de producto autoclavado (20 min, 120 °C, 1 atm).

El sustrato estéril utilizado fue favorable para la población fúngica de *Trichoderma*, en base a los resultados de otros estudios (Ahmad y Baker, 1987; Sariah *et al.*, 2005) donde los aislados difirieron en la adaptación a los tipos de suelo y a la competencia rizosférica y donde la población de *Trichoderma* spp. aumentó, en mayor medida, en suelo esterilizado confirmando que, éste proporciona un ambiente más favorable para la proliferación fúngica, de acuerdo con los hallazgos de Shaban y El-Komy (2001).

1.2.8. EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITES ESENCIALES

Se evaluaron cuatro productos basados en extractos vegetales y aceites esenciales:

- a) BIO 175 Agromed[®]: 99% de aceite de neem (*Azadirachta indica*).

- b) BIO 125 Ajo Agromed ®: 99% extracto líquido de ajo (*Allium sativum*).
- c) BIO 75 Timol Agromed ®: 99% de aceite natural obtenido por maceración de arbustos de tomillo rojo (*Thymus zygis*).
- d) BIO 50 Agromed ®: 100% de extracto natural obtenido por maceración de la madera seca y pulverizada de Quassia (*Quassia amara*).

Estos productos fueron diluidos en concentración 1:500 (v/v) para su aplicación a las dosis recomendadas por el fabricante. Los productos se aplicaron en dosis de 100 µl de extracto por maceta, en soluciones de 50ml, y se realizaron por triplicado en un periodo de 30 días (100 µl de extracto por planta cada 10 días). La primera aplicación fue justo antes del trasplante. Las plantas que no fueron tratadas con los extractos vegetales recibieron 50 ml de agua destilada en cada aplicación.

1.2.9. INÓCULO DE NEMÁTODOS FITOPARÁSITOS (*M. INCOGNITA*)

La población original de *M. incognita* fue recolectada de suelo y raíces de un cultivo de clavel en Chipiona (Cádiz), en marzo de 2006, y mantenida en cultivos sobre tomate susceptible cv. Durinta en invernaderos del IFAPA Centro Camino de Purchil.

Se utilizaron suspensiones de juveniles (J2s) de *M. incognita* eclosionados de huevos con una edad máxima de 48 h desde la eclosión. Los huevos fueron extraídos de raíces de tomate susceptible cv. Durinta mediante el método de maceración de las raíces, en una solución de hipoclorito sódico (NaOCl) al 1% (Hussey y Barker, 1973). Las raíces se lavaron con agua, liberándolas de partículas de suelo adheridas a ellas y se cortaron en fragmentos de aproximadamente 1-2 cm de longitud. Se sumergieron en hipoclorito sódico (NaOCl) al 1% y se sometieron a tres ciclos de batido, durante 10 segundos cada uno, para liberar los huevos de la matriz gelatinosa en la que se encuentran. La suspensión obtenida se filtró sucesivamente por tamices de 1 mm y 20 µm de luz de malla. Los huevos retenidos en el tamiz de 20 µm se lavaron varias veces con agua y se vertieron sobre bandejas de Whitehead con un doble filtro de papel de celulosa, que retiene los huevos pero permite el paso de los juveniles eclosionados de ellos (Whitehead y Hemming, 1965). Los juveniles eclosionados, que migraron al agua en el fondo de la bandeja, se recolectaron cada 24 horas en suspensiones acuosas. La concentración de las suspensiones se ajustó para disponer de aproximadamente 500 J2s por ml de suspensión acuosa, que se almacenaron en tubos de 50 ml a 10 °C, como máximo 48 h antes de la inoculación en macetas.

La inoculación de nemátodos en las macetas se realizó de modo que se alcanzara una densidad aproximada de 3 J2s por cm^3 de suelo. Justo antes del trasplante de las plántulas de tomate, se vertieron 3 ml de la suspensión acuosa con aproximadamente 1500 juveniles de *M. incognita* sobre el suelo de cada maceta, repartidos en tres agujeros alrededor, a una distancia de 1cm del centro de la maceta y a una profundidad de unos 3 cm desde la superficie de la maceta (Hooper, 1986). En cada agujero se inoculó 1 ml de suspensión con nemátodos. Dichos agujeros se cubrieron con suelo tras la inoculación. Las densidades medias de inóculo empleadas en cada ensayo se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Densidades de inóculo empleadas por maceta con 500 cm^3 de suelo en los ensayos sobre interacciones AMF-agentes antagonistas de nemátodos en el patosistema Tomate-*M. incognita*.

| Ensayo | Nº de macetas | Agentes antagonistas | J2s por 500 cm^3 de suelo |
|-----------------|---------------|--------------------------|------------------------------------|
| Ensayo 1 (2007) | 240 | AMFs-rizobacterias | 1735±76 |
| Ensayo 1 (2008) | 240 | AMFs-rizobacterias | 1236±55 |
| Ensayo 2 (2009) | 120 | AMF- <i>T. harzianum</i> | 1341±56 |
| Ensayo 2 (2010) | 120 | AMF- <i>T. harzianum</i> | 1705±59 |
| Ensayo 3 (2009) | 176 | AMF-Extractos vegetales | 1532±49 |
| Ensayo 3 (2010) | 176 | AMF-Extractos vegetales | 1378±63 |

1.3. DESARROLLO DE LOS ENSAYOS

Los ensayos se realizaron desde 2007 al 2010 en el Centro IFAPA “Camino de Purchil”, Granada. Las unidades experimentales se dispusieron en el interior de un invernadero de plástico monocapilla de cubierta curva y estructura metálica (Figura 11).

Figura 11. Invernadero donde se realizaron los ensayos.



El material plástico fue polietileno de baja densidad (PEBD cuya densidad es menor de 0,93 kg por m²), adaptado a las condiciones del área mediterránea. Los elementos de sujeción del material de cubierta fueron alambre acerado o galvanizado en tubo de sección circular. La temperatura en el interior se reguló con la ayuda de una pantalla de sombreado de material acrílico, abierta, con perforaciones para permitir el paso del aire, una ventana cenital automática para ventilación, un sistema de nebulización para refrigeración y un calefactor de gasoil por aire caliente, todos controlados por medio de crono-termostatos. El invernadero dispone de mesas con una rejilla metálica para colocar macetas a una distancia de 1,2 metros sobre el suelo y de un sistema de riego por goteo controlado por un programador automático (Figura 12).

**Figura 12. Disposición de macetas en el invernadero
(a) inicio ensayo; (b) mitad ensayo.**



En todos los casos se siguió un mismo protocolo de bioensayo tipo que consistió en:

1. Semillas de tomate susceptible del cultivar seleccionado fueron germinadas en celdillas de 25 ml de capacidad rellenas de turba estéril o bien turba estéril inoculada con AMF. Se sembraron tres semillas por celdilla.
2. Las bandejas se mantuvieron en cámaras de germinación a 25 ± 2 °C durante 10 días, momento en el cual se clarearon las semillas germinadas para dejar sólo una plántula en crecimiento por cada celdilla.
3. Estas plántulas se dejaron crecer en invernadero a 24 ± 3 °C durante dos o tres semanas más, hasta tener tres o cuatro hojas verdaderas, momento en el que se seleccionaron aquellos plantones de crecimiento más uniforme para su trasplante a macetas de 780 ml de capacidad, conteniendo 500 cm³ de suelo estéril con o sin los correspondientes inóculos según los tratamientos diseñados.
4. Las inoculaciones de microorganismos antagonistas y aplicaciones de extractos vegetales se realizaron una semana antes del trasplante en las bandejas de germinación (*B. megaterium* y *P. putida*), o bien en el momento del trasplante mezclando el inóculo con el suelo de la maceta (*P. penetrans*, *T. harzianum* y extractos vegetales), intentando simular las condiciones de aplicación en campo. Dependiendo del agente antagonista a ensayar, se pudieron realizar aplicaciones adicionales al suelo durante el periodo de crecimiento vegetativo de la planta.
5. Cada tratamiento se replicó entre cuatro y seis veces, dependiendo de la disponibilidad de espacio en invernadero. Las macetas se distribuyeron en el invernadero en bloques, con los tratamientos repartidos al azar dentro de cada bloque. La distancia entre bloques fue de 1,5 m y entre macetas de 10 cm.
6. Las plantas de tomate se dejaron crecer en invernadero con una temperatura media de 27 ± 3 °C, las mínimas y máximas se mantuvieron siempre entre 15 y 35 °C, con un 50-60% de humedad relativa.
7. Se regó diariamente a capacidad de campo y se fertilizó en una única ocasión con dos gramos por planta de Basacote plus 3M ® (16:8:12), fertilizante de liberación lenta, rico en nitrógeno y pobre en fósforo (para facilitar la micorrización).
8. La evaluación de la respuesta de la planta se realizó durante el cultivo y a los 60 días después del trasplante a las macetas, mediante la determinación de la severidad de los síntomas de nodulación en el sistema radical, la tasa de reproducción de los nemátodos y diferentes parámetros de crecimiento vegetal.

1.4. RECOGIDA DE DATOS

Durante el desarrollo de los cultivos se midieron, cada tres días, el número de flores y frutos, contenido relativo de clorofila en hoja (Relative Leaf Chlorophyll Content, RLCC) y temperatura de la cubierta desde el inicio de la antesis, obteniendo una evolución en el tiempo para estos parámetros, así como datos sobre precocidad del ciclo.

Las cosechas se llevaron a cabo a los 60 días tras el trasplante. Para cada maceta se cortó el tallo aproximadamente a 2 cm por encima del nivel del suelo y se separó el sistema radicular del cepellón disgregando el suelo manualmente con cuidado. El sistema radicular de la planta fue lavado con agua sobre un tamiz de 2 mm de luz de malla, para eliminar los restos de suelo adherido, y secado mediante presión ligera con papel secante.

El suelo procedente del lavado de las raíces fue recogido en suspensión acuosa en un cubo de 10l de capacidad y mezclado con el suelo restante, contenido en la maceta y obtenido al disgregar el cepellón.

1.4.1. MEDICIÓN DEL CONTENIDO EN CLOROFILA DE LAS HOJAS

Para la medición del contenido de clorofila en hojas se utilizó el medidor portátil SPAD 502 Minolta® (Figura 13). Los valores SPAD se correlacionan con la productividad vegetal y se pueden recopilar sin interferencias en el ciclo vegetal, lo cual hace aconsejable el uso de este parámetro bajo condiciones mediterráneas (Rharrabti, 2001).

El procedimiento consiste en estimar el contenido relativo de clorofila total (a + b) presente en la hoja (unidades SPAD relativas de Minolta), mediante la medición de la absorción de la hoja en dos regiones de longitud de onda, roja y cercana a infrarroja. Utilizando estas dos transmisiones el medidor calcula el valor numérico SPAD, que es proporcional a la cantidad de clorofila presente en la hoja.

Las mediciones se hicieron en el punto medio de la última hoja completamente desarrollada ya que, ha sido descrito como el mejor lugar para realizar las medidas de contenido de clorofilas (Hoel y Solhaug, 1998). Se realizaron cinco medidas sobre la cara adaxial de la hoja bandera de cada planta, cada tres días, durante la antesis. Los datos utilizados para este estudio corresponden a la media de cada grupo de cinco medidas, obtenida mediante la función "average" del equipo.

Figura 13. Medidor SPAD.

1.4.2. MEDICIÓN DE LA TEMPERATURA DE LA CUBIERTA VEGETAL

La temperatura de la cubierta vegetal se determinó mediante un termómetro de infrarrojos (PCE-889, PCE GROUP) dotado de un visor láser para indicar el punto de toma de la medida (Figura 14). Éste mide la temperatura utilizando la radiación emitida por los objetos. Las lecturas se hicieron cada tres días, durante la antesis. Se tomaron a las 12 horas solares, cinco lecturas por planta, calculándose posteriormente la media. El ángulo de medida fue de 30° con respecto a la horizontal.

Figura 14. Termómetro de infrarrojos.

1.4.3. BIOMASA

Se midieron las siguientes variables:

- a) Longitud de la planta en cm, medida desde el punto de corte al extremo apical (Figura 15).
- b) Peso fresco y seco de la parte aérea (secado en estufa a 60 °C, durante 48 h).
- c) Peso fresco de las raíces.
- d) Número de flores.
- e) Número de frutos.
- f) Peso fresco de los frutos.

Figura 15. Diferencias en la longitud de la planta entre distintos tratamientos.



1.4.4. MICORRIZACIÓN

La frecuencia de micorrización en la raíz (F%), la intensidad micorrización (M%), y la intensidad de la colonización media por fragmento (m%), se valoraron tras la cosecha en fragmentos de raíz fresca de cada planta inoculada con AMF, para ello se realizó una tinción de estructuras fúngicas (Phillips y Hayman, 1970; Koske y Gemma, 1989) modificando los tiempos según nuestro tipo de raíces:

1. Las raíces se sumergen en una solución de KOH al 10%, a 90°C durante 5 minutos, donde sufren una hidrólisis de las paredes celulares que permite una mejor penetración del colorante.

2. Se lavan las raíces y se sumergen en HCl 0,1N, durante 2-3 minutos a temperatura ambiente, para acidificar y que el colorante se adhiera mejor a las estructuras fúngicas.
3. Se elimina el HCl y se añade azul tripán 0,05% en ácido láctico (v/v), a 90 °C durante 5 minutos.
4. Por último, se elimina el colorante y se añade ácido láctico, que permite una buena conservación de la raíz y una decoloración de las zonas de la raíz no teñidas.

La cuantificación de la colonización de las raíces por AMF se estimó mediante la metodología descrita por Ocampo *et al.*, (1980) y Trouvelot *et al.*, (1986), según la cual 30 fragmentos de raíz de 1 cm de longitud se montan en un portaobjetos y sobre ellos se hace un recuento en el microscopio, específico de estructuras fúngicas (Figura 16a, b). Este método requiere la definición de unos valores numéricos para cada estadio de la micorrización, en una escala de 0 (no colonización) a 5 (100% de ocupación del fragmento por estructuras fúngicas). Con los datos numéricos obtenidos de los 30 segmentos de raíz se calculan los parámetros de micorrización deseados.

Frecuencia de la micorrización en la raíz:

$$F\% = (\text{n}^\circ \text{ de fragmentos con micorrización} / \text{n}^\circ \text{ total de fragmentos}) \times 100$$

Intensidad de la micorrización en el sistema radical:

$$M\% = (95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1) / \text{n}^\circ \text{ total de fragmentos}$$

n₅= número de fragmentos con valor 5

95: valor teórico de ocupación dado a los fragmentos con valor 5

n₄= número de fragmentos con valor 4

70: valor teórico de ocupación dado a los fragmentos con valor 4

n₃= número de fragmentos con valor 3

30: valor teórico de ocupación dado a los fragmentos con valor 3

n₂= número de fragmentos con valor 2

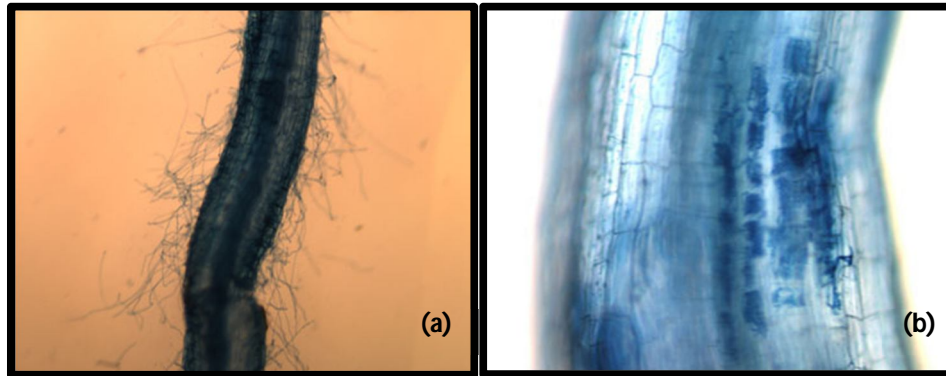
5: valor teórico de ocupación dado a los fragmentos con valor 2

n₁= número de fragmentos con valor 1

Intensidad de la colonización media por fragmento:

$$m\% = M \times \text{n}^\circ \text{ total de fragmentos} / \text{n}^\circ \text{ fragmentos con alguna micorrización}$$

Figura 16. Fragmento de raíz micorrizada (a) y detalle de las estructuras características de los AMFs (arbusculos) (b).



1.4.5. ÍNDICE DE AGALLAS

La severidad de la enfermedad en el sistema radicular se estimó mediante la observación del índice de agallas en las raíces infestadas (Figura 17) y en una escala 0-10 (0: ninguna agalla; 7: 100% de las raíces presentan agallas; 10: no existe sistema radicular, planta muerta) (Figura 5) (Bridge y Page, 1980).

Figura 17. Sistema radicular afectado.



1.4.6. DENSIDADES DE NEMÁTODOS EN RAÍCES

Las densidades de población de nemátodos en raíces se estimaron en submuestras de 10 g de raíz, o en todo el sistema radicular cuando el peso era menor a 10 g, mediante la extracción de huevos por batida en solución de hipoclorito sódico (Hussey y Barker, 1973):

1. Las muestras de raíces se cortaron en fragmentos de 1-2 cm de longitud y se mezclaron cuidadosamente.
2. Submuestras de raíces de 10 g, cortadas y mezcladas, se colocaron en una batidora.
3. Se agregaron 200 ml de solución de hipoclorito sódico al 0,5% y se batió a la velocidad mínima del aparato durante tres minutos.
4. Se batió de nuevo durante 30 segundos a la velocidad máxima. Se lavaron las paredes de la licuadora y se batió durante 30 segundos más.
5. Se vertió la suspensión sobre 2 tamices superpuestos, colocando en la parte superior un tamiz de 150 μm de apertura de malla y en la inferior, uno de 20 μm .
6. Se enjuagaron los 2 tamices por separado. El material recolectado en el tamiz de 150 μm contenía la mayoría de las hembras, J3s y J4s, mientras que el recolectado en el tamiz de 20 μm contenía principalmente J2s y huevos.
7. Los adultos, juveniles y huevos de *Meloidogyne* se contaron en placas de recuento y se expresó el resultado por g de raíz. El número de nemátodos presentes en las raíces se calculó multiplicando el número de nemátodos presentes en 1 g de raíz por el peso total del sistema radicular.

1.4.7. DENSIDADES DE NEMÁTODOS EN SUELO

Los nemátodos presentes en suelo se recuperaron de muestras de 500 cm^3 de suelo procedente de las macetas, mediante el método de tamizado, decantación (Cobb, 1918) y centrifugación en gradiente de MgSO_4 con densidad 1,18 (Coolen, 1979) (Figura 18).

Figura 18. Extracción de nemátodos del suelo.



1.4.8. ÍNDICE DE EFICACIA ABBOTT

Finalmente, se calculó el número de nemátodos por planta sumando los juveniles presentes en los 500 cm³ de suelo de cada maceta con los huevos, juveniles y adultos obtenidos del total del sistema radicular de cada planta. Con este dato se calculó el índice de eficacia de los tratamientos en la reducción de las densidades de población finales de *M. incognita*, mediante la fórmula de Abbott modificada, para cada maceta.

$$\text{Eficacia} = [1 - (N_i / N_{\max})] \times 100$$

Donde N_i es el número de nemátodos en la maceta "i" al finalizar el ensayo y N_{\max} es el número máximo de nemátodos por maceta obtenido entre todos los tratamientos y repeticiones al finalizar el ensayo.

1.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se utilizó el software Statistix 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL ©). Todos los datos fueron analizados mediante análisis de la variancia paramétrico (ANOVA) o su equivalente no paramétrico (Kruskal-Wallis). Previamente al análisis, se comprobó la similitud entre los ensayos realizados en años consecutivos mediante un ANOVA preliminar. En el caso de encontrar diferencias significativas, se analizaron ambas repeticiones anuales por separado. En caso de no encontrar diferencias significativas entre años, se agruparon los datos y se consideraron como repeticiones de un mismo ensayo.

Se aplicaron los test de Shapiro-Wilk y Levene para comprobar la normalidad y homocedasticidad de las variables, respectivamente. Cuando resultaron significativos, los datos numéricos se transformaron mediante $\log(x+1)$ y los porcentajes mediante el arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje, $\arcsen\sqrt{p}$, y los datos transformados volvieron a someterse a los test de Shapiro-Wilk y Levene. Se utilizaron test estadísticos paramétricos (ANOVA) siempre que se pudo comprobar la homocedasticidad de las variancias y la normalidad de la distribución de los datos, y también en casos de distribuciones no normales cuando el número de casos fue mayor de 50. En el resto de los casos, se optó por un análisis de Kruskal-Wallis.

Mediante ANOVA, en los casos en que fue posible aplicarlo, se pudieron interpretar las interacciones entre factores y si sus efectos correspondían sólo a la suma de los efectos de los factores principales o bien existía una interacción significativa entre ellos. Esto no fue posible en el caso de los análisis de Kruskal-Wallis, ya que se trata de un análisis de un

solo factor (una vía), por lo que para cada factor principal se realizó un análisis de Kruskal-Wallis independiente. Los efectos de la combinación de los factores principales se analizaron considerando cada combinación de factores como un tratamiento individualizado, en análisis de Kruskal-Wallis independientes (Thomas y Kiwanga, 1993).

Cuando los valores de la F obtenidos en los ANOVA resultaron significativos, las diferencias entre medias de los distintos grupos o tratamientos fueron comparadas mediante el procedimiento de comparaciones múltiples de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD). Cuando los valores del estadístico de H de Kruskal-Wallis resultaron significativos, las diferencias entre medianas de los distintos grupos o tratamientos fueron comparadas mediante el procedimiento de comparaciones múltiples basadas en el test de Mann-Whitney y la corrección de Bonferroni, para todas las parejas de medianas. Para todos los test se consideró significativo el valor de $P < 0,05$.

2. RESULTADOS

2.1. ENSAYO 1. EFECTOS DE LA MICORRIZACIÓN E INOCULACIÓN CON BACTERIAS SOBRE EL PATOSISTEMA TOMATE-*M. INCOGNITA*

Se investigaron los efectos de la inoculación de microorganismos bioprotectores AMF (*Glomus intraradices* o *G. mosseae*) y PGPR (*Bacillus megaterium* o *Pseudomonas putida*) y de un bacteria parásita de *Meloidogyne* (*Pasteuria penetrans*) sobre distintas variables de crecimiento y producción vegetal, micorrización, severidad de la enfermedad causada por *M. incognita* y reproducción del nemátodo, en tomate cv. Durinta y cv. Josefina.

2.1.1. ENSAYOS EN TOMATE CV. DURINTA

En la tabla 15 se muestra la significación estadística para los efectos de los factores ensayados [infestación por nemátodos (NEM), micorrización (AMF), inoculación con bacterias (BAC)] y sus interacciones sobre las variables de crecimiento y productividad vegetal, micorrización y reproducción del nemátodo en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita*.

Tabla 15. Significación estadística del ANOVA multifactorial o los test de Kruskal-Wallis en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita*.

| | NEM | AMF | BAC | NEM×AMF | NEM×BAC | AMF×BAC | NEM×AMF×BAC |
|--|--------|--------|--------|---------|---------|---------|-------------|
| Longitud parte aérea (cm) ^{KW} | 0,0008 | ns | ns | 0,0042 | 0,0005 | ns | 0,0002 |
| Peso fresco parte aérea (g) año 1 ^o ^{KW} | 0,0000 | ns | ns | 0,0000 | 0,0000 | ns | 0,0001 |
| Peso fresco parte aérea (g) año 2 ^o ^{AV} | 0,0437 | ns | ns | ns | 0,0240 | ns | ns |
| Peso seco parte aérea (g) ^{KW} | 0,0098 | 0,0024 | ns | 0,0000 | 0,0007 | ns | 0,0000 |
| Peso fresco raíces (g) ^{KW} | ns | ns | 0,0000 | 0,0065 | 0,0002 | 0,0000 | 0,0000 |
| Número de flores ^{KW} | 0,0000 | 0,0000 | ns | 0,0000 | 0,0003 | 0,0000 | 0,0000 |
| Número de frutos ^{KW} | 0,0000 | 0,0131 | ns | 0,0000 | 0,0000 | ns | 0,0000 |
| Peso fresco de frutos (g) ^{KW} | 0,0308 | ns | 0,0001 | ns | 0,0001 | 0,0000 | 0,0000 |
| Contenido en clorofila (RLCC-SPAD) año 2 ^o ^{KW} | 0,0022 | 0,0000 | ns | 0,0000 | ns | 0,0058 | 0,0009 |
| Temperatura de la cubierta vegetal (°C) año 2 ^o ^{KW} | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Frecuencia de micorrización, F% ^{KW} | 0,0255 | 0,0345 | 0,0022 | 0,0079 | 0,0000 | 0,0007 | 0,0000 |
| Intensidad de micorrización, M% ^{KW} | 0,0024 | 0,0000 | 0,0155 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |
| Intensidad de micorrización media por fragmento, m% ^{AV} | 0,0000 | 0,0000 | 0,0091 | ns | 0,0000 | ns | 0,0000 |
| Índice de agallas ^{KW} | - | 0,0306 | 0,0003 | - | - | 0,0000 | - |
| Número de J2 + huevos por maceta ^{AV} | - | 0,0001 | 0,0000 | - | - | 0,0000 | - |
| Número de hembras de <i>Meloidogyne</i> por maceta ^{KW} | - | ns | ns | - | - | ns | - |
| Eficacia Abbott en la reducción del número de nemátodos por maceta ^{KW} | - | 0,0096 | 0,0000 | - | - | 0,0000 | - |

Tratamientos analizados por ANOVA ^{AV} o Kruskal-Wallis ^{KW}. ns. Nivel de significación $p > 0,05$, no significativo.

Las siguientes tablas y figuras muestran los resultados obtenidos para las distintas variables de crecimiento vegetal (Tabla 16), productividad vegetal (Tabla 17), micorrización (Tabla 18) y reproducción de nemátodos (Figuras 19-22) en tomate cv. Durinta.

Tabla 16. Valores de crecimiento vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita*. (Continúa).

| Tratamientos | Longitud parte aérea (cm) | Peso fresco parte aérea, año 1 (g) * | Peso fresco parte aérea, año 2 (g) * |
|--------------|---------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| ØØØ | 71,13 ± 2,00 ab | 40,48 ± 3,82 ab | 43,68 ± 4,18 a |
| IØØ | 69,27 ± 2,29 ab | 51,60 ± 2,57 a | 49,90 ± 3,39 a |
| MØØ | 67,72 ± 2,48 ab | 49,66 ± 1,37 a | 49,06 ± 1,95 a |
| ØBØ | 66,95 ± 3,32 ab | 48,62 ± 3,55 ab | 35,86 ± 4,96 a |
| IBØ | 66,68 ± 3,02 ab | 43,46 ± 3,69 ab | 47,78 ± 2,69 a |
| MBØ | 74,52 ± 3,24 ab | 45,94 ± 2,99 ab | 50,84 ± 8,61 a |
| ØSØ | 74,84 ± 4,11 ab | 47,34 ± 5,99 ab | 47,70 ± 4,06 a |
| ISØ | 69,57 ± 1,38 ab | 49,90 ± 2,21 a | 46,06 ± 4,13 a |
| MSØ | 72,85 ± 2,02 ab | 51,06 ± 4,60 ab | 49,14 ± 5,53 a |
| ØPØ | 70,86 ± 1,35 ab | 47,12 ± 3,56 ab | 45,00 ± 1,82 a |
| IPØ | 71,32 ± 1,89 ab | 49,26 ± 2,18 ab | 53,80 ± 1,74 a |
| MPØ | 68,10 ± 1,84 ab | 51,20 ± 0,71 a | 48,20 ± 0,66 a |
| ØØN | 64,06 ± 3,74 ab | 40,82 ± 5,76 ab | 42,16 ± 7,24 a |
| IØN | 69,56 ± 2,74 ab | 41,08 ± 1,39 ab | 41,74 ± 2,87 a |
| MØN | 61,94 ± 3,06 ab | 40,42 ± 2,59 ab | 43,82 ± 4,57 a |
| ØBN | 64,75 ± 3,40 ab | 41,54 ± 3,89 ab | 44,14 ± 4,14 a |
| IBN | 69,41 ± 3,47 ab | 41,88 ± 2,48 ab | 48,12 ± 3,64 a |
| MBN | 72,70 ± 1,55 ab | 43,14 ± 3,83 ab | 48,44 ± 3,89 a |
| ØSN | 57,96 ± 3,30 ab | 35,78 ± 3,80 ab | 50,66 ± 4,12 a |
| ISN | 54,63 ± 5,10 ab | 15,56 ± 1,55 b | 50,18 ± 3,25 a |
| MSN | 59,51 ± 4,57 ab | 34,80 ± 5,50 ab | 43,68 ± 3,87 a |
| ØPN | 66,86 ± 2,49 ab | 35,88 ± 2,05 ab | 39,68 ± 4,57 a |
| IPN | 55,42 ± 3,51 b | 28,04 ± 6,43 ab | 29,80 ± 5,41 a |
| MPN | 75,31 ± 2,20 a | 40,62 ± 2,01 ab | 41,94 ± 2,51 a |

Datos expresados como media ± error estándar de diez réplicas (cinco repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cinco réplicas.

Tratamientos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

La longitud de la parte aérea se vio disminuida por la presencia de nemátodos ($64,34 \pm 1,10$ cm) frente al conjunto de plantas no infestadas ($70,32 \pm 0,74$ cm) (Tablas 15 y 16). Aunque, la micorrización o la inoculación con bacterias no influyeron sobre la longitud de la parte de aérea de la planta por sí mismas, en el análisis de la combinación de factores (NEM×AMF), se observó un menor crecimiento en las plantas micorrizadas por *G. intraradices* e infestadas por nemátodos ($62,26 \pm 2,16$ cm) frente a aquellas micorrizadas por *G. mosseae* y no infestadas ($70,80 \pm 1,27$ cm) (Tablas 15 y 16). Así mismo, al analizar la

combinación de factores (NEM×BAC), las plantas inoculadas con *P. putida* e infestadas por *M. incognita* mostraron menores longitudes ($57,37 \pm 2,47$ cm) que todas aquellas no infestadas y que las infestadas con nemátodos pero inoculadas con *B. megaterium* (Tablas 15 y 16). En el análisis individualizado de todos los tratamientos o triple combinación (NEM×AMF×BAC), el tratamiento micorrizado por *G. mosseae*, inoculado con *P. penetrans* e infestado por nemátodos [MPN] fue el que mostró mayor longitud de la parte aérea, aunque sólo fue significativamente diferente del micorrizado por *G. intraradices*, inoculado con *P. penetrans* e infestado por nemátodos [IPN] (Tabla 16).

Durante el primer año de ensayo, el peso fresco de la parte aérea se vio disminuido por la infestación de la planta por *M. incognita* frente al conjunto de plantas no infestadas, ($36,63 \pm 1,40$ g vs $47,97 \pm 0,98$ g) (Tablas 15 y 16). En el análisis de la combinación (NEM×AMF) se observó que, las plantas micorrizadas por *G. intraradices* e infestadas por nemátodos mostraron menor peso fresco de la parte aérea ($31,64 \pm 2,98$ g) que los tratamientos control sin infestar ya fuesen sin micorrizar ($45,89 \pm 2,13$) o micorrizados por *G. intraradices* ($48,56 \pm 1,44$ g) o *G. mosseae* ($49,47 \pm 1,40$ g) (Tablas 15 y 16). El análisis de la combinación (NEM×BAC) mostró que los tratamientos control sin infestar por nemátodos y sin inocular con bacterias ($47,25 \pm 1,97$ g), así como aquellos sin infestar pero inoculados con *P. putida* ($49,43 \pm 2,47$ g) o *P. penetrans* ($49,19 \pm 1,38$ g) mostraron mayor peso fresco de la parte aérea que los tratamientos que combinaron la infestación por nemátodos con la inoculación de *P. putida* ($28,71 \pm 3,27$ g) o *P. penetrans* ($34,85 \pm 2,58$ g) (Tablas 15 y 16). Entre todos los tratamientos, se observó que las plantas micorrizadas por *G. intraradices*, inoculadas con *P. putida* e infestadas por *M. incognita* [ISN] mostraron el menor peso fresco de la parte aérea, aunque siendo diferente significativamente sólo de las no infestadas y no inoculadas con bacteria, bien micorrizadas por *G. mosseae* o bien por *G. intraradices* [MØØ], [IØØ], las micorrizadas por *G. intraradices*, inoculadas con *P. putida* y no infestadas [ISØ] o las micorrizadas por *G. mosseae*, inoculadas con *P. penetrans* y no infestadas [MPØ] (Tabla 16).

El peso fresco de la parte aérea también se vio disminuido por la infestación de la planta por *M. incognita* frente al conjunto de plantas no infestadas, en el segundo año de ensayo ($43,70 \pm 1,33$ g vs $47,25 \pm 1,22$ g) (Tablas 15 y 16). La micorrización o la inoculación con bacterias no influyeron sobre el peso fresco de la parte de aérea de la planta por sí mismas, aunque en este caso se observó una interacción significativa en la combinación (NEM × BAC) ya que, las plantas infestadas por nemátodos e inoculadas con

P. penetrans, independientemente de la micorrización, mostraron un menor peso fresco que el resto ($37,14 \pm 2,71$ g) (Tablas 15 y 16).

Tabla 16 (continuación). Valores de crecimiento vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita*.

| Tratamientos | Peso seco parte aérea (g) | Peso fresco de la raíz (g) |
|--------------|---------------------------|----------------------------|
| ØØØ | 9,53 ± 0,43 abc | 7,75 ± 0,59 abcde |
| IØØ | 10,92 ± 0,48 ab | 4,71 ± 0,49 de |
| MØØ | 11,54 ± 0,55 ab | 9,34 ± 0,68 abcd |
| ØBØ | 7,81 ± 0,88 bc | 5,54 ± 0,64 bcde |
| IBØ | 10,65 ± 1,05 abc | 14,71 ± 1,58 a |
| MBØ | 10,16 ± 1,55 abc | 8,62 ± 1,21 abcde |
| ØSØ | 7,68 ± 1,20 abc | 7,45 ± 1,03 abcde |
| ISØ | 10,33 ± 0,54 abc | 9,64 ± 1,03 abcd |
| MSØ | 11,64 ± 0,53 ab | 10,47 ± 1,45 abc |
| ØPØ | 9,45 ± 0,21 abc | 7,33 ± 0,47 abcde |
| IPØ | 10,62 ± 0,29 abc | 3,60 ± 0,34 e |
| MPØ | 11,89 ± 0,48 a | 8,72 ± 0,45 abcd |
| ØØN | 8,81 ± 0,92 abc | 8,20 ± 1,02 abcde |
| IØN | 9,10 ± 0,51 abc | 10,27 ± 0,58 abc |
| MØN | 10,13 ± 0,47 abc | 6,80 ± 0,52 bcde |
| ØBN | 9,34 ± 0,61 abc | 7,42 ± 0,62 abcde |
| IBN | 10,20 ± 0,47 abc | 7,91 ± 0,15 abcde |
| MBN | 10,21 ± 0,41 abc | 8,97 ± 1,18 abcde |
| ØSN | 11,35 ± 0,58 ab | 10,74 ± 0,82 ab |
| ISN | 10,96 ± 0,39 ab | 7,27 ± 0,39 abcde |
| MSN | 9,16 ± 0,52 abc | 9,77 ± 0,77 abc |
| ØPN | 8,82 ± 0,65 abc | 7,81 ± 0,88 abcde |
| IPN | 6,54 ± 0,71 c | 4,95 ± 0,97 cde |
| MPN | 9,29 ± 0,37 abc | 4,81 ± 0,59 de |

Datos expresados como media ± error estándar de diez réplicas (cinco repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cinco réplicas. Tratamientos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

El peso seco de la parte aérea también disminuyó en presencia de *M. incognita* ($9,49 \pm 0,19$ g vs $10,19 \pm 0,25$ g) y las plantas micorrizadas por *G. mosseae* ($10,50 \pm 0,27$ g) mostraban mayor peso seco de la parte aérea que las no micorrizadas ($9,10 \pm 0,28$ g), ya estuviesen infestadas por nemátodos o no (Tablas 15 y 16). En el análisis de la combinación (NEM × AMF) se observó que, en las plantas libres de nemátodos, la micorrización por *G. mosseae* ($11,31 \pm 0,45$ g) o *G. intraradices* ($10,63 \pm 0,32$ g) incrementó el peso seco de la parte aérea en comparación con los controles sin infestar y sin micorrizar

($8,62 \pm 0,40$ g) (Tablas 15 y 16). Similarmente, en el análisis de la combinación (NEM \times BAC), las plantas infestadas por nemátodos e inoculadas con *P. penetrans* mostraron los mínimos valores de peso seco de la parte aérea ($8,22 \pm 0,40$ g), siendo significativamente menores que en las plantas infestadas e inoculadas con *P. putida* ($10,49 \pm 0,33$ g) y que aquellas libres de nemátodos y no inoculadas con bacterias ($10,66 \pm 0,31$ g), o inoculadas con *P. penetrans* ($10,65 \pm 0,27$ g) o *P. putida* ($9,88 \pm 0,55$ g) (Tablas 15 y 16). En cuanto al análisis de los tratamientos individualizados, los mayores valores de peso seco de la parte aérea los mostraron los tratamientos micorrizados por *G. mosseae* sin infestar por nemátodos [MØØ], [MPØ], [MSØ] y los tratamientos [ØSN], [ISN] y [IØØ], que fueron todos significativamente mayores que el tratamiento micorrizado por *G. intraradices* en suelo inoculado por *P. penetrans* e infestado por *M. incognita* [IPN], que mostró los mínimos valores de peso seco de la parte aérea (Tabla 16).

Ni la micorrización, ni la infestación por *M. incognita* influyeron en el peso fresco de las raíces, y solo aquellas plantas en suelos inoculados con *P. penetrans* ($6,20 \pm 0,35$ g) mostraron un menor peso del sistema radical que el resto (Tablas 15 y 16). Mediante el análisis de la combinación (NEM \times AMF) se observó que, las plantas micorrizadas por *G. mosseae* y no infestadas por nemátodos ($9,29 \pm 0,51$ g) mostraron mayor peso fresco de las raíces que aquellas no micorrizadas ni infestadas por nemátodos ($7,02 \pm 0,37$ g) (Tablas 15 y 16). En el caso de la combinación (NEM \times BAC) las plantas infestadas por nemátodos e inoculadas con *P. putida* mostraron el mayor peso fresco de raíces ($9,26 \pm 0,47$ g) significativamente mayor que aquellas inoculadas con *P. penetrans*, tanto infestadas por nemátodos ($5,86 \pm 0,53$ g) como sin infestar ($6,55 \pm 0,47$ g) (Tablas 15 y 16). También se observaron diferencias significativas en el caso de la combinación (AMF \times BAC) ya que, las plantas micorrizadas por *G. intraradices* e inoculadas con *B. megaterium* ($11,31 \pm 1,10$ g) y las micorrizadas por *G. mosseae* e inoculadas con *P. putida* ($10,12 \pm 0,80$ g) mostraron mayores pesos que las no micorrizadas e inoculadas con *B. megaterium* ($6,48 \pm 0,48$ g) y que las micorrizadas con *G. intraradices* e inoculadas con *P. penetrans* ($4,28 \pm 0,52$ g) (Tablas 15 y 16). En la triple interacción, los mayores valores de peso fresco de las raíces se obtuvieron en los tratamientos [IBØ] y [ØSN], que fueron significativamente mayores que los tratamientos [IPN], [MPN], [IØØ] e [IPØ] (Tabla 16).

Tabla 17. Valores de productividad vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita*. (Continúa).

| Tratamientos | Número de flores | Número de frutos | Peso fresco de los frutos (g) |
|--------------|----------------------|------------------|-------------------------------|
| ØØØ | 7,40 ± 0,62 defgh | 3,60 ± 0,50 abc | 23,49 ± 1,55 bcd |
| IØØ | 9,80 ± 1,25 abcdef | 5,00 ± 0,54 a | 30,32 ± 2,99 abcd |
| MØØ | 11,80 ± 0,25 ab | 5,50 ± 1,05 abc | 45,23 ± 3,35 ab |
| ØBØ | 7,40 ± 0,22 defgh | 2,90 ± 0,28 abc | 41,00 ± 5,80 abcd |
| IBØ | 8,90 ± 0,18 abcdefg | 3,70 ± 0,40 abc | 49,44 ± 4,42 a |
| MBØ | 9,20 ± 0,13 abcdef | 5,10 ± 0,78 ab | 23,03 ± 4,67 abcd |
| ØSØ | 7,70 ± 0,30 cdefgh | 3,20 ± 0,33 abc | 40,28 ± 3,38 abcd |
| ISØ | 9,30 ± 0,15 abcdef | 2,60 ± 0,40 abc | 32,38 ± 3,40 abcd |
| MSØ | 11,20 ± 0,20 abc | 5,50 ± 0,48 a | 31,63 ± 2,59 abcd |
| ØPØ | 8,00 ± 0,73 bcdefgh | 4,00 ± 0,30 abc | 23,59 ± 0,82 bcd |
| IPØ | 8,00 ± 0,63 abcdefgh | 4,10 ± 0,46 abc | 26,34 ± 2,66 abcd |
| MPØ | 12,00 ± 0,26 a | 5,60 ± 0,56 a | 43,85 ± 2,46 ab |
| ØØN | 4,10 ± 0,35 h | 3,30 ± 0,52 abc | 21,88 ± 3,58 bcd |
| IØN | 8,30 ± 0,65 abcdefgh | 1,60 ± 0,37 c | 31,35 ± 8,10 abcd |
| MØN | 10,70 ± 0,37 abcd | 2,50 ± 0,50 abc | 42,69 ± 5,63 abcd |
| ØBN | 6,20 ± 0,36 fgh | 3,50 ± 0,40 abc | 47,61 ± 5,47 abc |
| IBN | 7,40 ± 0,52 defgh | 2,60 ± 0,70 abc | 28,60 ± 6,35 abcd |
| MBN | 8,70 ± 0,26 abcdefgh | 2,90 ± 0,57 abc | 31,81 ± 4,53 abcd |
| ØSN | 7,20 ± 0,33 efgh | 2,60 ± 0,69 abc | 35,81 ± 6,28 abcd |
| ISN | 8,30 ± 0,34 abcdefgh | 3,10 ± 0,35 abc | 33,14 ± 3,95 abcd |
| MSN | 10,20 ± 0,42 abcde | 2,40 ± 0,31 abc | 27,93 ± 3,30 abcd |
| ØPN | 9,90 ± 0,66 abcdef | 5,20 ± 1,06 abc | 19,77 ± 2,89 d |
| IPN | 4,90 ± 0,48 gh | 1,60 ± 0,45 bc | 17,80 ± 3,75 d |
| MPN | 8,30 ± 0,37 abcdefgh | 3,20 ± 0,55 abc | 18,92 ± 4,06 cd |

Datos expresados como media ± error estándar de diez réplicas (cinco repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cinco réplicas.

Tratamientos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

El número de flores producidas por planta fue menor cuando las plantas estuvieron infestadas por nemátodos ($7,85 \pm 0,22$) que cuando se encontraban libres de ellos ($9,23 \pm 0,21$), mayor cuando estaban micorrizadas por *G. mosseae* ($10,26 \pm 0,18$) que por *G. intraradices* ($8,11 \pm 0,26$), y éstas a su vez mayores que cuando no estaban micorrizadas ($7,24 \pm 0,24$) (Tablas 15 y 17). La inoculación con bacterias no influyó en el número de flores por planta, aunque se observaron diferencias significativas dentro de la combinación (NEM × BAC) ya que, las plantas infestadas por nemátodos e inoculadas por *B. megaterium* produjeron menos flores ($7,43 \pm 0,29$) que aquellas sin infestar y sin inocular con ninguna bacteria ($9,67 \pm 0,57$) o inoculadas con *P. putida* ($9,40 \pm 0,29$) o *P. penetrans* ($9,33 \pm 0,48$) (Tablas 15 y 17). Por último, el análisis de la triple combinación de factores reveló que las

plantas infestadas por nemátodos, sin micorrizar y sin inocular con bacterias [ØØN] mostraron el menor número de flores de todos los tratamientos mientras que, el máximo correspondió a aquellas micorrizadas por *G. mosseae* en suelos inoculados con *P. penetrans* y sin infestar [MPØ] (Tabla 17).

El número de frutos se redujo en las plantas infestadas por nemátodos ($2,88 \pm 0,18$) frente a las no infestadas ($4,23 \pm 0,18$), y en las micorrizadas por *G. intraradices* ($3,04 \pm 0,20$) frente a las micorrizadas por *G. mosseae* ($4,09 \pm 0,26$), pero no se observaron diferencias en cuanto a la bacteria inoculada (Tablas 15 y 17). No obstante, en el análisis de la combinación (NEM \times BAC) se observó que, las plantas no infestadas por nemátodos sin bacterias ($4,70 \pm 0,44$) o inoculadas con *P. penetrans* ($4,57 \pm 0,29$) mostraban mayor número de frutos que las infestadas por nemátodos y sin bacteria ($2,47 \pm 0,29$) o inoculadas con *P. putida* ($2,70 \pm 0,27$) (Tablas 15 y 17). En cuanto al análisis de la triple combinación de factores, las plantas micorrizadas por *G. mosseae* e inoculadas con *P. putida* o *P. penetrans* en suelos sin infestar por *M. incognita*, [MSØ] y [MPØ], y las micorrizadas por *G. intraradices*, sin bacteria y sin nemátodos [IØØ], mostraron mayor número de frutos que aquellas infestadas por *M. incognita* y micorrizadas por *G. intraradices* e inoculadas con *P. penetrans* [IPN] o sin inocular con bacterias [IØN] (Tabla 17).

El peso fresco de los frutos fue reducido por la infestación por nemátodos ($29,78 \pm 1,61$ g vs $34,22 \pm 1,25$ g), e incrementado por la inoculación con *B. megaterium* ($36,92 \pm 2,42$ g) o *P. putida* ($33,53 \pm 1,64$ g) frente a las inoculadas con *P. penetrans* ($25,05 \pm 1,64$ g) (Tablas 15 y 17). Los menores valores de peso fresco de los frutos fueron para los tratamientos que combinaron la infestación por nemátodos en suelos inoculados con *P. penetrans* [ØPN], [IPN] y [MPN], todos ellos mostraron valores significativamente menores que los tratamientos sin infestar, micorrizados por *G. mosseae*, sin bacteria [MØØ] o inoculados con *P. penetrans* [MPØ] o que el tratamiento sin infestar, micorrizado por *G. intraradices* e inoculado con *B. megaterium* [IBØ] que mostró el mayor peso de frutos (Tabla 17).

Tabla 17 (Continuación). Valores de productividad vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita*.

| Tratamientos | Contenido en clorofila (unidades SPAD) * | Temperatura de la cubierta vegetal (°C) * |
|--------------|--|---|
| ØØØ | 29,22 ± 0,80 ab | 26,68 ± 0,48 a |
| IØØ | 30,22 ± 0,87 ab | 27,46 ± 0,17 a |
| MØØ | 32,40 ± 2,25 ab | 27,44 ± 0,46 a |
| ØBØ | 29,38 ± 1,45 ab | 27,42 ± 0,24 a |
| IBØ | 29,58 ± 1,13 ab | 27,24 ± 0,65 a |
| MBØ | 34,40 ± 0,61 a | 27,32 ± 0,74 a |
| ØSØ | 27,70 ± 1,63 ab | 26,80 ± 0,66 a |
| ISØ | 31,66 ± 0,95 ab | 28,04 ± 0,79 a |
| MSØ | 31,28 ± 0,90 ab | 26,82 ± 0,44 a |
| ØPØ | 28,60 ± 0,98 ab | 26,80 ± 0,49 a |
| IPØ | 30,60 ± 0,51 ab | 27,60 ± 0,24 a |
| MPØ | 36,80 ± 1,71 a | 27,60 ± 0,24 a |
| ØØN | 27,50 ± 1,33 ab | 26,16 ± 0,54 a |
| IØN | 24,50 ± 3,16 ab | 27,86 ± 0,69 a |
| MØN | 29,40 ± 1,86 ab | 27,72 ± 0,32 a |
| ØBN | 22,70 ± 1,91 b | 27,98 ± 0,47 a |
| IBN | 28,90 ± 1,93 ab | 27,64 ± 0,59 a |
| MBN | 29,38 ± 1,13 ab | 28,52 ± 0,50 a |
| ØSN | 28,78 ± 1,25 ab | 28,04 ± 0,62 a |
| ISN | 29,84 ± 1,59 ab | 27,40 ± 0,32 a |
| MSN | 34,22 ± 0,62 a | 27,78 ± 0,94 a |
| ØPN | 27,82 ± 1,32 ab | 28,16 ± 0,65 a |
| IPN | 29,82 ± 0,37 ab | 27,24 ± 1,09 a |
| MPN | 28,46 ± 1,56 ab | 26,86 ± 1,27 a |

Datos expresados como media ± error estándar de diez réplicas (cinco repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cinco réplicas.

Tratamientos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

El contenido en clorofila fue mayor en las plantas libres de nemátodos ($30,99 \pm 0,46$) que en las infestadas por *M. incognita* ($28,44 \pm 0,56$), y también mayor en las micorrizadas por *G. mosseae* ($32,04 \pm 0,64$) que en las micorrizadas por *G. intraradices* ($29,39 \pm 0,59$) o en las no micorrizadas ($27,71 \pm 0,55$) (Tablas 15 y 17). No se observaron diferencias en cuanto al efecto individual de la inoculación con las distintas bacterias; no obstante, en la combinación de factores (AMF × BAC) se observó que la inoculación con *B. megaterium* en plantas sin micorrizar redujo los contenidos en clorofila ($26,04 \pm 1,59$) en comparación al valor máximo, proporcionado por el tratamiento micorrización por *G. mosseae* e inoculación con *P. putida* ($32,75 \pm 0,71$) (Tablas 15 y 17). Los tratamientos

correspondientes a las interacciones de *G. mosseae* con las tres bacterias ensayadas en plantas sin infestar por nemátodos [MBØ], [MPØ] y [MSØ], fueron los que mostraron mayor porcentaje de clorofila en las hojas, frente al tratamiento sin micorrizar e inoculado con *B. megaterium* [ØBN] que dio el valor mínimo (Tabla 17).

Tabla 18. Valores medios de variables relacionadas con la micorrización en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Durinta -*M. incognita*.

| Tratamientos | Frecuencia de micorrización (F%) | Intensidad de micorrización (M%) | Intensidad de colonización media por fragmento (m%) |
|--------------|----------------------------------|----------------------------------|---|
| IØØ | 72,15 ± 1,05 bcd | 10,82 ± 1,61 cd | 17,74 ± 2,06 ef |
| MØØ | 69,17 ± 2,35 d | 20,18 ± 1,79 abc | 30,68 ± 2,34 ab |
| IBØ | 85,02 ± 2,07 ab | 25,72 ± 0,92 a | 29,90 ± 0,59 abc |
| MBØ | 81,70 ± 3,00 abcd | 26,93 ± 1,30 a | 34,84 ± 2,58 a |
| ISØ | 71,35 ± 1,40 cd | 22,19 ± 0,49 ab | 31,59 ± 0,71 a |
| MSØ | 83,82 ± 2,15 abc | 28,08 ± 1,96 a | 30,82 ± 2,02 ab |
| IPØ | 73,52 ± 0,91 bcd | 7,92 ± 0,67 d | 16,11 ± 1,39 ef |
| MPØ | 68,71 ± 1,86 d | 19,26 ± 1,51 abcd | 31,45 ± 2,07 ab |
| IØN | 71,80 ± 1,09 cd | 13,17 ± 1,61 bcd | 17,95 ± 2,01 ef |
| MØN | 85,49 ± 2,08 ab | 19,83 ± 2,63 abc | 20,97 ± 1,96 de |
| IBN | 72,03 ± 2,29 bcd | 9,83 ± 0,91 cd | 13,46 ± 1,28 f |
| MBN | 79,93 ± 1,09 abcd | 19,19 ± 1,44 abcd | 24,05 ± 2,58 d |
| ISN | 72,85 ± 1,52 bcd | 12,66 ± 1,05 bcd | 16,76 ± 0,98 ef |
| MSN | 71,49 ± 1,17 cd | 17,99 ± 1,30 abcd | 24,61 ± 2,19 cd |
| IPN | 89,00 ± 2,22 a | 22,81 ± 1,91 ab | 25,97 ± 2,08 bcd |
| MPN | 88,42 ± 1,93 a | 17,78 ± 1,21 abcd | 23,65 ± 1,45 d |

Datos expresados como media ± error estándar de diez réplicas (cinco repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cinco réplicas.

Tratamientos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

La frecuencia de micorrización (F%) fue mayor en las plantas infestadas por nemátodos ($78,88 \pm 1,01$) que en aquellas no infestadas ($75,68 \pm 0,97$), y *G. mosseae* mostró mayor F% ($78,59 \pm 1,06$) que *G. intraradices* ($75,97 \pm 0,92$) (Tablas 15 y 18). Las plantas inoculadas con *B. megaterium* ($79,67 \pm 1,31$) mostraron F% mayores que aquellas inoculadas con *P. putida* ($74,88 \pm 1,13$) o no inoculadas con bacterias ($74,65 \pm 1,32$) (Tablas 15 y 18). Además, en el análisis de la combinación (NEM × BAC) se observó que, independientemente del AMF utilizado, en las plantas infestadas e inoculadas con *P. penetrans* ($88,71 \pm 1,44$), F% fue mayor que en el resto de tratamientos, y del análisis de la combinación (AMF × BAC), independientemente de si la planta estaba infestada o no por nemátodos, las plantas coinoculadas con *G. mosseae* y *B. megaterium* ($80,82 \pm 1,57$) y las coinoculadas con *G. intraradices* y *P. penetrans* ($81,26 \pm 2,13$) mostraban mayores F% que

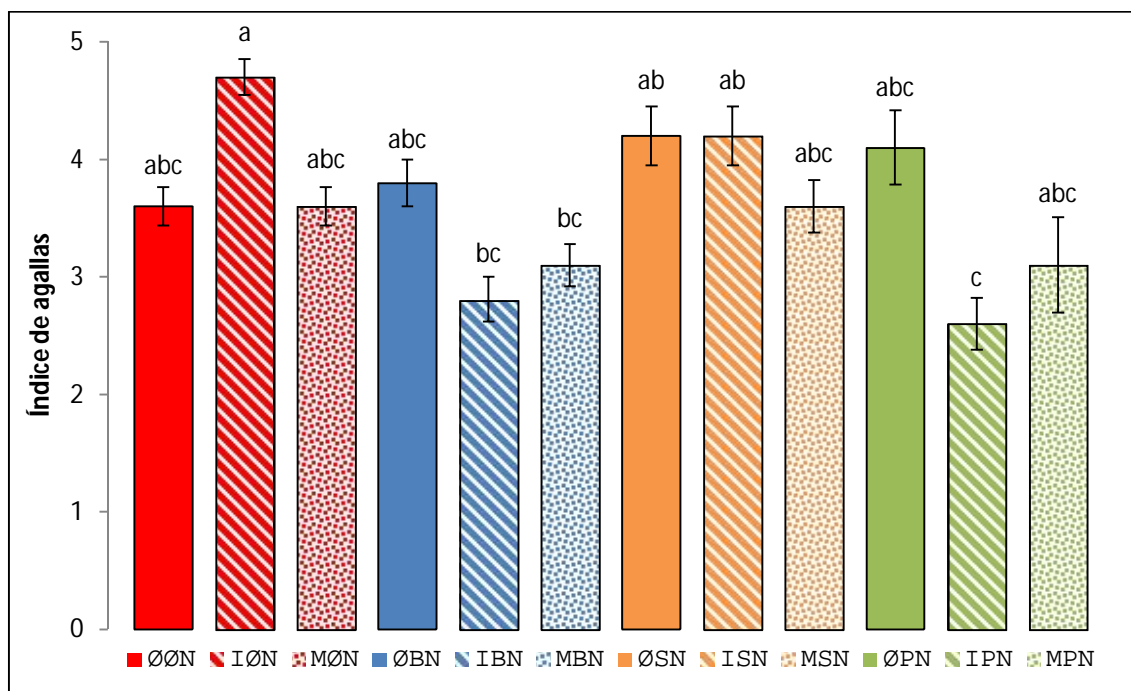
las micorrizadas por *G. intraradices* coinoculadas con *P. putida* ($72,10 \pm 1,02$) o *B. megaterium* ($78,52 \pm 2,12$) (Tablas 15 y 18). Los mayores valores de F% se obtuvieron en los tratamientos infestados por nemátodos en suelo inoculado con *P. penetrans* y micorrizados, ya fuera por *G. intraradices* [IPN] o por *G. mosseae* [MPN], que fueron significativamente mayores que los correspondientes tratamientos sin infestar o que aquellos inoculados con otras bacterias. Estas frecuencias de micorrización sólo se incrementaron por *P. penetrans* en presencia de nemátodos, no siendo significativos los incrementos en los tratamientos [IPØ] o [MPØ], éste último mostró la menor F% de todos los tratamientos (Tabla 18).

Por el contrario, la intensidad de micorrización (M%) fue mayor en plantas no infestadas ($20,14 \pm 0,91$) que en plantas infestadas por nemátodos ($16,66 \pm 0,71$) (Tablas 15 y 18). *G. mosseae* también mostró mayor M% ($21,16 \pm 0,71$) que *G. intraradices* ($15,64 \pm 0,83$), y aquellas plantas inoculadas con *B. megaterium* ($20,42 \pm 1,22$) mostraron M% mayores que aquellas no inoculadas con bacterias ($16,00 \pm 1,15$) (Tablas 15 y 18). El análisis de la combinación (NEM \times BAC) mostró además que, aquellas plantas sin infestar e inoculadas con *B. megaterium* ($26,33 \pm 0,79$) o *P. putida* ($25,14 \pm 1,19$) mostraban mayores M% que el resto de combinaciones (Tablas 15 y 18). El análisis de la combinación (AMF \times BAC) indicó que, independientemente de la infestación por nemátodos, las plantas micorrizadas por *G. intraradices* y sin inocular con bacterias mostraban los valores mínimos de M% ($11,99 \pm 1,14$), significativamente diferentes de las micorrizadas con *G. mosseae* (Tablas 15 y 18). Los tratamientos conjuntos [IBØ], [MBØ], [MSØ], mostraron los mayores valores de M% y los tratamientos [IPØ], [IBN] y [IØØ] los valores mínimos de M% (Tabla 18).

La intensidad media de micorrización por fragmento (m%) se redujo cuando las plantas fueron infestadas por nemátodos ($20,93 \pm 0,79$ vs $27,89 \pm 0,96$) (Tablas 15 y 18). *G. mosseae* mostró mayor m% ($27,64 \pm 0,90$) que *G. intraradices* ($21,18 \pm 0,89$), y cualquier inoculación bacteriana incrementó m% en relación a las plantas no inoculadas con bacteria ($21,83 \pm 1,32$) (Tablas 15 y 18). Se observó una interacción significativa en (NEM \times BAC), ya que la inoculación del suelo con *P. penetrans* disminuyó m% en ausencia de nemátodos ($23,78 \pm 2,14$), en relación a los tratamientos sin infestar e inoculados con *P. putida* ($31,21 \pm 1,05$) o *B. megaterium* ($32,37 \pm 1,40$) y, sin embargo, incrementó m% en plantas infestadas ($24,81 \pm 1,26$) vs la inoculación con otras bacterias en plantas infestadas, *B. megaterium* ($18,75 \pm 1,85$) y *P. putida* ($20,69 \pm 1,48$) (Tablas 15 y 18). Los mayores valores de m% se hallaron en las plantas no infestadas, micorrizadas por *G. mosseae* e inoculadas

con *B. megaterium* [MBØ] o micorrizadas por *G. intraradices* e inoculadas con *P. putida* [ISØ], significativamente mayores que en todos aquellos tratamientos con plantas infestadas por nemátodos, y que en aquellos no infestados y micorrizados por *G. intraradices* sin bacteria [IØØ] o coinoculado con *P. penetrans* [IPØ] (Tabla 18).

Figura 19. Valores medios de los índices de agallas en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Durinta -*M. incognita*.



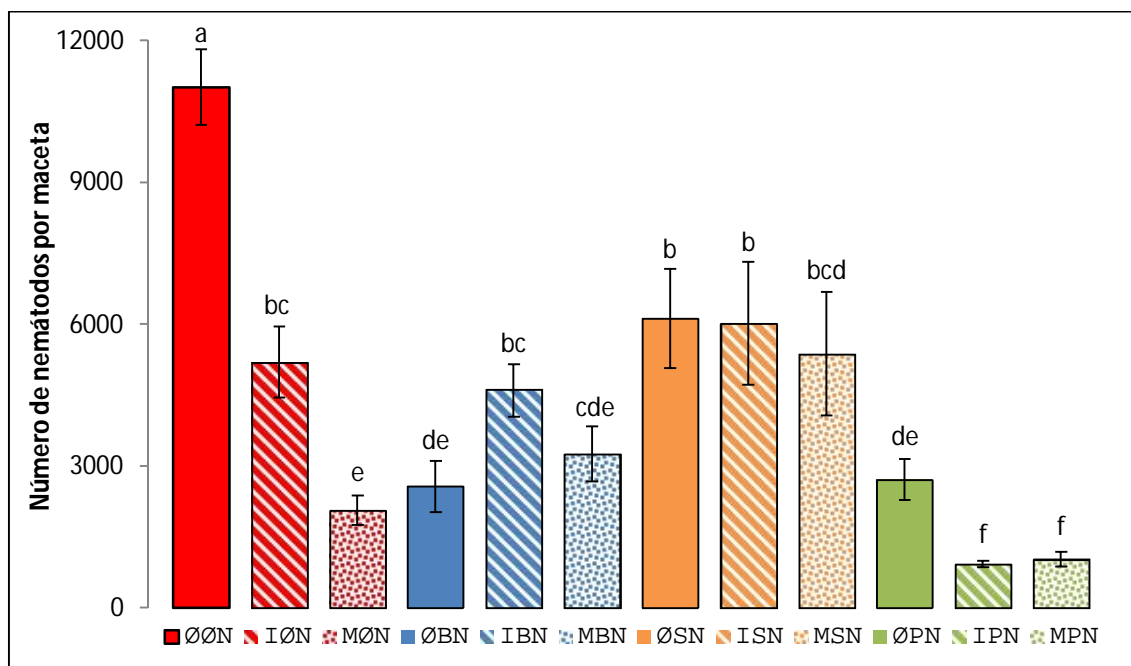
Datos expresados como media \pm error estándar de diez réplicas (cinco repeticiones x dos años).

Columnas coronadas con la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

La micorrización por *G. mosseae* redujo el índice de agallas ($3,35 \pm 0,13$) en comparación a las plantas no micorrizadas ($3,93 \pm 0,12$) (Tabla 15 y Figura 19). Así mismo, *P. penetrans* y *B. megaterium* también redujeron el índice de agallas ($3,27 \pm 0,21$ y $3,23 \pm 0,13$, respectivamente) en comparación con *P. putida* ($4,00 \pm 0,14$) o plantas sin inoculación bacteriana ($3,97 \pm 0,13$) (Tabla 15 y Figura 19). En el análisis de la combinación (AMF \times BAC) se observó que, las plantas micorrizadas por *G. intraradices* sin inoculación bacteriana mostraban el mayor índice de agallas ($4,70 \pm 0,15$), aunque sólo significativamente mayor que aquellas micorrizadas por *G. intraradices* y coinoculadas con *B. megaterium* ($2,80 \pm 0,20$) o *P. penetrans* ($2,60 \pm 0,22$) y aquellas micorrizadas por *G. mosseae* y coinoculadas con *B. megaterium* ($3,10 \pm 0,18$) (Tabla 15 y Figura 19). El tratamiento más efectivo en la reducción del índice de agallas fue la combinación de *G.*

intraradices y *P. penetrans* [IPN], cuyos valores fueron significativamente menores que en los tratamientos [IØN], [ISN] y [ØSN] (Figura 19).

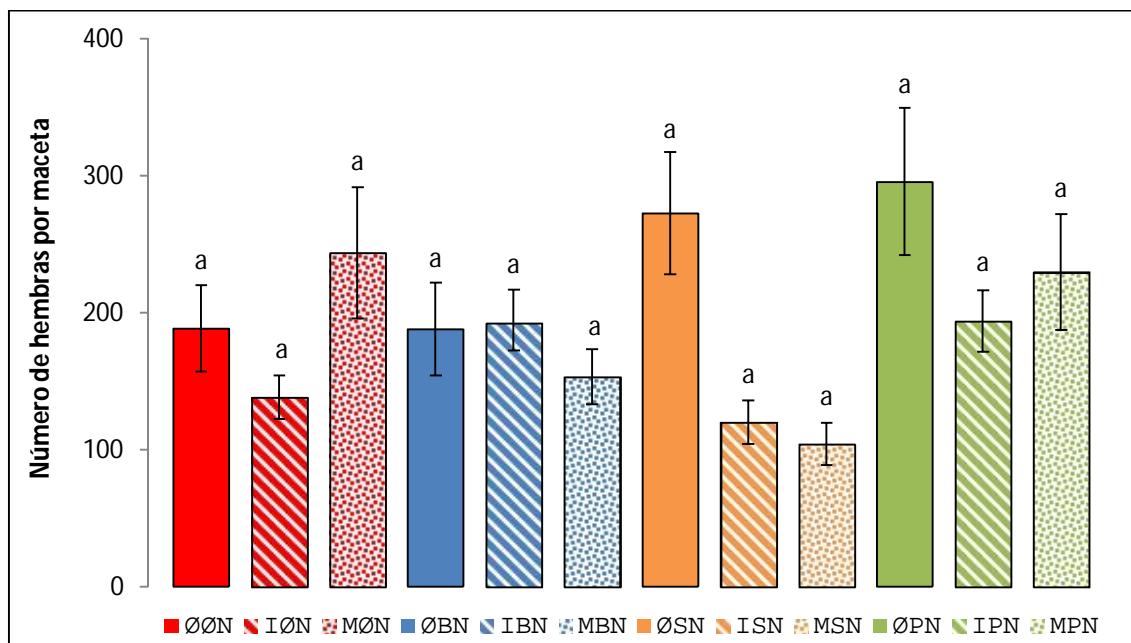
Figura 20. Valores medios de la densidad final de nemátodos por maceta en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita*.



Datos expresados como media \pm error estándar de diez réplicas (cinco repeticiones x dos años). Columnas coronadas con la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

El número de nemátodos por maceta se vio reducido en los tratamientos micorrizados por *G. mosseae* (3.064 ± 432) frente a aquellos micorrizados por *G. intraradices* (4.191 ± 494) o aquellos sin micorrizar (5.602 ± 656) (Tabla 15 y Figura 20). La inoculación con *P. penetrans* redujo el número de nemátodos (1.553 ± 214) en relación a la inoculación de la planta con *B. megaterium* (3.482 ± 344), y éste, a su vez, redujo el número de nemátodos en relación al tratamiento con *P. putida* (5.835 ± 685) o a las plantas sin bacterias (6.271 ± 750) (Tabla 15 y Figura 20). Todos los tratamientos redujeron el número de nemátodos por maceta en relación al control sin micorrizar y sin bacteria [ØØN]. Los tratamientos conjuntos con *P. penetrans* en plantas micorrizadas, ya fuera por *G. mosseae* [MPN] o por *G. intraradices* [IPN], fueron los que mostraron menor número de nemátodos por maceta (Figura 20).

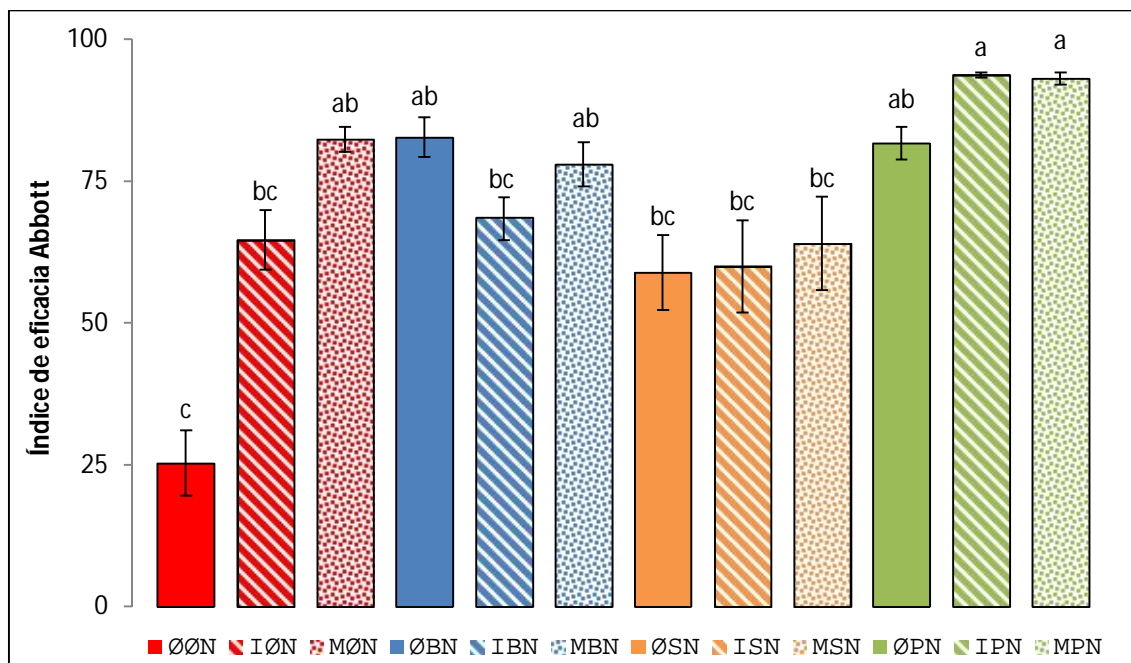
Figura 21. Valores medios del número de hembras de *M. incognita* por maceta en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita*.



Datos expresados como media \pm error estándar de diez réplicas (cinco repeticiones x dos años).

Columnas coronadas con la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

Figura 22. Valores medios de eficacia Abbott en la reducción del número de nemátodos en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita*.



Datos expresados como media \pm error estándar de diez réplicas (cinco repeticiones x dos años).

Columnas coronadas con la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

En cuanto al índice de eficacia Abbott para la reducción de las densidades de nemátodos, la micorrización por *G. mosseae* se mostró efectiva ($79,36 \pm 2,82$) frente a las plantas no micorrizadas ($62,16 \pm 4,43$) (Tabla 15 y Figura 18). La inoculación con *P. penetrans* fue más efectiva ($89,51 \pm 1,43$) que las inoculaciones con *B. megaterium* ($76,43 \pm 2,31$), *P. putida* ($60,98 \pm 4,32$) o sin bacteria ($57,42 \pm 5,13$) (Tabla 15 y Figura 22). Los tratamientos más efectivos fueron aquellos que combinaron la aplicación al suelo de esporas de *P. penetrans* con la micorrización, ya fuera por *G. mosseae* [MPN] o *G. intraradices* [IPN]. Las combinaciones de *G. intraradices* con las distintas bacterias promotoras del crecimiento vegetal no consiguieron incrementar significativamente la eficacia en la reducción del número de nemátodos, en relación al control sin tratar [ØØN] (Figura 22).

2.1.2. ENSAYOS EN TOMATE CV. JOSEFINA

En la tabla 19 se muestra la significación estadística para los efectos de los factores ensayados [infestación por nemátodos (NEM), micorrización (AMF) e inoculación con bacterias (BAC)] y sus interacciones sobre las distintas variables de crecimiento y productividad vegetal, micorrización y reproducción del nemátodo en el patosistema Tomate cv. Josefina-*M. incognita*.

Tabla 19. Significación estadística del ANOVA multifactorial o los test de Kruskal-Wallis en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacterias en el patosistema Tomate cv. Josefina-*M. incognita*.

| | NEM | AMF | BAC | NEM×AMF | NEM×BAC | AMF×BAC | NEM×AMF×BAC |
|---|--------|--------|--------|---------|---------|---------|-------------|
| Longitud parte aérea (cm) año 1 ^o ^{KW} | 0,0002 | 0,0427 | 0,0000 | 0,0009 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |
| Longitud parte aérea (cm) año 2 ^o ^{KW} | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Peso fresco parte aérea (g) ^{KW} | ns | 0,0130 | ns | 0,0172 | 0,0073 | 0,0000 | 0,0000 |
| Peso seco parte aérea (g) ^{KW} | ns | 0,0172 | ns | 0,0158 | 0,0187 | 0,0000 | 0,0000 |
| Peso fresco raíces (g) ^{KW} | ns | 0,0000 | 0,0007 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |
| Número de flores ^{KW} | 0,0000 | 0,0000 | 0,0001 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |
| Número de frutos ^{KW} | ns | 0,0061 | ns | ns | ns | 0,0000 | 0,0000 |
| Peso fresco de frutos (g) ^{KW} | ns | 0,0000 | 0,0248 | 0,0004 | 0,0223 | 0,0000 | 0,0000 |
| Contenido en clorofila (RLCC-SPAD) año 2 ^o ^{KW} | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Temperatura de la cubierta vegetal (°C) año 2 ^o ^{KW} | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Frecuencia de micorrización, F% ^{KW} | ns | ns | 0,0001 | ns | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |
| Intensidad de micorrización, M% ^{KW} | 0,0000 | 0,0001 | ns | 0,0000 | 0,0000 | 0,0022 | 0,0000 |
| Intensidad de micorrización media por fragmento, m% ^{KW} | 0,0000 | 0,0251 | 0,0002 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0002 | 0,0000 |
| Índice de agallas ^{KW} | - | 0,0294 | 0,0000 | - | - | 0,0000 | - |
| Número de J2 + huevos por maceta año 1 ^{oAV} | - | 0,0003 | 0,0000 | - | - | 0,0000 | - |
| Número de J2 + huevos por maceta año 2 ^{oAV} | - | ns | 0,0431 | - | - | 0,0153 | - |
| Número de hembras de <i>Meloidogyne</i> por maceta ^{KW} | - | 0,0139 | 0,0000 | - | - | 0,0000 | - |
| Eficacia Abbott en la reducción del número de nemátodos por maceta año 1 ^o ^{KW} | - | 0,0014 | 0,0001 | - | - | 0,0001 | - |
| Eficacia Abbott en la reducción del número de nemátodos por maceta año 2 ^o ^{AV} | - | ns | 0,0431 | - | - | 0,0153 | - |

Tratamientos analizados por ANOVA ^{AV} o Kruskal-Wallis ^{KW}. ns. Nivel de significación $p > 0,05$, no significativo.

Las siguientes tablas y figuras muestran los resultados obtenidos para las distintas variables de crecimiento vegetal (Tabla 20), productividad vegetal (Tabla 21), micorrización (Tabla 22) y reproducción de nemátodos (Figuras 23-28), en tomate cv. Josefina.

Tabla 20. Valores de crecimiento vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Josefina-*M. incognita*. (Continúa).

| Tratamientos | Longitud parte aérea, año 1 (cm) * | Longitud parte aérea, año 2 (cm) * | Peso fresco parte aérea (g) |
|--------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| ØØØ | 70,20 ± 7,90 abcd | 103,50 ± 1,98 a | 70,52 ± 6,14 abc |
| IØØ | 89,40 ± 2,38 abcd | 105,00 ± 4,55 a | 66,32 ± 3,21 abc |
| MØØ | 110,80 ± 12,61 ab | 104,20 ± 4,49 a | 70,75 ± 4,76 abc |
| ØBØ | 87,80 ± 4,33 abcd | 94,10 ± 5,10 a | 83,82 ± 4,10 a |
| IBØ | 94,20 ± 2,65 abcd | 99,60 ± 4,65 a | 63,99 ± 1,85 abc |
| MBØ | 93,42 ± 4,63 abcd | 101,40 ± 6,27 a | 59,86 ± 8,08 abc |
| ØSØ | 96,40 ± 4,32 abcd | 104,80 ± 3,52 a | 67,44 ± 5,61 abc |
| ISØ | 112,06 ± 6,20 a | 100,70 ± 3,91 a | 67,45 ± 5,31 abc |
| MSØ | 99,76 ± 2,06 abcd | 97,50 ± 2,98 a | 77,72 ± 3,85 abc |
| ØPØ | 104,28 ± 0,29 abc | 103,80 ± 0,74 a | 75,42 ± 0,78 abc |
| IPØ | 106,88 ± 4,78 abc | 103,40 ± 4,39 a | 70,06 ± 1,89 abc |
| MPØ | 105,32 ± 1,25 ab | 105,00 ± 1,73 a | 59,72 ± 1,57 abc |
| ØØN | 48,52 ± 2,71 d | 100,70 ± 4,69 a | 54,59 ± 4,54 c |
| IØN | 68,40 ± 1,83 bcd | 105,60 ± 1,34 a | 63,07 ± 6,53 abc |
| MØN | 67,80 ± 2,85 bcd | 101,70 ± 6,23 a | 59,35 ± 3,75 abc |
| ØBN | 96,20 ± 3,29 abcd | 92,50 ± 3,82 a | 81,16 ± 3,46 ab |
| IBN | 91,46 ± 3,06 abcd | 93,80 ± 7,51 a | 74,41 ± 3,18 abc |
| MBN | 105,74 ± 2,50 ab | 100,70 ± 4,64 a | 62,00 ± 4,96 abc |
| ØSN | 58,38 ± 5,17 cd | 98,40 ± 4,45 a | 56,19 ± 4,29 bc |
| ISN | 87,48 ± 8,89 abcd | 103,50 ± 5,93 a | 65,31 ± 6,41 abc |
| MSN | 77,14 ± 6,32 abcd | 105,60 ± 1,44 a | 68,27 ± 7,37 abc |
| ØPN | 101,18 ± 3,74 abcd | 102,00 ± 3,45 a | 76,48 ± 1,56 abc |
| IPN | 98,74 ± 2,11 abcd | 98,30 ± 2,80 a | 65,12 ± 4,98 abc |
| MPN | 100,00 ± 1,98 abcd | 99,70 ± 2,70 a | 63,12 ± 2,31 abc |

Datos expresados como media ± error estándar de diez réplicas (cinco repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cinco réplicas.

Tratamientos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

Durante el primer año del ensayo, la longitud de la parte aérea se vio disminuida por la presencia de nemátodos ($83,42 \pm 2,60$ cm), frente al conjunto de plantas no infestadas ($97,54 \pm 2,05$ cm) (Tablas 19 y 20). La micorrización por *G. mosseae* incrementó la longitud de la parte aérea ($95,00 \pm 2,86$ cm), frente a las plantas no micorrizadas ($82,87 \pm 3,47$ cm) (Tablas 19 y 20). Las plantas que crecieron en suelos no inoculados con bacterias mostraron menor longitud ($75,85 \pm 4,35$ cm) que aquellas inoculadas con *B. megaterium* ($94,80 \pm 1,66$ cm) o *P. penetrans* ($102,73 \pm 1,17$ cm), éstas últimas, a su vez, también presentaron mayor longitud que las inoculadas con *P. putida* ($88,54 \pm 3,87$ cm)

(Tablas 19 y 20). Las plantas no micorrizadas ni inoculadas con bacterias, pero infestadas por nemátodos [ØØN], presentaron los valores mínimos de longitud de la parte aérea, sólo en el caso de la inoculación conjunta con *G. mosseae* y *B. megaterium* [MBN] se consiguió incrementar la longitud significativamente, en presencia de nemátodos (Tabla 20).

La micorrización por *G. mosseae* disminuyó el peso fresco de la parte aérea ($65,10 \pm 1,84$ g), en relación a las plantas no micorrizadas ($70,70 \pm 1,81$ g) (Tablas 19 y 20). El análisis de la combinación (NEM \times BAC) también mostró un mayor peso fresco de la parte aérea en aquellas plantas infestadas por nemátodos e inoculadas con *B. megaterium* ($72,52 \pm 2,65$ g), en comparación con las plantas infestadas pero sin inocular con bacterias ($59,00 \pm 2,90$ g) (Tablas 19 y 20). El análisis de la combinación (AMF \times BAC) asimismo mostró que, independientemente de la infestación por nemátodos, la inoculación con *B. megaterium* ($82,49 \pm 2,63$ g) o *P. penetrans* ($75,95 \pm 0,86$ g) producía mayor peso fresco de la parte aérea que las plantas inoculadas con *P. putida* ($61,82 \pm 3,67$ g) (Tablas 19 y 20). En cuanto al análisis conjunto de la combinación de los tres factores, las plantas sin micorrizar no inoculadas con bacteria pero infestadas [ØØN] mostraron los valores mínimos de peso fresco de la parte aérea (Tabla 20).

Tabla 20 (Continuación). Valores de crecimiento vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Josefina-M. incognita.

| Tratamientos | Peso seco parte aérea (g) | Peso fresco de la raíz (g) |
|--------------|---------------------------|----------------------------|
| ∅∅∅ | 13,16 ± 0,92 abc | 15,51 ± 1,00 ab |
| I∅∅ | 12,56 ± 1,95 abc | 7,47 ± 0,41 cdef |
| M∅∅ | 13,13 ± 1,25 abc | 10,69 ± 0,71 abcde |
| ∅B∅ | 14,10 ± 0,71 abc | 16,47 ± 1,68 ab |
| IB∅ | 10,85 ± 0,49 bc | 8,47 ± 0,44 bcdef |
| MB∅ | 11,50 ± 1,06 abc | 8,08 ± 0,70 bcdef |
| ∅S∅ | 12,17 ± 1,48 abc | 10,44 ± 0,84 abcdef |
| IS∅ | 13,80 ± 1,49 abc | 5,51 ± 0,39 f |
| MS∅ | 14,19 ± 2,06 abc | 9,92 ± 0,42 abcdef |
| ∅P∅ | 15,69 ± 0,35 a | 13,52 ± 0,98 abc |
| IP∅ | 13,52 ± 0,16 abc | 7,43 ± 0,36 def |
| MP∅ | 9,98 ± 0,26 bc | 9,84 ± 0,55 abcdef |
| ∅∅N | 9,17 ± 1,13 c | 7,42 ± 0,45 def |
| I∅N | 10,77 ± 1,88 abc | 6,06 ± 0,97 ef |
| M∅N | 10,40 ± 1,32 abc | 8,31 ± 0,39 bcdef |
| ∅BN | 14,72 ± 0,71 ab | 15,47 ± 3,57 abcde |
| IBN | 13,27 ± 0,63 abc | 18,22 ± 2,50 ab |
| MBN | 10,79 ± 0,88 abc | 10,18 ± 1,12 abcdef |
| ∅SN | 8,97 ± 1,10 bc | 11,42 ± 0,52 abcde |
| ISN | 11,53 ± 1,01 abc | 7,60 ± 0,92 cdef |
| MSN | 12,04 ± 1,47 abc | 13,27 ± 1,34 abcd |
| ∅PN | 13,75 ± 0,26 abc | 16,47 ± 0,95 a |
| IPN | 12,51 ± 1,22 abc | 9,04 ± 0,91 abcdef |
| MPN | 11,48 ± 0,39 abc | 7,84 ± 0,21 cdef |

Datos expresados como media ± error estándar de diez réplicas (cinco repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cinco réplicas.

Tratamientos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

El peso seco de la parte aérea se vio reducido, de la misma manera que el peso fresco, por la micorrización por *G. mosseae* ($11,69 \pm 0,44$ g) vs plantas no micorrizadas ($12,72 \pm 0,40$ g) (Tablas 19 y 20). Del análisis de la combinación (NEM × AMF) se deduce que, la combinación de micorrización por *G. mosseae* e infestación por nemátodos ($11,18 \pm 0,54$ g) redujo significativamente el peso seco de la parte aérea en relación a los controles sin micorrizar ni infestar por nemátodos ($13,78 \pm 0,51$ g) (Tablas 19 y 20). Además, en el análisis (AMF × BAC) también se observó que, independientemente de la infestación por nemátodos, aquellas plantas sin micorrizar e inoculadas por *P. penetrans* ($14,72 \pm 0,31$ g) o *B. megaterium* ($14,41 \pm 0,49$ g) mostraban mayores pesos secos de la parte aérea que las inoculadas con *P. putida* ($10,57 \pm 0,97$ g) y que las micorrizadas por *G. mosseae* e inoculadas con *P. penetrans* ($10,73 \pm 0,29$ g) (Tablas 19 y 20). En cuanto al análisis de los

tratamientos individualizados considerando los tres factores implicados, el mayor peso seco de la parte aérea se obtuvo en los tratamientos sin micorrizar y sin infestar e inoculado con *P. penetrans* [ØPØ] y sin micorrizar, infestado e inoculado con *B. megaterium* [ØBN], los cuales fueron significativamente mayores que los tratamientos micorrizado por *G. intraradices*, coinoculado con *B. megaterium* y sin infestar [IBØ], micorrizado por *G. mosseae*, coinoculado con *P. penetrans* sin infestar [MPØ], e infestados, sin micorrizar, sin inocular con bacteria [ØØN] o inoculado con *P. putida* [ØSN] (Tabla 20).

El peso fresco de las raíces fue disminuido por la micorrización por *G. intraradices* ($8,73 \pm 0,56$ g) y *G. mosseae* ($9,77 \pm 0,32$ g), frente a las plantas no micorrizadas ($13,34 \pm 0,63$ g), mientras que la inoculación con *B. megaterium* lo incrementó ($12,82 \pm 0,94$ g) en comparación con las plantas sin inoculación bacteriana ($9,24 \pm 0,49$ g) (Tablas 19 y 20). Los mayores pesos frescos de las raíces se observaron en los tratamientos control [ØØØ] y con inoculación bacteriana (*B. megaterium* o *P. penetrans*), sin micorrizar y sin infestar por nemátodos [ØBØ] y [ØPØ], que fueron significativamente mayores que la mayoría de los micorrizados por *G. intraradices* [IØØ], [IØN], [IPØ], [ISØ], [ISN] que mostraron los valores mínimos (Tabla 20).

Tabla 21. Valores de productividad vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Josefina-M. *incognita*. (Continúa).

| Tratamientos | Número de flores | Número de frutos | Peso fresco de los frutos (g) |
|--------------|--------------------|-------------------|-------------------------------|
| ØØØ | 9,60 ± 0,91 abcdef | 12,90 ± 1,22 abcd | 19,15 ± 3,50 abcd |
| IØØ | 7,90 ± 0,23 cdef | 9,30 ± 0,99 abcd | 6,14 ± 0,69 d |
| MØØ | 11,40 ± 1,23 abcd | 9,60 ± 0,90 abcd | 10,46 ± 0,51 abcd |
| ØBØ | 10,90 ± 0,55 abcd | 15,70 ± 1,19 a | 14,02 ± 4,14 abcd |
| IBØ | 9,80 ± 0,47 abcdef | 12,40 ± 0,69 abcd | 13,47 ± 4,42 abcd |
| MBØ | 14,60 ± 0,54 a | 6,90 ± 1,36 cd | 5,73 ± 2,33 cd |
| ØSØ | 10,90 ± 0,60 abcd | 6,50 ± 0,73 d | 11,13 ± 1,32 abcd |
| ISØ | 8,90 ± 0,28 bcdef | 9,90 ± 0,98 abcd | 14,47 ± 2,87 abcd |
| MSØ | 11,20 ± 0,39 abcd | 13,50 ± 1,43 abcd | 18,06 ± 1,67 ab |
| ØPØ | 11,80 ± 0,80 abcd | 14,80 ± 0,25 a | 22,59 ± 3,52 a |
| IPØ | 7,90 ± 0,18 def | 10,10 ± 0,94 abcd | 7,04 ± 0,51 bcd |
| MPØ | 14,70 ± 0,92 ab | 10,20 ± 0,59 abcd | 10,45 ± 0,33 abcd |
| ØØN | 5,40 ± 0,37 ef | 13,10 ± 1,12 abc | 17,54 ± 1,60 ab |
| IØN | 9,80 ± 0,25 abcde | 11,00 ± 1,28 abcd | 13,79 ± 2,85 abcd |
| MØN | 11,50 ± 0,37 abc | 9,10 ± 1,31 abcd | 8,45 ± 2,12 abcd |
| ØBN | 5,70 ± 0,30 ef | 11,70 ± 1,04 abcd | 10,22 ± 2,56 abcd |
| IBN | 8,90 ± 0,18 bcdef | 11,20 ± 0,73 abcd | 6,62 ± 1,07 bcd |
| MBN | 9,00 ± 0,30 bcdef | 11,10 ± 0,81 abcd | 10,95 ± 1,51 abcd |
| ØSN | 11,50 ± 0,50 abcd | 8,20 ± 1,01 bcd | 17,15 ± 1,58 abc |
| ISN | 10,20 ± 0,29 abcd | 12,00 ± 1,02 abcd | 7,56 ± 1,55 abcd |
| MSN | 11,50 ± 0,56 abcd | 13,70 ± 0,84 abc | 7,58 ± 1,56 abcd |
| ØPN | 5,50 ± 0,22 f | 14,60 ± 1,18 ab | 13,08 ± 0,96 abcd |
| IPN | 8,30 ± 0,30 cdef | 7,30 ± 1,65 bcd | 11,90 ± 2,75 abcd |
| MPN | 7,90 ± 0,38 cdef | 6,80 ± 1,30 cd | 17,58 ± 1,61 ab |

Datos expresados como media ± error estándar de diez réplicas (cinco repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cinco réplicas.

Tratamientos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

El número de flores producidas por planta fue menor cuando las plantas estuvieron infestadas por nemátodos ($8,77 \pm 0,22$), que cuando se encontraban libres de ellos ($10,80 \pm 0,27$); mayor cuando estaban micorrizadas por *G. mosseae* ($11,48 \pm 0,33$), que cuando estaban micorrizadas por *G. intraradices* ($8,96 \pm 0,14$) o no estaban micorrizadas ($8,91 \pm 0,36$); y mayor cuando estuvieron inoculadas con *P. putida* ($10,70 \pm 0,21$), que cuando no hubo inoculación bacteriana ($9,27 \pm 0,38$) o el suelo estuvo inoculado con *P. penetrans* ($9,35 \pm 0,45$) (Tablas 19 y 21). Los tratamientos infestados por nemátodos, sin micorrizar y sin inoculación bacteriana [ØØN] o inoculados con *B. megaterium* [ØBN] o *P. penetrans* [ØPN] produjeron el menor número de flores, y fueron significativamente menores que los tratamientos sin infestar e inoculados con bacteria [ØBØ], [ØPØ] y [ØSØ] y que la mayoría de tratamientos micorrizados por *G. mosseae* (Tabla 21).

El número de frutos también se redujo en las plantas micorrizadas por *G. mosseae* ($10,11 \pm 0,47$) o *G. intraradices* ($10,40 \pm 0,40$), frente a las no micorrizadas ($12,19 \pm 0,59$) (Tablas 19 y 21). Asimismo, el número de frutos disminuyó en los tratamientos sin infestar sin micorrizar e inoculados con *P. putida* [$\emptyset S \emptyset$], en relación a los tratamientos sin infestar sin micorrizar pero inoculados con otras bacterias [$\emptyset B \emptyset$] y [$\emptyset P \emptyset$] (Tabla 21).

El peso fresco de los frutos fue reducido por la micorrización, ya fuese por *G. mosseae* ($11,16 \pm 0,72$ g) o *G. intraradices* ($10,12 \pm 0,91$ g), frente a las plantas no micorrizadas ($15,61 \pm 1,00$ g); e incrementado por la inoculación con *P. penetrans* ($13,77 \pm 1,02$ g) frente a la inoculación con *B. megaterium* ($10,17 \pm 1,22$ g) (Tablas 19 y 21).

Tabla 21 (Continuación). Valores de productividad vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacteria en el patosistema Tomate cv. Josefina-M. incognita.

| Tratamientos | Contenido en clorofila (unidades SPAD) * | Temperatura de la cubierta vegetal (°C) * |
|---------------------------------|--|---|
| $\emptyset \emptyset \emptyset$ | 23,64 ± 2,16 a | 29,04 ± 0,71 a |
| I $\emptyset \emptyset$ | 24,66 ± 1,44 a | 28,22 ± 0,51 a |
| M $\emptyset \emptyset$ | 22,56 ± 1,79 a | 27,80 ± 0,80 a |
| $\emptyset B \emptyset$ | 25,80 ± 2,51 a | 28,22 ± 0,46 a |
| I $B \emptyset$ | 24,44 ± 0,73 a | 28,14 ± 0,77 a |
| M $B \emptyset$ | 26,74 ± 1,78 a | 28,08 ± 0,28 a |
| $\emptyset S \emptyset$ | 28,48 ± 2,01 a | 28,80 ± 0,48 a |
| I $S \emptyset$ | 26,20 ± 1,13 a | 27,94 ± 0,47 a |
| M $S \emptyset$ | 26,90 ± 1,17 a | 28,88 ± 0,85 a |
| $\emptyset P \emptyset$ | 23,60 ± 0,93 a | 28,40 ± 0,51 a |
| I $P \emptyset$ | 24,80 ± 1,16 a | 28,00 ± 0,32 a |
| M $P \emptyset$ | 23,20 ± 1,02 a | 27,80 ± 0,73 a |
| $\emptyset \emptyset N$ | 21,94 ± 1,04 a | 27,74 ± 0,45 a |
| I $\emptyset N$ | 24,26 ± 2,35 a | 27,34 ± 0,97 a |
| M $\emptyset N$ | 24,52 ± 2,14 a | 29,66 ± 1,00 a |
| $\emptyset B N$ | 26,32 ± 1,46 a | 28,58 ± 0,58 a |
| I $B N$ | 25,66 ± 1,17 a | 27,96 ± 0,53 a |
| M $B N$ | 23,72 ± 1,12 a | 27,78 ± 0,97 a |
| $\emptyset S N$ | 21,76 ± 0,63 a | 27,86 ± 0,63 a |
| I $S N$ | 24,46 ± 1,03 a | 27,92 ± 0,28 a |
| M $S N$ | 24,92 ± 1,48 a | 28,60 ± 0,34 a |
| $\emptyset P N$ | 25,72 ± 0,99 a | 28,28 ± 0,47 a |
| I $P N$ | 22,24 ± 0,72 a | 28,62 ± 0,72 a |
| M $P N$ | 25,20 ± 1,50 a | 29,12 ± 0,73 a |

Datos expresados como media ± error estándar de diez réplicas (cinco repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cinco réplicas. Tratamientos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

Tabla 22. Valores medios de variables relacionadas con la micorrización en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacterias en el patosistema Tomate cv. Josefina -*M. incognita*.

| Tratamientos | Frecuencia de micorrización (F%) | Intensidad de micorrización (M%) | Intensidad de colonización media por fragmento (m%) |
|--------------|----------------------------------|----------------------------------|---|
| IØØ | 81,73 ± 1,32 ab | 15,75 ± 0,94 abcd | 19,68 ± 1,22 bcd |
| MØØ | 83,70 ± 3,07 ab | 23,48 ± 2,60 abc | 23,80 ± 3,36 abcd |
| IBØ | 77,96 ± 1,95 abc | 24,38 ± 0,92 a | 30,79 ± 0,44 abc |
| MBØ | 77,37 ± 3,24 abc | 24,76 ± 1,45 a | 37,67 ± 2,14 a |
| ISØ | 74,53 ± 1,14 bc | 22,84 ± 0,50 ab | 31,94 ± 0,72 ab |
| MSØ | 71,97 ± 3,40 bc | 23,15 ± 1,53 ab | 36,81 ± 1,90 a |
| IPØ | 81,11 ± 1,12 ab | 16,25 ± 0,66 abcd | 19,66 ± 0,78 cd |
| MPØ | 75,27 ± 0,62 bc | 21,10 ± 1,76 abc | 20,54 ± 0,79 bcd |
| IØN | 78,31 ± 2,63 abc | 14,73 ± 1,07 bcd | 20,04 ± 1,29 bcd |
| MØN | 75,66 ± 2,08 abc | 14,23 ± 2,45 bcd | 17,18 ± 2,62 d |
| IBN | 65,39 ± 1,76 c | 10,78 ± 1,31 d | 15,24 ± 1,66 d |
| MBN | 83,01 ± 2,41 ab | 19,65 ± 1,63 abcd | 22,11 ± 1,24 abcd |
| ISN | 79,67 ± 2,11 abc | 14,13 ± 0,43 cd | 18,36 ± 0,51 d |
| MSN | 73,64 ± 1,82 bc | 19,02 ± 1,81 abcd | 24,58 ± 2,36 abcd |
| IPN | 87,98 ± 1,28 a | 16,78 ± 2,46 abcd | 23,45 ± 2,74 abcd |
| MPN | 85,16 ± 1,92 ab | 20,90 ± 1,69 abcd | 24,65 ± 1,73 abcd |

Datos expresados como media ± error estándar de diez réplicas (cinco repeticiones x dos años).

Tratamientos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

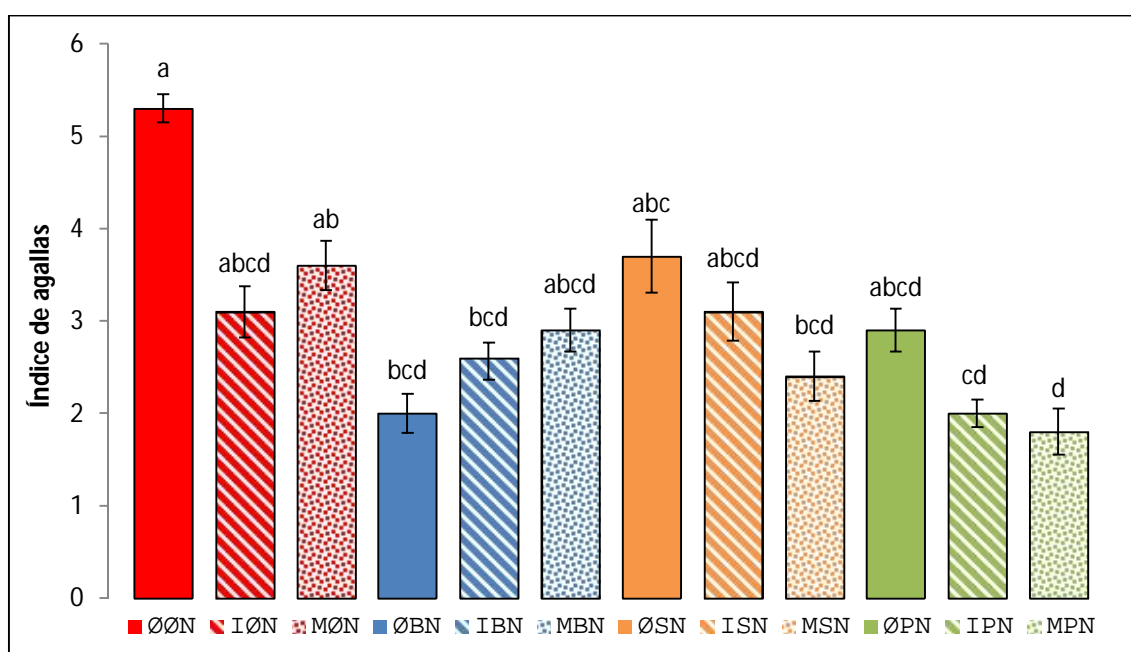
La frecuencia de micorrización (F%) fue mayor en las plantas crecidas en suelos con *P. penetrans* ($82,38 \pm 1,00$), que en plantas inoculadas con *B. megaterium* ($75,93 \pm 1,55$) o *P. putida* ($74,95 \pm 1,18$) (Tablas 19 y 22). Además, las plantas inoculadas con *P. putida* mostraron menor F% que las no inoculadas con ninguna bacteria ($79,85 \pm 1,24$) (Tablas 19 y 22). En el análisis (AMF × BAC) se observó que, independientemente de la infestación por nemátodos, en las plantas micorrizadas por *G. intraradices*, aquellas sin inocular con bacteria ($80,02 \pm 1,49$) o coinoculadas con *P. penetrans* ($84,55 \pm 1,14$) mostraban mayor F% que aquellas coinoculadas con *P. putida* ($77,10 \pm 1,31$) o *B. megaterium* ($71,68 \pm 1,93$) (Tablas 19 y 22). Los menores valores de F% se encontraron en el tratamiento [IBN], que fue significativamente menor que [MBN] o que [MPN] e [IPN] (Tabla 22).

La intensidad de micorrización (M%) fue mayor en plantas no infestadas ($21,46 \pm 0,62$) que en plantas infestadas por nemátodos ($16,28 \pm 0,69$) (Tablas 19 y 22). *G. mosseae* también mostró mayor M% ($20,79 \pm 0,73$) que *G. intraradices* ($16,96 \pm 0,63$) (Tablas 19 y 22). Los tratamientos conjuntos [IBØ], [MBØ], [ISØ] y [MSØ], mostraron los mayores valores de M% y los tratamientos [IBN] y [ISN] los valores mínimos de M% (Tabla 22).

La intensidad media de micorrización por fragmento (m%) se redujo cuando las plantas fueron infestadas por nemátodos ($20,70 \pm 0,75$ vs $27,61 \pm 0,98$) (Tablas 19 y 22). *G.*

.mosseae mostró mayor m% ($25,92 \pm 1,07$) que *G. intraradices* ($22,40 \pm 0,78$) (Tablas 19 y 22). Además, la inoculación con *B. megaterium* ($26,45 \pm 1,54$) o *P. putida* ($27,92 \pm 1,36$) incremento m% en relación a las plantas no inoculadas con bacteria ($20,17 \pm 1,17$) (Tablas 19 y 22). Los mayores valores de m% se hallaron en las plantas no infestadas, micorrizadas e inoculadas con *B. megaterium* [IBØ] [MBØ] o *P. putida* [ISØ] [MSØ], significativamente mayores que en aquellos tratamientos infestados por nemátodos inoculados con *B. megaterium* o *P. putida* y micorrizados por *G. intraradices* [IBN], [ISN] (Tabla 22).

Figura 23. Valores medios de los índices de agallas en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacterias en el patosistema Tomate cv. Josefina-M. *incognita*.

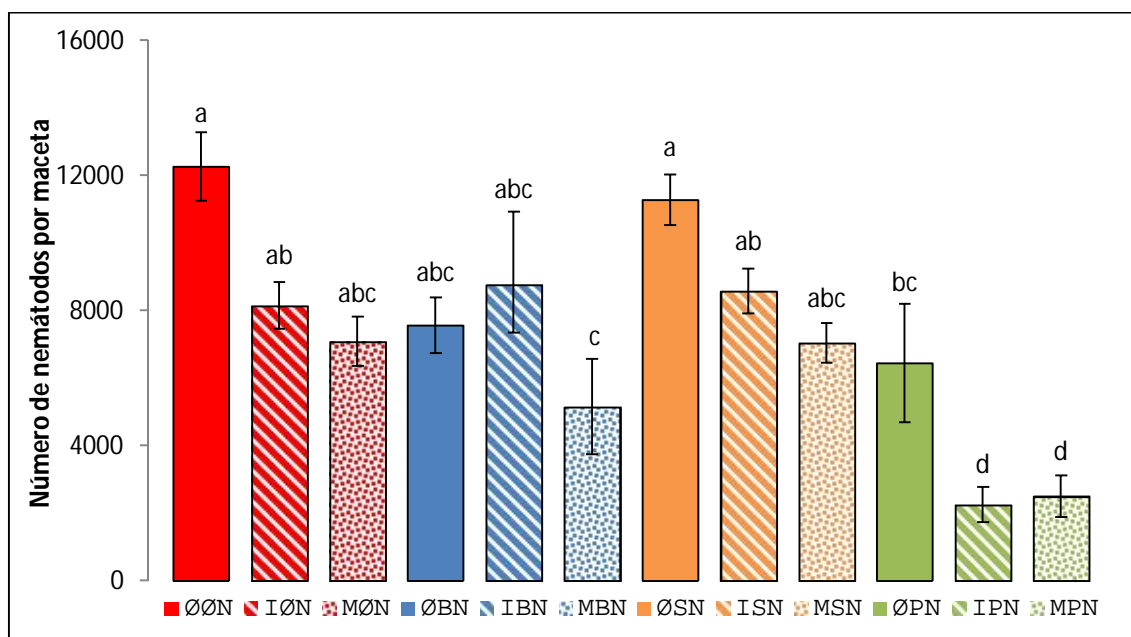


Datos expresados como media \pm error estándar de diez réplicas (cinco repeticiones x dos años).

Columnas coronadas con la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

La inoculación con *B. megaterium* o *P. penetrans* redujo el índice de agallas ($2,50 \pm 0,14$) ($2,23 \pm 0,15$) respectivamente, en comparación a las plantas no inoculadas con bacteria ($4,00 \pm 0,22$) (Tabla 19 y Figura 23). Todos los tratamientos redujeron el índice de agallas en relación al control [ØØN], pero los más efectivos fueron la combinación de micorrización e inoculación del suelo con *P. penetrans* [IPN] y [MPN], cuyos valores fueron significativamente menores que en el tratamiento control (Figura 23).

Figura 24. Valores medios de la densidad final de nemátodos por maceta en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacterias en el patosistema Tomate cv. Josefina-M. *incognita*, año 1°.

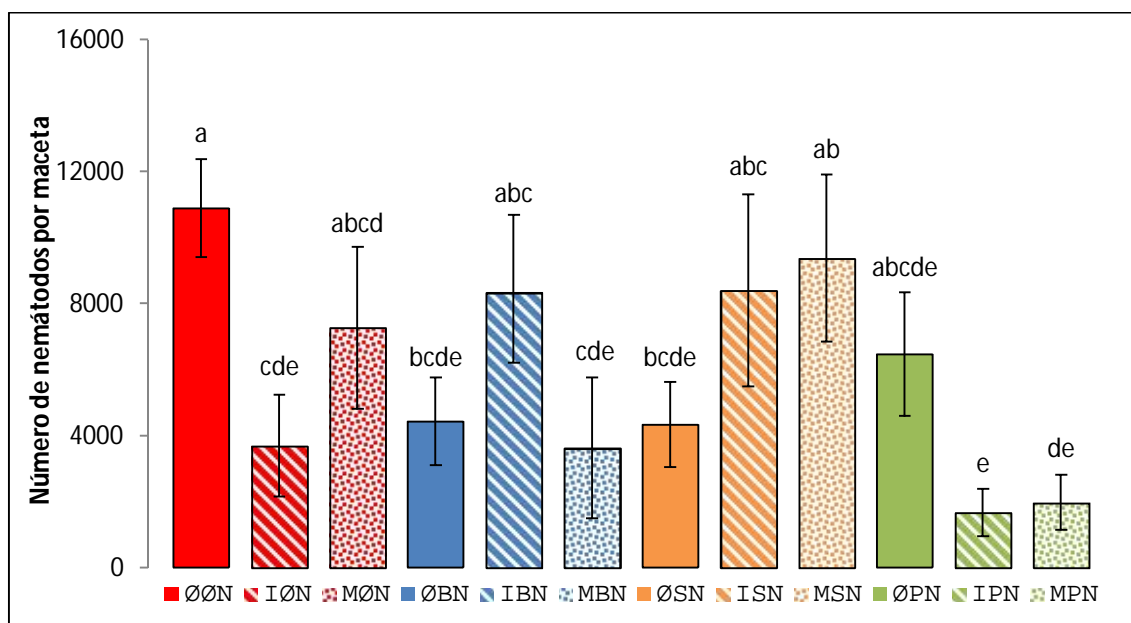


Datos expresados como media \pm error estándar de cinco réplicas.

Columnas coronadas con la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

Durante el primer año del ensayo, el número de nemátodos por maceta se vio reducido en los tratamientos micorrizados por *G. mosseae* (5.441 ± 596) o *G. intraradices* (6.932 ± 833), frente a aquellos sin micorrizar (9.386 ± 772) (Tabla 19 y Figura 24). La inoculación con *P. penetrans* redujo el número de nemátodos (3.728 ± 786), en relación a la inoculación de la planta con *P. putida* (8.961 ± 588) o *B. megaterium* (7.156 ± 927), éste último, a su vez, redujo el número de nemátodos en relación a las plantas no inoculadas con bacteria (9.165 ± 743) (Tabla 19 y Figura 24). El tratamiento control sin micorrizar y sin bacteria [ØØN] mostró el mayor número de nemátodos al igual que el tratamiento sin micorrizar pero inoculado con *P. putida* [ØSN], los cuales fueron reducidos significativamente en los tratamientos con *P. penetrans* [ØPN], [MPN] e [IPN] o los micorrizados por *G. mosseae* e inoculados con *B. megaterium* [MBN] (Figura 24).

Figura 25. Valores medios de la densidad final de nemátodos por maceta en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacterias en el patosistema Tomate cv. Josefina-M. *incognita*, año 2°.

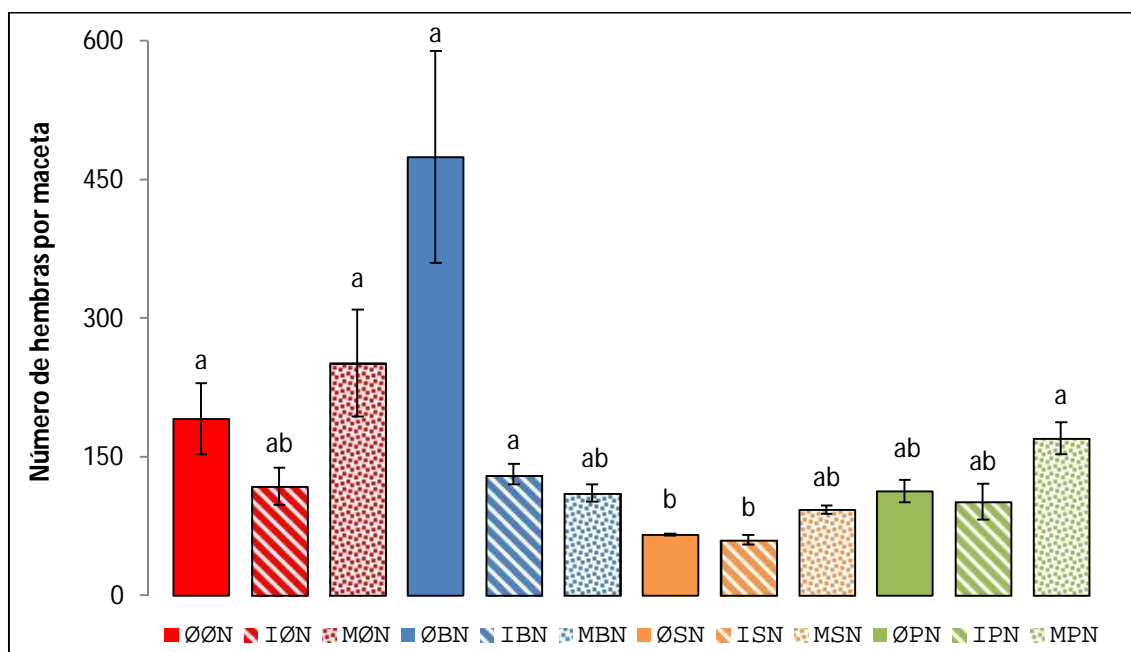


Datos expresados como media \pm error estándar de cinco réplicas.

Columnas coronadas con la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

Durante el segundo año del ensayo, la inoculación con *P. penetrans* redujo el número de nemátodos (3.363 ± 892), en relación a la inoculación de la planta con *P. putida* (7.364 ± 1385) o a las plantas no inoculadas con bacteria (7.281 ± 1276) (Tabla 19 y Figura 25). El tratamiento control sin micorrizar y sin bacteria [ØØN] mostró el mayor número de nemátodos, que fueron reducidos significativamente en los tratamientos de micorrización combinada con *P. penetrans* [MPN] y [IPN], micorrización con *G. intraradices* y no inoculación bacteriana [IØN] e inoculación sencilla con *B. megaterium* [ØBN] o *P. putida* [ØSN] (Figura 25).

Figura 26. Valores medios del número de hembras de *M. incognita* por maceta en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacterias en el patosistema Tomate cv. Josefina-*M. incognita*.

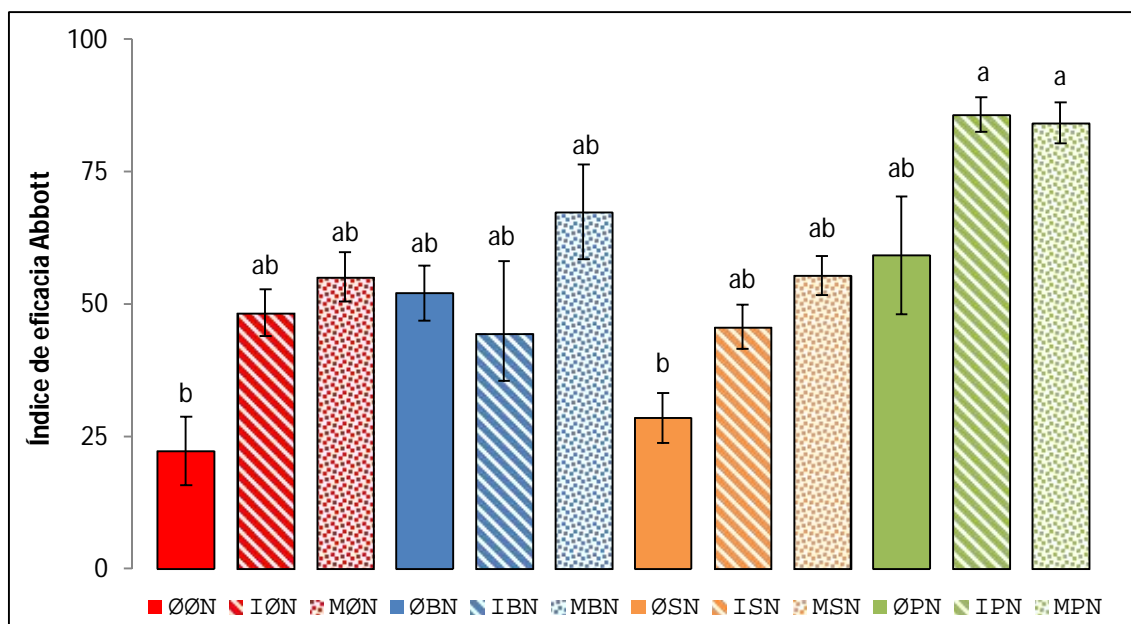


Datos expresados como media \pm error estándar de diez réplicas (cinco repeticiones x dos años).

Columnas coronadas con la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

El número de hembras por maceta fue mayor en los tratamientos micorrizados por *G. mosseae* (156 ± 18) que en aquellos micorrizados por *G. intraradices* (102 ± 9), y menor en aquellas plantas inoculadas con *P. putida* (73 ± 4) que en las inoculadas con *B. megaterium* (238 ± 49), *P. penetrans* (128 ± 11) o no inoculadas con bacteria (187 ± 25) (Tabla 19 y Figura 26). Los tratamientos inoculados con *P. putida* y no micorrizados [ØSN] o micorrizado por *G. intraradices* [ISN] produjeron el menor número de hembras por maceta, significativamente menor que el tratamiento control [ØØN] y los tratamientos inoculados sólo con *B. megaterium* [ØBN], o *G. mosseae* [MØN] o conjuntamente con *G. mosseae* y *P. penetrans* [MPN] o *G. intraradices* y *B. megaterium* [IBN] (Figura 26).

Figura 27. Valores medios de eficacia Abbott en la reducción del número de nemátodos en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacterias en el patosistema Tomate cv. Josefina-*M. incognita*, año 1º.

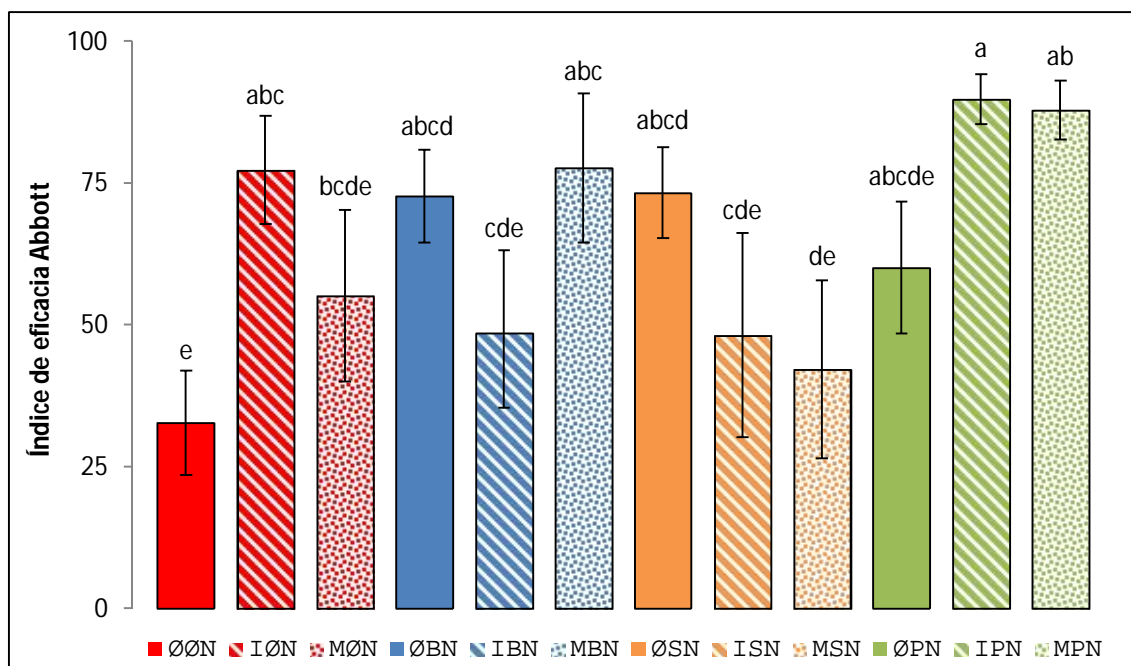


Datos expresados como media \pm error estándar de cinco réplicas.

Columnas coronadas con la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

En cuanto al índice de eficacia Abbott para la reducción de las densidades de nemátodos, durante el primer año de ensayo, la micorrización por *G. mosseae* se mostró efectiva ($65,50 \pm 3,78$) frente a las plantas no micorrizadas ($40,48 \pm 4,89$) (Tabla 19 y Figura 27). La inoculación con *P. penetrans* fue más efectiva ($76,36 \pm 4,98$) que las inoculaciones con *P. putida* ($43,17 \pm 3,73$) o sin bacteria ($41,88 \pm 4,71$) (Tabla 19 y Figura 27). Los tratamientos más efectivos fueron aquellos que combinaron la aplicación al suelo de esporas de *P. penetrans* con la micorrización, ya fuera por *G. mosseae* [MPN] o *G. intraradices* [IPN]. Las combinaciones de micorrización con las bacterias promotoras del crecimiento vegetal no consiguieron incrementar significativamente la eficacia en la reducción del número de nemátodos, en relación al control sin tratar [ØØN] (Figura 27).

Figura 28. Valores medios de eficacia Abbott en la reducción del número de nemátodos en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-bacterias en el patosistema Tomate cv. Josefina-*M. incognita*, año 2°.



Datos expresados como media \pm error estándar de cinco réplicas.

Columnas coronadas con la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

Durante el segundo año de ensayo, la micorrización no mostró efecto sobre la eficacia Abbott, pero la inoculación con *P. penetrans* siguió siendo más efectiva ($79,22 \pm 5,51$) que las inoculaciones con *P. putida* ($54,50 \pm 8,56$) o sin bacteria ($55,01 \pm 7,89$) (Tabla 19 y Figura 28). De nuevo, los tratamientos más efectivos fueron aquellos que combinaron la aplicación al suelo de esporas de *P. penetrans* con la micorrización, ya fuera por *G. mosseae* [MPN] o *G. intraradices* [IPN] (Figura 28).

2.2. ENSAYO 2. EFECTOS DE LA MICORRIZACIÓN E INOCULACIÓN CON *TRICHODERMA HARZIANUM* SOBRE EL PATOSISTEMA TOMATE-*M. INCOGNITA*.

Se investigaron los efectos producidos por la inoculación simple y combinada de microorganismos bioprotectores (*Glomus intraradices* o *G. mosseae*) y un hongo oportunista como agente de biocontrol (*Trichoderma harzianum*), sobre distintas variables de crecimiento y producción vegetal, micorrización, severidad de la enfermedad causada por *M. incognita* y reproducción del nemátodo, en tomate cv. Durinta y cv. Josefina.

2.2.1. ENSAYOS EN TOMATE CV. DURINTA

En la tabla 23 se muestra la significación estadística para los efectos de los factores ensayados [infestación por nemátodos (NEM), micorrización (AMF) e inoculación con *Trichoderma harzianum* (TRI)] y sus interacciones, sobre las distintas variables de crecimiento y productividad vegetal, micorrización y reproducción del nemátodo.

Tabla 23. Significación estadística del ANOVA multifactorial o los test de Kruskal-Wallis en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-*T. harzianum* en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita*.

| | NEM | AMF | TRI | NEM × AMF | NEM × TRI | AMF × TRI | NEM × AMF × TRI |
|--|--------|--------|--------|-----------|-----------|-----------|-----------------|
| Longitud parte aérea (cm) ^{AV} | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Peso fresco parte aérea (g) año 1 ^{oAV} | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Peso fresco parte aérea (g) año 2 ^{oAV} | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Peso seco parte aérea (g) año 1 ^{oAV} | ns | ns | ns | ns | ns | 0,0445 | ns |
| Peso seco parte aérea (g) año 2 ^{oAV} | ns | 0,0338 | ns | ns | ns | ns | ns |
| Peso fresco raíces (g) año 1 ^{oAV} | ns | ns | ns | ns | ns | ns | 0,0043 |
| Peso fresco raíces (g) año 2 ^{oKW} | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Número de flores ^{AV} | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Número de frutos ^{AV} | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Peso fresco de frutos (g) año 1 ^{oAV} | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Peso fresco de frutos (g) año 2 ^{oAV} | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Contenido en clorofila(RLCC-SPAD) año 1 ^{oKW} | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Contenido en clorofila (RLCC-SPAD) año 2 ^{oKW} | ns | ns | 0,0382 | ns | ns | ns | ns |
| Temperatura de la cubierta vegetal (°C) año 1 ^{oAV} | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Temperatura de la cubierta vegetal (°C) año 2 ^{oAV} | ns | ns | 0,0007 | ns | 0,0001 | 0,0004 | 0,0001 |
| Frecuencia de micorrización, F% ^{KW} | 0,0000 | ns | ns | 0,0000 | 0,0000 | ns | 0,0000 |
| Intensidad de micorrización, M% ^{KW} | 0,0023 | ns | ns | 0,0212 | 0,0189 | ns | 0,0372 |
| Intensidad de micorrización media por fragmento, m% ^{KW} | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Índice de agallas ^{KW} | - | 0,0219 | 0,0004 | - | - | 0,0008 | - |
| Número de J2 + huevos por maceta ^{KW} | - | ns | 0,0143 | - | - | ns | - |
| Número de hembras de <i>Meloidogyne</i> por maceta ^{KW} | - | ns | 0,0044 | - | - | ns | - |
| Eficacia Abbott en la reducción del número de nemátodos por maceta ^{AV} | - | ns | 0,0435 | - | - | ns | - |

Tratamientos analizados por ANOVA^{AV} o Kruskal-Wallis^{KW}. ns. Nivel de significación $p > 0,05$, no significativo.

Las siguientes tablas y figuras muestran los resultados obtenidos para las distintas variables de crecimiento (Tabla 24) y productividad vegetal (Tabla 25), micorrización (Tabla 26) y reproducción de nemátodos (Figuras 29-32), para cada uno de los tratamientos ensayados.

Tabla 24. Valores de crecimiento vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-*T. harzianum* en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita* (continúa).

| Tratamientos | Longitud parte aérea (cm) | Peso fresco parte aérea, año 1 (g)* | Peso fresco parte aérea, año2 (g)* |
|--------------|---------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| ØØØ | 62,63 ± 4,70 a | 75,43 ± 21,14 abcd | 76,03 ± 8,24 ab |
| IØØ | 61,85 ± 5,37 a | 29,08 ± 6,57 d | 93,43 ± 18,89 ab |
| MØØ | 65,81 ± 3,35 a | 110,35 ± 19,89 ab | 78,05 ± 10,48 ab |
| ØTØ | 64,50 ± 5,30 a | 90,87 ± 22,66 abc | 58,23 ± 8,07 b |
| ITØ | 67,64 ± 2,39 a | 63,87 ± 5,52 abcd | 81,15 ± 9,42 ab |
| MTØ | 65,38 ± 3,86 a | 75,00 ± 16,32 abcd | 84,95 ± 11,09 ab |
| ØØN | 64,64 ± 6,30 a | 121,67 ± 24,91 a | 60,95 ± 9,93 b |
| IØN | 67,63 ± 4,77 a | 56,40 ± 18,77 cd | 98,80 ± 11,60 a |
| MØN | 62,06 ± 3,76 a | 70,15 ± 16,88 abcd | 90,23 ± 6,13 ab |
| ØTN | 64,31 ± 5,60 a | 63,75 ± 20,59 bcd | 86,40 ± 23,18 ab |
| ITN | 65,14 ± 6,07 a | 106,83 ± 20,94 abc | 64,08 ± 14,14 ab |
| MTN | 67,19 ± 3,75 a | 97,40 ± 24,63 abc | 82,13 ± 7,42 ab |

Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cuatro réplicas.

Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

Ni la infestación por nemátodos, ni la micorrización, ni *Trichoderma* tuvieron influencia en la longitud o en el peso fresco de la parte aérea (Tabla 23).

En cuanto al análisis de los tratamientos individualizados, el peso fresco de la parte aérea mostró resultados opuestos en el primer y segundo año de los ensayos ya que, el control infestado sin micorrizar y sin inocular [ØØN] mostró los mayores valores de peso fresco de la parte aérea durante el primer año de ensayo, y los menores durante el segundo. Además, durante el primer año, la micorrización por *G. intraradices* en plantas no infestadas ni inoculadas con *Trichoderma* [IØØ] disminuyó significativamente el peso fresco de la parte aérea (Tabla 24).

Tabla 24 (continuación). Valores de crecimiento vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-*T. harzianum* en el patosistema Tomate cv. Durinta -*M. incognita* (continúa).

| Tratamientos | Peso seco parte aérea, año 1 (g)* | Peso seco parte aérea, año 2 (g)* |
|--------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| ØØØ | 15,56 ± 4,66 bcd | 13,65 ± 2,80 abc |
| IØØ | 6,35 ± 1,54 d | 18,50 ± 4,49 ab |
| MØØ | 25,00 ± 5,72 ab | 14,05 ± 2,97 abc |
| ØTØ | 17,73 ± 4,93 abcd | 9,30 ± 2,28 c |
| ITØ | 15,57 ± 1,59 abcd | 17,20 ± 1,52 abc |
| MTØ | 17,75 ± 4,11 abcd | 16,78 ± 3,38 abc |
| ØØN | 29,63 ± 6,12 a | 10,25 ± 3,11 c |
| IØN | 12,30 ± 5,00 cd | 20,80 ± 1,61 a |
| MØN | 15,43 ± 4,20 bcd | 17,10 ± 0,77 abc |
| ØTN | 12,70 ± 3,24 bcd | 12,95 ± 3,52 abc |
| ITN | 24,67 ± 3,94 abc | 10,70 ± 2,99 bc |
| MTN | 21,28 ± 5,74 abc | 15,20 ± 2,31 abc |

Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cuatro réplicas.

Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

En el primer año del ensayo, a pesar de que la micorrización y la inoculación con *T. harzianum* no influyeron sobre el peso seco de la parte aérea por sí mismas, sí se detectó en la interacción (AMF × TRI) que las plantas micorrizadas por *G. intraradices* en ausencia de *T. harzianum* ($9,33 \pm 2,67$ g) mostraron un menor peso seco de la parte aérea que el resto de tratamientos (Tablas 23 y 24). En el segundo año del ensayo se observó que, las plantas micorrizadas, tanto por *G. intraradices* ($16,80 \pm 1,62$ g) como por *G. mosseae* ($15,78 \pm 1,19$ g), mostraron un peso seco mayor que aquellas plantas no micorrizadas ($11,54 \pm 1,40$ g) (Tablas 23 y 24).

Al igual que en el peso fresco de la parte aérea, el análisis de los tratamientos individualizados en la variable peso seco mostró resultados opuestos en el primer y segundo año de los ensayos, ya que [ØØN] mostró los mayores valores de peso seco de la parte aérea durante el primer año de ensayo y los menores durante el segundo. Además, con el mismo comportamiento que en la variable anterior, durante el primer año la micorrización por *G. intraradices* en plantas no infestadas ni inoculadas con *Trichoderma* [IØØ] también disminuyó significativamente el peso seco de la parte aérea (Tabla 24).

Tabla 24 (continuación). Valores de crecimiento vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-*T. harzianum* en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita*.

| Tratamientos | Peso fresco de la raíz, año 1 (g)* | Peso fresco de la raíz, año 2 (g)* |
|--------------|------------------------------------|------------------------------------|
| ØØØ | 21,63 ± 7,26 c | 15,53 ± 2,46 a |
| IØØ | 14,63 ± 4,33 c | 23,85 ± 7,31 a |
| MØØ | 41,55 ± 5,46 ab | 23,00 ± 4,85 a |
| ØTØ | 33,80 ± 8,15 abc | 14,40 ± 3,30 a |
| ITØ | 30,43 ± 2,39 bc | 24,55 ± 6,27 a |
| MTØ | 25,10 ± 6,97 bc | 21,68 ± 2,89 a |
| ØØN | 55,27 ± 10,76 a | 16,08 ± 2,36 a |
| IØN | 14,78 ± 6,47 c | 19,80 ± 6,71 a |
| MØN | 16,78 ± 5,69 c | 23,33 ± 3,32 a |
| ØTN | 17,00 ± 8,03 c | 24,20 ± 10,10 a |
| ITN | 19,50 ± 4,39 c | 13,88 ± 3,46 a |
| MTN | 42,68 ± 10,28 ab | 16,20 ± 3,96 a |

Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cuatro réplicas.

Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

Durante el primer año del ensayo, mediante el análisis de la triple interacción, se observó que las plantas control infestadas [ØØN] mostraron el máximo peso fresco de la raíz (Tabla 24).

Tabla 25. Valores de productividad vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-*T. harzianum* en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita* (continúa).

| Tratamientos | Número de flores | Número de frutos |
|--------------|------------------|------------------|
| ØØØ | 4,38 ± 1,29 a | 2,13 ± 0,72 a |
| IØØ | 5,50 ± 1,21 a | 1,50 ± 0,71 a |
| MØØ | 6,25 ± 1,22 a | 1,75 ± 0,59 a |
| ØTØ | 6,00 ± 0,93 a | 1,71 ± 0,47 a |
| ITØ | 5,57 ± 1,81 a | 1,00 ± 0,38 a |
| MTØ | 5,38 ± 0,94 a | 1,88 ± 0,74 a |
| ØØN | 7,14 ± 1,14 a | 1,86 ± 0,67 a |
| IØN | 7,00 ± 1,39 a | 2,13 ± 0,67 a |
| MØN | 5,75 ± 1,22 a | 1,38 ± 0,50 a |
| ØTN | 6,63 ± 1,55 a | 0,75 ± 0,25 a |
| ITN | 6,57 ± 1,85 a | 1,71 ± 0,64 a |
| MTN | 7,50 ± 1,56 a | 2,25 ± 1,06 a |

Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cuatro réplicas.

Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

Tabla 25 (continuación). Valores de productividad vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-*T. harzianum* en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita* (continúa).

| Tratamientos | Peso fresco de los frutos, año 1 (g)* | Peso fresco de los frutos, año 2 (g)* |
|--------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| ØØØ | 46,65 ± 16,13 a | 13,70 ± 6,28 ab |
| IØØ | 4,03 ± 4,03 a | 24,63 ± 14,13 ab |
| MØØ | 34,60 ± 18,58 a | 12,00 ± 7,45 ab |
| ØTØ | 21,20 ± 13,30 a | 19,98 ± 7,43 ab |
| ITØ | 12,33 ± 6,42 a | 15,45 ± 6,96 ab |
| MTØ | 11,63 ± 9,82 a | 25,33 ± 11,80 ab |
| ØØN | 30,70 ± 8,42 a | 5,63 ± 5,63 b |
| IØN | 11,15 ± 11,15 a | 30,13 ± 4,81 a |
| MØN | 27,63 ± 16,39 a | 16,40 ± 8,37 ab |
| ØTN | 5,75 ± 4,17 a | 5,00 ± 2,22 b |
| ITN | 26,27 ± 13,41 a | 17,50 ± 11,14 ab |
| MTN | 39,73 ± 31,52 a | 13,53 ± 6,38 ab |

Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cuatro réplicas. Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

Tabla 25 (continuación). Valores de productividad vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-*T. harzianum* en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita* (continúa).

| Tratamientos | Contenido en clorofila, año 1 (unidades SPAD)* | Contenido en clorofila, año 2 (unidades SPAD)* |
|--------------|--|--|
| ØØØ | 31,55 ± 0,59 a | 44,45 ± 3,25 a |
| IØØ | 32,85 ± 2,33 a | 44,05 ± 3,84 a |
| MØØ | 33,18 ± 2,31 a | 45,85 ± 4,37 a |
| ØTØ | 33,97 ± 1,54 a | 53,65 ± 0,60 a |
| ITØ | 33,67 ± 3,70 a | 42,00 ± 4,24 a |
| MTØ | 41,55 ± 6,06 a | 41,08 ± 8,26 a |
| ØØN | 31,43 ± 2,76 a | 40,88 ± 4,60 a |
| IØN | 32,53 ± 2,00 a | 42,25 ± 4,69 a |
| MØN | 32,63 ± 0,88 a | 41,33 ± 2,75 a |
| ØTN | 32,13 ± 1,68 a | 46,20 ± 4,93 a |
| ITN | 37,00 ± 3,75 a | 51,05 ± 3,75 a |
| MTN | 33,38 ± 4,29 a | 51,55 ± 0,99 a |

Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cuatro réplicas. Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

En el segundo año del ensayo se observó que, el contenido en clorofila fue mayor en aquellas plantas inoculadas con *T. harzianum* ($47,59 \pm 1,94$ vs $43,13 \pm 1,49$) (Tabla 25).

Tabla 25 (continuación). Valores de productividad vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-*T. harzianum* en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita*.

| Tratamientos | Temperatura de la cubierta vegetal, año 1 (°C)* | Temperatura de la cubierta vegetal, año 2 (°C)* |
|--------------|---|---|
| ØØØ | 24,80 ± 2,02 a | 24,53 ± 0,85 cde |
| IØØ | 27,33 ± 2,26 a | 28,15 ± 1,38 ab |
| MØØ | 28,45 ± 2,82 a | 29,75 ± 0,87 a |
| ØTØ | 30,43 ± 0,67 a | 24,03 ± 0,56 cdef |
| ITØ | 24,93 ± 2,00 a | 22,15 ± 0,67 ef |
| MTØ | 27,40 ± 2,40 a | 21,33 ± 0,40 f |
| ØØN | 23,43 ± 3,53 a | 23,90 ± 2,00 def |
| IØN | 24,70 ± 1,40 a | 25,03 ± 1,26 cde |
| MØN | 25,98 ± 2,87 a | 26,48 ± 1,72 bcd |
| ØTN | 28,10 ± 1,12 a | 27,08 ± 0,31 abc |
| ITN | 23,83 ± 1,56 a | 25,05 ± 0,66 bcde |
| MTN | 25,80 ± 2,52 a | 24,60 ± 0,81 cde |

Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cuatro réplicas.

Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

La temperatura de la cubierta vegetal, durante el segundo año del ensayo, fue mayor en las plantas no inoculadas con *T. harzianum* ($26,30 \pm 0,67$ °C), frente a las que recibieron al hongo oportunista ($24,04 \pm 0,45$ °C) (Tablas 23 y 25). La presencia del nemátodo o la micorrización no influyeron sobre la temperatura de la cubierta vegetal por sí mismas, sin embargo, se observaron mayores temperaturas de la cubierta vegetal en las plantas infestadas, tanto en ausencia de *Trichoderma* ($25,13 \pm 0,94$ °C) como en presencia del hongo ($25,58 \pm 0,46$ °C), frente a las plantas sanas inoculadas con el hongo oportunista ($22,50 \pm 0,45$ °C) (Tablas 23 y 25). Asimismo se observó que, las plantas dualmente inoculadas con *G. mosseae* y *T. harzianum* mostraron menor temperatura de la cubierta vegetal ($22,96 \pm 0,75$ °C), comparadas con las que no fueron micorrizadas pero sí inoculadas con *T. harzianum* ($25,55 \pm 0,65$ °C) y las que fueron micorrizadas pero no inoculadas con el hongo oportunista ($26,59 \pm 1,05$ °C en plantas micorrizadas por *G. intraradices* y $28,11 \pm 1,09$ °C en plantas micorrizadas por *G. mosseae*) (Tablas 23 y 25). En el análisis estadístico de la triple interacción, (NEM × AMF × TRI), el tratamiento que agrupó micorrización por *G. mosseae*, inoculación con *T. harzianum* y ausencia de nemátodo [MTØ] fue el que mostró menor temperatura de la cubierta vegetal, de manera significativamente diferente del control sano [ØØØ], los sanos únicamente micorrizados [IØØ] o [MØØ], los infestados micorrizados [IØN] o [MØN], el infestado exclusivamente

inoculado con *T. harzianum* [ØTN], o los infestados micorrizados e inoculados con *T. harzianum* [ITN] o [MTN] (Tabla 25).

Tabla 26. Valores medios de variables relacionadas con la micorrización en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-*T. harzianum* en el patosistema Tomate cv. Durinta-M. *incognita*.

| Tratamientos | Frecuencia de micorrización (F%) | Intensidad de micorrización (M%) | Intensidad de colonización media por fragmento (m%) |
|--------------|----------------------------------|----------------------------------|---|
| IØØ | 89,58 ± 1,33 a | 25,19 ± 2,49 a | 28,26 ± 2,94 a |
| MØØ | 82,50 ± 2,42 abc | 19,75 ± 2,61 a | 23,98 ± 3,10 a |
| ITØ | 82,38 ± 1,74 abc | 17,96 ± 2,90 a | 21,84 ± 3,58 a |
| MTØ | 87,92 ± 2,59 ab | 21,93 ± 1,88 a | 24,82 ± 1,77 a |
| IØN | 68,83 ± 2,18 c | 15,05 ± 1,47 a | 22,18 ± 2,44 a |
| MØN | 76,67 ± 2,44 bc | 17,17 ± 1,62 a | 22,42 ± 1,98 a |
| ITN | 76,19 ± 1,98 bc | 16,10 ± 1,39 a | 21,05 ± 1,52 a |
| MTN | 81,67 ± 1,26 abc | 16,41 ± 1,50 a | 20,04 ± 1,71 a |

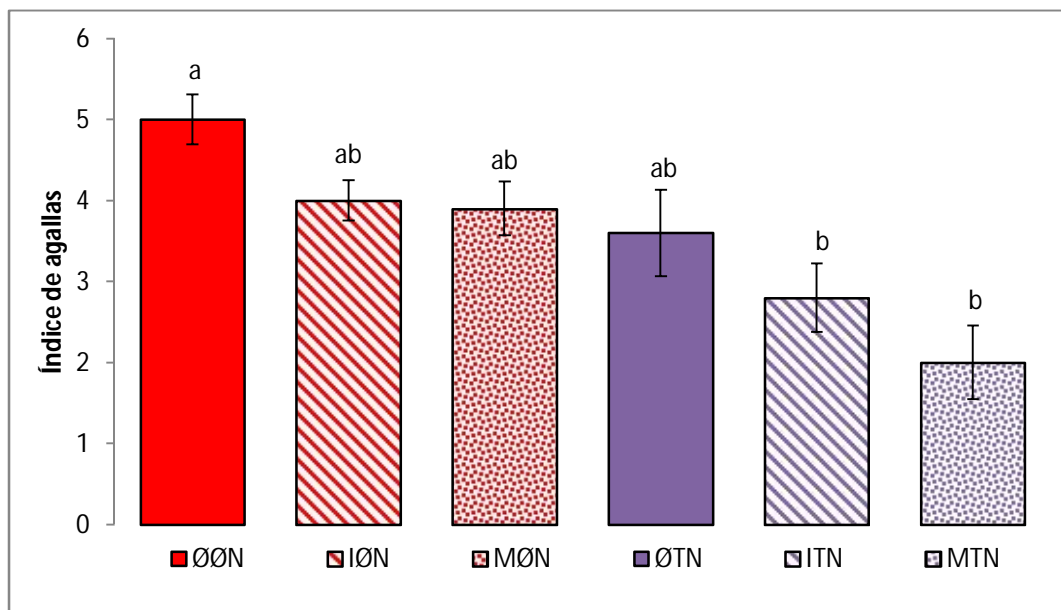
Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años).

Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según el test KW ($p \leq 0,05$).

La frecuencia de micorrización (F%), fue mayor en las plantas no infestadas por nemátodos ($85,70 \pm 1,16$) que en aquellas infestadas ($75,83 \pm 1,28$) (Tablas 23 y 26). Las plantas micorrizadas no infestadas ($86,22 \pm 1,41$ en plantas micorrizadas por *G. intraradices* y $85,21 \pm 1,85$ en plantas micorrizadas por *G. mosseae*) mostraron mayor frecuencia de micorrización que las plantas infestadas y micorrizadas por *G. intraradices* ($72,26 \pm 1,74$) (Tablas 23 y 26). Las plantas sanas no inoculadas con *T. harzianum* mostraron mayor frecuencia de micorrización ($86,04 \pm 1,61$), en comparación con aquellas infestadas tanto en ausencia de *T. harzianum* ($72,75 \pm 1,88$) como en presencia del hongo oportunista ($79,11 \pm 1,32$) (Tablas 23 y 26). El tratamiento que mostró mayor frecuencia de micorrización fue el que incorporó *G. intraradices* sin hongo oportunista ni nemátodo [IØØ] (Tabla 26).

La intensidad de micorrización (M%), se vio disminuida por la presencia del nemátodo ($16,19 \pm 0,73$) frente al conjunto de plantas no infestadas ($21,31 \pm 1,27$) (Tablas 23 y 26). El tratamiento con mayor intensidad de micorrización fue el que incorporó *G. intraradices* sin *T. harzianum* y sin nemátodo [IØØ] (Tabla 26).

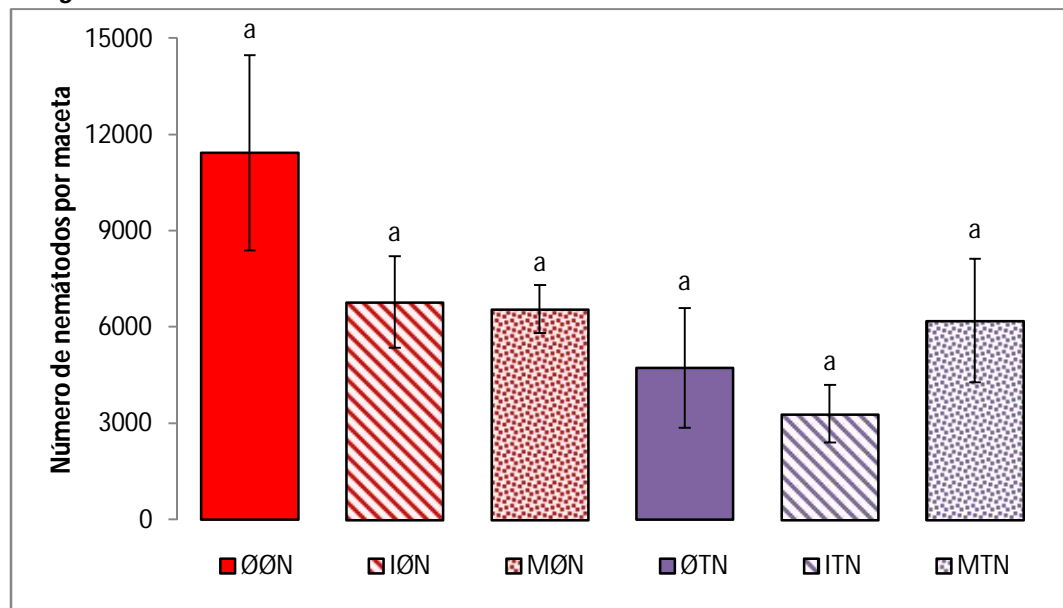
Figura 29. Valores medios de los índices de agallas en el ensayo para el estudio de la interacción AMF- *T. harzianum* en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita*.



Datos expresados como media \pm error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años). Columnas coronadas con la misma letra no difieren significativamente según el test KW ($p \leq 0,05$).

La micorrización por *G. mosseae* redujo el índice de agallas ($2,97 \pm 0,37$), en comparación con las plantas no micorrizadas ($4,27 \pm 0,36$) (Tabla 23 y Figura 29). Igualmente, la inoculación con *T. harzianum* redujo la severidad de la enfermedad ($2,80 \pm 0,30$), en comparación con plantas sin inoculación del hongo oportunista ($4,28 \pm 0,19$) (Tabla 23 y Figura 29). El efecto conjunto de *G. mosseae* y *T. harzianum* redujo el índice de agallas en mayor medida que ambos microorganismos aplicados individualmente siendo, por tanto, el tratamiento más efectivo en la reducción del índice de agallas, pero no de forma significativa en comparación con el tratamiento micorrizado por *G. mosseae* sin *T. harzianum*, ni el no micorrizado inoculado con el hongo oportunista (Tabla 23 y Figura 29). Aunque todos los tratamientos redujeron el índice de agallas respecto al control sin tratar [ØØN], los más efectivos en la reducción de esta variable fueron los que combinaron *Glomus* spp. y *T. harzianum* [ITN] y [MTN], cuyos valores fueron significativamente menores respecto al tratamiento control (Figura 29).

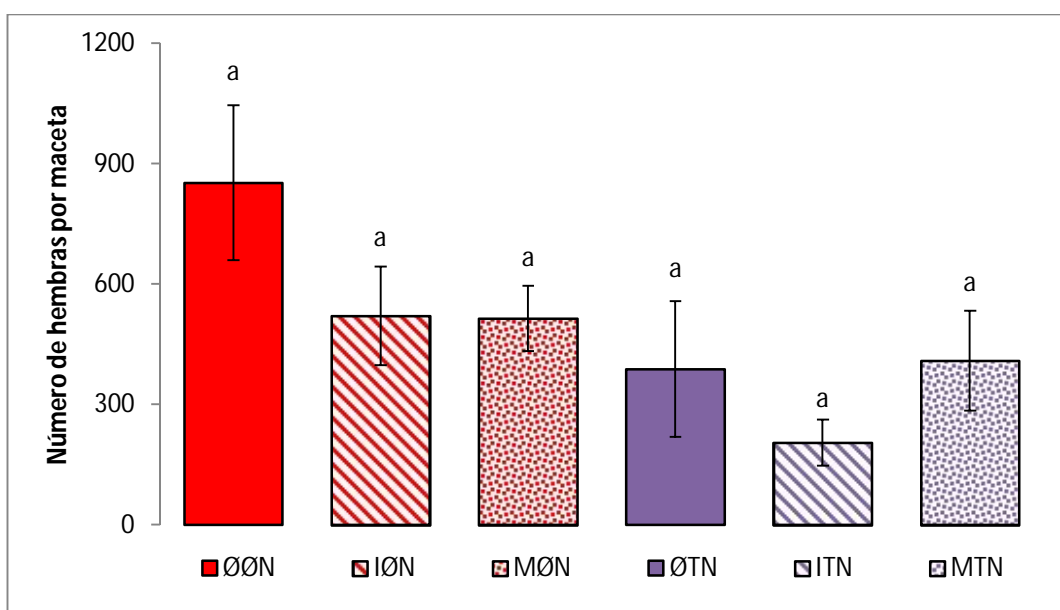
Figura 30. Valores medios de la densidad final de nemátodos por maceta en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-*T. harzianum* en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita*.



Datos expresados como media \pm error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años). Columnas coronadas con la misma letra no difieren significativamente según el test KW ($p \leq 0,05$).

El número de nemátodos por maceta fue reducido, en aproximadamente un 41%, en las plantas inoculadas con *T. harzianum* (4.803 ± 959), frente a las plantas no inoculadas con este hongo (8.122 ± 1.129) (Tabla 23 y Figura 30).

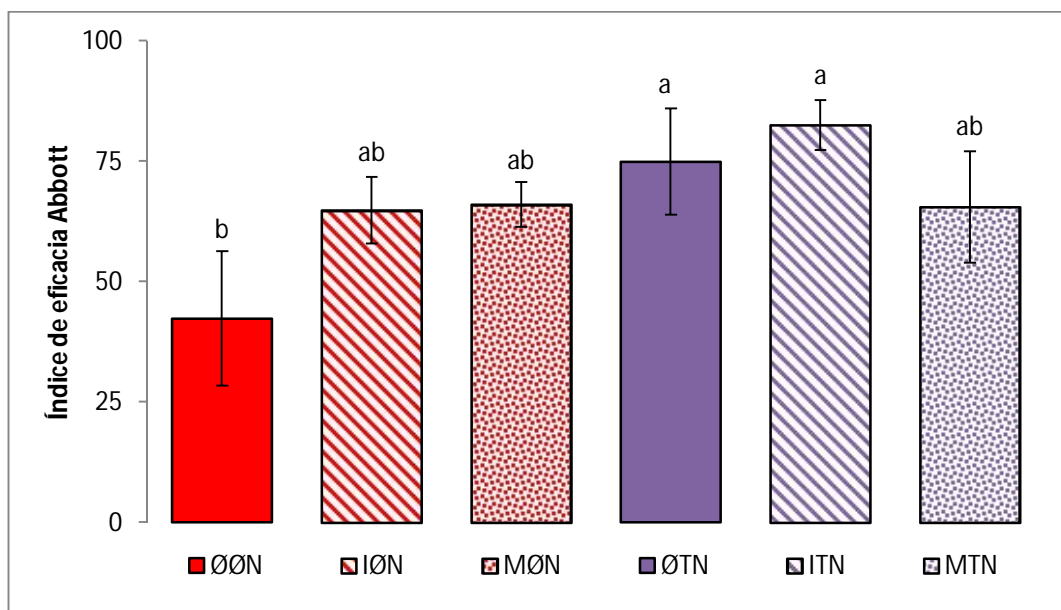
Figura 31. Valores medios del número de hembras de *M. incognita* por maceta en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-*T. harzianum* en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita*.



Datos expresados como media \pm error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años). Columnas coronadas con la misma letra no difieren significativamente según el test KW ($p \leq 0,05$).

El número de hembras por maceta también fue reducido en más de un 45% en aquellas plantas inoculadas con *T. harzianum* (340 ± 74), frente a las que no recibieron este inóculo (620 ± 81) (Tabla 23 y Figura 31).

Figura 32. Valores medios de eficacia Abbott en la reducción del número de nemátodos en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-*T. harzianum* en el patosistema Tomate cv. Durinta-M. *incognita*.



Datos expresados como media \pm error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años). Columnas coronadas con la misma letra no difieren significativamente según el test LSD ($p \leq 0,05$).

El índice de eficacia Abbott para la reducción de las densidades de nemátodos mostró la efectividad de la inoculación con *T. harzianum* al obtener un índice mayor ($73,95 \pm 5,73$), frente a las plantas no inoculadas con este hongo ($58,38 \pm 5,38$) (Tabla 23 y Figura 32). Los tratamientos más efectivos fueron aquellos que combinaron la micorrización por *G. intraradices* y la inoculación con *T. harzianum* [ITN] o la aplicación individual del hongo oportunista [ØTN], en relación al control sin tratar [ØØN] (Figura 32).

2.2.2. ENSAYOS EN TOMATE CV. JOSEFINA

En la tabla 27 se muestra la significación estadística para los efectos de los factores ensayados [infestación por nemátodos (NEM), micorrización (AMF) e inoculación con *Trichoderma harzianum* (TRI)] y sus interacciones sobre las distintas variables de crecimiento y productividad vegetal, micorrización y reproducción del nemátodo.

Tabla 27. Significación estadística del ANOVA multifactorial o los test de Kruskal-Wallis en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-*T. harzianum* en el patosistema Tomate-*M. incognita*. Tomate cv. Josefina.

| | NEM | AMF | TRI | NEM × AMF | NEM × TRI | AMF × TRI | NEM × AMF × TRI |
|--|--------|--------|--------|-----------|-----------|-----------|-----------------|
| Longitud parte aérea (cm) ^{AV} | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Peso fresco parte aérea (g) año 1 ^{oAV} | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Peso fresco parte aérea (g) año 2 ^{oKW} | 0,0466 | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Peso seco parte aérea (g) año 1 ^{oAV} | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Peso seco parte aérea (g) año 2 ^{oKW} | 0,0069 | ns | ns | ns | 0,0496 | ns | ns |
| Peso fresco raíces (g) año 1 ^{oAV} | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Peso fresco raíces (g) año 2 ^{oKW} | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Número de flores ^{AV} | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Número de frutos ^{AV} | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Peso fresco de frutos (g) ^{AV} | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Contenido en clorofila(RLCC-SPAD) ^{AV} | ns | ns | ns | ns | ns | ns | 0,0445 |
| Temperatura de la cubierta vegetal (°C) ^{KW} | ns | ns | ns | ns | 0,0400 | 0,0030 | 0,0087 |
| Frecuencia de micorrización, F% ^{KW} | 0,0071 | ns | ns | 0,0000 | 0,0097 | ns | 0,0000 |
| Intensidad de micorrización, M% ^{KW} | 0,0019 | ns | ns | 0,0000 | 0,0150 | ns | 0,0002 |
| Intensidad de micorrización media por fragmento, m% ^{KW} | 0,0030 | ns | ns | 0,0019 | 0,0291 | ns | 0,0311 |
| Índice de agallas ^{AV} | - | 0,0120 | 0,0079 | - | - | ns | - |
| Número de J2 + huevos por maceta ^{AV} | - | ns | ns | - | - | ns | - |
| Número de hembras de <i>Meloidogyne</i> por maceta ^{AV} | - | ns | ns | - | - | ns | - |
| Eficacia Abbott en la reducción del número de nemátodos por maceta ^{AV} | - | ns | ns | - | - | 0,0069 | - |

Tratamientos analizados por ANOVA^{AV} o Kruskal-Wallis^{KW}. ns. Nivel de significación $p > 0,05$, no significativo.

Las siguientes tablas y figuras muestran los resultados obtenidos para las distintas variables de crecimiento (Tabla 28) y productividad vegetal (Tabla 29), micorrización (Tabla 30) y reproducción de nemátodos (Figuras 33-36), para cada uno de los tratamientos ensayados en tomate cv. Josefina.

Tabla 28. Valores de crecimiento vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-*T. harzianum* en el patosistema Tomate cv. Josefina-*M. incognita* (continúa).

| Tratamientos | Longitud parte aérea (cm) | Peso fresco parte aérea, año 1 (g)* | Peso fresco parte aérea, año2 (g)* |
|--------------|---------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| ØØØ | 84,81 ± 3,63 a | 69,05 ± 11,12 a | 90,03 ± 11,38 a |
| IØØ | 74,88 ± 6,76 a | 86,33 ± 36,17 a | 89,83 ± 3,23 a |
| MØØ | 81,94 ± 6,84 a | 68,35 ± 26,21 a | 97,50 ± 7,41 a |
| ØTØ | 82,21 ± 4,83 a | 53,83 ± 25,23 a | 87,03 ± 6,28 a |
| ITØ | 81,07 ± 6,44 a | 53,90 ± 10,94 a | 90,73 ± 10,02 a |
| MTØ | 83,38 ± 5,56 a | 94,40 ± 47,66 a | 89,08 ± 6,48 a |
| ØØN | 82,44 ± 4,70 a | 70,80 ± 8,02 a | 98,60 ± 16,11 a |
| IØN | 72,94 ± 5,02 a | 79,45 ± 26,94 a | 82,95 ± 14,19 a |
| MØN | 70,50 ± 7,47 a | 89,45 ± 24,90 a | 52,78 ± 12,18 a |
| ØTN | 73,94 ± 4,16 a | 51,65 ± 17,76 a | 70,33 ± 12,67 a |
| ITN | 81,19 ± 5,30 a | 90,20 ± 34,13 a | 65,53 ± 12,16 a |
| MTN | 77,56 ± 5,88 a | 85,35 ± 45,52 a | 92,10 ± 14,15 a |

Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cuatro réplicas.

Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

En el segundo año de ensayo, solo aquellas plantas infestadas por *M. incognita* mostraron un menor peso fresco de la parte aérea ($77,05 \pm 5,93$ g), en comparación con las plantas sanas ($90,70 \pm 2,94$ g) (Tabla 27).

Tabla 28 (continuación). Valores de crecimiento vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-*T. harzianum* en el patosistema Tomate cv. Josefina-*M. incognita* (continúa).

| Tratamientos | Peso seco parte aérea, año 1 (g)* | Peso seco parte aérea, año 2 (g)* |
|--------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| ∅∅∅ | 16,35 ± 2,09 a | 18,48 ± 1,21 a |
| I∅∅ | 17,93 ± 8,42 a | 18,13 ± 2,41 a |
| M∅∅ | 15,88 ± 6,27 a | 21,95 ± 2,75 a |
| ∅T∅ | 9,93 ± 4,54 a | 21,06 ± 4,63 a |
| IT∅ | 9,93 ± 3,28 a | 22,93 ± 3,78 a |
| MT∅ | 23,33 ± 10,93 a | 16,10 ± 2,36 a |
| ∅∅N | 13,45 ± 3,94 a | 28,48 ± 8,73 a |
| I∅N | 15,33 ± 4,61 a | 15,68 ± 3,98 a |
| M∅N | 22,63 ± 9,06 a | 8,13 ± 1,59 a |
| ∅TN | 10,53 ± 4,55 a | 13,50 ± 4,20 a |
| ITN | 21,65 ± 10,86 a | 12,05 ± 2,94 a |
| MTN | 20,25 ± 13,60 a | 14,70 ± 2,69 a |

Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cuatro réplicas.

Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

También en el segundo año de ensayo, las plantas infestadas por el nemátodo mostraron un menor peso seco de la parte aérea ($15,42 \pm 2,13$ g), frente al resto ($19,77 \pm 1,21$ g) (Tabla 27). Evaluando el efecto conjunto del nemátodo y *T. harzianum* se revela que, las plantas que combinaron en su tratamiento ambos microorganismos mostraron un menor peso seco de la parte aérea ($13,42 \pm 1,78$ g) que el resto (Tabla 27).

Tabla 28 (continuación). Valores de crecimiento vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-*T. harzianum* en el patosistema Tomate cv. Josefina-*M. incognita*.

| Tratamientos | Peso fresco de la raíz, año 1 (g)* | Peso fresco de la raíz, año 2 (g)* |
|--------------|------------------------------------|------------------------------------|
| ØØØ | 25,53 ± 4,43 a | 24,58 ± 5,87 a |
| IØØ | 23,48 ± 10,47 a | 25,00 ± 3,43 a |
| MØØ | 22,18 ± 7,61 a | 25,08 ± 4,89 a |
| ØTØ | 18,10 ± 10,31 a | 20,53 ± 4,13 a |
| ITØ | 20,07 ± 5,05 a | 20,30 ± 4,29 a |
| MTØ | 35,58 ± 21,09 a | 25,95 ± 4,13 a |
| ØØN | 31,48 ± 2,23 a | 26,23 ± 7,09 a |
| IØN | 31,43 ± 15,74 a | 19,73 ± 6,89 a |
| MØN | 22,43 ± 9,44 a | 14,18 ± 5,32 a |
| ØTN | 12,45 ± 5,36 a | 17,40 ± 8,37 a |
| ITN | 28,26 ± 13,42 a | 19,43 ± 5,99 a |
| MTN | 36,35 ± 24,03 a | 31,58 ± 4,84 a |

Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cuatro réplicas. Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

Tabla 29. Valores de productividad vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-*T. harzianum* en el patosistema Tomate cv. Josefina-*M. incognita* (continúa).

| Tratamientos | Número de flores | Número de frutos | Peso fresco de los frutos (g) |
|--------------|------------------|------------------|-------------------------------|
| ØØØ | 11,13 ± 2,64 a | 2,50 ± 0,71 a | 16,26 ± 4,31 a |
| IØØ | 14,50 ± 2,60 a | 1,88 ± 0,79 a | 11,16 ± 4,58 a |
| MØØ | 11,75 ± 2,58 a | 2,50 ± 1,00 a | 13,80 ± 5,14 a |
| ØTØ | 9,57 ± 2,28 a | 1,43 ± 0,37 a | 8,67 ± 2,43 a |
| ITØ | 10,43 ± 1,27 a | 1,71 ± 0,47 a | 9,79 ± 3,18 a |
| MTØ | 13,13 ± 3,14 a | 1,50 ± 0,63 a | 9,73 ± 3,96 a |
| ØØN | 14,13 ± 3,34 a | 2,00 ± 0,50 a | 11,05 ± 2,76 a |
| IØN | 14,00 ± 2,72 a | 1,63 ± 0,65 a | 9,00 ± 3,84 a |
| MØN | 8,25 ± 1,81 a | 1,38 ± 0,73 a | 6,20 ± 3,23 a |
| ØTN | 9,50 ± 2,82 a | 1,38 ± 0,53 a | 7,46 ± 2,85 a |
| ITN | 9,75 ± 2,85 a | 1,75 ± 0,45 a | 10,08 ± 2,79 a |
| MTN | 13,38 ± 3,44 a | 2,00 ± 0,82 a | 9,10 ± 3,79 a |

Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años).

Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

Tabla 29 (continuación). Valores de productividad vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-*T. harzianum* en el patosistema Tomate cv. Josefina-M. *incognita*.

| Tratamientos | Contenido en clorofila (unidades SPAD) | Temperatura de la cubierta vegetal (°C) |
|--------------|--|---|
| ØØØ | 33,41 ± 1,53 c | 25,21 ± 0,32 a |
| IØØ | 36,20 ± 1,95 abc | 27,90 ± 1,15 a |
| MØØ | 42,68 ± 3,00 a | 26,35 ± 0,32 a |
| ØTØ | 33,24 ± 1,96 c | 26,91 ± 1,49 a |
| ITØ | 34,93 ± 2,29 bc | 23,26 ± 0,97 a |
| MTØ | 31,61 ± 2,47 c | 23,58 ± 1,36 a |
| ØØN | 33,21 ± 2,56 c | 24,56 ± 1,10 a |
| IØN | 37,34 ± 2,43 abc | 27,55 ± 0,81 a |
| MØN | 38,26 ± 2,66 abc | 26,10 ± 1,02 a |
| ØTN | 37,19 ± 3,02 abc | 28,31 ± 0,77 a |
| ITN | 34,04 ± 2,55 c | 26,05 ± 1,37 a |
| MTN | 41,55 ± 2,64 ab | 25,33 ± 0,90 a |

Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años).

Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

El estudio de la triple interacción (NEM × AMF × TRI) nos indica que, las plantas con valores de contenido de clorofila más elevados fueron aquellas únicamente micorrizadas por *G. mosseae* [MØØ] o las infestadas e inoculadas con *G. mosseae* y *T. harzianum* [MTN], siendo significativamente diferentes de las plantas sanas control [ØØØ], sanas inoculadas con *T. harzianum* [ØTØ], sanas dualmente inoculadas con *G. mosseae* y hongo oportunista [MTØ], control infestadas [ØØN] e infestadas micorrizadas por *G. intraradices* e inoculadas con *T. harzianum* [ITN] (Tabla 29).

En la variable temperatura de la cubierta, no influyó ninguno de los factores por sí mismos, sin embargo, el análisis de la combinación (NEM × TRI) nos indicó que, aquellas plantas no infestadas e inoculadas con *T. harzianum* mostraron la menor temperatura de la cubierta ($24,54 \pm 0,80^{\circ}\text{C}$), aunque sin diferencias significativas con el resto de combinaciones. Por otra parte, el análisis de la combinación (AMF × TRI) mostró que las plantas micorrizadas por *G. mosseae* e inoculadas con *T. harzianum* mostraron menor temperatura de la cubierta ($24,45 \pm 0,82^{\circ}\text{C}$), siendo diferente significativamente de las micorrizadas por *G. intraradices* en ausencia del hongo oportunista ($27,73 \pm 0,68^{\circ}\text{C}$). Los tratamientos con menores temperaturas de la cubierta vegetal fueron los que agruparon la

micorrización y la inoculación con *T. harzianum* en ausencia de *M. incognita* [ITØ] y [MTØ] (Tabla 29).

Tabla 30. Valores medios de variables relacionadas con la micorrización en el ensayo para el estudio de la interacción AMF- *T. harzianum* en el patosistema Tomate cv. Josefina-*M. incognita*.

| Tratamientos | Frecuencia de micorrización (F%) | Intensidad de micorrización (M%) | Intensidad de colonización media por fragmento (m%) |
|--------------|----------------------------------|----------------------------------|---|
| IØØ | 94,58 ± 1,25 a | 23,92 ± 1,55 a | 25,20 ± 1,45 a |
| MØØ | 82,08 ± 2,27 abc | 17,41 ± 1,08 abc | 21,16 ± 1,05 a |
| ITØ | 94,76 ± 1,23 a | 24,48 ± 2,07 ab | 25,72 ± 1,93 a |
| MTØ | 70,84 ± 3,44 c | 15,43 ± 1,25 abc | 21,77 ± 1,34 a |
| IØN | 76,25 ± 2,22 bc | 15,65 ± 1,54 abc | 20,29 ± 1,64 a |
| MØN | 72,08 ± 3,88 c | 14,66 ± 1,59 bc | 20,08 ± 1,48 a |
| ITN | 68,75 ± 3,21 c | 12,68 ± 1,74 c | 18,28 ± 2,28 a |
| MTN | 91,67 ± 1,41 ab | 18,73 ± 1,26 abc | 20,37 ± 1,20 a |

Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años). Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según el test KW ($p \leq 0,05$).

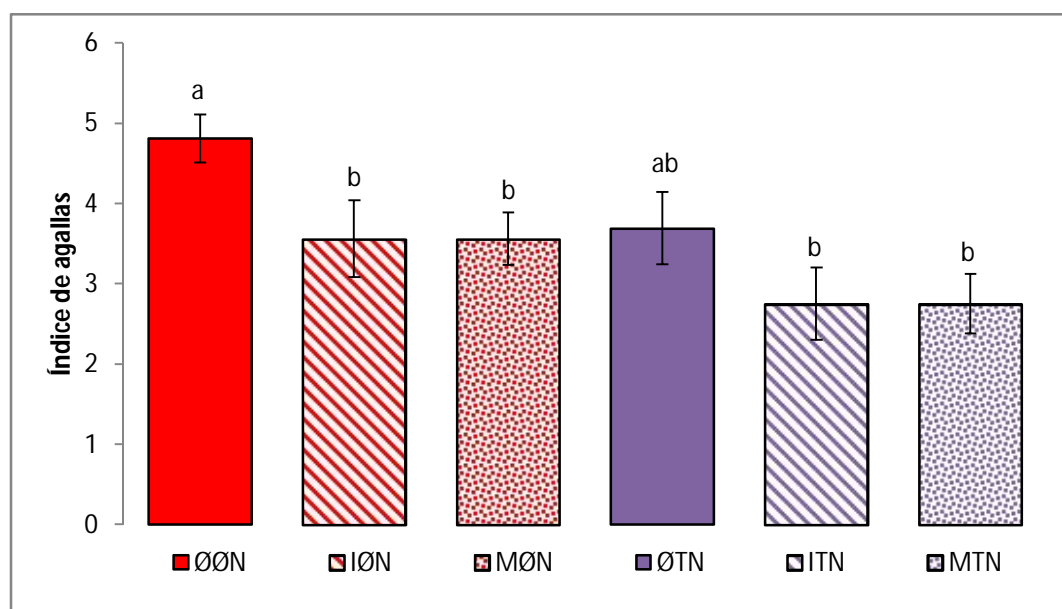
La frecuencia de micorrización (F%) fue mayor en las plantas no infestadas por *M. incognita* ($85,27 \pm 2,12$), que en las plantas infestadas ($77,19 \pm 2,07$) (Tablas 27 y 30). La micorrización no tuvo efecto por sí misma, sin embargo, se observó que analizando la combinación (NEM × AMF) las plantas no infestadas micorrizadas por *G. intraradices* mostraron mayor frecuencia de micorrización ($94,67 \pm 0,85$) que el resto (Tablas 27 y 30). Los tratamientos que presentaron mayor F% fueron los que incluyeron únicamente micorrización por *G. intraradices* [IØØ] o la combinación de este hongo arbuscular y el oportunista [ITØ], con diferencias significativas en comparación con los tratamientos que agruparon *G. mosseae* y *T. harzianum* sin nemátodo [MTØ], *Glomus* spp. y *M. Incognita* [IØN]o [MØN] y *G. intraradices*, *T. harzianum* y *M. incognita* [ITN] (Tabla 30).

La intensidad de micorrización (M%) fue mayor en plantas no infestadas ($20,18 \pm 1,01$), que en plantas infestadas por nemátodos ($15,43 \pm 0,83$) (Tablas 27 y 30). Tal y como ocurriera para la variable anteriormente estudiada, la micorrización por sí misma no mostró efecto sobre M%, sin embargo, en el análisis de la combinación (NEM × AMF) nuevamente se observó que, las plantas no infestadas micorrizadas por *G. intraradices* mostraron mayor intensidad de micorrización ($24,18 \pm 1,23$) que el resto (Tablas 27 y 30).

El tratamiento [IØØ] presentó el mayor valor de M% y los tratamientos [MØN] y [ITN] los valores mínimos de M%, mostrando diferencias significativas (Tabla 30).

En concordancia con las dos variables previas de micorrización, también la intensidad media de micorrización por fragmento (m%) fue mayor en plantas no infestadas ($23,39 \pm 0,78$), que en plantas infestadas por nemátodos ($19,76 \pm 0,82$) (Tablas 27 y 30). Tampoco en esta variable tuvieron efecto la micorrización y la inoculación con *T. harzianum* por sí mismas, no obstante, el análisis de la combinación (NEM \times AMF) mostró que las plantas no infestadas micorrizadas por *G. intraradices* presentaron mayor intensidad media de micorrización por fragmento ($25,44 \pm 1,15$), comparadas con las infestadas que fueron micorrizadas tanto por *G. intraradices* como por *G. mosseae* ($19,29 \pm 1,38$ y $20,23 \pm 0,92$ respectivamente) (Tablas 27 y 30). Por su parte, el análisis de la combinación (NEM \times TRI) mostró que, las plantas no infestadas e inoculadas con *T. harzianum* presentaron mayor m% ($23,61 \pm 1,23$) que el resto, aunque sin diferencias significativas entre ellas. Los tratamientos [IØØ] y [ITØ] mostraron los máximos valores para m% y el tratamiento [ITN] el mínimo valor para m% (Tabla 30).

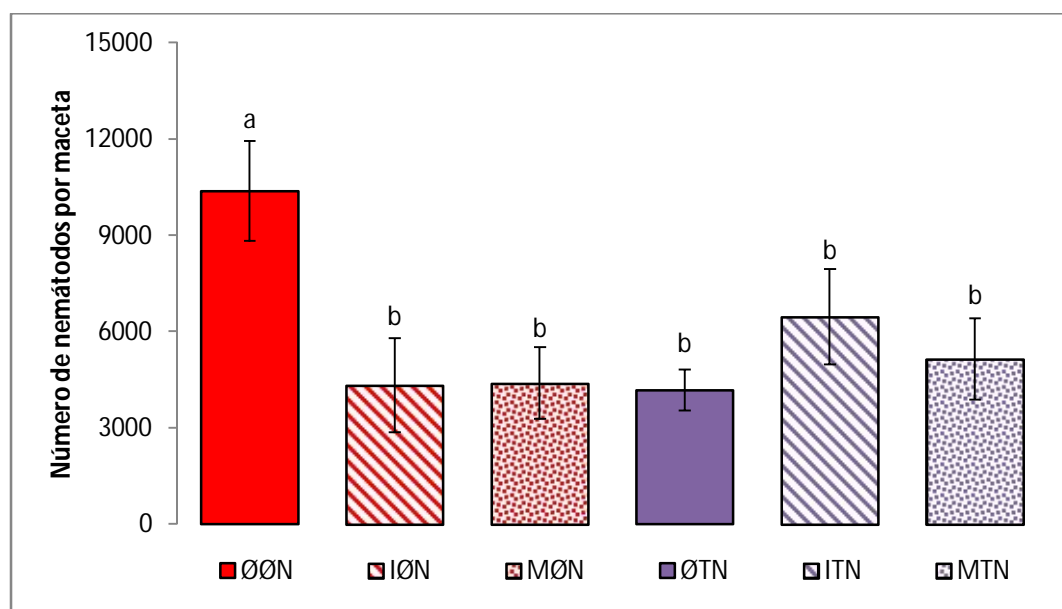
Figura 33. Valores medios de los índices de agallas en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-*T. harzianum* en el patosistema Tomate cv. Josefina-*M. incognita*.



Datos expresados como media \pm error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones \times dos años). Columnas coronadas con la misma letra no difieren significativamente según el test LSD ($p \leq 0,05$).

La micorrización con *G. intraradices* o *G. mosseae* redujo el índice de agallas ($3,16 \pm 0,33$ y $3,16 \pm 0,26$ respectivamente), en comparación a las plantas no micorrizadas ($4,25 \pm 0,30$) (Tabla 27 y Figura 33). La inoculación con *T. harzianum* también redujo el índice de agallas ($3,06 \pm 0,25$), respecto a la ausencia de este hongo ($3,98 \pm 0,24$) (Tabla 27 y Figura 33). Todos los tratamientos redujeron el índice de agallas en relación al control [ØØN], pero los más efectivos fueron aquellos únicamente micorrizados [IØN] y [MØN], y los que además del hongo arbuscular incluyeron al hongo oportunista [ITN] y [MTN]. Aunque la combinación de ambos hongos alcanzó mayor efectividad respecto a la utilización simple de la micorrización, tales diferencias no llegaron a ser significativas (Figura 33).

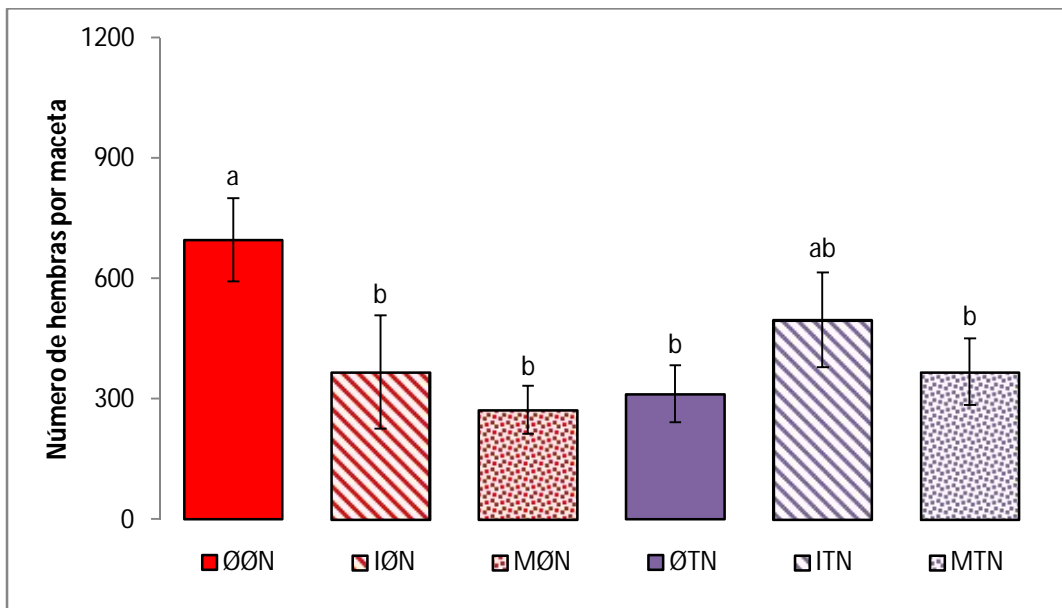
Figura 34. Valores medios de la densidad final de nemátodos por maceta en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-*T. harzianum* en el patosistema Tomate cv. Josefina-M. incognita.



Datos expresados como media \pm error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años). Columnas coronadas con la misma letra no difieren significativamente según el test LSD ($p \leq 0,05$).

El número de nemátodos por maceta se redujo en todos los tratamientos con respecto al control [ØØN] (Tabla 27 y Figura 34).

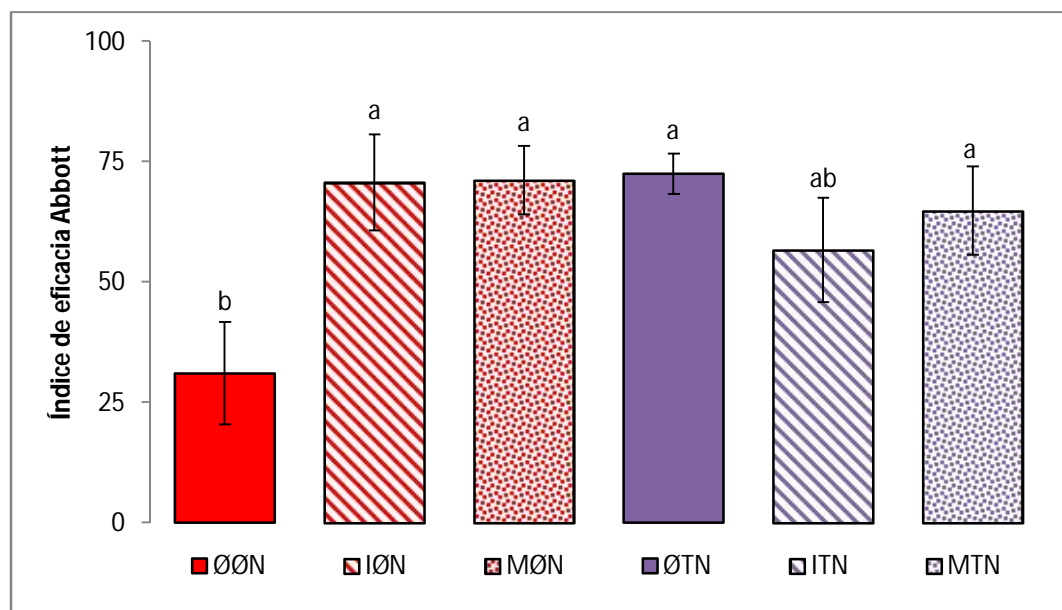
Figura 35. Valores medios del número de hembras de *M. incognita* por maceta en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-*T. harzianum* en el patosistema Tomate cv. Josefina-*M. incognita*.



Datos expresados como media \pm error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años). Columnas coronadas con la misma letra no difieren significativamente según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Los tratamientos con AMFs y sin *Trichoderma* [IØN] y [MØN], el que exclusivamente recibió *Trichoderma* [ØTN] y el que combinó *G. mosseae* y *Trichoderma* [MTN] redujeron el número de hembras por maceta, respecto al control [ØØN] (Figura 35).

Figura 36. Valores medios de eficacia Abbott en la reducción del número de nemátodos en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-*T. harzianum* en el patosistema Tomate cv. Josefina-*M. incognita*.



Datos expresados como media \pm error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años). Columnas coronadas con la misma letra no difieren significativamente según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Ni la micorrización ni la inoculación con *T. harzianum* mostraron efecto por sí mismas sobre la eficacia Abbott, sin embargo, en la interacción (AMF \times TRI) se observó que las plantas no micorrizadas e inoculadas con *T. harzianum* [ØTN], las micorrizadas pero no inoculadas por el hongo oportunista [IØN] o [MØN] y las dualmente inoculadas con *G. mosseae* y *T. harzianum* [MTN] mostraron las mayores eficacias Abbott en la reducción de las densidades de nemátodos (Figura 36).

2.3. ENSAYO 3. EFECTOS DE LA MICORRIZACIÓN Y APLICACIÓN AL SUELO DE EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITES ESENCIALES SOBRE EL PATOSISTEMA TOMATE-*M. INCOGNITA*

Se investigaron los efectos producidos por la inoculación simple y combinada de microorganismos bioprotectores (*Glomus intraradices* o *G. mosseae*) y los extractos vegetales y aceites esenciales (*Allium sativum*, *Azadirachta indica*, *Quassia amara* y *Thymus zygis*), sobre distintas variables de crecimiento y producción vegetal, micorrización, severidad de la enfermedad causada por *M. incognita* y reproducción del nemátodo, en tomate cv. Durinta y cv. Josefina.

2.3.1. ENSAYOS EN TOMATE CV. DURINTA

En la tabla 31 se muestra la significación estadística para los efectos de los factores ensayados y sus interacciones sobre las distintas variables de crecimiento y productividad vegetal, micorrización y reproducción del nemátodo:

- infestación por nemátodos (NEM)
- micorrización (AMF)
- aplicación de extractos vegetales y aceites esenciales (ACE)

Las siguientes tablas y figuras muestran los resultados obtenidos para las distintas variables de crecimiento (Tabla 32) y productividad vegetal (Tabla 33), micorrización (Tabla 34) y reproducción de nemátodos (Figuras 37-40), para cada uno de los tratamientos ensayados.

Tabla 31. Significación estadística del ANOVA multifactorial o los test de Kruskal-Wallis en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita*.

| | NEM | AMF | ACE | NEM × AMF | NEM × ACE | AMF × ACE | NEM × AMF × ACE |
|--|--------|--------|--------|-----------|-----------|-----------|-----------------|
| Longitud parte aérea (cm) año 1 ^o KW | ns | ns | 0,0491 | ns | ns | ns | ns |
| Longitud parte aérea (cm) año 2 ^o AV | ns | ns | ns | ns | * | ns | ns |
| Peso fresco parte aérea (g) año 1 ^o AV | ns | 0,0252 | ns | ns | * | ns | ns |
| Peso fresco parte aérea (g) año 2 ^o KW | ns | 0,0077 | ns | ns | ns | 0,0288 | ns |
| Peso seco parte aérea (g) año 1 ^o AV | ns | 0,0301 | ns | ns | * | ns | ns |
| Peso seco parte aérea (g) año 2 ^o AV | ns | ns | ns | ns | * | ns | ns |
| Peso fresco raíces (g) año 1 ^o AV | ns | ns | ns | 0,0144 | * | ns | ns |
| Peso fresco raíces (g) año 2 ^o AV | ns | ns | ns | ns | * | ns | ns |
| Número de flores ^{AV} | ns | ns | ns | ns | * | ns | ns |
| Número de frutos año 1 ^o KW | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Número de frutos año 2 ^o AV | ns | ns | ns | ns | * | ns | ns |
| Peso fresco de frutos (g) año 1 ^o AV | ns | ns | ns | ns | * | ns | ns |
| Peso fresco de frutos (g) año 2 ^o AV | ns | ns | ns | ns | * | ns | ns |
| Contenido en clorofila(RLCC-SPAD) ^{AV} | ns | ns | ns | ns | * | ns | ns |
| Temperatura de la cubierta vegetal (°C) ^{KW} | 0,0050 | ns | 0,0000 | 0,0185 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |
| Frecuencia de micorrización, F% ^{KW} | 0,0016 | 0,0015 | 0,0129 | 0,0002 | 0,0001 | 0,0000 | 0,0000 |
| Intensidad de micorrización, M% ^{AV} | 0,0028 | 0,0079 | ns | ns | * | ns | 0,0032 |
| Intensidad de micorrización media por fragmento, m% ^{KW} | 0,0137 | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Índice de agallas ^{AV} | - | 0,0090 | ns | - | - | ns | - |
| Número de J2 + huevos por maceta ^{AV} | - | ns | 0,0318 | - | - | ns | - |
| Número de hembras de <i>Meloidogyne</i> por maceta ^{AV} | - | ns | 0,0139 | - | - | 0,0410 | - |
| Eficacia Abbott en la reducción del número de nemátodos por maceta ^{AV} | - | ns | 0,0144 | - | - | ns | - |

Tratamientos analizados por ANOVA^{AV} o Kruskal-Wallis^{KW}. ns. Nivel de significación $p > 0,05$, no significativo. * Interacción no permitida en el modelo estadístico.

Tabla 32. Valores de crecimiento vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita* (continúa).

| Tratamientos | Longitud parte aérea, año 1 (cm)* | Longitud parte aérea, año 2 (cm)* |
|--------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| ØØØ | 61,25 ± 9,23 a | 64,00 ± 4,07 abcd |
| IØØ | 53,00 ± 5,70 a | 70,70 ± 7,06 abc |
| MØØ | 69,38 ± 3,34 a | 62,25 ± 5,73 bcd |
| ØØN | 77,00 ± 3,75 a | 55,38 ± 8,07 d |
| IØN | 63,00 ± 9,03 a | 72,25 ± 3,25 ab |
| MØN | 56,00 ± 5,09 a | 68,13 ± 3,92 abc |
| ØAN | 70,63 ± 7,28 a | 62,75 ± 3,23 bcd |
| IAN | 65,88 ± 9,86 a | 62,88 ± 5,84 bcd |
| MAN | 81,88 ± 2,42 a | 66,63 ± 1,95 abcd |
| ØNN | 59,88 ± 10,47 a | 59,25 ± 3,00 cd |
| INN | 53,75 ± 15,26 a | 75,63 ± 3,54 a |
| MNN | 68,25 ± 6,18 a | 65,63 ± 2,99 abcd |
| ØQN | 73,38 ± 3,98 a | 64,00 ± 4,34 abcd |
| IQN | 67,50 ± 3,01 a | 61,88 ± 4,83 bcd |
| MQN | 67,00 ± 4,87 a | 58,88 ± 3,45 cd |
| ØToN | 75,00 ± 2,68 a | 59,63 ± 3,73 cd |
| IToN | 76,33 ± 7,42 a | 72,25 ± 1,01 ab |
| MToN | 74,25 ± 4,09 a | 60,25 ± 3,65 bcd |

Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cuatro réplicas. Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

Durante el primer año del ensayo, la longitud de la parte aérea fue máxima en las plantas donde se aplicó aceite esencial de *T. zygis* o extracto de *A. sativum* ($75,09 \pm 2,38$ cm o $72,79 \pm 4,28$ cm respectivamente), en comparación con el resto (Tabla 31).

En el segundo año de ensayo, las plantas infestadas por nemátodos, sin micorrizar y en suelos sin ninguna aplicación de extracto vegetal o aceite esencial [ØØN] mostraron la menor longitud de la parte aérea, siendo significativamente menor que aquellas infestadas en suelos donde no se aplicaron extractos vegetales pero fueron micorrizadas [IØN] y [MØN], y las micorrizadas por *G. intraradices* en suelos con *A. indica* [INN] o *T. zygis* [IToN] (Tabla 32).

Tabla 32 (continuación). Valores de crecimiento vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita* (continúa).

| Tratamientos | Peso fresco parte aérea, año 1 (g)* | Peso fresco parte aérea, año 2 (g)* |
|--------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| ØØØ | 75,43 ± 21,14 abcd | 76,03 ± 8,24 a |
| IØØ | 29,08 ± 6,57 d | 93,43 ± 18,89 a |
| MØØ | 110,35 ± 19,89 ab | 78,05 ± 10,48 a |
| ØØN | 121,67 ± 24,91 a | 60,95 ± 9,93 a |
| IØN | 56,40 ± 18,77 bcd | 98,80 ± 11,59 a |
| MØN | 70,15 ± 16,88 abcd | 90,23 ± 6,13 a |
| ØAN | 68,83 ± 12,94 abcd | 62,48 ± 2,58 a |
| IAN | 90,78 ± 28,82 abc | 91,83 ± 15,28 a |
| MAN | 105,83 ± 12,42 ab | 84,55 ± 6,05 a |
| ØNN | 72,33 ± 23,49 abcd | 74,48 ± 8,31 a |
| INN | 43,65 ± 16,81 cd | 99,98 ± 6,73 a |
| MNN | 59,13 ± 11,64 bcd | 82,88 ± 7,31 a |
| ØQN | 84,38 ± 12,09 abcd | 101,10 ± 13,21 a |
| IQN | 80,43 ± 17,85 abcd | 75,05 ± 7,60 a |
| MQN | 101,75 ± 18,90 ab | 63,95 ± 7,30 a |
| ØTØN | 111,70 ± 18,77 ab | 65,15 ± 7,55 a |
| ITØN | 94,10 ± 45,68 abc | 99,58 ± 9,41 a |
| MTØN | 122,10 ± 24,96 a | 66,10 ± 10,96 a |

Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cuatro réplicas.

Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

El peso fresco de la parte aérea, durante el primer año de ensayo, fue mayor en las plantas micorrizadas por *G. mosseae* (94,88 ± 8,03 g), frente a las no micorrizadas (87,64 ± 8,01 g) o las micorrizadas por *G. intraradices* (64,50 ± 9,73 g) (Tabla 31). De todos los tratamientos el no infestado, micorrizado por *G. intraradices* y en suelos sin fitoquímicos fue el que mostró menor peso fresco de la parte aérea [IØØ], significativamente menor que el infestado sin micorrizar ni tratar con extractos o aceites esenciales [ØØN] o que el infestado, micorrizado por *G. mosseae* y tratado con extracto de *T. zygis* [MTØN] (Tabla 32).

En contraste, en el segundo año de ensayo, el peso fresco de la parte aérea fue mayor en las plantas micorrizadas por *G. intraradices* (93,11 ± 4,81 g), en comparación con las plantas que no recibieron inóculo de AMF (73,36 ± 4,29 g). Además, el estudio de la combinación (AMF × ACE) exhibió valores más elevados de peso fresco de la parte aérea en plantas no micorrizadas que recibieron extracto de *Q. amara* (101,10 ± 13,21 g), las micorrizadas por *G. intraradices* con aplicación de aceite de *A. indica* (99,98 ± 6,73 g) o *G. intraradices* con aplicación de aceite de *T. zygis* (99,58 ± 9,41 g) (Tabla 31).

Tabla 32. (continuación) Valores de crecimiento vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita* (continúa).

| Tratamientos | Peso seco parte aérea, año 1 (g)* | Peso seco parte aérea, año 2 (g)* |
|--------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| ØØØ | 15,55 ± 4,66 abc | 13,65 ± 2,80 abc |
| IØØ | 6,35 ± 1,54 c | 18,50 ± 4,49 ab |
| MØØ | 25,00 ± 5,72 ab | 14,05 ± 2,97 abc |
| ØØN | 29,63 ± 6,12 a | 10,25 ± 3,11 c |
| IØN | 12,30 ± 5,01 bc | 20,80 ± 1,61 a |
| MØN | 15,43 ± 4,20 abc | 17,10 ± 0,77 abc |
| ØAN | 13,55 ± 2,67 bc | 12,88 ± 1,74 bc |
| IAN | 24,08 ± 8,91 ab | 16,15 ± 3,66 abc |
| MAN | 22,55 ± 2,47 ab | 14,53 ± 1,06 abc |
| ØNN | 15,35 ± 5,00 abc | 14,03 ± 1,33 abc |
| INN | 8,15 ± 3,61 c | 18,40 ± 2,80 ab |
| MNN | 13,55 ± 3,33 bc | 16,68 ± 2,38 abc |
| ØQN | 19,05 ± 3,21 abc | 12,95 ± 2,70 bc |
| IQN | 16,45 ± 3,70 abc | 14,45 ± 1,48 abc |
| MQN | 19,78 ± 4,59 abc | 9,98 ± 2,40 c |
| ØToN | 25,53 ± 4,90 ab | 10,30 ± 1,74 c |
| IToN | 17,90 ± 8,86 abc | 20,05 ± 1,87 ab |
| MToN | 27,80 ± 5,44 a | 12,90 ± 3,57 bc |

Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cuatro réplicas. Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

En cuanto al peso seco de la parte aérea, en el primer año del ensayo, fue significativamente mayor tan solo en las plantas micorrizadas por *G. mosseae* ($20,68 \pm 1,92$ g), en relación al resto (Tabla 31). En el análisis de la triple combinación (NEM × AMF × ACE) se observó que, durante el primer año del ensayo, los valores máximos de peso seco de la parte aérea correspondieron a los tratamientos control infestado sin micorrizar y sin fitoquímicos [ØØN] e infestado, micorrizado por *G. mosseae* y con aceite esencial de *T. zygis* [MToN]. Por el contrario, durante el segundo año de ensayos, el tratamiento control infestado sin micorrizar y sin fitoquímicos [ØØN] proporcionó uno de los valores mínimos de peso seco de la parte aérea (Tabla 32).

Tabla 32. (continuación) Valores de crecimiento vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita*.

| Tratamientos | Peso fresco de la raíz, año 1 (g)* | Peso fresco de la raíz, año 2(g)* |
|--------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| ØØØ | 21,63 ± 7,26 cd | 15,53 ± 2,46 c |
| IØØ | 14,63 ± 4,33 d | 23,85 ± 7,31 abc |
| MØØ | 41,55 ± 5,46 abc | 23,00 ± 4,85 abc |
| ØØN | 55,27 ± 10,76 a | 16,08 ± 2,36 c |
| IØN | 14,78 ± 6,47 d | 19,80 ± 6,71 abc |
| MØN | 16,78 ± 5,69 cd | 23,33 ± 3,32 abc |
| ØAN | 21,20 ± 4,40 cd | 12,63 ± 3,86 c |
| IAN | 28,78 ± 9,53 abcd | 32,43 ± 6,32 a |
| MAN | 35,83 ± 5,38 abcd | 22,53 ± 3,67 abc |
| ØNN | 27,60 ± 15,65 abcd | 19,45 ± 3,30 abc |
| INN | 13,48 ± 8,44 d | 24,55 ± 5,39 abc |
| MNN | 26,88 ± 11,91 bcd | 21,30 ± 4,71 abc |
| ØQN | 35,80 ± 6,50 abcd | 18,25 ± 4,77 bc |
| IQN | 31,78 ± 9,31 abcd | 20,13 ± 2,92 abc |
| MQN | 42,08 ± 12,28 abc | 21,05 ± 6,18 abc |
| ØTON | 52,35 ± 13,95 ab | 12,63 ± 3,46 c |
| ITON | 33,70 ± 17,17 abcd | 31,60 ± 6,19 ab |
| MTON | 27,48 ± 5,56 abcd | 15,08 ± 5,13 c |

Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cuatro réplicas.

Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

En el análisis de la triple combinación (NEM × AMF × ACE) se observó que, durante el primer año del ensayo, los valores máximos de peso fresco de la raíz correspondieron al tratamiento control infestado sin micorrizar y sin fitoquímicos [ØØN]. Por el contrario, durante el segundo año de ensayos, el tratamiento control infestado sin micorrizar y sin fitoquímicos [ØØN] proporcionó uno de los valores mínimos de peso fresco de la raíz (Tabla 32).

Tabla 33. Valores de productividad vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita* (continúa).

| Tratamientos | Número de flores | Número de frutos, año 1 (g)* | Número de frutos, año2 (g)* |
|--------------|------------------|------------------------------|-----------------------------|
| ØØØ | 4,38 ± 1,29 c | 3,00 ± 1,29 a | 1,25 ± 0,48 bc |
| IØØ | 5,50 ± 1,21 bc | 0,50 ± 0,50 a | 2,50 ± 1,19 abc |
| MØØ | 6,25 ± 1,22 abc | 2,50 ± 1,04 a | 1,00 ± 0,41 bc |
| ØØN | 7,14 ± 1,14 abc | 3,33 ± 0,33 a | 0,75 ± 0,75 c |
| IØN | 7,00 ± 1,39 abc | 1,00 ± 1,00 a | 3,25 ± 0,48 a |
| MØN | 5,75 ± 1,22 bc | 1,50 ± 0,87 a | 1,25 ± 0,63 bc |
| ØAN | 6,00 ± 0,50 abc | 1,25 ± 0,95 a | 1,75 ± 0,25 abc |
| IAN | 7,25 ± 1,58 abc | 2,50 ± 0,87 a | 2,00 ± 0,91 abc |
| MAN | 9,63 ± 1,92 a | 2,00 ± 0,91 a | 2,25 ± 0,25 abc |
| ØNN | 6,00 ± 1,17 abc | 0,25 ± 0,25 a | 2,00 ± 0,82 abc |
| INN | 5,88 ± 1,52 bc | 1,00 ± 0,71 a | 2,75 ± 0,25 ab |
| MNN | 6,38 ± 1,43 abc | 0,75 ± 0,48 a | 2,75 ± 1,03 ab |
| ØQN | 6,88 ± 1,41 abc | 1,75 ± 1,18 a | 1,00 ± 0,58 bc |
| IQN | 7,38 ± 1,16 abc | 1,75 ± 0,48 a | 2,25 ± 0,85 abc |
| MQN | 5,75 ± 1,51 bc | 1,75 ± 0,75 a | 0,75 ± 0,48 c |
| ØToN | 7,25 ± 0,92 abc | 2,00 ± 0,71 a | 1,75 ± 0,48 abc |
| IToN | 9,14 ± 1,10 ab | 1,33 ± 1,33 a | 1,75 ± 0,48 abc |
| MToN | 7,50 ± 1,17 abc | 1,75 ± 0,48 a | 1,25 ± 0,48 bc |

Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cuatro réplicas.

Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

El menor número de flores se observó en el tratamiento control sin infestar sin micorrizar y sin tratar [ØØØ], y únicamente los tratamientos [MAN] e [IToN] consiguieron incrementar significativamente este número de flores (Tabla 33).

En cuanto al número de frutos, durante el segundo año del ensayo, disminuyó significativamente en las plantas control infestadas por nemátodos [ØØN], pero sólo los tratamientos conjuntos de micorrización y aceite de neem [INN] y [MNN] y de micorrización por *G. intraradices* sin fitoquímicos pero con nemátodo [IØN] consiguieron compensar este efecto (Tabla 33).

Tabla 33 (continuación) Valores de productividad vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita* (continúa).

| Tratamientos | Peso fresco de los frutos, año 1 (g)* | Peso fresco de los frutos, año 2 (g)* |
|--------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| ∅∅∅ | 46,65 ± 16,13 a | 13,70 ± 6,28 abcd |
| I∅∅ | 4,03 ± 4,03 bc | 24,63 ± 14,13 abcd |
| M∅∅ | 34,60 ± 18,58 ab | 12,00 ± 7,45 abcd |
| ∅∅N | 30,70 ± 8,42 abc | 5,63 ± 5,63 d |
| I∅N | 11,15 ± 11,15 bc | 30,13 ± 4,81 ab |
| M∅N | 27,63 ± 16,39 abc | 16,40 ± 8,37 abcd |
| ∅AN | 18,40 ± 12,26 abc | 18,70 ± 6,71 abcd |
| IAN | 26,90 ± 12,69 abc | 20,15 ± 7,59 abcd |
| MAN | 30,50 ± 14,84 abc | 23,48 ± 7,39 abcd |
| ∅NN | 0,75 ± 0,75 c | 16,40 ± 7,52 abcd |
| INN | 12,30 ± 8,70 bc | 27,58 ± 6,59 abc |
| MNN | 8,73 ± 5,91 bc | 31,60 ± 12,14 a |
| ∅QN | 17,88 ± 10,40 abc | 7,73 ± 4,55 cd |
| IQN | 24,98 ± 9,31 abc | 20,25 ± 8,74 abcd |
| MQN | 27,95 ± 15,25 abc | 9,50 ± 8,22 bcd |
| ∅ToN | 24,88 ± 10,03 abc | 20,05 ± 6,19 abcd |
| IToN | 10,53 ± 10,53 bc | 21,38 ± 2,05 abcd |
| MToN | 19,00 ± 5,88 abc | 14,88 ± 5,27 abcd |

Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cuatro réplicas. Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

Durante el segundo año del ensayo, la infestación por nemátodos en plantas sin micorrizar y suelos sin tratar [∅∅N] redujo significativamente el peso de los frutos, en comparación con los tratamientos [I∅N] y [MNN] (Tabla 33).

Tabla 33 (continuación) Valores de productividad vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y Aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita*.

| Tratamientos | Contenido en clorofila (unidades SPAD) | Temperatura de la cubierta vegetal (°C) |
|--------------|--|---|
| ØØØ | 38,00 ± 2,88 a | 24,66 ± 1,02 d |
| IØØ | 38,45 ± 2,97 a | 27,74 ± 1,24 bcd |
| MØØ | 39,51 ± 3,31 a | 29,10 ± 1,39 abcd |
| ØØN | 36,83 ± 3,28 a | 23,70 ± 1,71 d |
| IØN | 37,39 ± 2,99 a | 24,86 ± 0,87 d |
| MØN | 36,98 ± 2,12 a | 26,23 ± 1,55 cd |
| ØAN | 39,75 ± 2,86 a | 33,95 ± 0,68 ab |
| IAN | 42,71 ± 3,11 a | 35,05 ± 0,72 a |
| MAN | 38,20 ± 3,04 a | 30,93 ± 0,87 abcd |
| ØNN | 38,45 ± 3,06 a | 28,66 ± 1,31 abcd |
| INN | 42,74 ± 3,78 a | 29,74 ± 0,62 abcd |
| MNN | 41,05 ± 4,68 a | 30,41 ± 0,65 abcd |
| ØQN | 41,23 ± 3,85 a | 29,19 ± 1,18 abcd |
| IQN | 44,19 ± 4,23 a | 29,01 ± 0,60 abcd |
| MQN | 44,15 ± 3,90 a | 28,64 ± 1,23 abcd |
| ØTØN | 41,58 ± 4,13 a | 30,50 ± 0,59 abcd |
| ITØN | 43,24 ± 2,18 a | 32,09 ± 0,57 abc |
| MTØN | 40,35 ± 2,80 a | 31,68 ± 1,09 abc |

Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cuatro réplicas. Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

La temperatura de la cubierta vegetal fue mayor en las plantas infestadas por *M. incognita* ($29,67 \pm 0,37$ °C), en comparación con las plantas no infestadas por el nemátodo ($27,17 \pm 0,78$ °C) (Tablas 31 y 33). Esta variable también se vio afectada por la aplicación del fitoquímico ya que, las plantas con menor temperatura significativa de la cubierta vegetal fueron las que no recibieron fitoquímico en su tratamiento ($26,10 \pm 0,58$ °C), frente a la temperatura medida en las plantas donde se aplicó aceite de *A. indica* ($29,60 \pm 0,53$ °C), *T. zygis* ($31,39 \pm 0,47$ °C) o extracto de *A. sativum* ($33,31 \pm 0,56$ °C) (Tablas 31 y 33). A pesar de que la micorrización por sí misma no influyó en la temperatura de la cubierta vegetal, en el análisis de la combinación (NEM × AMF) se observó que, la temperatura fue significativamente menor en aquellas plantas que no fueron inoculadas ni con *M. incognita* ni con *Glomus* spp. ($24,66 \pm 1,02$ °C), en comparación con las plantas infestadas por el nemátodo que no fueron micorrizadas ($29,34 \pm 0,71$ °C) o bien infestadas y micorrizadas por *G. mosseae* ($29,58 \pm 0,57$ °C) o infestadas y micorrizadas por *G. intraradices* ($30,10 \pm 0,63$ °C) (Tablas 31 y 33). Paralelamente, el análisis de la combinación (NEM × ACE) mostró que, las plantas infestadas sin aplicación de fitoquímicos presentaron la menor

temperatura significativa de la cubierta vegetal ($24,98 \pm 0,80$ °C), en comparación con las plantas infestadas que adicionalmente recibieron la aplicación de extracto de *Q. amara* ($28,95 \pm 0,58$ °C) o de aceite de *A. indica* ($29,60 \pm 0,53$ °C), *T. zygis* ($31,39 \pm 0,47$ °C) o extracto de *A. sativum* ($33,31 \pm 0,56$ °C). Por su parte, el análisis de la combinación (AMF × ACE) indicó que, cualquier tratamiento que en su composición no llevase extracto vegetal o aceite esencial, independientemente de la inoculación con hongo micorrícico y/o de la especie de hongo micorrícico inoculada, mostró menor temperatura de la cubierta vegetal, especialmente el tratamiento sin *Glomus* spp. ($24,21 \pm 0,94$ °C), y de manera significativa si se compara con el tratamiento que no fue micorrizado pero si se le aplicó extracto de *A. sativum* ($33,95 \pm 0,68$ °C) o el micorrizado por *G. intraradices* y paralelamente con la aplicación de extracto de *A. sativum* ($35,05 \pm 0,72$ °C). Los tratamientos control sano [ØØØ] e infestado [ØØN], y el infestado y micorrizado por *G. intraradices* [IØN] mostraron las menores temperaturas de la cubierta vegetal, y los tratamientos micorrizados por *Glomus* spp. con aplicación de aceite de *T. zygis* e infestados por *M. incognita* [IToN] y [MToN], el infestado que recibió exclusivamente aplicación de extracto de *A. sativum* [ØAN] y el infestado micorrizado por *G. intraradices* y con aplicación de extracto de *A. sativum* [IAN] los valores máximos de temperatura (Tabla 33).

Tabla 34. Valores medios de variables relacionadas con la micorrización en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Durinta -*M. incognita*.

| Tratamientos | Frecuencia de micorrización (F%) | Intensidad de micorrización (M%) | Intensidad de colonización media por fragmento (m%) |
|--------------|----------------------------------|----------------------------------|---|
| IØØ | 89,58 ± 1,33 a | 25,19 ± 2,49 a | 28,26 ± 2,94 a |
| MØØ | 82,50 ± 2,42 abc | 19,75 ± 2,61 ab | 23,98 ± 3,10 a |
| IØN | 68,83 ± 2,18 bc | 15,05 ± 1,47 bc | 22,18 ± 2,44 a |
| MØN | 76,67 ± 2,44 abc | 17,17 ± 1,62 bc | 22,42 ± 1,98 a |
| IAN | 74,58 ± 4,67 abc | 15,38 ± 2,87 bc | 20,16 ± 3,05 a |
| MAN | 76,25 ± 2,22 abc | 15,68 ± 2,18 bc | 20,80 ± 3,09 a |
| INN | 87,08 ± 0,98 a | 18,78 ± 2,71 b | 21,52 ± 3,07 a |
| MNN | 67,08 ± 1,33 bc | 12,31 ± 1,31 c | 18,31 ± 1,83 a |
| IQN | 88,33 ± 3,39 a | 18,43 ± 2,60 b | 20,40 ± 2,19 a |
| MQN | 84,17 ± 3,26 ab | 17,40 ± 1,29 bc | 20,97 ± 1,90 a |
| IToN | 83,81 ± 1,13 abc | 16,36 ± 1,19 bc | 19,55 ± 1,45 a |
| MToN | 62,08 ± 3,15 c | 12,21 ± 1,07 c | 19,58 ± 1,22 a |

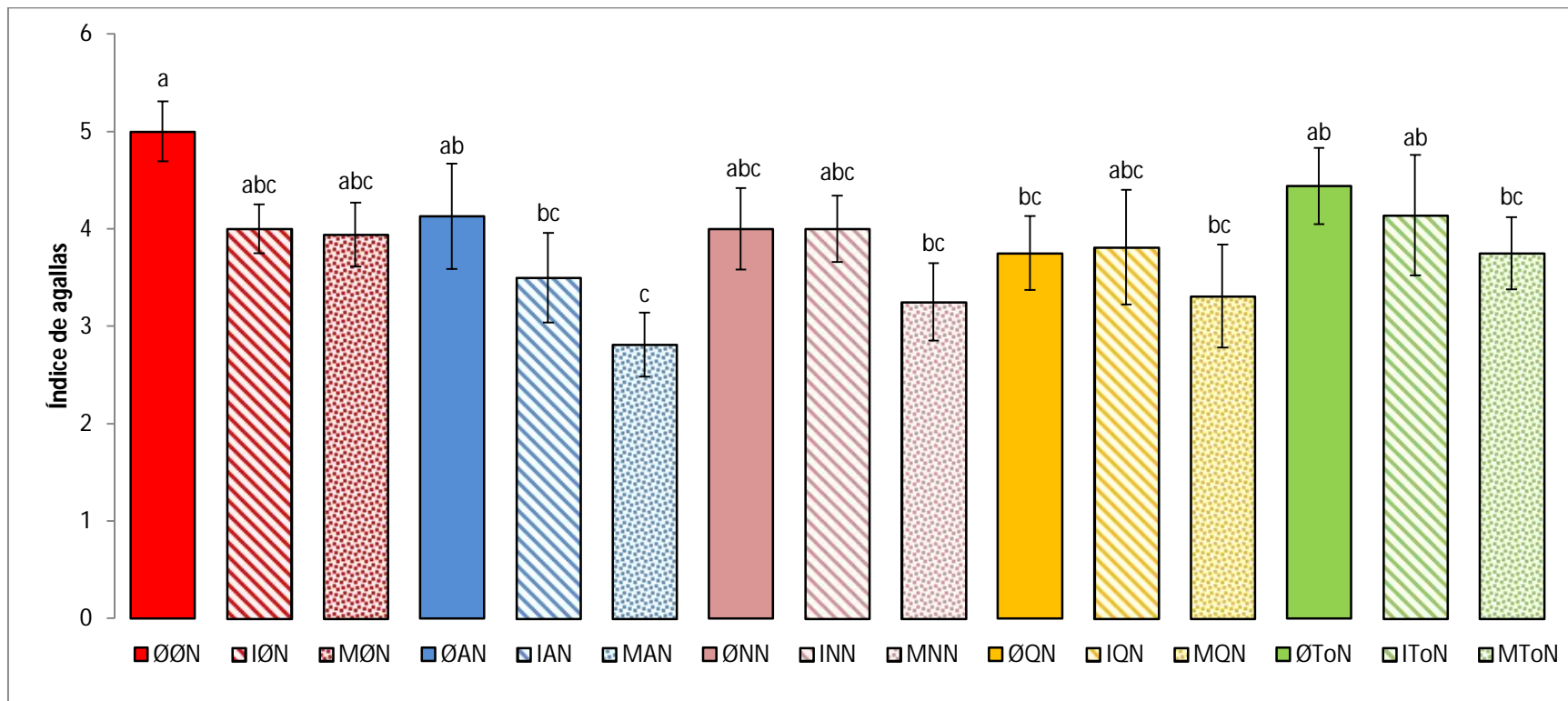
Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años). Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

La frecuencia de micorrización (F%) disminuyó significativamente en presencia del nemátodo ($76,80 \pm 1,26$), en comparación con las plantas no inoculadas con *M. incognita* ($86,04 \pm 1,62$). Esta variable fue mayor cuando la micorrización fue por *G. intraradices* ($82,00 \pm 1,55$), frente a la obtenida por *G. mosseae* ($74,79 \pm 1,51$) (Tablas 31 y 34). La aplicación de los fitoquímicos también influyó en la frecuencia de micorrización mostrando la máxima F% cuando el extracto aplicado procedió de *Q. amara* ($86,25 \pm 2,34$), siendo significativa esta diferencia al compararlo con la aplicación de aceite de *T. zygis* ($72,22 \pm 3,36$) (Tablas 31 y 34). Los mayores valores de F% se encontraron en los tratamientos [IØØ], [IQN] y [INN] que fueron significativamente mayores que los tratamientos [IØN],[MNN] y [MToN] (Tabla 34).

La intensidad de micorrización (M%) también se vio reducida en plantas infestadas por el nemátodo ($15,87 \pm 0,63$), en comparación con aquellas no infestadas ($22,47 \pm 1,88$) (Tablas 31 y 34). Asimismo, esta variable fue mayor cuando la micorrización fue por *G. intraradices* ($18,24 \pm 1,04$), en comparación con *G. mosseae* ($15,75 \pm 0,79$) (Tablas 31 y 34). El estudio de la triple interacción (NEM \times AMF \times ACE) indicó que, el tratamiento con el máximo valor de M% fue [IØØ], siendo significativo del resto de tratamientos excepto de [MØØ]. Los mínimos valores de M% corresponden a los tratamientos [MNN] y [MToN] (Tabla 34).

En concordancia con las dos variables estudiadas anteriormente, la intensidad media de micorrización por fragmento (m%) fue significativamente menor en las plantas infestadas por *M. incognita* ($20,60 \pm 0,71$) vs ($26,12 \pm 2,14$) en plantas no infestadas (Tablas 31 y 34).

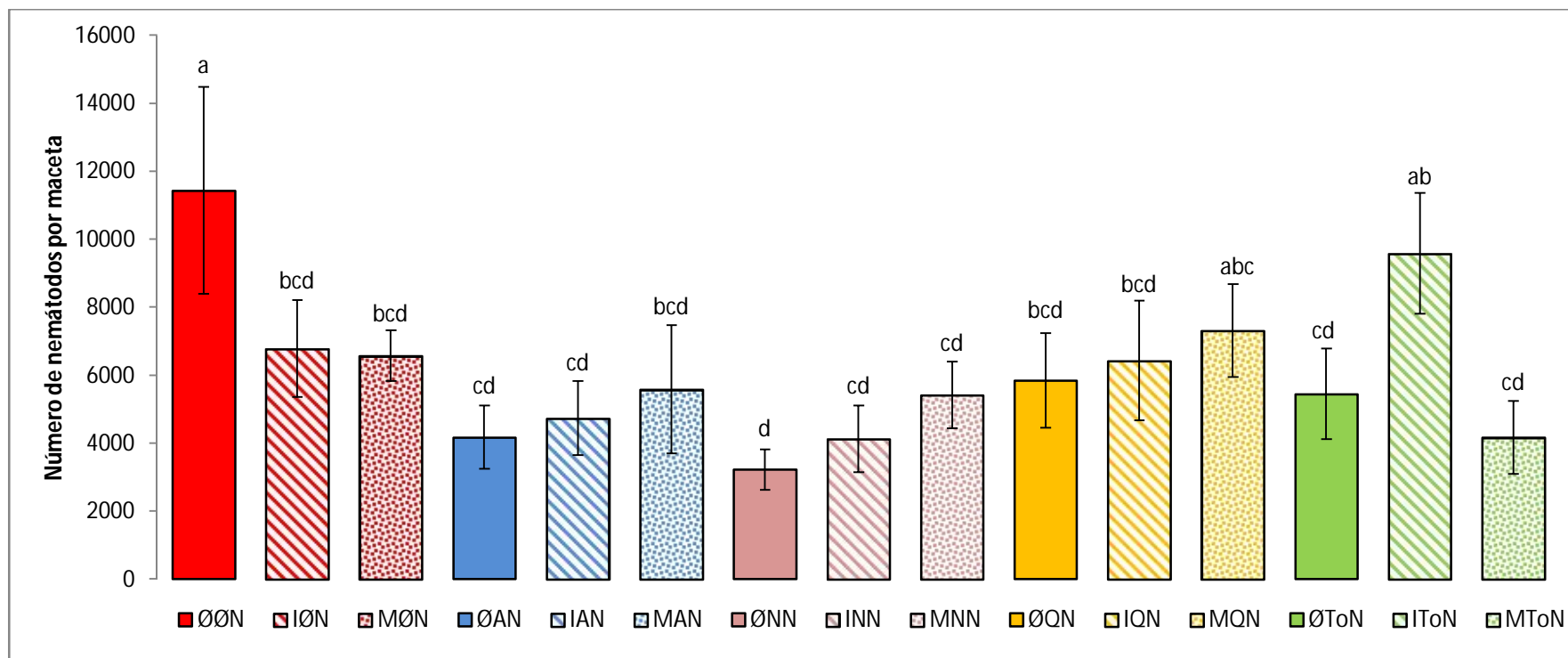
Figura 37. Valores medios de los índices de agallas en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita*.



Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años).
 Columnas coronadas con la misma letra no difieren significativamente según el test LSD ($p \leq 0,05$).

La micorrización por *G. mosseae* redujo significativamente el índice de agallas ($3,41 \pm 0,18$), en comparación con la ausencia de micorrización ($4,24 \pm 0,19$). Todos los tratamientos redujeron el índice de agallas en relación al control [$\emptyset\emptyset N$], pero los más efectivos fueron la combinación de *Glomus* spp. y extracto de ajo [IAN] y [MAN], *G. mosseae* combinado con aceite de *A. indica* [MNN], la aplicación de *Quassia amara* individualmente o en combinación con *G. mosseae* [$\emptyset QN$] o [MQN], y la aplicación conjunta de *G. mosseae* y aceite de *T. zygis* [MToN], cuyos valores fueron significativamente menores que en el tratamiento control (Tabla 31 y Figura 37).

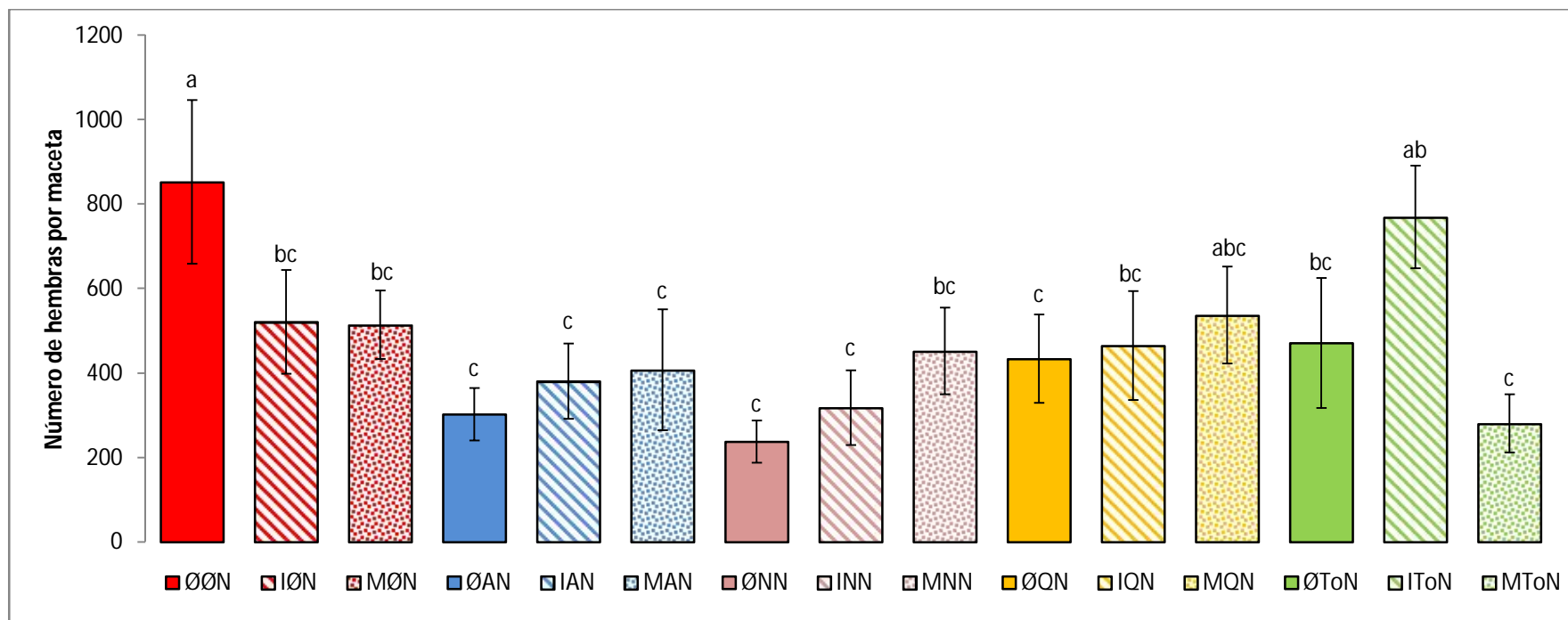
Figura 38. Valores medios de la densidad final de nemátodos por maceta en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita*.



Datos expresados como media \pm error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años).
Columnas coronadas con la misma letra no difieren significativamente según el test LSD ($p \leq 0,05$).

El número de nemátodos por maceta se redujo significativamente con las aplicaciones de extracto de *A. sativum* (4.826 ± 765) o aceite de *A. indica* (4.253 ± 519), en comparación con las plantas sin aplicación de extracto vegetal o aceite esencial (8.122 ± 1.129). Todos los tratamientos redujeron significativamente el número de nemátodos por maceta respecto del control [ØØN], a excepción de [MQN] e [IToN] que redujeron la variable aunque no de forma significativa (Tabla 31 y Figura 38).

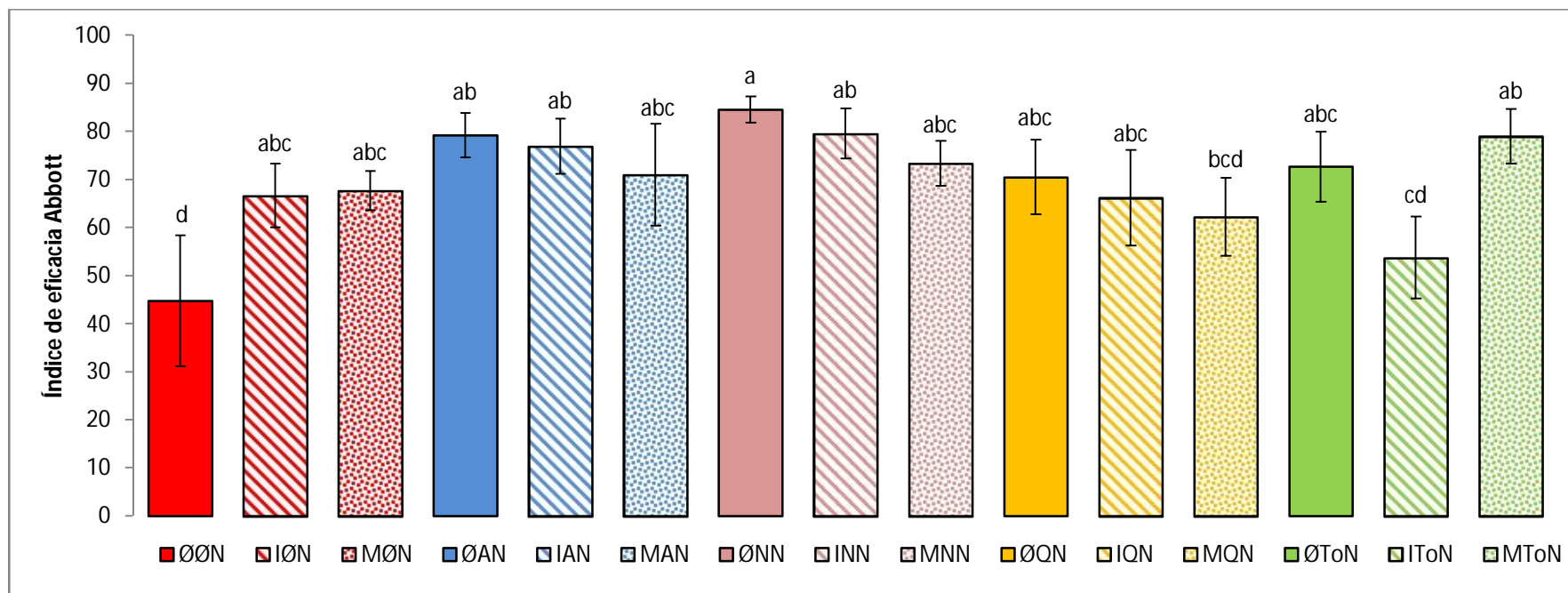
Figura 39. Valores medios del número de hembras de *M. incognita* por maceta en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y Aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita*.



Datos expresados como media \pm error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años).
Columnas coronadas con la misma letra no difieren significativamente según el test LSD ($p \leq 0,05$).

El número de hembras por maceta disminuyó significativamente en las plantas donde se aplicó extracto de *A. sativum* (363 ± 58) o aceite de *A. indica* (335 ± 50), respecto del tratamiento sin extracto vegetal o aceite esencial (620 ± 81). La micorrización por sí misma no influyó en el número de hembras, sin embargo, la interacción (AMF \times ACE) mostró que, todas las posibles combinaciones redujeron significativamente el número de hembras por maceta, exceptuando la combinación de *G. intraradices* y aceite de *T. zygis* [IToN] o *G. mosseae* y extracto de *Q. amara* [MQN] que redujeron la variable pero no significativamente, respecto del control no micorrizado sin aplicación de fitoquímicos [ØØN] (Tabla 31 y Figura 39).

Figura 40. Valores medios de eficacia Abbott en la reducción del número de nemátodos en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y Aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Durinta-*M. incognita*.



Datos expresados como media \pm error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años).
Columnas coronadas con la misma letra no difieren significativamente según el test LSD ($p \leq 0,05$).

En cuanto al índice de eficacia Abbott para la reducción de las densidades de nemátodos, la aplicación de aceite de *A. indica* se mostró efectiva ($79,13 \pm 2,57$), frente a las plantas que recibieron extracto de *Q. amara* ($66,29 \pm 4,83$) o que no recibieron extracto vegetal ni aceite esencial ($60,33 \pm 5,20$). El tratamiento más efectivo fue el que recibió únicamente aceite de *A. indica* [ØNN], aunque tan solo significativamente diferente en comparación con el control [ØØN], la combinación de *G. mosseae* y extracto de *Q. amara* [MQN] y con el tratamiento que aunó *G. intraradices* y aceite de *T. zygis* [IToN] (Tabla 31 y Figura 40).

2.3.2. ENSAYOS EN TOMATE CV. JOSEFINA

En la tabla 35 se muestra la significación estadística para los efectos de los factores ensayados y sus interacciones sobre las distintas variables de crecimiento y productividad vegetal, micorrización y reproducción del nemátodo:

- infestación por nemátodos (NEM)
- micorrización (AMF)
- aplicación de extractos vegetales y aceites esenciales (ACE)

Las siguientes tablas y figuras muestran los resultados obtenidos para las distintas variables de crecimiento (Tabla 36) y productividad vegetal (Tabla 37), micorrización (Tabla 38) y reproducción de nemátodos (Figuras 41-44), para cada uno de los tratamientos ensayados.

Tabla 35. Significación estadística del ANOVA multifactorial o los test de Kruskal-Wallis en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Josefina-M. *incognita*.

| | NEM | AMF | ACE | NEM × AMF | NEM × ACE | AMF × ACE | NEM × AMF × ACE |
|--|--------|--------|--------|-----------|-----------|-----------|-----------------|
| Longitud parte aérea (cm) ^{AV} | ns | ns | ns | ns | * | ns | ns |
| Peso fresco parte aérea (g) año 1 ^o ^{KW} | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Peso fresco parte aérea (g) año 2 ^o ^{AV} | ns | ns | ns | ns | * | ns | ns |
| Peso seco parte aérea (g) año 1 ^o ^{AV} | ns | ns | ns | ns | * | ns | ns |
| Peso seco parte aérea (g) año 2 ^o ^{KW} | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Peso fresco raíces (g) año 1 ^o ^{AV} | ns | ns | ns | ns | * | ns | ns |
| Peso fresco raíces (g) año 2 ^o ^{AV} | ns | ns | ns | ns | * | ns | ns |
| Número de flores ^{AV} | ns | ns | ns | ns | * | ns | ns |
| Número de frutos ^{AV} | ns | ns | ns | ns | * | ns | ns |
| Peso fresco de frutos ^{AV} | ns | ns | ns | ns | * | ns | ns |
| Contenido en clorofila (RLCC-SPAD) año 1 ^o ^{KW} | ns | 0,0122 | 0,0087 | 0,0241 | 0,0134 | 0,0233 | ns |
| Contenido en clorofila (RLCC-SPAD) año 2 ^o ^{AV} | ns | 0,0121 | 0,0010 | ns | * | ns | 0,0010 |
| Temperatura de la cubierta vegetal (°C) ^{KW} | ns | ns | 0,0004 | ns | 0,0009 | 0,0092 | 0,0296 |
| Frecuencia de micorrización, F% año 1 ^o ^{AV} | 0,0000 | ns | 0,0007 | 0,0304 | * | 0,0019 | 0,0000 |
| Frecuencia de micorrización, F% año 2 ^o ^{AV} | 0,0000 | ns | 0,0137 | 0,0150 | * | 0,0000 | 0,0000 |
| Intensidad de micorrización, M% ^{AV} | 0,0011 | ns | 0,0109 | ns | * | ns | 0,0000 |
| Intensidad de micorrización media por fragmento, m% ^{AV} | ns | ns | ns | ns | * | ns | ns |
| Índice de agallas ^{AV} | - | 0,0000 | 0,0343 | - | - | ns | - |
| Número de J2 + huevos por maceta ^{AV} | - | 0,0030 | ns | - | - | ns | - |
| Número de hembras de <i>Meloidogyne</i> por maceta ^{AV} | - | 0,0091 | ns | - | - | ns | - |
| Eficacia Abbott en la reducción del número de nemátodos por maceta ^{KW} | - | 0,0004 | ns | - | - | 0,0326 | - |

Tratamientos analizados por ANOVA ^{AV} o Kruskal-Wallis ^{KW}. ns. Nivel de significación $p > 0,05$, no significativo. * Interacción no permitida en el modelo estadístico.

Tabla 36. Valores de crecimiento vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Josefina-M. *incognita* (continúa).

| Tratamientos | Longitud parte aérea (cm) | Peso fresco parte aérea, año 1(g)* | Peso fresco parte aérea, año 2 (g)* |
|--------------|---------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| ØØØ | 84,81 ± 3,63 ab | 69,05 ± 11,12 a | 90,03 ± 11,38 a |
| IØØ | 74,88 ± 6,76 abc | 86,33 ± 36,17 a | 89,83 ± 3,23 a |
| MØØ | 81,94 ± 6,84 abc | 68,35 ± 26,21 a | 97,50 ± 7,41 a |
| ØØN | 82,44 ± 4,70 abc | 70,80 ± 8,02 a | 98,60 ± 16,11 a |
| IØN | 72,94 ± 5,02 abc | 79,45 ± 26,94 a | 82,95 ± 14,19 a |
| MØN | 70,50 ± 7,47 bc | 89,45 ± 24,90 a | 52,78 ± 12,18 a |
| ØAN | 88,93 ± 5,16 a | 97,70 ± 35,79 a | 92,20 ± 12,09 a |
| IAN | 88,00 ± 7,63 ab | 106,72 ± 5,72 a | 69,75 ± 8,15 a |
| MAN | 86,38 ± 3,47 ab | 101,63 ± 26,90 a | 86,35 ± 12,54 a |
| ØNN | 79,88 ± 4,60 abc | 66,58 ± 24,80 a | 91,63 ± 9,43 a |
| INN | 66,67 ± 6,61 c | 25,27 ± 5,88 a | 71,47 ± 20,60 a |
| MNN | 87,29 ± 4,51 ab | 76,23 ± 12,48 a | 88,40 ± 2,25 a |
| ØQN | 78,64 ± 5,11 abc | 64,15 ± 28,50 a | 82,80 ± 10,83 a |
| IQN | 65,79 ± 8,23 c | 54,95 ± 5,37 a | 43,03 ± 15,01 a |
| MQN | 81,81 ± 7,55 abc | 54,75 ± 17,06 a | 94,63 ± 12,16 a |
| ØToN | 74,43 ± 9,00 abc | 73,93 ± 5,55 a | 72,00 ± 30,08 a |
| IToN | 81,58 ± 5,46 abc | 82,48 ± 30,26 a | 87,80 ± 0,30 a |
| MToN | 80,31 ± 4,34 abc | 128,88 ± 48,14 a | 84,20 ± 12,46 a |

Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cuatro réplicas.

Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

El valor máximo de la longitud de la parte aérea se observó en el tratamiento infestado por nemátodos sin micorrizar y en suelo tratado con extracto de ajo [ØAN], pero este solo fue significativamente mayor en comparación con el tratamiento infestado por nemátodos micorrizado por *G. mosseae* y sin tratamiento fitoquímico [MØN], el infestado micorrizado por *G. intraradices* y tratado con extracto de *Q. amara* [IQN] y el micorrizado por *G. intraradices* tratado con aceite de neem e infestado [INN] (Tabla 36).

Tabla 36 (continuación). Valores de crecimiento vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Josefina-*M. incognita* (continúa).

| Tratamientos | Peso seco parte aérea, año 1 (g) | Peso seco parte aérea, año 2 (g)* |
|--------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| ØØØ | 16,35 ± 2,09 ab | 18,48 ± 1,21 a |
| IØØ | 17,93 ± 8,42 ab | 18,13 ± 2,41 a |
| MØØ | 15,88 ± 6,27 ab | 21,95 ± 2,75 a |
| ØØN | 13,45 ± 3,94 ab | 28,48 ± 8,73 a |
| IØN | 15,33 ± 4,61 ab | 15,68 ± 3,98 a |
| MØN | 22,63 ± 9,06 ab | 8,13 ± 1,59 a |
| ØAN | 24,38 ± 9,51 a | 15,93 ± 4,49 a |
| IAN | 26,05 ± 2,62 a | 14,20 ± 10,10 a |
| MAN | 23,15 ± 3,45 ab | 16,35 ± 3,05 a |
| ØNN | 16,78 ± 9,48 ab | 16,55 ± 2,16 a |
| INN | 4,37 ± 1,23 b | 11,63 ± 4,16 a |
| MNN | 20,45 ± 6,47 ab | 23,80 ± 3,36 a |
| ØQN | 13,75 ± 6,96 ab | 13,47 ± 4,18 a |
| IQN | 11,73 ± 2,73 ab | 5,30 ± 1,90 a |
| MQN | 10,83 ± 3,71 ab | 15,55 ± 2,40 a |
| ØTøN | 14,90 ± 1,82 ab | 14,10 ± 7,42 a |
| ITøN | 19,95 ± 8,99 ab | 21,85 ± 4,15 a |
| MTøN | 29,10 ± 10,64 a | 17,98 ± 5,54 a |

Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cuatro réplicas.

Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

Durante el primer año de ensayos, se observaron valores máximos de peso seco de la parte aérea en los tratamientos infestados por nemátodos en suelo tratado con extracto de ajo, sin micorrizar y micorrizado por *G. intraradices* [ØAN] e [IAN], y en el tratamiento infestado por nemátodos en suelo tratado con aceite de *T. zygis* y micorrizado por *G. mosseae* [MTøN], los cuales fueron significativamente mayores que en el tratamiento infestado por nemátodos, micorrizado por *G. intraradices* y tratado con aceite de neem [INN] (Tabla 36).

Tabla 36 (continuación). Valores de crecimiento vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Josefina-*M. incognita*.

| Tratamientos | Peso fresco de la raíz, año 1 (g)* | Peso fresco de la raíz, año2 (g)* |
|--------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| ∅∅∅ | 25,53 ± 4,43 abc | 24,58 ± 5,87 ab |
| I∅∅ | 23,48 ± 10,47 bc | 25,00 ± 3,43 ab |
| M∅∅ | 22,18 ± 7,61 bc | 25,08 ± 4,89 ab |
| ∅∅N | 31,48 ± 2,23 abc | 26,23 ± 7,09 ab |
| I∅N | 31,43 ± 15,74 abc | 19,73 ± 6,89 ab |
| M∅N | 22,43 ± 9,44 bc | 14,18 ± 5,32 ab |
| ∅AN | 24,15 ± 8,80 bc | 25,93 ± 3,67 ab |
| IAN | 51,98 ± 6,72 a | 9,90 ± 8,30 b |
| MAN | 25,68 ± 8,02 abc | 23,40 ± 8,04 ab |
| ∅NN | 14,13 ± 6,75 bc | 30,33 ± 4,91 a |
| INN | 8,10 ± 3,59 c | 18,00 ± 13,12 ab |
| MNN | 31,20 ± 8,26 abc | 24,93 ± 3,36 ab |
| ∅QN | 18,53 ± 8,08 bc | 27,90 ± 10,05 ab |
| IQN | 12,83 ± 1,21 bc | 14,27 ± 2,18 ab |
| MQN | 40,10 ± 17,46 ab | 21,85 ± 5,16 ab |
| ∅TON | 22,10 ± 2,69 bc | 14,23 ± 6,56 ab |
| ITON | 18,08 ± 8,43 bc | 27,35 ± 3,35 ab |
| MTON | 39,28 ± 19,05 ab | 17,43 ± 1,80 ab |

Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cuatro réplicas.

Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

Durante el primer año de ensayos, se observó el valor máximo de peso fresco de la raíz en el tratamiento infestado por nemátodos en suelo tratado con extracto de ajo y micorrizado por *G. intraradices* [IAN], mientras que el peso mínimo se observó en el tratamiento infestado por nemátodos, micorrizado por *G. intraradices* y tratado con aceite de neem [INN]. Durante el segundo año de ensayos, el valor máximo fue para el tratamiento infestado por nemátodos en suelo tratado con aceite de neem y sin micorrizar [∅NN], mientras que el mínimo correspondió al tratamiento infestado por nemátodos en suelo tratado con extracto de ajo y micorrizado por *G. intraradices* [IAN] (Tabla 36).

Tabla 37. Valores de productividad vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Josefina-*M. incognita* (continúa)

| Tratamientos | Número de flores | Número de frutos | Peso fresco de los frutos (g) |
|--------------|------------------|------------------|-------------------------------|
| ØØØ | 11,13 ± 2,64 ab | 2,50 ± 0,71 a | 16,26 ± 4,31 a |
| IØØ | 14,50 ± 2,60 ab | 1,88 ± 0,79 ab | 11,16 ± 4,58 abc |
| MØØ | 11,75 ± 2,58 ab | 2,50 ± 1,00 a | 13,80 ± 5,14 ab |
| ØØN | 14,13 ± 3,34 ab | 2,00 ± 0,50 ab | 11,05 ± 2,76 abc |
| IØN | 14,00 ± 2,72 ab | 1,63 ± 0,65 ab | 9,00 ± 3,84 abc |
| MØN | 8,25 ± 1,81 b | 1,38 ± 0,73 ab | 6,20 ± 3,23 abc |
| ØAN | 13,71 ± 2,97 ab | 2,00 ± 0,72 ab | 11,04 ± 4,22 abc |
| IAN | 10,67 ± 1,73 ab | 1,67 ± 0,67 ab | 9,77 ± 4,18 abc |
| MAN | 15,50 ± 4,04 ab | 2,75 ± 0,77 a | 14,75 ± 4,18 ab |
| ØNN | 13,13 ± 1,92 ab | 1,38 ± 0,53 ab | 10,14 ± 4,63 abc |
| INN | 9,83 ± 3,66 ab | 1,00 ± 0,68 ab | 5,82 ± 4,24 abc |
| MNN | 10,71 ± 1,95 ab | 2,14 ± 0,59 ab | 11,70 ± 3,11 abc |
| ØQN | 11,29 ± 2,13 ab | 1,29 ± 0,75 ab | 6,89 ± 3,93 abc |
| IQN | 7,43 ± 1,36 b | 0,29 ± 0,29 b | 0,99 ± 0,99 c |
| MQN | 11,50 ± 2,76 ab | 1,13 ± 0,58 ab | 6,86 ± 4,14 abc |
| ØToN | 11,57 ± 3,58 ab | 1,57 ± 0,69 ab | 6,99 ± 2,91 abc |
| IToN | 14,17 ± 4,58 ab | 2,50 ± 0,76 a | 13,50 ± 3,91 ab |
| MToN | 17,63 ± 4,14 a | 1,13 ± 0,52 ab | 5,44 ± 2,29 bc |

Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cuatro réplicas.

Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

El máximo número de flores se observó en el tratamiento infestado por nemátodos en suelo tratado con aceite de *T. zygis* y micorrizado por *G. mosseae* [MToN], y los mínimos en el infestado por nemátodos, micorrizado por *G. mosseae* y sin tratamiento fitoquímico [MØN], y en el infestado micorrizado por *G. intraradices* y tratado con extracto de *Quassia amara* [IQN] (Tabla 37).

En cuanto al número de frutos, los tratamientos control sin infestar sin micorrizar y sin tratar [ØØØ], sin infestar micorrizado por *G. mosseae* y sin tratar [MØØ], infestado micorrizado por *G. mosseae* en suelo tratado con extracto de ajo [MAN], e infestado micorrizado por *G. intraradices* en suelo tratado con aceite de *T. zygis* [IToN] mostraron mayor número de frutos que el tratamiento infestado micorrizado por *G. intraradices* y tratado con extracto de *Q. amara* [IQN] (Tabla 37).

El mayor peso fresco de los frutos se obtuvo en el tratamiento control sin infestar sin micorrizar y sin tratar [ØØØ], significativamente mayor que el tratamiento infestado, micorrizado por *G. mosseae* y tratado con aceite de *T. zygis* [MTØN] y que el infestado micorrizado por *G. intraradices* y tratado con extracto de *Q. amara* [IQN (Tabla 37).

Tabla 37 (continuación) Valores de productividad vegetal en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Josefina-*M. incognita*.

| Tratamientos | Contenido en clorofila, año 1 (unidades SPAD) | Contenido en clorofila, año 2 (unidades SPAD) | Temperatura de la cubierta vegetal (°C) |
|--------------|---|---|---|
| ØØØ | 30,00 ± 0,90 a | 36,83 ± 1,53 bcdef | 25,21 ± 0,32 a |
| IØØ | 34,78 ± 3,14 a | 37,63 ± 2,55 bcdef | 27,90 ± 1,15 a |
| MØØ | 36,70 ± 1,97 a | 48,65 ± 3,81 a | 26,35 ± 0,32 a |
| ØØN | 28,33 ± 1,58 a | 38,10 ± 3,49 bcdef | 24,56 ± 1,10 a |
| IØN | 36,48 ± 4,73 a | 38,20 ± 2,16 bcdef | 27,55 ± 0,80 a |
| MØN | 33,08 ± 1,30 a | 43,45 ± 3,65 abc | 26,10 ± 1,02 a |
| ØAN | 27,70 ± 2,46 a | 33,43 ± 2,13 def | 28,23 ± 1,33 a |
| IAN | 30,95 ± 3,01 a | 44,60 ± 1,70 abc | 28,90 ± 1,57 a |
| MAN | 29,33 ± 1,16 a | 39,68 ± 1,69 bcde | 29,51 ± 1,15 a |
| ØNN | 33,38 ± 3,13 a | 34,78 ± 3,60 cdef | 27,91 ± 1,83 a |
| INN | 35,53 ± 1,11 a | 31,37 ± 2,29 ef | 30,73 ± 0,52 a |
| MNN | 33,25 ± 1,44 a | 33,07 ± 4,43 def | 28,76 ± 1,23 a |
| ØQN | 28,08 ± 0,99 a | 29,57 ± 1,35 f | 25,96 ± 1,54 a |
| IQN | 28,78 ± 1,23 a | 36,53 ± 1,49 bcdef | 26,40 ± 0,81 a |
| MQN | 28,30 ± 1,73 a | 42,83 ± 3,52 abc | 26,16 ± 1,59 a |
| ØTON | 26,23 ± 0,94 a | 41,87 ± 6,04 abcd | 28,26 ± 1,22 a |
| ITON | 30,78 ± 2,76 a | 45,25 ± 0,55 ab | 29,22 ± 2,03 a |
| MTON | 34,45 ± 3,37 a | 47,98 ± 1,01 a | 28,95 ± 1,05 a |

Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cuatro réplicas.

Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según los test LSD o KW ($p \leq 0,05$).

El contenido en clorofila, en el primer año de ensayo, fue menor en las plantas no micorrizadas ($28,95 \pm 0,82$), respecto de las que fueron micorrizadas por *G. intraradices* ($32,77 \pm 1,26$) (Tablas 35 y 37). La aplicación de extractos vegetales o aceites esenciales también influyó sobre esta variable, de este modo, el mínimo valor de contenido en clorofila se mostró en el tratamiento con extracto vegetal de *Q. amara* ($28,38 \pm 0,71$), siendo significativamente diferente respecto de la aplicación de aceite de *A. indica* ($33,92 \pm 1,21$) (Tablas 35 y 37).

Por su parte, durante el segundo año de ensayo, el contenido en clorofila también fue menor en plantas no micorrizadas ($35,88 \pm 1,43$), pero respecto de las que fueron micorrizadas por *G. mosseae* ($43,02 \pm 1,55$) (Tablas 35 y 37). El tratamiento con aceite esencial de *T. zygis* aumentó el contenido en clorofila ($45,33 \pm 2,03$), en comparación con el resto de extractos vegetales o aceites esenciales pero no de forma significativa respecto de la ausencia de extracto vegetal o aceite esencial (Tablas 35 y 37). El estudio de la triple interacción (NEM \times AMF \times ACE) mostró que, los tratamientos con mayor contenido en clorofila incluyeron *G. mosseae* exclusivamente [MØØ] o combinado con aceite esencial de *T. zygis* y *M. incognita* [MTØN], de manera significativa en comparación con los dos controles [ØØØ] y [ØØN], la micorrización exclusiva por *G. intraradices* en plantas sanas [IØØ]o infestadas [IØN], la aplicación de extracto de *A. sativum* y *M. incognita* [ØAN] o en combinación con *G. mosseae* [MAN], cualquiera de los tratamientos con aceite de *A. indica* [ØNN] o [INN]o [MNN], la aplicación de *Q. amara* y *M. incognita* [ØQN] o en combinación con *G. intraradices* [IQN] (Tabla 37).

La temperatura de la cubierta vegetal se redujo significativamente en los tratamientos con extracto de *Q. amara* ($26,17 \pm 0,77$ °C) o sin extracto vegetal ni aceite esencial ($26,28 \pm 0,37$ °C), respecto de los tratamientos donde se utilizó aceite de *T. zygis* ($28,80 \pm 0,77$ °C), extracto de *A. sativum* ($28,91 \pm 0,74$ °C) o aceite de neem ($29,00 \pm 0,83$ °C) (Tablas 35 y 37). La infestación por *M. incognita* no intervino *per se* en la temperatura de la cubierta vegetal, no obstante, en la combinación (NEM \times ACE) se observó que, las plantas infestadas que recibieron aceite de *A. indica* mostraron la mayor temperatura significativamente de la cubierta ($29,00 \pm 0,83$ °C), en comparación con aquellas infestadas que no recibieron extracto vegetal ni aceite esencial ($26,07 \pm 0,60$ °C) (Tablas 35 y 37). La micorrización por sí misma tampoco mostró efecto significativo sobre la temperatura de la cubierta vegetal, sin embargo, en el análisis de la combinación (AMF \times ACE) se observaron diferencias significativas entre el máximo valor mostrado en plantas micorrizadas por *G. intraradices* con aceite de *A. indica* ($30,73 \pm 0,52$) y el mínimo hallado en plantas no micorrizadas y sin aplicación de extracto vegetal ni aceite esencial ($24,89 \pm 0,56$) (Tablas 35 y 37).

Tabla 38. Valores medios de variables relacionadas con la micorrización en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Josefina -*M. incognita* (continúa).

| Tratamientos | Frecuencia de micorrización, año 1 (F%)* | Frecuencia de micorrización, año 2 (F%)* |
|--------------|--|--|
| IØØ | 95,00 ± 2,15 a | 94,17 ± 1,60 a |
| MØØ | 77,50 ± 2,85 bc | 86,67 ± 1,36 bc |
| IØN | 71,67 ± 2,89 c | 80,83 ± 0,83 de |
| MØN | 62,50 ± 2,85 d | 81,67 ± 0,96 de |
| IAN | 84,17 ± 3,15 b | 85,00 ± 1,67 bcd |
| MAN | 76,67 ± 3,60 bc | 74,17 ± 1,60 f |
| INN | 73,34 ± 3,33 c | 76,67 ± 1,93 ef |
| MNN | 80,00 ± 1,36 bc | 85,56 ± 2,94 bcd |
| IQN | 62,50 ± 1,60 d | 82,22 ± 2,22 cd |
| MQN | 83,34 ± 5,77 b | 90,00 ± 1,36 ab |
| IToN | 83,33 ± 4,30 b | 73,33 ± 0,00 f |
| MToN | 85,00 ± 2,15 b | 90,00 ± 2,36 ab |

Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años) o bien * como media ± error estándar de cuatro réplicas.

Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Durante el primer año de ensayo, la frecuencia de micorrización (F%) disminuyó en plantas infestadas por *M. incognita* ($76,33 \pm 1,62$), frente a las no infestadas por el nemátodo ($86,25 \pm 3,70$) (Tablas 35 y 38). También se observaron diferencias significativas en cuanto a la utilización de extractos vegetales o aceites esenciales, así, la máxima F% se observó en plantas donde se aplicó aceite de *T. zygis* ($84,17 \pm 2,25$), en comparación con la aplicación de aceite de neem ($77,14 \pm 1,98$), no aplicación de fitoquímico ($76,67 \pm 3,29$) o el mínimo valor observado en plantas con extracto de *Q. amara* ($72,92 \pm 4,82$) (Tablas 35 y 38). El estudio de la triple interacción (NEM × AMF × ACE) mostró el máximo valor de F% para el tratamiento que exclusivamente fue micorrizado por *G. intraradices* [IØØ] siendo su diferencia significativa del resto, y el mínimo valor se obtuvo en los tratamientos que combinaron *G. intraradices*, extracto de *Q. amara* y *M. incognita* [IQN] y *G. mosseae* junto a *M. incognita* [MØN] (Tabla 38).

En el segundo año de ensayo, la frecuencia de micorrización también disminuyó en plantas infestadas por el nemátodo ($82,32 \pm 1,11$), frente a las no infestadas por *M. incognita* ($90,42 \pm 1,72$) (Tablas 35 y 38). En este año, la aplicación de extracto de *Q. amara* aumentó la frecuencia de micorrización ($86,67 \pm 1,92$) de forma significativa frente al resto. Aunque la especie de hongo micorrícico no influyó por sí misma en la F%, en la interacción (NEM × AMF) se observa que, entre las plantas infestadas, aquellas micorrizadas por *G. mosseae* presentaron mayor F% ($84,21 \pm 1,61$) que las micorrizadas por

G. intraradices ($79,76 \pm 1,18$) (Tablas 35 y 38). Mediante el análisis de la interacción (AMF \times ACE) se observaron máximos valores en las interacciones de *G. mosseae* y extracto de *Q. amara* ($90,00 \pm 1,36$) y *G. mosseae* y aceite de *T. zygis* ($90,00 \pm 2,36$) y mínimo valor en la interacción de *G. intraradices* y aceite de *T. zygis* ($73,33 \pm 0,00$) (Tablas 35 y 38). El estudio de la triple interacción (NEM \times AMF \times ACE) indicó que, la frecuencia de micorrización fue máxima en [IØØ] de forma significativa frente al resto de tratamientos, especialmente en comparación con [MAN] y [IToN] que mostraron valores mínimos (Tabla 38).

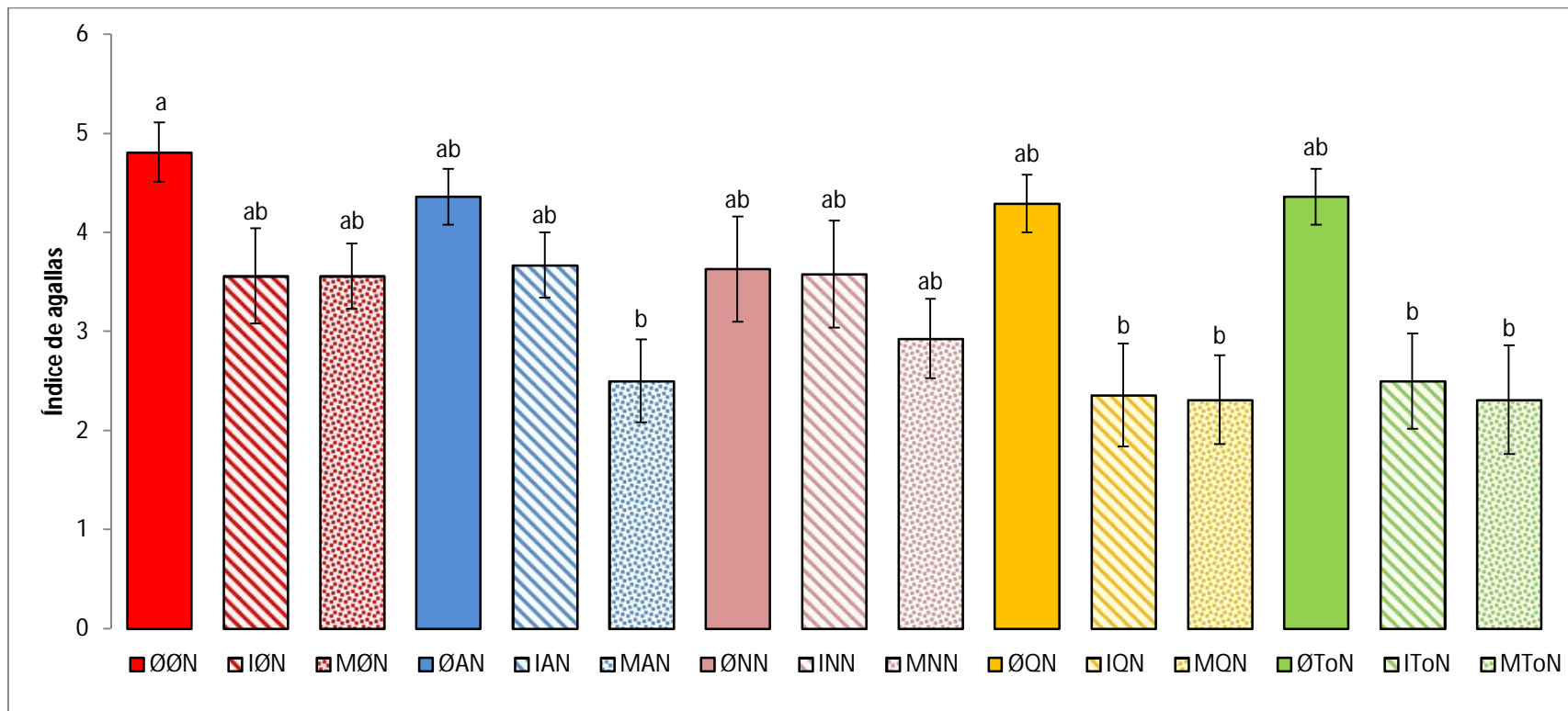
Tabla 38 (continuación). Valores medios de variables relacionadas con la micorrización en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Josefina -*M. incognita*.

| Tratamientos | Intensidad de micorrización (M%) | Intensidad de colonización media por fragmento (m%) |
|--------------|----------------------------------|---|
| IØØ | 23,92 \pm 1,55 a | 25,20 \pm 1,45 a |
| MØØ | 17,41 \pm 1,08 bcd | 21,16 \pm 1,05 abcd |
| IØN | 15,65 \pm 1,54 de | 20,29 \pm 1,64 abcd |
| MØN | 14,66 \pm 1,59 de | 20,08 \pm 1,48 abcd |
| IAN | 15,79 \pm 1,91 cde | 20,06 \pm 3,34 abcd |
| MAN | 13,65 \pm 1,55 de | 18,31 \pm 2,35 cd |
| INN | 12,16 \pm 1,02 e | 16,34 \pm 1,65 d |
| MNN | 15,78 \pm 1,76 cde | 19,05 \pm 1,92 cd |
| IQN | 13,91 \pm 1,28 de | 19,65 \pm 1,34 bcd |
| MQN | 20,26 \pm 2,41 abc | 23,06 \pm 2,21 abc |
| IToN | 17,93 \pm 1,86 bcd | 22,51 \pm 2,33 abc |
| MToN | 21,57 \pm 1,99 ab | 24,59 \pm 2,16 ab |

Datos expresados como media \pm error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones \times dos años) o bien * como media \pm error estándar de cuatro réplicas. Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente según el test LSD ($p \leq 0,05$).

La intensidad de micorrización (M%) disminuyó en plantas inoculadas con *M. incognita* ($16,24 \pm 0,62$), frente a las plantas sin nemátodos ($20,66 \pm 1,24$) (Tablas 35 y 38). Los tratamientos con aplicación de aceite de *T. zygis* presentaron mayor M% ($20,01 \pm 1,43$) que el resto, siendo diferente significativamente de la M% mostrada en los tratamientos donde se aplicó extracto de *A. sativum* ($14,57 \pm 1,20$) o aceite de *A. indica* ($14,11 \pm 1,14$) (Tablas 35 y 38). Analizando la triple interacción se observó que, el mínimo valor de M% se mostró en el tratamiento conjunto de *G. intraradices*, aceite de *Azadirachta indica* y *M. incognita* [INN], siendo diferente significativamente de [IØØ], [MØØ], [IToN], [MToN] y [MQN], que mostraron máximos valores de M% (Tabla 38).

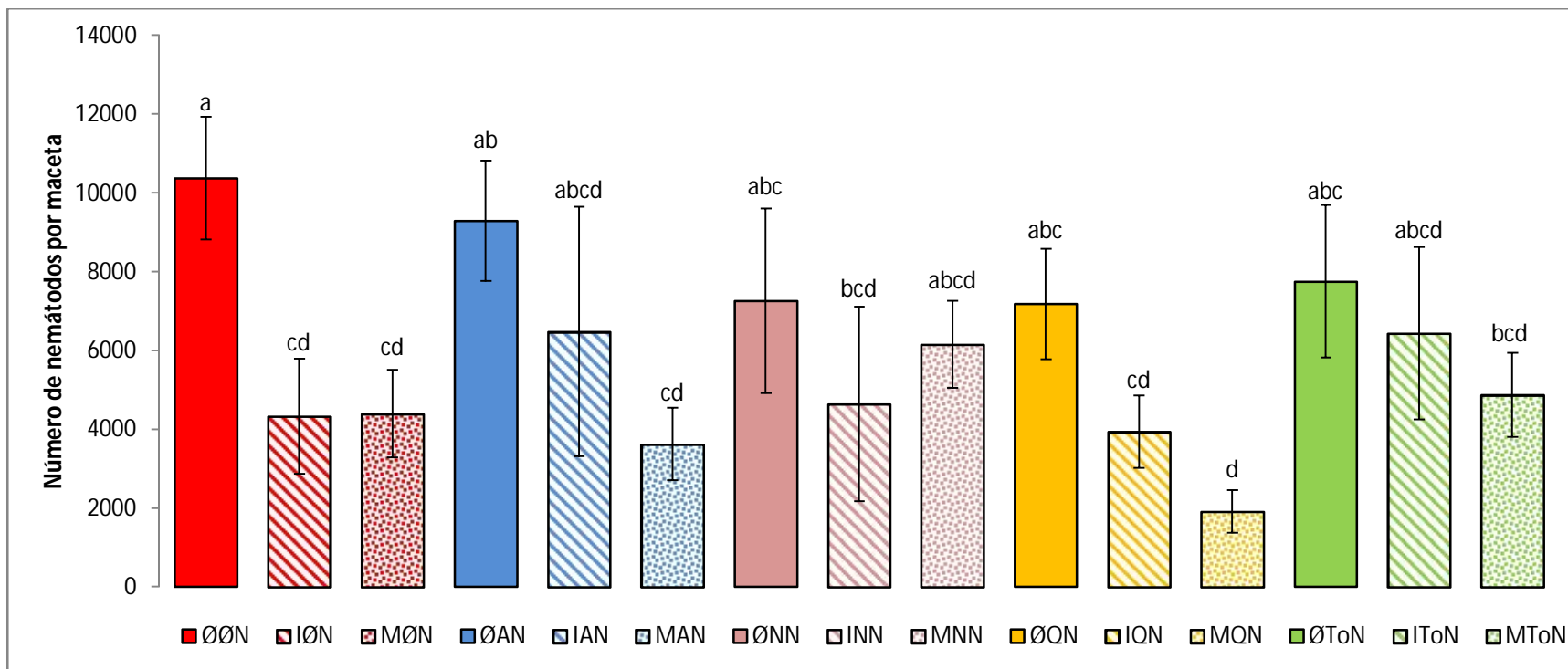
Figura 41. Valores medios de los índices de agallas en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Josefina-*M. incognita*.



Datos expresados como media \pm error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años).
Columnas coronadas con la misma letra no difieren significativamente según el test LSD ($p \leq 0,05$).

La micorrización por *Glomus* spp. disminuyó significativamente el índice de agallas independientemente de la especie micorrícica inoculada ($3,14 \pm 0,23$ en plantas micorrizadas por *G. intraradices* y $2,72 \pm 0,20$ en plantas micorrizadas por *G. mosseae*), en comparación con las plantas no micorrizadas ($4,28 \pm 0,17$) (Tabla 35 y Figura 41). La aplicación de extractos vegetales o aceites esenciales también redujo el índice de agallas, de forma significativa en plantas que recibieron aceite de *T. zygis* o extracto de *Q. amara* ($3,05 \pm 0,33$ y $2,95 \pm 0,31$ respectivamente), en comparación con las plantas sin fitoquímico ($3,98 \pm 0,24$) (Tabla 35 y Figura 41). No se observaron interacciones significativas entre los factores AMF y ACE. Todos los tratamientos redujeron el índice de agallas en relación al control [ØØN], pero los más efectivos fueron los que combinaron *G. mosseae* y extracto de *A. sativum* [MAN], *Glomus* spp. y extracto de *Q. amara* [IQN] y [MQN] y *Glomus* spp. y aceite de *T. zygis* [IToN] y [MToN], cuyos valores fueron significativamente menores que en el tratamiento control (Figura 41).

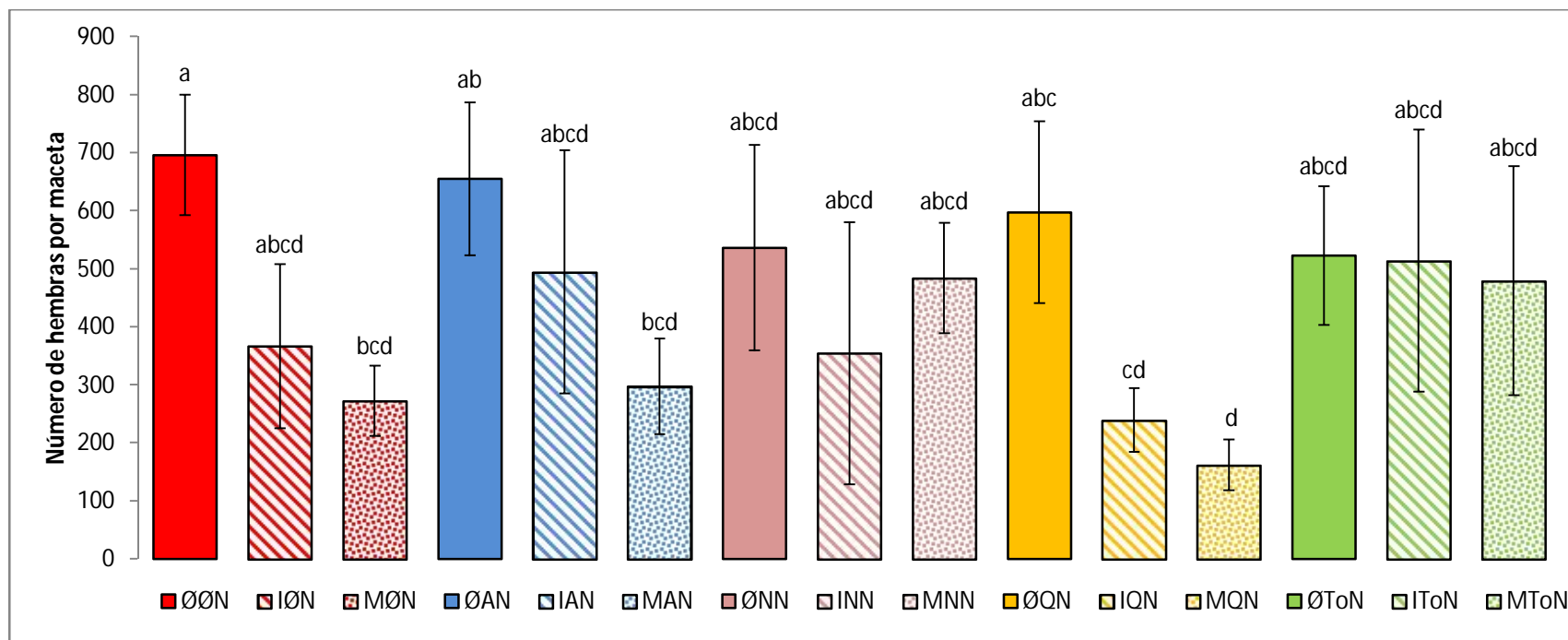
Figura 42. Valores medios de la densidad final de nemátodos por maceta en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Josefina-*M. incognita*.



Datos expresados como media ± error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años).
 Columnas coronadas con la misma letra no difieren significativamente según el test LSD ($p \leq 0,05$).

El número de nemátodos por maceta se redujo significativamente en plantas micorrizadas (5.075 ± 881 en plantas micorrizadas por *G. intraradices* y 4.141 ± 467 en plantas micorrizadas por *G. mosseae*, sin diferencias significativas entre ambas especies), en comparación con las no micorrizadas (8.394 ± 795) (Tabla 35 y Figura 42). Todos los tratamientos redujeron el número de nemátodos por maceta en relación al control [ØØN], pero el más efectivo fue la combinación de *G. mosseae* y extracto de *Q. amara* [MQN] cuyo valor fue significativamente menor que en el tratamiento control y que en los tratamientos donde únicamente se aplicó extracto vegetal o aceite esencial [ØAN], [ØNN], [ØQN] y [ØToN] (Figura 42).

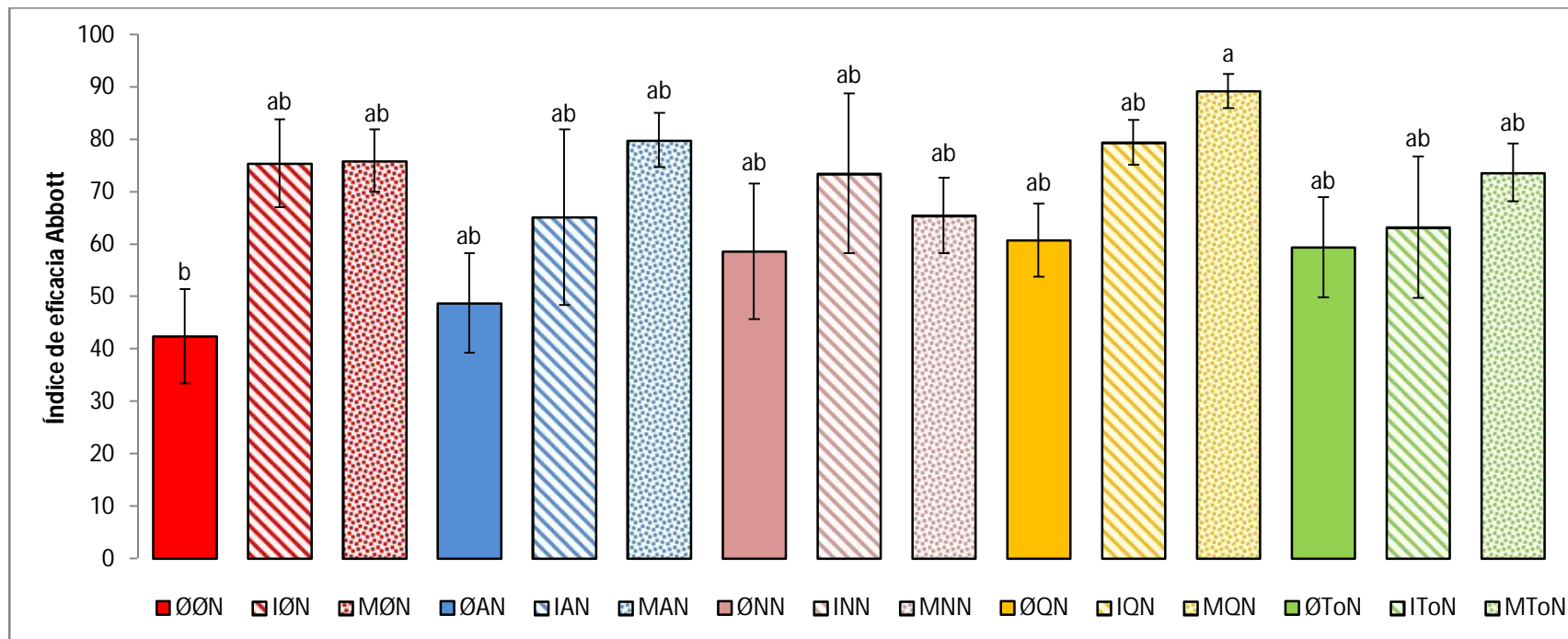
Figura 43. Valores medios del número de hembras de *M. incognita* por maceta en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Josefina-*M. incognita*.



Datos expresados como media \pm error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años).
Columnas coronadas con la misma letra no difieren significativamente según el test LSD ($p \leq 0,05$).

Paralelamente, la micorrización influyó de igual forma sobre la variable número de hembras por maceta reduciéndola significativamente en plantas micorrizadas (387 ± 75 en plantas micorrizadas por *G. intraradices* y 335 ± 51 en plantas micorrizadas por *G. mosseae*, sin diferencias significativas entre ambas especies), frente a las no micorrizadas (602 ± 61) (Tabla 35 y Figura 43). Todos los tratamientos redujeron el número de hembras por maceta en relación al control [ØØN], pero el más efectivo fue la combinación de *G. mosseae* y extracto de *Q. amara* [MQN] cuyo valor fue significativamente menor que en el tratamiento control y que en los tratamientos donde únicamente se aplicó extracto de *Allium sativum* [ØAN] o de *Q. amara* [ØQN] (Figura 43).

Figura 44. Valores medios de eficacia Abbott en la reducción del número de nemátodos en el ensayo para el estudio de la interacción AMF-Extractos vegetales y aceites esenciales en el patosistema Tomate cv. Josefina-*M. incognita*.



Datos expresados como media \pm error estándar de ocho réplicas (cuatro repeticiones x dos años).
Columnas coronadas con la misma letra no difieren significativamente según el test KW ($p \leq 0,05$).

El índice de eficacia Abbott para la reducción de las densidades de nemátodos, también se vio favorecido significativamente por la micorrización ($71,83 \pm 5,04$ en plantas micorrizadas por *G. intraradices* y $77,12 \pm 2,63$ en plantas micorrizadas por *G. mosseae*, sin diferencias significativas entre ambas especies), en comparación al valor obtenido en plantas no micorrizadas ($53,77 \pm 4,38$) (Tabla 35 y Figura 44). El estudio de la combinación (AMF \times ACE) indicó que, el tratamiento más eficaz aunó la micorrización por *G. mosseae* y la aplicación de extracto de *Q. amara* [MQN], siendo significativamente mayor al compararlo con plantas no micorrizadas sin extracto vegetal ni aceite esencial [$\emptyset\emptyset$ N]. El resto de tratamientos individuales y/o combinaciones de factores no consiguieron incrementar la eficacia en la reducción en el número de nemátodos significativamente, en relación al control sin tratar [$\emptyset\emptyset$ N] (Figura 44).

3. DISCUSIÓN

El interés a nivel mundial en la búsqueda de alternativas “sostenibles” para la protección vegetal se ha incrementado con las restricciones en el uso de los agroquímicos convencionales. En la Unión Europea se han prohibido, además del bromuro de metilo, el 1,3-dicloropropeno, aldicarb, thionazin y cadusafos, por lo que el control de las enfermedades causadas por nemátodos fitoparásitos se plantea problemático, ante la escasez de opciones eficaces. Entre las alternativas propuestas, el control biológico presenta ventajas sobre el resto ya que, el uso de múltiples organismos puede estimular el nivel y consistencia de la protección frente a nemátodos fitoparásitos a través de diferentes mecanismos de acción, proporcionando, además, una comunidad rizosférica más estable y mayor efectividad sobre un amplio rango de condiciones medioambientales (Pandey y Maheshwari, 2006; Sikora *et al.*, 2007).

3.1. ENSAYO 1. EFECTOS DE LA MICORRIZACIÓN E INOCULACIÓN CON BACTERIAS SOBRE EL PATOSISTEMA TOMATE-*M. INCOGNITA*

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal pueden influir sobre la planta mediante estimulación de la fijación del nitrógeno (Hong *et al.*, 1991), aumento de la disponibilidad de nutrientes en la rizosfera (Whitelaw, 2000), regulando la producción de etileno en raíces (Glick, 1995), liberando fitohormonas (Beyeler *et al.*, 1999), afectando el crecimiento y morfología radical (Vessey y Buss, 2002; Gamalero *et al.*, 2004) o favoreciendo la simbiosis de la planta con otros microorganismos beneficiosos (Molla *et al.*, 2001). Todos estos efectos pueden influir sobre la relación entre nemátodos fitoparásitos y planta hospedante por lo que, se decidió ensayar su posible efecto sinérgico con otros microorganismos citados frecuentemente en la literatura como bioprotectores frente a enfermedades, en particular los hongos formadores de micorrizas arbusculares (AMF), apoyándonos en que ya existían algunas citas previas de interacción positiva entre AMF y PGPR (Ordookhani *et al.*, 2010). Nuestros ensayos también incluyeron a la bacteria parásita *Pasteuria penetrans*, la cual ha demostrado un gran potencial como agente de biocontrol de nemátodos agalladores (Bird y Brisbane, 1988; Oostendorp *et al.*, 1991; Chen y Dickson 1998, 2004; Trudgill *et al.* 2000; Pembroke y Gowen 2006; Javed *et al.*, 2008; Ravichandra y Reddy, 2008).

3.1.1. EFECTOS SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCTIVIDAD VEGETAL

En el siguiente cuadro se muestra un resumen de los efectos de los factores individuales (nemátodos, AMFs y bacterias) sobre las variables de crecimiento y productividad vegetal en tomate, para los cultivares Durinta y Josefina.

| Tomate cv. Durinta | Nemátodo | AMFs | Bacterias |
|---------------------------|-------------------------|--|--|
| Longitud parte aérea | ∅ > <i>M. incognita</i> | ns | ns |
| Peso fresco parte aérea | ∅ > <i>M. incognita</i> | ns | ns |
| Peso seco parte aérea | ∅ > <i>M. incognita</i> | <i>G. mosseae</i> > ∅ | ns |
| Peso fresco raíces | ns | ns | [<i>B. megaterium</i> , <i>P. putida</i> , ∅] > <i>P. penetrans</i> |
| Número de flores | ∅ > <i>M. incognita</i> | <i>G. mosseae</i> > <i>G. intraradices</i> > ∅ | ns |
| Número de frutos | ∅ > <i>M. incognita</i> | <i>G. mosseae</i> > <i>G. intraradices</i> | ns |
| Peso fresco de frutos | ∅ > <i>M. incognita</i> | ns | [<i>B. megaterium</i> , <i>P. putida</i>] > <i>P. penetrans</i> |
| Contenido en clorofila | ∅ > <i>M. incognita</i> | <i>G. mosseae</i> > [<i>G. intraradices</i> , ∅] | ns |
| Tª de la cubierta vegetal | ns | ns | ns |
| Tomate cv. Josefina | Nemátodo | AMFs | Bacterias |
| Longitud parte aérea | ∅ > <i>M. incognita</i> | <i>G. mosseae</i> > ∅ | [<i>B. megaterium</i> , <i>P. penetrans</i>] > ∅ <i>P. penetrans</i> > <i>P. putida</i> |
| Peso fresco parte aérea | ns | ∅ > <i>G. mosseae</i> | ns |
| Peso seco parte aérea | ns | ∅ > <i>G. mosseae</i> | ns |
| Peso fresco raíces | ns | ∅ > [<i>G. intraradices</i> , <i>G. mosseae</i>] | <i>B. megaterium</i> > ∅ |
| Número de flores | ∅ > <i>M. incognita</i> | <i>G. mosseae</i> > [<i>G. intraradices</i> , ∅] | <i>P. putida</i> > [<i>P. penetrans</i> , ∅] |
| Número de frutos | ns | ∅ > [<i>G. intraradices</i> , <i>G. mosseae</i>] | ns |
| Peso fresco de frutos | ns | ∅ > [<i>G. intraradices</i> , <i>G. mosseae</i>] | <i>P. penetrans</i> > <i>B. megaterium</i> |
| Contenido en clorofila | ns | ns | ns |
| Tª de la cubierta vegetal | ns | ns | ns |

3.1.1.1. Efectos de los nemátodos

En tomate cv. Durinta, la mayoría de las variables de crecimiento y productividad vegetal, a excepción del peso fresco de la raíz y de la temperatura de la cubierta vegetal, se vieron afectadas negativamente por la presencia de *M. incognita*. En el caso de tomate cv. Josefina solo la longitud de la parte aérea y el número de flores fueron menores en las plantas infestadas por *M. incognita*, pero no se observaron efectos significativos causados por los nemátodos en el resto de variables de crecimiento vegetal.

En ninguno de los dos cultivares se observaron diferencias significativas entre plantas infestadas y sanas en la variable peso fresco de la raíz, lo cual ya había sido documentado

por Zhang *et al.* (2009) en raíces de pepino (*Cucumis sativus* L.). Este hecho se explica por el efecto compensatorio entre la disminución producida en el peso del sistema radical debida al daño y la necrosis causada por nemátodos y, por otra parte, el incremento en el peso de las raíces producido por la hipertrofia del tejido radical en las agallas causadas por *Meloidogyne*.

En cuanto al contenido en clorofila, si bien este fue disminuido por la infestación por nemátodos en el cv. Durinta, no se observaron diferencias en el cv. Josefina. En la literatura existen citas tanto de reducciones en el contenido en clorofila causadas por nemátodos, Al-Yahya *et al.* (1998) probaron la reducción en el contenido en clorofila experimentado en trigo infestado por *Heterodera avenae*, como de aumentos, El-Sherif e Ismail (2009) relataron el incremento de contenido en clorofila en plantas de soja infestadas por *M. incognita*. El hecho de que en el cv. Durinta se redujera el contenido en clorofila, está en consonancia con los resultados obtenidos para el resto de variables de crecimiento y productividad vegetal, que muestran como el estado nutricional de la planta se vio deteriorado por la infestación por *M. incognita*, mientras que esta reducción en el estado nutricional no se hizo tan patente en el cv. Josefina, probablemente por una mayor tolerancia hacia la población de nemátodos ensayada.

3.1.1.2. Efectos de los AMFs

La micorrización por *Glomus* spp., incrementó el peso seco de la parte aérea, número de flores, número de frutos y contenido en clorofila en el cv. Durinta, y *G. mosseae* mejoró dichas variables en mayor grado que *G. intraradices*. Además, el estudio de la combinación de tratamientos (NEM × AMF) en tomate cv. Durinta mostró que, en ausencia de nemátodos, las plantas micorrizadas por *G. mosseae* también tuvieron mayor peso fresco de las raíces que las no micorrizadas. Rivera *et al.* (2003) determinaron que, cuando las raíces están micorrizadas ocurren alteraciones morfológicas y fisiológicas en la planta, estimulando la síntesis de hormonas de crecimiento (auxinas, giberelinas y citoquinas). En consecuencia, la planta desarrolla un mayor sistema radical que favorece el incremento de la superficie de absorción de nutrientes (Paulitz y Linderman, 1991; Bais *et al.*, 2006), lo que se traduce en un incremento de la productividad vegetal, como se observó en nuestros ensayos con tomate cv. Durinta. No obstante, en el cv. Josefina, *G. mosseae* únicamente aumentó la longitud de la parte aérea y el número de flores, mientras que el resto de variables disminuyeron en presencia del AMF, excepto el contenido en clorofila y la

temperatura de la cubierta que no se vieron afectadas por la micorrización. Estos datos coinciden con los aportados por Talavera *et al.* (2002), donde la aplicación individual de *Glomus* sp. no se asoció con el incremento del peso fresco de la parte aérea ni del peso fresco de los frutos, y con los de Martínez-Medina *et al.* (2009) que incluso documentaron una reducción en el peso fresco y seco de la parte aérea en los tratamientos que solo incorporaron *G. mosseae*.

Existen múltiples citas de efectos positivos, neutros y negativos de la micorrización sobre el crecimiento vegetal, dependiendo de múltiples factores como, la especie de AMF, el cultivar empleado o el tiempo esperado hasta la medición de la biomasa o cosecha (Gera-Hol y Cook, 2005). En nuestros ensayos se observó claramente que la micorrización, por *G. mosseae* y en menor grado por *G. intraradices*, incrementaron los valores de crecimiento y productividad vegetal en tomate cv. Durinta, pero no así en tomate cv. Josefina donde se observó incluso el efecto contrario, por lo que se confirma que los efectos de la micorrización sobre las variables de crecimiento y productividad vegetal, en el caso del tomate, son dependientes del cultivar sobre el que se ensayan (Barker *et al.*, 1998).

3.1.1.3. Efectos de las bacterias

En relación a la inoculación bacteriana, en tomate cv. Josefina, la longitud de la parte aérea y el peso fresco de las raíces fueron mayores en aquellas plantas inoculadas con *B. megaterium*, frente a las plantas que no recibieron inóculo bacteriano, mientras que en tomate cv. Durinta, a pesar de que las plantas inoculadas con *B. megaterium* también mostraron los valores máximos de crecimiento vegetal, estos no fueron significativamente mayores que los de las plantas que no recibieron inóculo bacteriano. En 2007, López-Bucio *et al.* estudiaron los cambios en el sistema radical ocasionados por la inoculación con *B. megaterium*, viendo que causó una inhibición en el crecimiento de la raíz primaria seguido por un incremento en el número y crecimiento de raíces laterales, y en la longitud de los pelos radicales, que podrían inducir un aumento del peso del sistema radical, tras un primer periodo de decrecimiento en esta variable. El incremento en biomasa experimentado en las plantas con *B. megaterium* se apoya también en los datos documentados por Ryu *et al.* (2003, 2004a, b), donde el crecimiento de la planta fue estimulado en respuesta a la colonización de la raíz por esta PGPR, en los datos aportados por Singh y Siddiqui (2010), donde todos los aislados de *Bacillus* estimularon el crecimiento de las plantas de tomate y, en los proporcionados por Radwan *et al.* (2012), donde bioproductos basados en *B.*

megaterium incrementaron el peso fresco de la parte aérea. La colonización endofítica de la planta por *B. megaterium* refleja la habilidad adaptativa de esta bacteria en determinados nichos ecológicos (Hallmann *et al.*, 1997; Gray y Smith, 2005). En consecuencia, se origina una asociación entre planta hospedadora y bacteria (Kloepper *et al.*, 1999; Compant *et al.*, 2005) que puede beneficiar a la planta (Whipps, 2001; Lodewyckx *et al.*, 2002).

Del análisis de la combinación [NEM × BAC] observamos que, en el cultivar Josefina, se mostró un mayor peso fresco de la parte aérea en plantas infestadas e inoculadas con *B. megaterium* frente a las infestadas sin inoculación bacteriana. Este resultado se apoya en lo argumentado por Liu *et al.* (2012) donde, el crecimiento vegetal fue mayor en plantas infestadas por *M. incognita* y tratadas con PGPR, que en plantas infestadas sin tratar y sugiere que, la inoculación con *B. megaterium* compensa las reducciones en el crecimiento vegetal causadas por la infestación con *M. incognita*. En el caso del tomate cv. Durinta, se pudo observar una interacción verdadera entre los factores infestación por nemátodos e inoculación con bacterias que se tradujo en que las plantas infestadas e inoculadas con *B. megaterium* mostraron mayor longitud de la parte aérea que las infestadas e inoculadas con *P. putida* demostrando que, la bacteria endofítica impidió, en mayor medida, el efecto negativo ocasionado por la infestación por nemátodos, posiblemente porque es capaz de alcanzar zonas radicales donde la bacteria rizosférica no puede acceder, dificultando en mayor grado la penetración de *M. incognita*.

El número de flores, en el cv. Josefina, aumentó con la inoculación de *P. putida*, frente a aquellas plantas sin bacteria o con *P. penetrans*. *Pseudomonas* spp. produce una amplia variedad de antibióticos, hormonas y metabolitos secundarios (sideróforos y ácido cianhídrico) y puede solubilizar fósforo (Rodríguez y Fraga, 1999), lo que le confiere una gran habilidad para favorecer el crecimiento y la productividad vegetal; además, estos metabolitos han sido documentados como antagonistas de fitopatógenos (Bagnasco *et al.*, 1998; Siddiqui, 2006). Siddiqui y Ehteshamul-Haque (2001), determinaron un inóculo bacteriano de $2,5 \times 10^8$ ufc/ml de *Pseudomonas aeruginosa* como el óptimo para la estimulación del crecimiento vegetal, y que un inóculo inferior redujo el crecimiento de la planta. La cantidad de inóculo aplicada en nuestros ensayos coincidió con lo establecido por estos autores. Cuando se analizaron las combinaciones [NEM × BAC] en este mismo cultivar se observó que, la inoculación con *B. megaterium* no contrarrestó tampoco la acción negativa ejercida por el nemátodo en cuanto al número de flores, por lo que no se observó el efecto positivo sobre el crecimiento vegetal que Satyandra y Chaubey (2010) encontraron en plantas de tomate infestadas con *M. incognita* y tratadas con *B. subtilis*, y que atribuyeron

a la actividad solubilizadora de *B. subtilis* (Khan y Tarannum, 1999), que convierte las formas no utilizables de fosfato presente en el suelo en formas rápidamente utilizables por las plantas (Gaur, 1990).

En cuanto a los efectos de la bacteria parásita de nemátodos *P. penetrans* sobre el crecimiento vegetal, en tomate cv. Durinta el peso fresco de las raíces disminuyó en comparación a las PGPRs o a las plantas sin inoculación bacteriana, lo cual podría ser explicado por una reducción del porcentaje de juveniles que penetraron en las raíces, como consecuencia de una pérdida de movilidad al ser cubiertos por endosporas de *P. penetrans*, (Davies *et al.*, 1991; Kariuki *et al.*, 2006), lo que podría disminuir el peso de las raíces al estar éstas menos agalladas.

Por otra parte, cuando analizamos la combinación de los tratamientos [NEM × BAC], las plantas de tomate infestadas con *M. incognita* e inoculadas con *P. penetrans*, en ambos cultivares e independientemente de la micorrización, mostraron menor peso fresco y seco de la parte aérea que el resto. Este hecho podría explicarse porque, el desarrollo de la bacteria parásita está sincronizado con su hospedador y no afecta la habilidad de alimentación de los nemátodos (Bird, 1986) por lo que, los daños en la planta continúan produciéndose, al menos durante el periodo de 60 días de cultivo en maceta de nuestros ensayos.

3.1.1.4. Efectos de la interacción AMF × Bacterias

Aunque en general, en nuestros ensayos no se observaron verdaderas interacciones entre AMF y bacterias sobre las variables de crecimiento y productividad vegetal, sí que se observaron casos en los que la adición de ambos efectos individuales alcanzó la significación estadística necesaria para diferenciarlos de otras combinaciones de factores, por ejemplo en plantas de tomate cv. Josefina, en presencia de nemátodos, la combinación de *G. mosseae* y *B. megaterium* incrementó la longitud significativamente, en concordancia con los datos documentados por Liu *et al.* (2012) que obtuvieron mayor valor para esta variable en plantas de tomate que recibieron coinoculación con *G. mosseae* y *Bacillus* sp., frente a las plantas no inoculadas o con inoculación individual; o bien el mayor contenido de clorofila que presentaron los tratamientos que combinaron *G. mosseae* con las tres bacterias estudiadas sin infestación por *M. incognita*, en relación al resto de plantas infestadas. Estos resultados son apoyados parcialmente por los datos aportados por Kim *et al.* (1998), que encontraron que el contenido en fósforo aumentó con la inoculación tanto

de *Glomus etunicatum* como de *Enterobacter agglomerans*; por Ratti *et al.* (2001), que hallaron que la combinación de *Glomus aggregatum*, *Bacillus polymyxa* y *Azospirillum brasiliense* maximizó la biomasa y el contenido en fósforo de *Cymbopogon martinii*, cuando crece con una fuente insoluble de fosfato inorgánico; y por Ordookhani *et al.* (2010), que mostraron un incremento en potasio en tallo y fruto cuando PGPR y AMF se utilizaron conjuntamente.

En la literatura existen citas tanto de interacciones positivas como negativas entre distintos AMFs y bacterias (Hameeda *et al.*, 2007). Zhang *et al.* (2012) mostraron que, la coinoculación con *Glomus versiforme* y *Bacillus vallismortis* promovía el crecimiento vegetal en algodón afectado por *Verticillium*. Siddiqui y Akhtar (2009b) documentaron que, la aplicación de un hongo micorrícico o una bacteria promotora del crecimiento, individual o conjuntamente, incrementaba la longitud y peso seco de la planta, tanto en presencia como en ausencia de nemátodos. Estos resultados se apoyan en algunos efectos específicos de la interacción AMF-bacteria que han sido previamente descritos (Azcón, 1989). La actividad bacteriana puede estimular la colonización del hongo (Barea y Azcón-Aguilar, 1983), correlacionándose con la estimulación del crecimiento (Abbott y Robson, 1985). La efectividad bacteriana también podría ser explicada por una mayor habilidad de las raíces dualmente inoculadas para formar hifas externas (Azcón, 1987), influyendo en el aporte de nutrientes y, por tanto, en el crecimiento vegetal.

A pesar de los datos citados en la literatura, que documentan incremento en el crecimiento debido a interacciones positivas sinérgicas entre AMF y PGPR, en nuestros resultados no se observan efectos determinantes de estimulación del crecimiento como resultado de la aplicación conjunta de ambos microorganismos, corroborando otros resultados como los proporcionados por Vestberg *et al.* (2004), que estudiaron la inoculación simple o combinada de *G. mosseae*, *B. subtilis* y *P. fluorescens*, no alcanzando efectos estimulantes concluyentes sobre el crecimiento vegetal y observando que, la inoculación dual no aumentó el crecimiento en mayor medida que una simple inoculación, o también los resultados obtenidos por Medina *et al.* (2003) en *Medicago sativa*, donde la inoculación de *Bacillus* spp. y AMF no incrementó significativamente la biomasa de la parte aérea de la planta, comparado a las plantas únicamente micorrizadas. La literatura, incluso, refleja posibles interacciones negativas entre AMF y PGPR (Galleguillos *et al.*, 2000; Valdenegro *et al.*, 2001; Vivas *et al.*, 2003, 2006). Todo ello puede ser debido al impacto que las micorrizas producen en la composición de las comunidades bacterianas (Artursson *et al.*, 2006), al cambiar la composición química de los exudados de la raíz que son fuente

de alimentos para las bacterias asociadas en la micorrizosfera (Azcón-Aguilar y Bago, 1994; Barea, 1997; Gryndler, 2000; Artursson *et al.*, 2006). El micelio del AMF libera componentes orgánicos de gran valor energético, lo que induce a pensar en un mayor crecimiento y actividad de las bacterias presentes en la micorrizosfera. Sin embargo, este enriquecimiento es menor que el que ocurre en la rizosfera, por lo que, el nivel bacteriano en el suelo de la micorrizosfera es menor, comparado con el de la rizosfera (Andrade *et al.*, 1997). Por tanto, el establecimiento de las PGPR en la rizosfera puede verse afectado por la coinoculación con el hongo micorrícico (Ravnskov *et al.*, 1999; Bianciotto *et al.*, 2002; Bianciotto y Bonfante, 2002) y, en consecuencia, mermada su acción estimulante del crecimiento vegetal. Estos resultados revelan la necesidad de una selección cuidadosa y adecuada de las especies y/o razas bacterianas para una efectiva combinación con los hongos micorrícicos y maximizar la estimulación del crecimiento (Rydlová *et al.*, 2011), ya que el efecto y sentido de las posibles interacciones entre AMFs y PGPRs sobre el crecimiento de la planta, parece depender tanto de las especies de AMF, del tipo bacteriano asociado y del cultivar hospedante, entre otros factores.

3.1.2. EFECTOS SOBRE LA MICORRIZACIÓN

En el siguiente cuadro se muestra un resumen de los efectos de los factores individuales (nemátodos, AMFs y bacterias) sobre las variables relacionadas con la micorrización en tomate, para los cultivares Durinta y Josefina.

| Tomate cv. Durinta | Nemátodo | AMFs | Bacterias |
|---------------------|-------------------------|--|---|
| Frecuencia, F% | <i>M. incognita</i> >∅ | <i>G. mosseae</i> > <i>G. intraradices</i> | <i>B. megaterium</i> > [<i>P. putida</i> , ∅] |
| Intensidad, M% | ∅ > <i>M. incognita</i> | <i>G. mosseae</i> > <i>G. intraradices</i> | <i>B. megaterium</i> >∅ |
| Int. media, m% | ∅ > <i>M. incognita</i> | <i>G. mosseae</i> > <i>G. intraradices</i> | [<i>B. megaterium</i> , <i>P. penetrans</i> , <i>P. putida</i>] >∅ |
| Tomate cv. Josefina | Nemátodo | AMFs | Bacterias |
| Frecuencia, F% | ns | ns | <i>P. penetrans</i> > [<i>B. megaterium</i> , <i>P. putida</i>] ∅ > <i>P. putida</i> |
| Intensidad, M% | ∅ > <i>M. incognita</i> | <i>G. mosseae</i> > <i>G. intraradices</i> | ns |
| Int. media, m% | ∅ > <i>M. incognita</i> | <i>G. mosseae</i> > <i>G. intraradices</i> | [<i>B. megaterium</i> , <i>P. putida</i>] >∅ |

ns. No significativo. ∅: sin inoculación de nemátodo, AMF o bacteria.

3.1.2.1. Efectos de los nemátodos

En cv. Durinta, las plantas infestadas por *M. incognita* mostraron mayor frecuencia de micorrización (F%) que las no infestadas, mientras que en el cv. Josefina, el nemátodo no afectó esta variable. Por el contrario, la presencia del nemátodo redujo las variables M% y m%, en ambos cultivares. En la literatura existen tanto citas donde la colonización micorrízica no fue afectada por el establecimiento del nemátodo (Gómez *et al.*, 2008), como de reducciones e incrementos en la colonización por AMFs en presencia de distintas especies de *Meloidogyne* (Gera-Hol y Cook, 2005). En nuestros ensayos hemos observado un aumento de la frecuencia de micorrización F%, que mide el porcentaje de fragmentos micorrizados en el total del sistema radical, y que podría estar relacionada con el mecanismo sugerido por Gera-Hol y Cook (2005) en el que, la proliferación radicular inducida por las especies de *Meloidogyne* alrededor de sus sitios de alimentación, permitiría a los AMFs colonizar nuevas raíces, con lo que se incrementaría el número de fragmentos micorrizados y, por tanto, el valor de la variable F%. Por el contrario, también hemos observado, una reducción en las variables que miden la intensidad de micorrización, M% y m%, lo que podría estar influido por otros mecanismos implicados en la interacción AMF-*Meloidogyne*, como la destrucción de células que contribuyan al establecimiento de la simbiosis AMF-planta por parte del nemátodo o a respuestas de defensa en las plantas hospedantes, consecuencia de la infestación de las raíces por el nemátodo, que puedan interferir en el proceso de micorrización (Gera-Hol y Cook, 2005). Diedhiou *et al.* (2003) realizaron un examen microscópico de secciones radicales revelando que, *G. coronatum* coloniza preferiblemente el parénquima cortical de la raíz mientras que, *M. incognita* se localiza generalmente en el cilindro central, por lo que sugirieron que ambos microorganismos podrían coexistir sin afectarse mutuamente en cuanto a su distribución espacial en las raíces, por lo que la disminución de las intensidades de micorrización en presencia de nemátodos parece ser debida más a mecanismos bioquímicos y moleculares en el proceso de colonización radicular, por parte de ambos microorganismos, que a un efecto de competición física por el espacio dentro de la raíz.

3.1.2.2. Efectos de los AMFs

En plantas de tomate cv. Durinta, la frecuencia e intensidades de micorrización por *G. mosseae* fueron mayores que las de *G. intraradices*. En las plantas de tomate cv. Josefina, *G. mosseae* fue superior a *G. intraradices* en intensidades M% y m%. En general, se observó

una mayor colonización de las raíces de ambos cultivares de tomate ensayados por la cepa *G. mosseae* BEG119, que por la cepa *G. intraradices* BEG123.

3.1.2.3. Efectos de las bacterias

En plantas de tomate cv. Durinta, las plantas inoculadas con *B. megaterium* mostraron mayores valores de F%, M% y m% que aquellas sin inóculo bacteriano. Estos resultados son semejantes a los encontrados por Liu *et al.* (2012), donde diversas especies de *Bacillus* incrementaron la colonización micorrícica de las raíces. Se conoce que, determinados microorganismos producen componentes que incrementan la exudación radical y se estimula la formación del micelio fúngico de los AMFs en la rizosfera o, incluso, se facilita la penetración radical por el hongo. Además, los microorganismos presentes en la rizosfera también afectan los estadios previos a la micorrización (germinación de esporas y crecimiento del micelio) (Azcón-Aguilar y Barea, 1992, 1995).

En las plantas de tomate cv. Josefina, las plantas inoculadas con *P. putida* mostraron menor F% que las plantas que no recibieron ninguna inoculación bacteriana, por el contrario m% aumentó en presencia de *P. putida* y *B. megaterium*, frente a las plantas sin inóculo bacteriano. Estos datos se ajustan con los documentados por Akköprü y Demir (2005), que estudiando plantas de tomate afectadas por *Fusarium oxysporum* observaron que la bacteria *P. putida* tuvo impacto negativo sobre la micorrización por *G. intraradices*, o a los estudios realizados en trigo (Germida y Walley, 1996; Walley y Germida, 1997) en los que la coinoculación de AMF y razas de *Pseudomonas cepacia*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* o *P. putida* mostraron resultados variables. Aunque la literatura, mayoritariamente, documenta el efecto positivo de la coinoculación con *Glomus* spp. y PGPRs (Toro *et al.* 1997; Barea *et al.*, 1998), de los resultados obtenidos en nuestros estudios se deduce que, la combinación de PGPR y AMF no siempre incrementa la frecuencia e intensidad de micorrización, en particular con especies y cepas de *Pseudomonas*, ya que estas pueden ser productoras de compuestos antifúngicos, e influir sobre la formación y función de la micorrización.

En ambos cultivares de tomate, F% aumentó en presencia de *P. penetrans*, frente a la inoculación con las PGPRs. Además, se observó un efecto significativo de la interacción (NEM × BAC) la cual mostró que, la inoculación con *P. penetrans* incrementó m% en plantas infestadas, y que estos incrementos para la combinación de *P. penetrans* y *Glomus* spp. ocurrieron únicamente en presencia de *M. incognita*. La explicación para el efecto

estimuladorio de *P. penetrans* sobre la micorrización no está clara, porque esta bacteria no pertenece al grupo de las PGPR. No obstante, la influencia negativa de *P. penetrans* sobre el movimiento de los nemátodos (Davies *et al.*, 1991; Kariuki *et al.*, 2006), pudo evitar parcialmente la colonización de las raíces por éstos, reduciendo la competencia por el espacio con los hongos micorrícicos y facilitando el establecimiento de la simbiosis micorrícica.

3.1.3. EFECTOS SOBRE LA POBLACIÓN DE NEMÁTODOS

En el siguiente cuadro se muestra un resumen de los efectos de los factores individuales (AMFs y bacterias) sobre las variables relacionadas con la infestación por *M. incognita* en tomate, para los cultivares Durinta y Josefina.

| Tomate cv. Durinta | AMFs | Bacterias |
|---------------------|--|--|
| Índice de agallas | ∅ > <i>G. mosseae</i> | [<i>P. putida</i> , ∅] > [<i>B. megaterium</i> , <i>P. penetrans</i>] |
| Nº J2 + huevos | [<i>G. intraradices</i> , ∅] > <i>G. mosseae</i> | [<i>P. putida</i> , ∅] > <i>B. megaterium</i> > <i>P. penetrans</i> |
| Nº Hembras | ns | ns |
| Eficacia Abbott | <i>G. mosseae</i> > ∅ | <i>P. penetrans</i> > [<i>B. megaterium</i> , <i>P. putida</i> , ∅] |
| Tomate cv. Josefina | AMFs | Bacterias |
| Índice de agallas | ns | ∅ > [<i>B. megaterium</i> , <i>P. penetrans</i>] |
| Nº J2 + huevos | ∅ > [<i>G. intraradices</i> , <i>G. mosseae</i>] | ∅ > [<i>B. megaterium</i> , <i>P. putida</i>] > <i>P. penetrans</i> |
| Nº Hembras | <i>G. mosseae</i> > <i>G. intraradices</i> | [<i>B. megaterium</i> , <i>P. penetrans</i> , ∅] > <i>P. putida</i> |
| Eficacia Abbott | <i>G. mosseae</i> > ∅ | <i>P. penetrans</i> > [<i>P. putida</i> , ∅] |

ns. No significativo. ∅: sin inoculación de AMF o bacteria.

3.1.3.1. Efectos de los AMFs

En plantas de tomate cv. Durinta, *G. mosseae* fue más efectivo en la reducción del índice de agallas y de la densidad final de nemátodos, mostrándose como el AMF de mayor eficacia en el control de la enfermedad, ya que el índice de agallas fue mayor en las plantas sin micorrizar que en las micorrizadas por *G. mosseae* y la densidad final de nemátodos fue menor que en las plantas sin micorrizar, y también menor que en las plantas micorrizadas por *G. intraradices*. Este resultado coincide con lo documentado por Vos *et al.* (2012), donde se evidenció una reducción en la infestación por *M. incognita* y *Pratylenchus penetrans*, en tomate, debida a *G. mosseae*. La eficacia de *G. intraradices* en la reducción del índice de agallas, también ha sido observada en otros estudios y cultivos (Zhang *et al.*,

2009). En el cv. Josefina, *G. intraradices* y *G. mosseae* tuvieron similar comportamiento en la reducción del índice de agallas y de la densidad final de nemátodos. Sin embargo, *G. mosseae* fue menos eficaz que *G. intraradices* en la reducción del número de hembras. Los mecanismos por los que la micorrización influye sobre la infestación y reproducción de los nemátodos, aún están por aclararse. No obstante, la habilidad de las plantas micorrizadas para crecer, a pesar de la infestación por los nemátodos, se considera el principal efecto de los AMF sobre las plantas (Hussey y Roncadori, 1982). Para determinar los posibles mecanismos micorrícicos que podrían explicar este fenómeno se han propuesto las siguientes hipótesis (Azcón-Aguilar y Barea, 1996; Gera-Hol y Cook, 2005): a) modificación de los exudados radicales y desarrollo de nuevos microorganismos antagonistas en la micorrizosfera que afecta a la penetración del nemátodo; b) producción y acumulación de componentes tales como fenoles, fitoalexinas y hormonas, dentro del sistema radical micorrícico que afecta a la alimentación del nemátodo; c) competición espacial dentro de los tejidos radicales; d) mejora del ingreso de nutrientes por la planta hospedadora y e) una fuerte inducción de la resistencia sistémica de la planta (Elsen *et al.* 2008).

3.1.3.2. Efectos de las bacterias

En tomate cv. Durinta, el índice de agallas y la densidad final de nemátodos se redujeron significativamente debido a la inoculación con *B. megaterium*, frente a las plantas sin inoculación bacteriana o inoculadas con *P. putida*, aunque en el cv. Josefina las diferencias entre *B. megaterium* y *P. putida* no llegaron a ser significativas.

El potencial de las bacterias endofíticas del género *Bacillus* frente a los nemátodos fue estudiado anteriormente por Neipp y Becker (1999), que documentaron la capacidad de *B. megaterium* en la protección frente a *H. schachtii*, al reducir la penetración de los juveniles en cultivos de remolacha. Al-Rehiayani *et al.* (1999) utilizaron también inóculo de *B. megaterium* y observaron una reducción en la penetración de *M. chitwoodi* y *Pratylenchus penetrans* en patata. Padgham y Sikora (2007), en cultivo de arroz, demostraron que *B. megaterium* redujo la atracción y penetración de *M. graminicola* en la raíces de la planta y disminuyó la eclosión de los huevos. Mekete *et al.* (2009), observaron que el daño causado en plantas de café por *M. incognita* se redujo por la inoculación con las especies endofíticas *Bacillus pumilus* y *B. mycoides*. Recientemente, Radwan *et al.* (2012) establecieron la capacidad de *B. megaterium* para reducir la severidad de la enfermedad ocasionada por *M. incognita* en plantas de tomate.

En el caso de *Pseudomonas*, Lee *et al.* (2011) documentaron que *Pseudomonas chlororaphis*, cultivada en medio líquido, produce metabolitos secundarios que causan mortalidad sobre los juveniles de *M. hapla* y reducen significativamente los síntomas en raíces, en ensayos de tomate en condiciones controladas de invernadero. A pesar de que *P. putida* es también una bacteria conocida por colonizar ampliamente el sistema radical y por la producción de sideróforos (Siddiqui *et al.*, 2007), dando lugar a una reducción de los nemátodos, observamos una menor efectividad en los tratamientos que incorporaron esta bacteria rizosférica frente a los tratamientos con la bacteria endofítica *B. megaterium*, concordando con los resultados aportados por Oostendorp y Sikora (1990), donde no se apreció ningún efecto de la colonización de *P. fluorescens* en raíces de remolacha sobre el movimiento de los juveniles de *H. schachtii*, pero en contraposición a los resultados de Siddiqui *et al.* (2009) que observaron que, los aislados de *Pseudomonas* causaron un mayor efecto inhibitorio sobre la eclosión y penetración de *M. incognita* que los aislados de *Bacillus* en plantas de guisante.

El mayor efecto supresor de *B. megaterium* sobre *M. incognita*, en comparación con *P. putida*, podría deberse a la naturaleza endofítica de *Bacillus* que le permitiría una mayor colonización del sistema radical de la planta de tomate que la bacteria rizosférica, compitiendo por el espacio e impidiendo, por tanto, en mayor grado el establecimiento de los nemátodos dentro de las raíces. Sin embargo, esta explicación no concuerda con el menor número de hembras observado en nuestros ensayos en los tratamientos inoculados con *P. putida*, frente a aquellos inoculados con *B. megaterium*, ya que una menor penetración de juveniles en las raíces en los tratamientos con *B. megaterium* conllevaría un menor número de hembras y observamos justo lo contrario, lo que sugiere la existencia de otros mecanismos diferenciales en las interacciones de *B. megaterium* y *P. putida* con *M. incognita*.

Por su parte, el índice de agallas y la densidad final de nemátodos disminuyó significativamente con la inoculación de *P. penetrans*, en relación al efecto obtenido mediante la aplicación de las PGPR. *P. penetrans* mostró la máxima eficacia en la reducción de *M. incognita*, seguida de *B. megaterium* y, finalmente, la bacteria menos eficaz fue *P. putida*. Aunque el número de hembras no haya sido reducido en los tratamientos donde se aplicó *P. penetrans*, la densidad final de nemátodos sí lo fue; esto es debido a que, las hembras de los nemátodos agalladores infectadas por *P. penetrans* se desarrollan hasta la madurez pero, generalmente, no presentan un sistema reproductivo funcional cuando el cuerpo del nemátodo está relleno de endosporas (Mankau, 1980; Sayre, 1980; Bird, 1986) y,

en consecuencia, el número de nemátodos de la siguiente generación se reduce. Nuestros resultados coinciden con aquellos documentados por Brown *et al.* (1985), Bird y Brisbane (1988), Davies *et al.* (1988), Gowen y Ahmed (1990), Gowen y Tzortzakakis (1994), Weibelzahl-Fulton *et al.* (1996), Talavera *et al.* (2002) y Krueger y McSorley (2008).

También existen estudios que expresan las dificultades para alcanzar un control suficiente de los nemátodos agalladores con la bacteria parasita *P. penetrans*, como indicó Maximiniano *et al.* (2001) para *M. exigua* en plantaciones de café, aunque las condiciones de campo juegan un papel crucial en este resultado. A pesar de que la concentración de esporas de nuestro inóculo fue la indicada en la literatura para una infección efectiva, podría no haber sido suficiente en determinados tratamientos ya que, la relación entre la concentración de esporas y el nivel de adhesión no es lineal, indicando que, incluso a concentraciones muy altas de esporas, el número de éstas capaces de adherirse podría no ser suficiente y se dificultaría la infección de los nemátodos. Asimismo, los altos niveles de adhesión de esporas a los juveniles no siempre garantizan una reducción significativa ya que, está fuertemente influida por el biotipo de *Meloidogyne* (Tzortzakakis *et al.*, 1997). Una importante característica, de los estudios de adhesión de esporas, es el número relativamente bajo de esporas encontradas adheridas a juveniles, comparados con la alta concentración en la suspensión que los rodea. Esto indica que, un gran número de esporas podrían no ser viables o estar en un estado de inmadurez o dormancia (Tzortzakakis *et al.*, 1997). Las especies bacterianas que se adhieren en mayor número que otras, no siempre garantizan mayor reducción en el número de huevos. Las razones son, probablemente, por la elevada varianza en la adhesión de las esporas y en la infección o porque las esporas se suelten durante el movimiento de los juveniles en el suelo (Ratnasoma *et al.*, 1991). Igualmente, los individuos dentro de una especie de nemátodo, o una mezcla de especies, pueden resistir la adhesión de las esporas (Tzortzakakis *et al.*, 1996). La especificidad de *P. penetrans* puede ser superada usando mezclas de poblaciones de nemátodos (Channer y Gowen, 1988, 1992); paralelamente, los nemátodos agalladores presentan menos probabilidad de desarrollar resistencia a una mezcla de poblaciones de *P. penetrans* que a una única población (Tzortzakakis y Gowen, 1994). Todos estos factores se acrecientan por la variabilidad tanto del nemátodo como de la bacteria, lo que ha sido documentado por varios autores (Spaull, 1984; Stirling, 1985; Davies *et al.*, 1988; Channer y Gowen, 1992).

En general, podríamos determinar que, *P. penetrans* fue más eficaz que las bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la reducción de la enfermedad causada por *M. incognita*, mostrándose el parasitismo como el mecanismo más eficaz en la lucha contra el nemátodo.

3.1.3.3. Efectos de la interacción AMF × Bacterias

Aunque no se pudo determinar la existencia de una verdadera interacción significativa entre AMF y bacterias sobre la variable índice de agallas en tomate cv. Durinta, el tratamiento más efectivo en su reducción fue la combinación de *G. intraradices* y *P. penetrans* y, en tomate cv. Josefina, el más efectivo fue el que combinó *G. mosseae* y *P. penetrans* y está en concordancia con la hipótesis que sugiere que, la aplicación dual de microorganismos con diferentes mecanismos de acción proporciona mayor eficacia contra los patógenos que la inoculación simple con un único microorganismo (Guetsky *et al.*, 2002; Siddiqui y Akhtar, 2008a).

Para la variable número de nemátodos por maceta, sí que se encontraron interacciones significativas entre la micorrización y el inóculo bacteriano de forma que, los tratamientos que combinaron *P. penetrans* y *Glomus* spp. mostraron menor número de nemátodos por maceta en ambos cultivares. Estos resultados se relacionan con los obtenidos por Rao y Gowen (1998), donde *Glomus deserticola* se asoció con una mayor adhesión de las esporas de *Pasteuria* a *M. incognita*. La aplicación de estos dos microorganismos parece ser compatible y debería ser considerada una estrategia de control nematológico, como apuntaron Talavera *et al.* (2002).

Por otra parte, en tomate cv. Josefina, durante el primer año de ensayo, la densidad final de nemátodos fue reducida por la combinación de *G. mosseae* y *B. megaterium*. Se demuestra que los hongos micorrícicos y las PGPR pueden coexistir sin afectarse negativamente entre sí. De hecho, en combinaciones adecuadas como la que aquí se estudia, puede incrementarse más aún la resistencia a patógenos ya que los exudados radicales originados por plantas micorrizadas atraen a las PGPR, como *Pseudomonas fluorescens* (Sood, 2003). No obstante, las combinaciones de micorrización por *G. intraradices* con las distintas bacterias no incrementaron la eficacia en la reducción del número de nemátodos en relación al control y, en el segundo año de ensayos en el cultivar Josefina, el número de nemátodos fue reducido en los tratamientos que combinaron *Glomus* spp. y la bacteria parásita y por las inoculaciones individuales de *G. intraradices*, *B.*

megaterium o *P. putida*. Estos últimos resultados demuestran que, la aplicación de una especie simple de microorganismo, en muchas ocasiones, reduce el número de *M. incognita* hembras y juveniles más que cuando los microorganismos fueron combinados, como documentaron Oyekanmi *et al.* (2007). En la literatura existen resultados documentados donde, no siempre se obtienen resultados óptimos en la reducción de la infestación por *M. incognita* cuando se combinan microorganismos. Jaizme-Vega *et al.* (2006), al estudiar el efecto de la inoculación combinada de *Glomus* spp. y *Bacillus* en papaya, observaron que la infestación por el nemátodo agallador se redujo de forma significativa en plantas micorrizadas, pero que la adición de la bacteria no mejoró los resultados de la inoculación exclusiva con AMF.

Cuando consideramos el uso de mezclas o combinaciones de agentes es importante que ningún miembro de la mezcla sea inhibidor de otro, o interfiera con la microbiota no patogénica asociada a las raíces. Existen varios ejemplos de combinaciones de diferentes bacterias u hongos proporcionando peor promoción del crecimiento vegetal o biocontrol que los aislados usados individualmente (Chiarini *et al.*, 1998; Larkin y Fravel, 1998; de Boer *et al.*, 1999). Similarmente, una combinación de *Bacillus subtilis* y *Fusarium oxysporum* no patogénico no proporcionaron control de la podredumbre por *Fusarium* en garbanzo, mientras cualquiera de los dos aplicados individualmente si lo hizo (Hervas *et al.*, 1998).

La eficacia de la combinación de *P. penetrans* y micorrización, en la reducción de las poblaciones de nemátodos ha quedado reflejada en nuestros ensayos, sin embargo, no ha sido así con la combinación de hongos micorrícicos y PGPRs, por tanto, serían esclarecedoras futuras investigaciones sobre el efecto sinérgico de *B. megaterium* o *P. putida* respecto a otras especies de AMF y en distintos cultivares vegetales.

3.2. ENSAYO 2. EFECTOS DE LA MICORRIZACIÓN E INOCULACIÓN CON *TRICHODERMA HARZIANUM* SOBRE EL PATOSISTEMA TOMATE-*M. INCOGNITA*

Las especies del género *Trichoderma* son hongos de vida libre, comunes en suelo y ecosistemas radicales, capaces de degradar hidrocarburos, compuestos clorofenólicos, polisacáridos y pesticidas xenobióticos usados en agricultura (Harman y Kubicek, 1998; Harman *et al.*, 2004). Recientes descubrimientos han mostrado que también son simbioses de plantas, oportunistas, avirulentos y parásitos de otros hongos (Harman *et al.*, 2004).

Producen o liberan metabolitos con actividad antibiótica, bacteriostática y nematocida (Djian *et al.* 1991; Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998; Sikora *et al.*, 2003; Siddiqui y Shaukat, 2004b; Anitha y Murugesan, 2005; Li *et al.*, 2007; Reino *et al.*, 2008; Zhang y Zhang, 2009; Yang *et al.*, 2010) e inducen respuestas de resistencia localizada o sistémica, lo que explica su falta de patogenicidad para las plantas (Kuc, 2001; Evans *et al.*, 2003; Harman *et al.*, 2004). La colonización de la raíz por *Trichoderma* spp. suele estimular el crecimiento y desarrollo de ésta, la productividad, la resistencia a estreses de tipo abiótico, optimizar el ingreso y utilización de los nutrientes (nitrógeno, cobre, fósforo, hierro, manganeso y sodio) en las raíces (Yedidia *et al.*, 2001) y su solubilización en el suelo (Altomare *et al.*, 1999). Igualmente, pueden parasitar y competir con otros microorganismos del suelo (Elad, 1996, Howell, 2002), producir enzimas útiles (Harman y Kubicek, 1998; Sharon *et al.*, 2001), e inhibir y/o degradar otras enzimas esenciales para la infección por fitopatógenos (Zimand *et al.*, 1996). Por tanto, las especies de *Trichoderma* han sido reconocidas como agentes para el control de enfermedades de plantas (Chet, 1987; Chet *et al.*, 1997; Whipps, 2001, Yedidia *et al.*, 2003; Shores *et al.*, 2005; zum Felde *et al.*, 2006; Martínez-Medina *et al.*, 2009; Srivastava *et al.*, 2010). Concretamente *T. harzianum*, *T. virens* y *T. viride*, han sido ensayadas con éxito en el control de nemátodos agalladores (Meyer *et al.*, 2000; Sharon *et al.*, 2001; Pandey *et al.*, 2003; Suárez y Llobell, 2004; Spiegel *et al.*, 2006; Dababat y Sikora, 2007; Goswami y Tiwari, 2007; Sharon *et al.*, 2007; Goswami *et al.*, 2008; Sahebani y Hadavi, 2008). También se ha documentado su efecto promotor del crecimiento y desarrollo de las plantas hospedadoras (Naseby *et al.*, 2000; Harman *et al.*, 2004).

3.2.1. EFECTOS SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCTIVIDAD VEGETAL

En el siguiente cuadro se muestra un resumen de los efectos de los factores individuales (nemátodos, AMFs y *Trichoderma*) sobre el crecimiento y productividad vegetal en tomate, para los cultivares Durinta y Josefina.

| Tomate cv. Durinta | Nemátodo | AMFs | <i>T. harzianum</i> |
|---------------------------|-------------------------|--|-------------------------|
| Longitud parte aérea | ns | ns | ns |
| Peso fresco parte aérea | ns | ns | ns |
| Peso seco parte aérea | ns | [<i>G. intraradices</i> , <i>G. mosseae</i>] > Ø | ns |
| Peso fresco raíces | ns | ns | ns |
| Número de flores | ns | ns | ns |
| Número de frutos | ns | ns | ns |
| Peso fresco de frutos | ns | ns | ns |
| Contenido en clorofila | ns | ns | <i>T. harzianum</i> > Ø |
| Tª de la cubierta vegetal | ns | ns | Ø > <i>T. harzianum</i> |
| Tomate cv. Josefina | Nemátodo | AMFs | <i>T. harzianum</i> |
| Longitud parte aérea | ns | ns | ns |
| Peso fresco parte aérea | Ø > <i>M. incognita</i> | ns | ns |
| Peso seco parte aérea | Ø > <i>M. incognita</i> | ns | ns |
| Peso fresco raíces | ns | ns | ns |
| Número de flores | ns | ns | ns |
| Número de frutos | ns | ns | ns |
| Peso fresco de frutos | ns | ns | ns |
| Contenido en clorofila | ns | ns | ns |
| Tª de la cubierta vegetal | ns | ns | ns |

ns. No significativo. Ø: sin inoculación de nemátodo, AMF u hongo oportunista.

3.2.1.1. Efectos de los nemátodos

La infestación por *M. incognita* no afectó, en general, el crecimiento ni la productividad de las plantas de tomate; únicamente se observaron algunas reducciones del peso fresco y seco de la parte aérea en plantas de tomate cv. Josefina infestadas por nemátodos, durante el segundo año de los ensayos. Según Seinhorst (1960), los daños apreciables ocurren solo donde la densidad de población excede un cierto límite. Este umbral de daño para el crecimiento y productividad de la planta varía según el cultivo, el nemátodo y las condiciones experimentales. No obstante, las densidades de inóculo en nuestros ensayos fueron bastante elevadas, (año 1: 1341 ± 56 y año 2: 1705 ± 59 J2s por 500 cm³ de suelo, respectivamente) con la intención de observar reducciones en el crecimiento aún en el corto periodo de duración de los ensayos. Por lo que, la ausencia de efectos sobre las variables de crecimiento vegetal causados por los nemátodos, podría atribuirse o bien a la variabilidad observada en el crecimiento entre distintos plantones del mismo cultivar, en

nuestras condiciones experimentales, o bien a una pérdida de efectividad del inóculo de nemátodos.

3.2.1.2. Efectos de los AMFs

La inoculación de *Glomus* spp. no mostró efecto sobre el crecimiento y productividad de las plantas de tomate, excepto en el aumento experimentado en el peso seco de la parte aérea de las plantas de tomate cv. Durinta micorrizadas por *G. intraradices* o por *G. mosseae*, en comparación con la ausencia de inóculo micorrícico. La falta de estimulación del crecimiento y la productividad en plantas micorrizadas contrasta con la documentada capacidad de estos hongos para promover el crecimiento vegetal y estimular la disponibilidad y captación de fósforo (Smith *et al.*, 1997; Barea *et al.*, 2002; Tawaraya *et al.*, 2006). No obstante, estos resultados coinciden con otros datos en la literatura sobre la falta de respuesta de crecimiento a AMF en plantas de tomate bajo condiciones experimentales en invernadero (Jaizme-Vega, 2002; Diedhiou *et al.*, 2003). Además, Goicoechea *et al.* (2000) incluso llegaron a observar una depresión en el crecimiento de plantas micorrizadas y no infestadas en la asociación entre alfalfa y *G. mosseae*.

3.2.1.3. Efectos del hongo *Trichoderma harzianum*

A pesar de los múltiples resultados citados en la literatura donde *T. harzianum* muestra cierta estimulación del crecimiento vegetal (Windham *et al.*, 1986; Kleifeld y Chet, 1992; Pandey *et al.*, 2003), la respuesta de la planta frente a la inoculación con *Trichoderma* no es homogénea, ya que aunque la mayoría de las especies de *Trichoderma* no son normalmente perjudiciales para las plantas, razas concretas de *Trichoderma* son patogénicas para los cultivos y han sido documentadas como causantes de enfermedades en manzana, maíz y alfalfa. Algunas razas también pueden producir metabolitos altamente fitotóxicos (Bailey y Lumsden, 1998) e incluso, reducir el crecimiento vegetal, como recientemente mencionaron Radwan *et al.* (2012).

En nuestros ensayos *T. harzianum* no ejerció efecto sobre la mayoría de las variables de crecimiento de las plantas inoculadas, tal y como también observaron Martínez-Medina *et al.* (2009), donde *T. harzianum* no afectó el peso fresco de la parte aérea en tomate. Tampoco se observó efecto alguno sobre las plantas de tomate infestadas por *M. incognita*, en contraposición a lo documentado por Satyandra y Chaubey (2010). Únicamente, en

tomate cv. Durinta, la inoculación con *T. harzianum* aumentó el contenido en clorofila y disminuyó la temperatura de la cubierta vegetal de las plantas indicando que, el hongo oportunista *per se* mejoró el nivel nutricional de la planta, tal y como mencionaron Spiegel y Chet (1998) y Sharon *et al.* (2001).

3.2.1.4. Efectos de la interacción AMF × *Trichoderma harzianum*

La aplicación conjunta de *Glomus* spp. y *T. harzianum*, en tomate cv. Durinta, mostró mayores valores de peso seco de la parte aérea, en comparación con la micorrización exclusiva por *G. intraradices*, coincidiendo con los resultados de Camprubi *et al.* (1995), donde el crecimiento de *Citrus reshni* fue estimulado por la inoculación combinada de *G. intraradices* y *T. aureoviride*; y en contraposición con los resultados de Martínez-Medina *et al.* (2009), donde la inoculación dual de microorganismos disminuyó el peso fresco de la planta, en comparación con las plantas únicamente micorrizadas. También en cv. Durinta, se observó una interacción significativa entre *G. mosseae* y *T. harzianum*, los cuales en aplicación conjunta, redujeron significativamente la temperatura de la cubierta vegetal, en comparación con la aplicación individual de *G. intraradices*, *G. mosseae* o *T. harzianum*. Las plantas tienen mecanismos propios de regulación de la temperatura, destacando la transpiración. Este proceso, además de absorber energía, evita excesos de temperatura que puedan menguar el buen funcionamiento fisiológico y la integridad de las estructuras vegetales. La mayoría de la transpiración de la planta se realiza a través de los estomas y, en menor medida, por la cutícula. Cada especie posee una determinada capacidad de regulación de la propia temperatura y varía, en general, según la parte de la planta, del estado fisiológico y del estrés (Anglés, 2001), por lo que la mayor capacidad de reducción de la temperatura implica un estado fisiológico más sano en la planta.

El resto de variables relacionadas con el crecimiento y la productividad vegetal, en ambos cultivares, no se vieron afectadas de forma significativa por las interacciones o combinaciones de microorganismos, coincidiendo con Martínez-Medina *et al.* (2011), cuyas plantas de melón, coinoculadas con AMF y *T. harzianum*, no mostraron un efecto aditivo sobre el crecimiento y el estado nutricional de la planta.

3.2.2. EFECTOS SOBRE LA MICORRIZACIÓN

En el siguiente cuadro se muestra un resumen de los efectos de los factores individuales (nematodos, AMFs y *Trichoderma*) sobre las variables relacionadas con la micorrización en tomate, para los cultivares Durinta y Josefina.

| Tomate cv. Durinta | Nemátodo | AMFs | <i>T. harzianum</i> |
|---------------------|-------------------------|------|---------------------|
| Frecuencia, F% | ∅ > <i>M. incognita</i> | ns | ns |
| Intensidad, M% | ∅ > <i>M. incognita</i> | ns | ns |
| Int. media, m% | ns | ns | ns |
| Tomate cv. Josefina | Nemátodo | AMFs | <i>T. harzianum</i> |
| Frecuencia, F% | ∅ > <i>M. incognita</i> | ns | ns |
| Intensidad, M% | ∅ > <i>M. incognita</i> | ns | ns |
| Int. media, m% | ∅ > <i>M. incognita</i> | ns | ns |

ns. No significativo. ∅: sin inoculación de nemátodo, AMF u hongo oportunista.

3.2.2.1. Efectos de los nemátodos

Tanto en el cv. Durinta como en el cv. Josefina, se apreciaron reducciones en las variables de micorrización en presencia de *M. incognita*, excepto en m% en plantas de tomate cv. Durinta. En muchos casos, el establecimiento de la micorriza es afectado cuando los nemátodos son inoculados simultáneamente junto con los AMF, pero cuando el AMF ha colonizado las raíces antes de la infestación por el nemátodo las variables de micorrización se afectan levemente (Talavera *et al.*, 2002), siempre que el inóculo de nemátodos no sea demasiado elevado. Uno de los mecanismos propuestos para la reducción de la micorrización debida a la infestación por el nemátodo fue documentado por Jenkins y Taylor en 1967. Estudiaron cómo *M. javanica* invadió el cilindro vascular de la planta y los tejidos de alrededor se vieron afectados por la formación de las agallas. El transporte de agua y metabolitos a través de las raíces alteradas se interrumpió, y este hecho interfiere con el movimiento de metabolitos necesarios para el AMF. Sin embargo, aunque en nuestro estudio *M. incognita* fue inoculado varias semanas después que *Glomus* spp., permitiendo a la micorriza colonizar una elevada proporción de raíces antes de la infestación del nemátodo, el establecimiento de *Glomus* spp., en general, disminuyó debido a la infestación por *M. incognita*, probablemente debido a las altas densidades de inóculo utilizadas en nuestros ensayos. Este hecho se encuentra apoyado por el reducido porcentaje

de colonización y número de vesículas documentado en algunas interacciones micorriza-nemátodo (Smith y Kaplan, 1988; Camprubi *et al.*, 1993; Jaizme-Vega *et al.*, 1997).

3.2.2.2. Efectos de los AMFs

Los porcentajes de frecuencia e intensidad de micorrización y de intensidad de colonización media por fragmento, no mostraron diferencias en cuanto a la especie micorrícica inoculada, aunque en general, los tratamientos que incluyeron *G. intraradices* fueron los que mostraron valores mayores para estas variables.

3.2.2.3. Efectos del hongo *Trichoderma harzianum*

Los resultados obtenidos en nuestros ensayos indicaron que, *T. harzianum* no tuvo ningún efecto sobre las variables relacionadas con la micorrización. Estos resultados se apoyan en estudios como los de Camprubí *et al.* (1995) y Vázquez *et al.* (2000); y contrastan con el estudio de Calvet *et al.* (1992), donde *Trichoderma* spp. estimuló la germinación de esporas y el crecimiento del micelio de *G. mosseae*, y con el de Martínez-Medina *et al.* (2009), donde la presencia de *T. harzianum* incrementó la colonización radical por *G. intraradices*, *G. constrictum* y *G. claroideum*.

Aunque no se observaron interacciones o combinaciones significativas en el uso conjunto de ambos hongos, en relación a las variables de micorrización, los resultados documentados de las investigaciones previas sobre las interacciones entre *Trichoderma* y los AMFs difieren ampliamente, incluso cuando están involucradas las mismas especies de hongos. Por ejemplo, *Trichoderma* ha mostrado efectos antagonistas (Chu y Wu, 1981; Cook y Baker, 1983; Camporota, 1985; Wyss *et al.*, 1992; Rousseau *et al.* 1996; Brimner y Boland, 2003), neutrales (Fracchia *et al.*, 1998; Green *et al.*, 1999) y estimulantes (Calvet *et al.*, 1992; Godeas *et al.* 1999; Vázquez *et al.*, 2000; Martínez-Medina *et al.*, 2009) sobre la germinación de esporas y colonización de los AMF. Esta variación en la interacción entre AMF y *Trichoderma* podría atribuirse a las diferentes razas de las especies de hongos.

Martínez *et al.* (2004) indicaron que, *Trichoderma* afectó la colonización del AMF por influir sobre la fase presimbótica del hongo micorrícico. Adicionalmente, otros estudios indican que los hongos oportunistas pueden afectar el desarrollo y función del AMF cuando éste está dentro de la raíz (McAllister *et al.* 1994b, 1995).

T. aureoviride puede enrollar sus hifas alrededor de las hifas de otros hongos filamentosos. Este mecanismo se considera micoparasitismo y continúa con la penetración de la pared celular y la disolución del citoplasma en el hospedador (Calvet *et al.*, 1989). La penetración de *T. harzianum* en la pared celular de otros hongos se atribuye a la producción de enzimas (Zeilinger *et al.*, 1999), seguido por la liberación de antibióticos que evitan que el hospedador se restablezca (Lorito *et al.*, 1996). También se ha documentado la penetración de *T. harzianum* en esporas e hifas de *G. intraradices*, originando la disolución del citoplasma de ambas estructuras (Rousseau *et al.*, 1996).

La habilidad de *Trichoderma* spp. para impedir la colonización de las raíces de las plantas por los hongos micorrícicos parece ser dependiente del orden de inoculación de los hongos. Tal y como indicaron McAllister *et al.* (1994b), el porcentaje de colonización de las raíces por *G. mosseae* se redujo, solo cuando las plantas fueron inoculadas simultáneamente con *Trichoderma koningii* y *G. mosseae*, o cuando *T. koningii* se inoculó dos semanas antes que el AMF. Sin embargo, no hubo efecto sobre el porcentaje de colonización cuando *G. mosseae* se inoculó dos semanas antes que *T. koningii*. En nuestros experimentos evitamos este posible efecto supresor mediante una doble inoculación micorrícica (32 y 18 días antes), previa a la inoculación con *T. harzianum*.

3.2.3. EFECTOS SOBRE LA POBLACIÓN DE NEMÁTODOS

En el siguiente cuadro se muestra un resumen de los efectos de los factores individuales (AMFs y *Trichoderma*) sobre las variables relacionadas con la infestación por *M. incognita* en tomate, para los cultivares Durinta y Josefina.

| Tomate cv. Durinta | AMFs | <i>T. harzianum</i> |
|---------------------|--|-------------------------|
| Índice de agallas | ∅ > <i>G. mosseae</i> | ∅ > <i>T. harzianum</i> |
| Nº J2 + huevos | ns | ∅ > <i>T. harzianum</i> |
| Nº Hembras | ns | ∅ > <i>T. harzianum</i> |
| Eficacia Abbott | ns | <i>T. harzianum</i> > ∅ |
| Tomate cv. Josefina | AMFs | <i>T. harzianum</i> |
| Índice de agallas | ∅ > [<i>G. intraradices</i> , <i>G. mosseae</i>] | ∅ > <i>T. harzianum</i> |
| Nº J2 + huevos | ns | ns |
| Nº Hembras | ns | ns |
| Eficacia Abbott | ns | ns |

ns. No significativo. ∅: sin inoculación de AMF u hongo oportunista.

3.2.3.1. Efectos de los AMFs

La severidad de la enfermedad o índice de agallas se redujo en plantas micorrizadas por *G. mosseae* en tomate cv. Durinta y por *G. intraradices* o *G. mosseae* en tomate cv. Josefina, en comparación con las plantas sin micorrizar. Sin embargo, no se observaron efectos directos significativos de la micorrización sobre la densidad final de nemátodos, el número de hembras por maceta o la eficacia Abbott, para ninguno de los dos cultivares. En la literatura se recogen estudios que indican la reducción del daño que provocan los patógenos sobre las plantas, gracias al establecimiento de la simbiosis con el hongo AMF (Azcón-Aguilar y Barea, 1996; Bi *et al.*, 2007).

Además de los cambios en la capacidad de captación de nutrientes en el sistema radical, existen otros mecanismos del AMF responsables del control del patógeno radicular como son la compensación de los daños de la raíz, cambios morfológicos y anatómicos en el sistema radical, efecto micorrizosférico sobre las poblaciones microbianas, competición por los fotosintatos o por los sitios de colonización/infestación y activación de los mecanismos de defensa de la planta (Demir y Akkopru, 2005; Liu *et al.*, 2007). Adicionalmente, los tratamientos con *Glomus* spp. han sido documentados por incrementar los contenidos en fenilalanina y serina en las raíces de tomate (Suresh, 1980); estos aminoácidos presentan efectos inhibitorios sobre los nemátodos (Reddy, 1974). Varios estudios demostraron una inhibición de la actividad nematológica en plantas micorrizadas (Al-Raddad, 1995; Diedhiou *et al.* 2003). Sin embargo, Talavera *et al.* (2001) no revelaron diferencias entre las plantas micorrizadas y no micorrizadas cuando *G. mosseae* y *M. incognita* fueron inoculados simultáneamente. Esto sugiere que, no hay una única respuesta en las poblaciones de nemátodos a la inoculación mediante AMF y que, esta respuesta podría depender de las interacciones entre la planta hospedadora y el hongo. Se propone una cierta extensión de la micorrización para alcanzar un biocontrol suficiente. Saleh y Sikora (1984) demostraron que, se necesitó una micorrización del 38% por *G. fasciculatum* para el control de *M. incognita* en algodón. También se plantea la necesidad de una micorrización previa a la infestación (Talavera *et al.*, 2001).

3.2.3.2. Efectos del hongo *Trichoderma harzianum*

La inoculación con *T. harzianum* en tomate cv. Durinta redujo significativamente el índice de agallas, la densidad final de nemátodos y el número de hembras de *M. incognita*

presentes en las plantas infestadas e incrementó la eficacia Abbott para la reducción de las densidades de nemátodos. Estos resultados coinciden con los resultados documentados por Affokpon *et al.* (2011a) y Qureshi *et al.* (2012) sobre *M. incognita* y *M. javanica*, respectivamente. Este hecho podría ser explicado porque, algunas razas de *Trichoderma* pueden colonizar solo sitios locales sobre las raíces (Metcalf y Wilson, 2001); sin embargo, las especies rizosfera-competentes, como la que nosotros empleamos para nuestros estudios, colonizan las superficies completas de las raíces durante varias semanas (Thrane *et al.*, 1997) o incluso meses (Harman, 2000), estableciendo una zona de interacción donde *Trichoderma* libera moléculas bioactivas. El hongo también produce enzimas que estimulan las respuestas de resistencia de la planta, e incluso sus hifas pueden invadir la epidermis radical. La penetración del tejido de la raíz está normalmente limitada a la primera o segunda capa de células (Yedidia *et al.*, 1999; Yedidia *et al.*, 2000; Metcalf y Wilson, 2001); sin embargo, una raza de *Trichoderma stromaticum* fue hallada en el sistema vascular del cacao (Evans *et al.*, 2003). Por tanto, aunque en general, *Trichoderma* no rivaliza por el espacio con el nemátodo, existen algunas evidencias sobre cierta competencia ocasional. Otra teoría expone que, los nemátodos fitopatógenos podrían atacar las raíces pero, en presencia de *Trichoderma*, la infestación estaría reducida por las moléculas liberadas y por las alteraciones de la pared celular vegetal (Harman *et al.*, 2004). A pesar de los resultados documentados, en relación al eficaz control del hongo sobre los nemátodos fitoparásitos, la variabilidad de diferentes aislados en la supresión de los nemátodos agalladores depende de la patogenicidad de las especies fúngicas, adaptabilidad climática, el origen de los nemátodos e incluso de los cultivares estudiados (Harman, 2006; Sharon *et al.*, 2007). *Trichoderma* ha sido aislado en escasos huevos y hembras de nemátodos demostrando su pobre habilidad para parasitar estos patógenos (Siddiqui y Akhtar, 2008b), por lo que, no sería este mecanismo el principal implicado en el biocontrol de los nemátodos fitoparásitos.

También observamos la reducción en el índice de agallas en las plantas infestadas del cv. Josefina, aunque no causó efecto sobre el resto de variables relacionadas con la infestación por el nemátodo. El primer contacto de *T. harzianum* y *M. incognita* fue dos días después de la inoculación con el hongo oportunista y 20 días después del trasplante. Al no existir contacto previo al cultivo entre hongo y nemátodo, este hecho pudo ocasionar menor efectividad en la reducción de la enfermedad, tal y como relatan Dababat y Sikora (2007) en su estudio donde, el tratamiento del sustrato infestado por nemátodos con los aislados de *Trichoderma* en el momento del trasplante mostró una pobre reducción en el índice de agallas y, sin embargo, éste fue reducido significativamente cuando la inoculación

del hongo tuvo lugar una semana antes del trasplante. Por tanto, el nivel de biocontrol podría mejorar significativamente, y de manera especial en tomate cv. Josefina, si el nemátodo es expuesto a *Trichoderma* durante un periodo de tiempo prolongado antes del trasplante. También existen en la literatura datos que no arrojan resultados óptimos para el uso de *Trichoderma* en control de enfermedades, como los documentados por Spiegel y Chet (1998) y Dababat *et al.* (2006), que realizaron varios intentos en la utilización de diferentes especies de *Trichoderma* para el control de nemátodos parásitos de plantas, pero con niveles de control insatisfactorios.

3.2.3.3. Efectos de la interacción AMF × *Trichoderma harzianum*

En tomate cv. Durinta, el índice de agallas mostró su reducción más efectiva en la combinación de *G. mosseae* y *T. harzianum*, aunque no fueron diferencias significativas en relación a la aplicación individual de ambos hongos. Estos resultados se apoyan parcialmente en los obtenidos por Martínez-Medina *et al.* (2011), donde las plantas de melón coinoculadas con AMF y el hongo oportunista mostraron similar supresión de la enfermedad producida por *Fusarium* que las plantas inoculadas únicamente con *T. harzianum*. Habiendo podido comprobar anteriormente la capacidad individual supresora de la severidad de la enfermedad de *T. harzianum* y de *Glomus* spp., la explicación de esta falta de efecto sinérgico supresor entre el hongo oportunista y el AMF se apoyaría en los resultados documentados por Martínez-Medina *et al.* (2009), que observaron un efecto antagonista sobre la población de *T. harzianum* debida al AMF. Este hecho estaría basado en modificaciones de los exudados radicales originadas por el hongo micorrícico (McAllister *et al.*, 1995), influencia de las sustancias liberadas desde el micelio del AMF sobre las poblaciones microbianas (Filion *et al.*, 1999) y competición entre *Trichoderma* y el AMF en los primeros estadios (Green *et al.*, 1999; McAllister *et al.*, 1994b). Todos los tratamientos redujeron el número de nemátodos y hembras por maceta en relación al control, sin embargo, estas reducciones no fueron significativas. Como mecanismos de supresión se proponen la reducción en la eclosión, ya que *T. harzianum* es capaz de penetrar en la matriz de la masa de huevos, interferencia en el sitio de reconocimiento e invasión del hospedador, unión a la superficie radical, mortalidad de juveniles por la producción de metabolitos tóxicos y componentes nematocidas y alteración de los exudados específicos radicales que controlan el comportamiento de los nemátodos (Becker *et al.*, 1988; Racke y Sikora, 1992; Sahebani y Hadavi, 2008). Los tratamientos más efectivos en la reducción de la densidad final de nemátodos fueron los que combinaron *G. intraradices* y

T. harzianum y la aplicación individual del hongo oportunista. Según datos aportados por Martínez-Medina *et al.* (2009), la combinación de AMF y *T. harzianum* mostró un efecto sinérgico sobre el control de la enfermedad. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de Linderman (1988), donde AMF y el hongo oportunista funcionan en tándem para controlar la enfermedad en las raíces. Este incremento de biocontrol podría deberse a la combinación de agentes con modos de acción diferentes o complementarios, recreando la situación real de la rizosfera (Whipps, 2001).

Por su parte, en tomate cv. Josefina, los tratamientos más efectivos en la reducción del índice de agallas fueron los únicamente micorrizados y los que, además, incluyeron *T. harzianum*; sin embargo, aunque la combinación de ambos hongos alcanzó mayor efectividad que la utilización simple de la micorrización o el hongo oportunista, no llegaron a ser diferencias significativas. Masadeh *et al.* (2004) también obtuvieron igual comportamiento cuando combinaron *G. intraradices* y *Trichoderma viride* para biocontrol de nemátodos agalladores en tomate. La combinación de estos dos hongos no mostró efectos sinérgicos hacia *M. hapla* y *M. incognita*, en experimentos de invernadero. La razón podría deberse al antagonismo que presentan estos dos agentes. Incluso las interacciones de hongos saprófitos con AMF pueden diferir entre especies del mismo género. Por ejemplo, se observó competición entre *G. mosseae* y *Trichoderma koningii* (McAllister *et al.* 1994a, b), e interacción sinérgica entre *G. mosseae* y *Trichoderma aureoviridae* (Calvet *et al.* 1993). Además, los estudios que demostraron interacciones entre *G. intraradices* y *T. harzianum* han documentado tanto antagonismo (Green *et al.*, 1999; Rousseau *et al.*, 1996) como sinergismo (Datnoff *et al.*, 1995). Paralelamente, todos los tratamientos redujeron el número de nemátodos, independientemente de que los microorganismos se aplicaran individual o conjuntamente. Incluso existe literatura donde la combinación de microorganismos proporciona biocontrol nulo o negativo, en comparación con el uso individual de los agentes (Larkin y Fravel, 1998; De Boer *et al.* 1999). El número de hembras también fue reducido en todos los tratamientos, destacando aquellos únicamente micorrizados, únicamente inoculados con *T. harzianum* y el tratamiento que combinó *G. mosseae* y *T. harzianum*. Datnoff *et al.* (1995) observaron mayor efecto supresor sobre *Fusarium* con la combinación de *T. harzianum* y *G. intraradices*, que con algunos de los dos hongos aplicados individualmente. Además, Dong y Zhang (2006) y Sikora *et al.* (2008), documentaron que los exudados radicales de plantas micorrizadas estimulan a otros microorganismos beneficiosos presentes en el suelo, como *Trichoderma*. Destacó la mayor eficacia Abbott en los tratamientos con *T. harzianum*, *G. intraradices* o *G. mosseae*

individualmente y la acción conjunta de *G. mosseae* y *T. harzianum*, en comparación con las plantas control infestadas. Aunque las combinaciones de agentes de biocontrol se recomiendan para optimizar los beneficios potenciales de varios agentes (Meyer y Roberts, 2002), algunos estudios han demostrado los efectos nulos o negativos de aplicaciones de agentes combinados (Oyekanmi *et al.*, 2007), con incompatibilidad entre microorganismos causando una combinación menos efectividad que la aplicación de un agente individual (Meyer *et al.*, 2001). Existen casos en los que la incompatibilidad de los co-inoculantes puede aumentar y se inhiben entre sí, así como a los patógenos diana (Leeman *et al.*, 1996). Por tanto, un factor primordial para el desarrollo exitoso de las mezclas de especies es la compatibilidad de los microorganismos inoculados conjuntamente (Baker, 1990; De Boer *et al.*, 1997; Meyer y Roberts, 2002).

Por tanto, la compatibilidad entre los aislados fúngicos, el cultivar hospedador y el suelo juegan un importante papel en la proliferación, persistencia y eficacia de *Trichoderma* spp. Es esencial que los agentes de bioprotección y biocontrol sean capaces de coexistir, competir y persistir en el ambiente, colonizar rápidamente y proliferar con eficiencia sobre raíces recién formadas (Sariah *et al.*, 2005).

3.3. ENSAYO 3. EFECTOS DE LA MICORRIZACIÓN Y APLICACIÓN AL SUELO DE EXTRACTOS VEGETALES Y ACEITES ESENCIALES SOBRE EL PATOSISTEMA TOMATE-*M. INCOGNITA*

El interés mundial por respetar el medioambiente y la salud humana se encuentran asociados a la preocupación por el uso de pesticidas y nematicidas sintéticos. Las nuevas normas y principios para la consecución de una agricultura sostenible hacen, por tanto, necesaria la aplicación de métodos de control de nemátodos alternativos con nematicidas menos tóxicos (Noling y Becker, 1994). Los fitoquímicos son buenos candidatos porque pueden usarse como nematicidas por sí mismos, o pueden servir como modelos para el desarrollo de derivados sintetizados químicamente con actividad mejorada y/o respetuosos con el medioambiente (Chitwood, 2002; Park *et al.*, 2005). Además, muchos de los fitoquímicos, aunque ciertamente no todos, son más seguros para el medioambiente y la salud humana que los nematicidas químicos tradicionales. Recientemente, existe un interés creciente en la utilización de los extractos vegetales o los aceites esenciales como alternativas a los tratamientos nematicidas sintéticos (Deprasad *et al.*, 2000; Oka *et al.*, 2000a, b; Rodríguez-Kabana y Simmons, 2005; Douda *et al.*, 2010). Simultáneamente, los

aceites esenciales también pueden presentar actividad antifúngica (Fiori *et al.*, 2000; Cardenas-Ortega *et al.*, 2005) y antitermítica (Park y Shin, 2005).

Aunque los mecanismos de actuación de los fitoquímicos frente a patógenos del suelo no están claros, se puede proponer la producción de amoníaco y productos de descomposición, sustancias activas que los integran, cambios en la permeabilidad de la membrana y estimulación de agentes de protección o control biológicos (Oka *et al.*, 2000b; Abbasi *et al.*, 2005; Ntalli *et al.*, 2010). Por tanto, es importante conocer el control que ejercen los extractos vegetales y los aceites esenciales sobre los nemátodos agalladores.

3.3.1. EFECTOS SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCTIVIDAD VEGETAL

En el siguiente cuadro se muestra un resumen de los efectos de los factores individuales (nemátodos, AMFs y extractos vegetales) sobre las variables de crecimiento y productividad vegetal en tomate, para los cultivares Durinta y Josefina.

| Tomate cv. Durinta | Nemátodo | AMFs | Extractos |
|---------------------------|------------------------|--|--|
| Longitud parte aérea | ns | ns | [Ajo, Tomillo]>[Neem, Quassia, Ø] |
| Peso fresco parte aérea | ns | Año 1: <i>G. mosseae</i> > [<i>G. intraradices</i> , Ø] Año 2: <i>G. intraradices</i> >Ø | ns |
| Peso seco parte aérea | ns | <i>G. mosseae</i> > [<i>G. intraradices</i> , Ø] | ns |
| Peso fresco raíces | ns | ns | ns |
| Número de flores | ns | ns | ns |
| Número de frutos | ns | ns | ns |
| Peso fresco de frutos | ns | ns | ns |
| Contenido en clorofila | ns | ns | ns |
| Tª de la cubierta vegetal | <i>M. incognita</i> >Ø | ns | [Ajo, Neem, Tomillo] >Ø |
| Tomate cv. Josefina | Nemátodo | AMFs | Extractos |
| Longitud parte aérea | ns | ns | ns |
| Peso fresco parte aérea | ns | ns | ns |
| Peso seco parte aérea | ns | ns | ns |
| Peso fresco raíces | ns | ns | ns |
| Número de flores | ns | ns | ns |
| Número de frutos | ns | ns | ns |
| Peso fresco de frutos | ns | ns | ns |
| Contenido en clorofila | Año 1: ns Año 2: ns | Año 1: <i>G. intraradices</i> >Ø Año 2: <i>G. mosseae</i> >Ø | Año 1: Neem >Quassia Año 2: [Tomillo, Ø] > [Ajo, Neem, Quassia] |
| Tª de la cubierta vegetal | ns | ns | [Ajo, Neem, Tomillo] > [Quassia, Ø] |

ns. No significativo. Ø: sin inoculación de nemátodo, AMF o extracto vegetal.

3.3.1.1. Efectos de los nemátodos

La infestación por *M. incognita* no afectó a la mayoría de las variables de crecimiento y productividad vegetal de ambos cultivares de tomate. Exclusivamente en cv. Durinta, la presencia del nemátodo aumentó la temperatura de la cubierta vegetal, evidenciando el estrés hídrico provocado por la infestación. La temperatura de la cubierta vegetal se utilizó como un indicador del estrés hídrico del cultivo de caña de azúcar (Inman-Bamber y De Jager, 1986) y de trigo (Ehrler *et al.* 1978; Siddique *et al.*, 2000); también se emplea como un indicador del estrés vegetal inducido por hongos fitopatógenos y nemátodos fitoparásitos (Nicolas *et al.*, 1991). Smiley *et al.* (2005a) documentaron una temperatura de la cubierta vegetal 4°C más elevada en plantas control, que en las tratadas con Aldicarb, indicando el elevado estrés hídrico sufrido por la planta en suelos con alta población de *Pratylenchus neglectus*. Similares resultados se detectaron para trigo en suelos infestados por *P. thornei* (Smiley *et al.*, 2005b).

Al igual que en el ensayo con *Trichoderma*, las densidades de inóculo en nuestros ensayos fueron bastante elevadas, (año 1: 1532±49 y año 2: 1378±63 J2s por 500 cm³ de suelo, respectivamente), con la intención de observar reducciones en el crecimiento aún en el corto periodo de duración de los ensayos. Por tanto, la ausencia de efectos sobre las variables de crecimiento vegetal causados por los nemátodos, podría atribuirse o bien a la variabilidad observada en el crecimiento entre distintos plantones del mismo cultivar, en nuestras condiciones experimentales, o bien a una pérdida de efectividad del inóculo de nemátodos.

3.3.1.2. Efectos de los AMFs

En tomate cv. Durinta, la inoculación con *G. mosseae*, en el primer año de ensayo, y de *G. intraradices*, en el segundo, aumentó el peso fresco de la parte aérea; además, el peso seco de la parte aérea se vio incrementado en aquellas plantas micorrizadas por *G. mosseae*. En tomate cv. Josefina, únicamente el contenido en clorofila aumentó en el primer año de ensayo, con la inoculación de *G. intraradices*, y en el segundo año con la inoculación de *G. mosseae*. Esto datos coinciden con numerosos estudios, donde sus autores relatan la estimulación del crecimiento y productividad vegetal como consecuencia de la micorrización, como Ozgonen y Erkilic describieron en 2007.

3.3.1.3. Efectos de los extractos vegetales y los aceites esenciales

Nuestros resultados revelaron que, las plantas que recibieron aplicación de extracto de *A. sativum* o de aceite de *T. zygis* tuvieron mayores valores de longitud de la parte aérea en plantas de tomate cv. Durinta, no apreciándose ningún efecto fitotóxico en las variables de crecimiento debido a sus aplicaciones. En contraste, Chitwood (2002) documentó que, la inmersión de raíces de tomate en soluciones ricas en allicin, como medida profiláctica, presentó problemas de toxicidad para la planta.

A excepción del dato anteriormente mencionado, la aplicación de extractos y aceites no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de las plantas, como documentaron Ipsilantis *et al.* (2012). En cambio, otros aceites, como el de ricino, han destacado por mostrar mayor crecimiento longitudinal en las plantas donde se han aplicado (Katooli *et al.*, 2010). Rossner y Zebitz (1986) también indicaron que, las plantas de tomate infestadas con nemátodos agalladores en invernadero mostraron un incremento significativo en el crecimiento, en suelos que recibieron aceite de *A. indica*. Por el contrario, algunos aceites esenciales causaron una inhibición de la germinación, sugiriendo un potencial uso como bioherbicidas (Dudai *et al.*, 1999). Akut (1991) y Agbenin *et al.* (2004) documentaron reducciones iniciales en el crecimiento vegetal en invernadero, debidas al polvo de semilla de *A. indica*. El estudio de Agbenin *et al.* (2004) también reveló que, estas reducciones en el crecimiento vegetal revertían tras tres semanas, resultando en un aumento final en el crecimiento y productividad del tomate, lo cual sugiere que el polvo de semilla de *A. indica*, mezclado con el suelo en el trasplante, podría ser parcialmente fitotóxico, por lo que la aplicación debería realizarse 2-3 semanas antes del trasplante (Agbenin *et al.*, 2004). La disolución que utilizamos en nuestro ensayo, aunque aplicada según recomendación del fabricante, pudo igualmente haber desplegado cierto efecto tóxico para las plantas de tomate, pero no podemos asegurar si tras un determinado tiempo este efecto negativo hubiera revertido o, incluso, podría haber aumentado.

En cuanto a la productividad, en el primer año de ensayo, las plantas de tomate cv. Josefina inoculadas con aceite de *A. indica* mostraron mayor contenido en clorofila que las que recibieron extracto de *Q. amara*. En el segundo año, la aplicación de aceite de *T. zygis* o la ausencia de fitoquímico mostraron valores de contenido en clorofila mayores que el resto. En ambos cultivares de tomate, la aplicación de extracto de *A. sativum*, aceite de *A. indica* o de *T. zygis* aumentó la temperatura de la cubierta vegetal, indicando un posible efecto fitotóxico. Aunque no podemos determinar qué parte del efecto sobre la temperatura de la cubierta se atribuye al estrés ocasionado por la infestación del nemátodo

y cuál a la fitotoxicidad del aceite, Ntalli *et al.* (2010) documentó que el efecto negativo observado sobre las plantas podría deberse a la acumulación de productos de descomposición en el suelo, especialmente nitratos y nitrógeno amoniacal.

3.3.1.4. Efectos de la interacción AMF × Extractos vegetales y aceites esenciales

En cv. Josefina, las plantas con mayor contenido en clorofila fueron las micorrizadas exclusivamente por *G. mosseae* o la combinación de este hongo con aceite esencial de *T. zygis*. Estos resultados se apoyan parcialmente en los documentados por Nagesh *et al.* (1999b), que observaron que las micorrizas en combinación con enmiendas orgánicas de *A. indica* dieron mayores parámetros de crecimiento vegetal y productividad, comparados a las plantas tratadas con carbofuran; y sugieren, al menos, un efecto aditivo entre la micorrización y el aceite esencial de *T. zygis*.

3.3.2. EFECTOS SOBRE LA MICORRIZACIÓN

En el siguiente cuadro se muestra un resumen de los efectos de los factores individuales (nemátodos, AMFs y extractos vegetales) sobre las variables relacionadas con la micorrización en tomate, para los cultivares Durinta y Josefina.

| Tomate cv. Durinta | Nemátodo | AMFs | Extractos |
|---------------------|-------------------------|--|--|
| Frecuencia, F% | ∅ > <i>M. incognita</i> | <i>G. intraradices</i> > <i>G. mosseae</i> | <i>Quassia</i> > Tomillo |
| Intensidad, M% | ∅ > <i>M. incognita</i> | <i>G. intraradices</i> > <i>G. mosseae</i> | ns |
| Int. media, m% | ∅ > <i>M. incognita</i> | ns | ns |
| Tomate cv. Josefina | Nemátodo | AMFs | Extractos |
| Frecuencia, F% | ∅ > <i>M. incognita</i> | ns | Año 1: Tomillo > [Neem, <i>Quassia</i> , ∅] Año 2: <i>Quassia</i> > [Ajo, Neem, Tomillo, ∅] |
| Intensidad, M% | ∅ > <i>M. incognita</i> | ns | Tomillo > [Ajo, Neem] |
| Int. media, m% | ns | ns | ns |

ns. No significativo. ∅: sin inoculación de nemátodo, AMF o extracto vegetal.

3.3.2.1. Efectos de los nemátodos

La infestación por *M. incognita* redujo las variables de micorrización en ambos cultivares, a excepción de m% en el cv. Josefina. Estos resultados corroboran los obtenidos

por Paulitz y Linderman (1991), quienes determinaron que el desarrollo de las micorrizas se vio afectado por los nemátodos agalladores.

3.3.2.2. Efectos de los AMFs

En plantas de tomate cv. Durinta, F% y M% fueron más elevadas para *G. intraradices* que para *G. mosseae*. En el cv. Josefina, no existieron diferencias significativas entre las especies micorrícicas. Como documentaron Meier *et al.* (2012), la colonización micorrícica de la raíz estuvo altamente influenciada por las especies vegetales ensayadas.

3.3.2.3. Efectos de los extractos vegetales y los aceites esenciales

En tomate cv. Durinta y en el segundo año del ensayo con el cv. Josefina, el estudio de las variables de micorrización indicó que, las plantas que recibieron aplicación de extracto de *Q. amara* presentaron mayor F%, que las que recibieron aceite de *T. zygis*. Calvet *et al.* (2001a) mostraron que, la colonización micorrícica por *G. intraradices* en plantas de tomate fue afectada negativamente por los tratamientos con carvacrol y timol (presentes en el aceite esencial de tomillo), mientras la colonización por *G. mosseae* fue inhibida solo por timol. Por tanto, un efecto inhibitor del timol podría haber sido el causante de la menor frecuencia de micorrización observada en nuestros ensayos, en el tratamiento con aceite esencial de *T. zygis*. En cambio, durante el primer año de ensayos con el cv. Josefina se observó el efecto contrario ya que, las plantas tratadas con aceite de *T. zygis* mostraron mayor F% que las tratadas con extracto de *Q. amara*, por lo que los efectos de la aplicación de aceites y extractos vegetales sobre las variables de micorrización parecen ser también dependientes del cultivar o de las condiciones ambientales.

En el cv. Josefina, las plantas tratadas con aceite de *A. indica* mostraron menor F% y menor M% que las tratadas con aceite de *T. zygis* o *Q. amara*. Un estudio del impacto de los pesticidas biológicos sobre los AMF, realizado por Ipsilantis *et al.* (2012), determinó que la aplicación en maceta de azadirachtin ejerció inhibición selectiva sobre *Glomus etunicatum*, realizando cambios significativos y persistentes en la comunidad fúngica. Este hecho se explicaría por inhibición directa del azadirachtin sobre *G. etunicatum*. Wan y Rahe (1998) mostraron *in vitro* que azadirachtin poseía una baja toxicidad sobre *G. intraradices*, comparado con otros biopesticidas, pero que aun así ejercía efectos inhibitorios sobre la micorrización, tal y como hemos observado en nuestros ensayos.

En cuanto a los efectos positivos sobre la micorrización, observados con algunos extractos vegetales como el de *Q. amara*, Sankaranarayanan y Sundarababu (1997) y, más recientemente, Bharadwaj y Sharma (2006), documentaron el efecto positivo de las enmiendas orgánicas de restos de plantas utilizadas para extracción de aceites esenciales sobre la población de esporas de los AMF y la colonización micorrícica. La adición de estas enmiendas orgánicas podría influir sobre la fisiología de las plantas y provocar alteraciones en la naturaleza de los exudados radicales, lo cual mediaría en la colonización micorrícica.

3.3.2.4. Efectos de la interacción AMF × Extractos vegetales y aceites esenciales

En plantas de tomate cv. Durinta, el tratamiento que aunó *G. intraradices*, aceite de *A. indica* y *M. incognita* alcanzó mayores valores significativos de F%, en comparación con la combinación que incorporó *G. mosseae*; además, los mínimos valores de M%, correspondieron a los tratamientos que agruparon *G. mosseae*, aceite de *A. indica* o de *T. zygis* y *M. incognita*. Según estos resultados, podemos determinar que ciertos aceites esenciales, especialmente el procedente de *A. indica*, puede ejercer supresión sobre el desarrollo de *G. mosseae*, llegando incluso a reducir el crecimiento micelial. Además, en nuestros ensayos observamos, en el caso del cv. Josefina, interacciones significativas entre los AMFs y extractos o aceites, que se tradujeron en que el aceite de *T. zygis* aumentó la frecuencia de micorrización por *G. mosseae*, pero la redujo con *G. intraradices*, lo cual confirma la hipótesis sugerida por Trappe *et al.* (1984) de que, existe una variación genética inherente entre los AMF respecto a la tolerancia a los biopesticidas. La morfología de las esporas de los AMF destaca como una de las causas más probables de su diferente tolerancia a los posibles efectos tóxicos de los componentes de los aceites (Schenck y Pérez, 1988).

3.3.3. EFECTOS SOBRE LA POBLACIÓN DE NEMÁTODOS

En el siguiente cuadro se muestra un resumen de los efectos de los factores individuales (AMFs y extractos vegetales) sobre las variables relacionadas con la infestación por *M. incognita* en tomate, para los cultivares Durinta y Josefina.

| Tomate cv. Durinta | AMFs | Extractos |
|---------------------|--|------------------------|
| Índice de agallas | ∅ > <i>G. mosseae</i> | ns |
| Nº J2 + huevos | ns | ∅ > [Ajo, Neem] |
| Nº Hembras | ns | ∅ > [Ajo, Neem] |
| Eficacia Abbott | ns | Neem > [Quassia, ∅] |
| Tomate cv. Josefina | AMFs | Extractos |
| Índice de agallas | ∅ > [<i>G. intraradices</i> , <i>G. mosseae</i>] | ∅ > [Quassia, Tomillo] |
| Nº J2 + huevos | ∅ > [<i>G. intraradices</i> , <i>G. mosseae</i>] | ns |
| Nº Hembras | ∅ > [<i>G. intraradices</i> , <i>G. mosseae</i>] | ns |
| Eficacia Abbott | [<i>G. intraradices</i> , <i>G. mosseae</i>] > ∅ | ns |

ns. No significativo. ∅: sin inoculación de AMF o extracto vegetal.

3.3.3.1. Efectos de los AMFs

En el cv. Durinta, a pesar de que F% y M% fueron mayores en las plantas inoculadas con *G. intraradices*, fue *G. mosseae* el que redujo de manera significativa el índice de agallas; el resto de variables no se vieron afectadas por la micorrización. En el cv. Josefina, el índice de agallas y el número de nemátodos y hembras por maceta disminuyeron significativamente en las plantas micorrizadas, independientemente del AMF utilizado. De la Peña *et al.* (2006) consideraron que la supresión de los nemátodos, ocasionada por los AMF, no ocurre a través de una respuesta sistémica de la planta sino a través de mecanismos locales, aunque también pueden influir cambios fisiológicos en las raíces que provocan condiciones desfavorables para el desarrollo de los nemátodos, más que una directa competición por el espacio. Vos *et al.* (2012) sugirieron que, *G. mosseae* reduce el número de nemátodos agalladores mediante la intervención en las primeras etapas de la infestación, concretamente durante la penetración en la raíz, y en los siguientes estadios del ciclo de desarrollo, por tanto, el ciclo de vida del nemátodo se ralentizaría en raíces micorrizadas. El AMF podría afectar la movilidad o el comportamiento del juvenil para encontrar al hospedador en el suelo. Para penetrar en las raíces, los nemátodos se guían hacia un hospedador y sitio de infestación adecuados gracias a la exudación radical (Wuyts *et al.* 2006b; Curtis *et al.* 2009). La simbiosis micorrícica provoca diferencias cuantitativas y cualitativas en los exudados radicales (Jones *et al.*, 2004), en cuanto a los aminoácidos, flavonoides, compuestos fenólicos, azúcares y ácidos orgánicos (Lioussanne *et al.*, 2009). Debido a varios compuestos fenólicos, se han documentado efectos negativos sobre la quimiotaxis, movilidad y supervivencia de los nemátodos (Wuyts *et al.*, 2006a). Vos *et al.* (2011) observaron que, los exudados radicales desde plantas micorrizadas de tomate

redujeron la penetración radical de *M. incognita* y el juvenil fue paralizado temporalmente *in vitro*, cuando se expuso a estos exudados. Además, los nemátodos que encuentran un sitio de infestación también deben superar otras barreras como el refuerzo en la pared celular que se crea en las raíces micorrizadas. Dehne (1982) observó un incremento en la lignificación de las células radicales inducida por la colonización micorrícica; además de que, los mecanismos de defensa vegetal se activan transitoriamente en respuesta a la simbiosis micorrícica (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 2009).

3.3.3.2. Efectos de los extractos vegetales y los aceites esenciales

En relación a la infestación por el nemátodo, en el cv. Durinta, el índice de agallas no se vio afectado por la aplicación de extractos vegetales y aceites esenciales, coincidiendo con Grandison (1992) que no observó ningún efecto directo de las sustancias purificadas de semillas de *A. indica* sobre los juveniles de *M. javanica*. Sin embargo, en el cv. Josefina, esta variable relacionada con la infestación de *M. incognita* fue la única afectada ya que, el extracto de *Q. amara* y el aceite de *T. zygis* redujeron la severidad de la enfermedad. La mayor efectividad de los tratamientos que incorporaron estos aceites se reafirma, parcialmente, con los resultados aportados por Calvet *et al.* (2001a) donde el thymol ejerció control muy efectivo al no existir agallas en el sistema radical de las plantas infestadas por *M. javanica*, por Zouhar *et al.* (2009) que mostraron la supresión de *Thymus vulgaris* sobre *Ditylenchus dipsaci* y por Cetintas y Yarba (2010) donde, de entre los aceites ensayados, fueron el de *A. sativum* y el de *T. vulgaris* los que dieron mejores resultados como métodos de control de nemátodos de raíces en áreas de producción de tomate. Paralelamente, el efecto supresor del aceite de *Quassia* fue relatado por Chitwood (2002) que observó que los quassinoides, procedentes de la madera del árbol de *Quassia amara*, disminuyeron la movilidad en los nemátodos.

En plantas de tomate cv. Durinta, el extracto de *A. sativum* y el aceite de *A. indica* redujeron significativamente la densidad final de nemátodos y el número de hembras en planta, en comparación con la ausencia de extracto o aceite. Similares resultados ya habían establecido que, los aceites esenciales de determinadas plantas superiores son nematotóxicos e inhibidores de la eclosión de los huevos de *M. incognita* (Pandey *et al.*, 2000, *Eucalyptus melliodora* y *Ocimum basilicum*; Cristobal-Alejo *et al.*, 2006, *Eugenia winzerlingii*; Natarajan *et al.*, 2006, *Tagetes erecta*; Elbadri *et al.*, 2008, *Ocimum basilicum*; Ahmad *et al.*, 2010, *Lantana cámara*). Además, nuestros resultados presentaron al aceite de

A. indica como el más efectivo en la reducción de la densidad final de nemátodos. La aplicación de formulaciones de *A. indica* tras la invasión del nemátodo controla el desarrollo de éste, reduciendo el número de hembras y de masas de huevos (Javed *et al.*, 2007). Por tanto, se demuestra que, los metabolitos nematicidas de *A. indica* (amoniaco, fenoles, ácidos grasos y volátiles solubles en agua), liberados durante la descomposición del aceite fueron absorbidos por las raíces e interrumpieron el desarrollo y reproducción de los nemátodos que ya las habían invadido. Sin embargo, el principal inconveniente del aceite de *A. indica* es su ingrediente activo azadirachtin que se descompone rápidamente. Su breve efecto residual (5-7 días) hace necesarias varias aplicaciones (triple en nuestro ensayo), aunque los efectos sistémicos persisten durante más tiempo (Gahukar, 1995). La persistencia de las formulaciones de *A. indica* depende del modo en que son aplicadas y del tipo de formulación por lo que, los productos de tipo acuoso y aplicados en plantas directamente expuestas a la luz solar pueden perder su efecto (Javed *et al.*, 2007).

La eficacia en la reducción de la densidad final de nemátodos, conseguida en el tratamiento que incorporó exclusivamente aceite de *A. indica* en plantas de tomate cv. Durinta, alcanzó un 84,5%. Abbasi *et al.* (2005) mostraron una reducción del 67-90% en poblaciones de *Pratylenchus penetrans* y *M. hapla* en raíces de tomate.

Muchas investigaciones se han centrado en el estudio de aceites esenciales, primordialmente en los metabolitos secundarios del árbol de *A. indica* y en el amplio rango de formulaciones comerciales creadas a partir de ellos, con eficacia contra más de 400 especies de insectos (Akhtar *et al.*, 2008). Sin embargo, los productos refinados de azadirachtín han mostrado escasa eficacia contra *Meloidogyne* spp. (Javed *et al.*, 2007; Ntalli *et al.*, 2009), comparado con las enmiendas orgánicas de *A. indica*, probablemente debido a la acción sinérgica entre las sustancias presentes en las enmiendas pero eliminadas en los productos refinados (Ntalli *et al.*, 2010). Además, los diferentes productos derivados de neem contienen distintos niveles de ingredientes activos (Thoeming y Poehling, 2006).

A pesar de la eficacia demostrada por el aceite de *A. indica* en nuestros ensayos de invernadero, este aceite, frecuentemente, ha mostrado escasa eficacia bajo condiciones de campo. Este hecho ha sido principalmente atribuido a una baja acción sobre insectos (Schmutterer, 1988; Isman, 2006), inestabilidad en el almacenamiento (Immaraju, 1998), formulación inconsistente (Isman *et al.*, 1990) especialmente por la variabilidad en el contenido en azadirachtin (Sidhu *et al.*, 2003) y la degradación por luz, pH (Sundaram, 1996; Sundaram *et al.*, 1997; Caboni *et al.*, 2002, 2006), temperatura (Stark y Walter, 1995; Sundaram, 1996; Jarvis *et al.*, 1998; Barrek *et al.*, 2004;), y actividad microbiana (Stark y

Walter, 1995). Además, la efectividad en solitario del aceite de *A. indica* contrasta con los datos obtenidos por Javed *et al.* (2007), donde una formulación de azadirachtín sin tratar no detuvo la invasión de juveniles sugiriendo que, esta materia activa no fue absorbida o no fue tóxica para los nemátodos. Por tanto, un paso más en nuestra investigación sería el estudio futuro de sus propiedades nematicidas mediante ensayos en parcelas.

Todas estas consideraciones se podrían aplicar al resto de extractos y aceites testados y, de este modo, explicar la falta de reducción significativa de la infestación cuando se aplicaron individualmente. Además, Wang *et al.* (2007) documentaron una posible destrucción de los componentes con propiedades nematicidas en el proceso de destilación. En cualquier caso, aunque ciertos extractos o aceites reduzcan la eclosión de los huevos, no causan la muerte, probablemente debido a que la cubierta protectora del huevo protege a los juveniles J1 o J2 que se encuentran aún dentro, donde el componente nematicida del extracto o aceite no es capaz de penetrar (Oka, 2012).

El efecto nematicida de los extractos vegetales y aceites esenciales también puede ser atribuido a su elevado contenido de componentes oxigenados, los cuales son caracterizados por sus propiedades lipofílicas que les permiten disolver la membrana citoplasmática de las células de los nemátodos y sus grupos funcionales interfieren con la estructura de las proteínas enzimáticas (Knoblock *et al.*, 1989). La contribución de cada componente del aceite sobre la actividad nematicida es un modelo complicado de interacción. Lahlou (2004) concluyó que, la relación entre la composición del aceite y su actividad se atribuye, tanto a sus principales componentes como a los que se encuentran en menor cantidad, existiendo la posibilidad de que actúen conjuntamente de forma sinérgica o antagonista para contribuir a la toxicidad total del aceite. Conocer el modo de acción de los aceites es importante para el control de nemátodos ya que, podría aportar información sobre la formulación o aplicación más adecuada. Oka *et al.* (2000b) indicaron una relación estrecha entre las actividades nematicidas e insecticidas de los aceites esenciales. Enan (2001) y Kostyukovsky *et al.* (2002) evidenciaron una interferencia con el neuromodulador octopamina; y Miyazawa *et al.* (1998) observaron que los aceites esenciales de *Mentha* spp. inhibieron la actividad acetilcolinesterasa.

3.3.3.3. Efectos de la interacción AMF × Extractos vegetales y aceites esenciales

En tomate cv. Durinta, los tratamientos más efectivos en la reducción del índice de agallas fueron la interacción de *Glomus* spp. y extracto de *A. sativum*, *G. mosseae* y aceite de

A. indica, la aplicación individual de *Q. amara* y combinada con *G. mosseae* y la combinación de *G. mosseae* y aceite de *T. zygis*. En general, se observa el beneficio del tratamiento dual. A la eficacia bioprotectora del AMF, se unió uno de los componentes más importantes de *A. sativum*, allicin, que según datos recogidos por Chitwood (2002) es causante de la inhibición de la penetración de las raíces por los juveniles en un 50% y de la eclosión de *M. incognita*. Dialil-disulfuro, presente en el extracto de ajo, redujo el índice de agallas hasta un 20% (Calvet *et al.*, 2001a). Los datos obtenidos, sobre la mayor eficacia del aceite de *T. zygis* en el control de nemátodos, se apoyan en el estudio realizado por Soler-Serratos *et al.* (1996) usando *T. vulgaris*. Timol y carvacrol son monoterpenos fenólicos volátiles presentes en el aceite esencial de tomillo. La adición de timol al suelo redujo drásticamente las poblaciones finales de *M. arenaria*, *H. glycines*, *Paratrichodorus minor* y dorilaimidos. Oka *et al.* (2000b) encontraron que el aceite esencial de *T. vulgaris* redujo la movilidad de los juveniles y la eclosión de los huevos de *M. javanica*. Insunza *et al.* (2001a; 2001b) demostraron que la exposición a extractos acuosos de *Thymus serpyllum* fue letal en *Xiphinema index* y *X. americanum*. Además, el aceite esencial de tomillo y sus principales componentes son fungicidas y antibacterianos (Kurita *et al.*, 1981; Janssen *et al.*, 1987; Paster *et al.*, 1990; Panizzi *et al.*, 1993; Muller-Ribeau *et al.*, 1995; Daferera *et al.*, 2000; 2003), herbicidas (Tworkoski, 2002; Angelini *et al.*, 2003) e insecticidas (Duke *et al.*, 1992). Se encontró un mecanismo de bloqueo del sistema nervioso en timol y carvacrol en insectos (Ryan y Byrne, 1988) y, en consecuencia, un modo similar de acción podría proponerse para la acción del tomillo contra nemátodos (Korayem *et al.*, 1993). Del mismo modo, en un estudio conducido por Elbadri *et al.* (2008) se demostró que, de los aceites ensayados contra *Bursaphelenchus xylophilus*, uno de los más efectivos fue el de *T. vulgaris* mostrándose en los resultados un porcentaje significativamente menor de agallamiento y de masas de huevos.

En el cv. Josefina, para la variable índice de agallas, los tratamientos más efectivos en la reducción del índice de agallas fueron los que combinaron *Glomus* spp. con extracto de *Q. amara* o con aceite de *T. zygis* y la combinación de *G. mosseae* con extracto de *A. sativum*. Estas combinaciones redujeron en mayor medida la severidad de la enfermedad, aunque no de forma significativa al comparar con la aplicación individual del AMF o del fitoquímico.

En el cv. Durinta, contrariamente a lo apreciado en la variable índice de agallas, se podría determinar que en la reducción de la densidad final de nemátodos y del número de hembras en planta tuvieron mayor eficacia los tratamientos de los fitoquímicos

individuales, en comparación con aquellos combinados con AMF. La falta de eficacia de la combinación de tratamientos se justificaría por una incompatibilidad entre los AMF ensayados y los extractos vegetales o aceites esenciales. De este modo, la combinación podría frenar, en mayor medida, la entrada del nemátodo en las raíces de la planta pero, una vez infestadas, sería menos eficaz.

En cv. Josefina, el tratamiento más efectivo en la reducción de la densidad final de nemátodos fue el que combinó *G. mosseae* y extracto de *Q. amara*, cuyo valor no solo fue significativamente menor que en el tratamiento control sino también que en los tratamientos donde únicamente se aplicó extracto vegetal o aceite esencial. Este mismo tratamiento fue el más efectivo en la reducción del número de hembras en plantas. La potencial eficacia de los AMF como bioprotectores frente a los nemátodos fitoparásitos está bien documentada y a esto se une el potencial del extracto de *Q. amara* documentado por Mancebo *et al.* (2000), que mostraron su efecto inhibitor sobre *Hypsipyla grandella* al actuar en su modo de alimentación y crecimiento, o los datos mostrados por Flores *et al.* (2008) que determinaron la disuasión de *Bemisia tabaci* al utilizar extracto crudo o distintas fracciones de *Q. amara*, lo que podría explicarse por la presencia de quasinoídes como quasin y neoquasin (Polonsky, 1973).

Mediante el estudio de la eficacia Abbott, en cv. Durinta, comprobamos que no es necesaria la coinoculación con AMF ya que, en general, el aceite individualmente proporciona mayor eficacia que cuando fue combinado con el hongo o cuando se inoculó *Glomus* spp. exclusivamente. En plantas de tomate cv. Josefina, destacó la eficacia Abbott del tratamiento que agrupó *G. mosseae* y la aplicación de extracto de *Q. amara*; el resto de tratamientos individuales o combinaciones de factores no consiguieron incrementar significativamente esta variable en relación al control sin tratar.

Una vez discutidos todos los resultados obtenidos en cada cultivar de tomate en los dos años ensayados se aprecia que, las combinaciones de hongo micorrízico y extracto o aceite mostraron mejores resultados sobre determinadas variables relacionadas con la infestación por *M. incognita*, aunque mayoritariamente de forma no significativa, que cuando los factores fueron aplicados individualmente. No existe excesiva información sobre su actuación conjunta, aunque encontramos algunas investigaciones donde se utilizaron enmiendas orgánicas de plantas utilizadas para extracción de aceites esenciales. El uso de AMF en combinación con estas enmiendas orgánicas fue altamente beneficioso, debido a la reducción de la infestación de nemátodos y al incremento de la productividad (Rao *et al.*, 1995; Parvatha Reddy *et al.*, 1997; Sankaranarayanan y Sundarababu, 1997;

Bharadwaj y Sharma, 2006). En la literatura se documentó que, los cambios rizosféricos deseables, por adición de aceite de ricino al suelo, facilitaron la utilización efectiva de *G. fasciculatum* para el manejo de *M. incognita* en tomate (Rao *et al.*, 1997b).

En cualquier caso, resulta difícil comparar los resultados documentados en diferentes estudios debido a que, la composición de los aceites esenciales varía ampliamente dependiendo de la región geográfica, el cultivar, la edad de la planta y el método de secado y extracción del aceite.

A pesar de los resultados prometedores presentes en la literatura y de los favorables obtenidos en nuestros ensayos, se hacen necesarias investigaciones futuras para evaluar los aspectos económicos y determinar la concentración y tiempo de aplicación de los distintos aceites esenciales y de su viabilidad para el uso en campo o en invernadero ya que factores como la relación nemátodo-planta hospedadora, la fitotoxicidad para los cultivos y la estabilidad de los componentes nematicidas en el suelo (temperatura y pH), tienen que ser estudiados para obtener una eficacia máxima en el manejo. Otro importante factor, para un buen control utilizando preparaciones vegetales con componentes nematicidas, es el tipo de suelo. Sería lógico pensar que serían más efectivos en suelos ligeros, como los arenosos, que en los suelos pesados, porque en estos últimos los componentes activos podrían ser absorbidos por la arcilla e inactivados; además, el bajo contenido en materia orgánica y la buena aireación también contribuyen. Al igual que otros métodos alternativos, los extractos vegetales no son la solución definitiva para la protección de cultivos, pero deberían aplicarse especialmente en zonas donde se premia la seguridad y protección medioambiental.

Según nuestros resultados, se recomiendan estudios posteriores que incluyan evaluaciones en microparcels, con la finalidad de comprobar su efectividad en suelo. En estudios de campo pueden interferir otras variables sobre los compuestos como las propiedades del suelo, los microorganismos presentes y las condiciones ambientales. Igualmente, se recomienda realizar estudios sobre el efecto que estos extractos pueden tener en los microorganismos del suelo ya que, pueden existir efectos alelopáticos o tóxicos; así como, la evaluación del control de los extractos o aceites sobre otras especies de nemátodos.

3.4. DISCUSIÓN GENERAL SOBRE LOS EFECTOS DE LA INOCULACIÓN CON *M. INCOGNITA*

3.4.1. EFECTOS SOBRE EL CRECIMIENTO Y PRODUCTIVIDAD VEGETAL DEL TOMATE EN LOS TRES ENSAYOS

El ensayo realizado entre 2007-2008, donde se estudiaron los efectos de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y la bacteria hiperparásita, en plantas de tomate cv. Durinta, la mayoría de las variables de crecimiento y productividad decrecieron en presencia de *M. incognita*, como cabía esperar por la naturaleza parásita del nemátodo. Por su parte, las plantas de tomate cv. Josefina, aunque afectadas por el nemátodo, mostraron las variables de crecimiento y productividad sensiblemente menos perturbadas por la infestación de *M. incognita*. Este hecho denota una posible mayor tolerancia del cv. Josefina hacia la población de nemátodos ensayada.

Sin embargo, en los ensayos realizados entre 2009-2010, tanto en el que se estudiaron los efectos de *Trichoderma*, como en el que se testó la aplicación de extractos vegetales o aceites esenciales, la infestación por *M. incognita* no afectó, en general, el crecimiento ni la productividad vegetal de ambos cultivares de tomate. Esta ausencia de efectos sobre las variables podría atribuirse o bien a la variabilidad observada en el crecimiento y productividad entre distintos plantones del mismo cultivar, en nuestras condiciones experimentales, o bien a una pérdida de efectividad del inóculo de nemátodos.

3.4.2. EFECTOS SOBRE LAS VARIABLES DE MICORRIZACIÓN EN LOS TRES ENSAYOS

Nuestros estudios corroboran la literatura que documenta disminuciones en las variables de micorrización, como consecuencia de la infestación por nemátodos ya que, los resultados han mostrado que la infestación por *M. incognita* redujo la mayoría de las variables de micorrización, en todos los ensayos realizados. Excepcionalmente, en el cv. Durinta, en el estudio con bacterias, se observó que las plantas infestadas por *M. incognita* mostraron mayor frecuencia de micorrización que las no infestadas. Este aumento en la variable F%, podría estar relacionado con una proliferación radicular inducida por las especies de *Meloidogyne* alrededor de sus sitios de alimentación, lo que permitiría a los AMFs colonizar nuevas raíces y, con ello, incrementar el número de fragmentos micorrizados (Gera-Hol y Cook, 2005).

3.5. DISCUSIÓN GENERAL SOBRE EL EFECTO DE LA MICORRIZACIÓN

3.5.1. EFECTOS SOBRE EL CRECIMIENTO Y PRODUCTIVIDAD VEGETAL DEL TOMATE EN LOS TRES ENSAYOS

Los resultados evidencian que, existe variabilidad en los efectos de la micorrización sobre el crecimiento vegetal. En el primer ensayo realizado, se observó que la micorrización por *G. mosseae*, y en menor grado por *G. intraradices*, incrementó los valores de crecimiento y productividad vegetal en tomate cv. Durinta; en contraposición con lo ocurrido en tomate cv. Josefina, donde se observó incluso el efecto contrario. Por tanto, se confirma que, los efectos de la micorrización sobre el crecimiento y la productividad, en el caso del tomate, son dependientes del cultivar (Barker *et al.*, 1998). Similarmente, en el tercer ensayo, donde se estudió la aplicación de fitoquímicos en el suelo, los resultados también mostraron estimulación del crecimiento y la productividad vegetal como consecuencia de la micorrización, apoyando estudios previos como los de Ozgonen y Erkilic (2007).

Sin embargo, en el segundo ensayo, la inoculación de *Glomus* spp. no mostró efecto positivo, prácticamente en la totalidad de las variables, sobre el crecimiento y productividad de las plantas de tomate. Esta ausencia de estimulación en las plantas micorrizadas contrasta con la documentada capacidad de estos hongos para promover el crecimiento vegetal (Barea *et al.*, 2002; Tawaraya *et al.*, 2006); aunque coincide con otros datos sobre la falta de respuesta de crecimiento a AMF, en plantas de tomate bajo condiciones experimentales en invernadero (Jaizme-Vega, 2002; Diedhiou *et al.*, 2003).

3.5.2. EFECTOS SOBRE LAS POBLACIONES DE *M. INCOGNITA* EN LOS TRES ENSAYOS

Destaca la bondad obtenida en nuestros tres ensayos, en cuanto a los efectos reductores de *Glomus* spp. sobre la población de *M. incognita*, derivados de sus mecanismos protectores e incrementados por la micorrización de los plantones previa a la infestación (Talavera *et al.*, 2001), especialmente cuando la micorrización fue por *G. mosseae*, coincidiendo con Vos *et al.*, (2012).

CAPÍTULO III

EVALUACIÓN DEL USO COMBINADO DE LA SOLARIZACIÓN Y LA APLICACIÓN AL SUELO DE GALLINAZA PARA EL CONTROL DE *M. INCOGNITA* EN CULTIVOS DE CLAVEL PROTEGIDOS BAJO PLÁSTICOS

1. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un ensayo en campo para la evaluación de la efectividad al combinar la solarización del suelo y la aplicación de gallinaza (sin tratar o peletizada) en el control de *M. incognita*, en plantaciones de clavel protegido bajo plásticos en la zona de Chipiona, Cádiz.

1.1. LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO

Entre 2005 y 2010, se realizaron tres ensayos en campo, (experimento 1: 2005-2006, experimento 2: 2007-2008, experimento 3: 2009-2010), en un invernadero protegido bajo plásticos en el centro IFAPA en Chipiona, Cádiz, España, (36°44'56''N 6°24'06''W) (1.000 m²) (Figura 45a, b). El suelo del invernadero era arenoso-arcilloso (84% arena: 10% limo: 6% arcilla), pH 7,7, conductividad eléctrica 3,8 dS m⁻¹ y 0,5% materia orgánica y fue desinfectado, previamente a los ensayos, con Telopic c-35 (1,3-dicloropropeno 81,9% + cloropicrina 46,5%) por inyección a una dosis de 35 ml por m² dentro del sistema de irrigación. Tras cubrir la superficie del suelo con un film transparente de polietileno durante dos semanas, el suelo se descubrió y se dejó airear durante cuatro semanas previas a la inoculación con los nemátodos.

Figura 45a. Localización del invernadero utilizado en los ensayos (mapa).

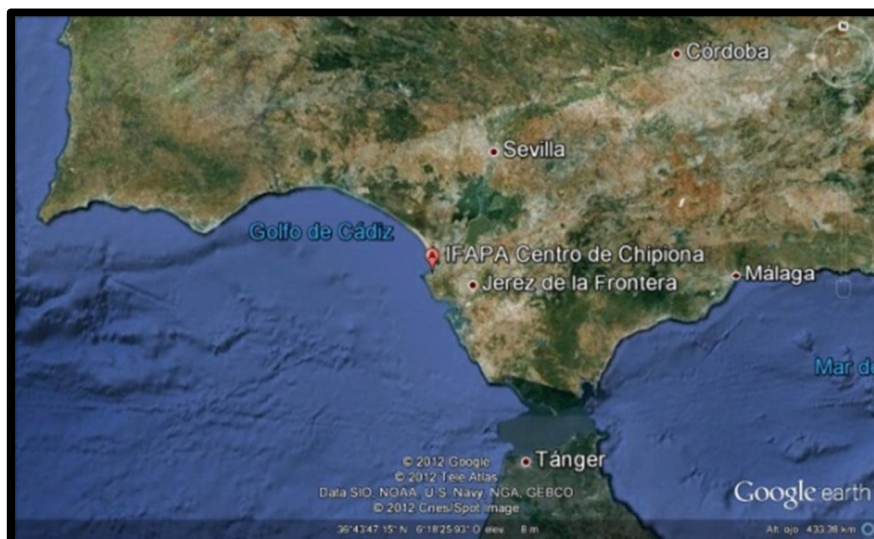


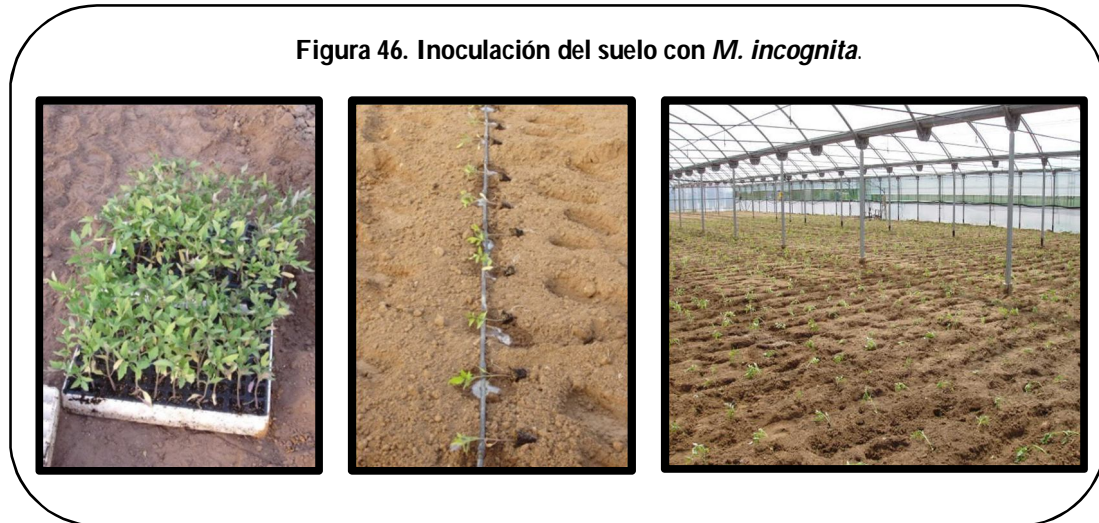
Figura 45b. Localización del invernadero utilizado en los ensayos (vista aérea).

Fuente:(Google Earth ©, 2012)

1.2. INOCULACIÓN DEL SUELO CON *M. INCOGNITA*

Se recuperaron hembras, huevos y juveniles de *M. incognita* desde raíces de tomate (Hussey y Barker, 1973) y muestras de suelo (Whitehead y Hemming, 1965) de un terreno cercano al centro IFAPA de Chipiona. Las hembras se utilizaron para identificar los nemátodos por su patrón perineal (Hartman y Sasser, 1985) y SCAR-PCR (Zijlstra *et al.*, 2000). Para la reproducción y el mantenimiento de la población se utilizaron los huevos y juveniles que se inocularon en plantas en macetas de tomate susceptible cv. Brillante.

El suelo del invernadero experimental se inoculó artificialmente con *M. incognita* mediante el trasplante de plantas de tomate cv. Brillante infestadas (2,5 plantas por m²), de dos semanas de edad, donde crecieron durante 6 semanas más (Figura 46). Las partes aéreas de las plantas se eliminaron, dejando las raíces enterradas en el suelo durante 8 semanas más. Posteriormente, el suelo del invernadero fue cuidadosamente labrado transversalmente, regado por goteo hasta capacidad de campo y preparado para los tratamientos.

Figura 46. Inoculación del suelo con *M. incognita*.

1.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

El terreno se dividió en 48 parcelas individuales de 24 m² (6 x 4 m). Previamente a los tratamientos, se estimaron las densidades de nemátodos en suelo para cada parcela, tomando muestras de suelo compuestas por unas 10 catas de 100 cm³ de suelo cada una, y estimando las densidades de nemátodos desde dos sub-muestras de 250 cm³ de suelo mezclado, según el método de las bandejas de Whitehead (Whitehead y Hemming, 1965). Se eligieron para los objetivos de este ensayo las 15 parcelas con las densidades de nemátodos más homogéneas. Los tratamientos se realizaron sobre 12 (ensayos 1 y 3) o 15 (ensayo 2) parcelas individuales utilizando un diseño de bloques completamente al azar (CRBD) con tres repeticiones. Como controles se incluyeron parcelas no tratadas y parcelas fumigadas con 1,3-dicloropropeno + cloropicrina. Las parcelas que recibieron enmiendas orgánicas se mantuvieron en la misma localización a lo largo de los tres ensayos consecutivos ya que, se ha citado que este tratamiento tiene un efecto de control de patógenos acumulativo a largo plazo, atribuible a un cambio gradual en las poblaciones microbianas (Lazarovits *et al.*, 2005). Las parcelas no tratadas y las fumigadas químicamente fueron reubicadas en los ensayos 2 y 3, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, con el propósito de utilizar parcelas con densidades medias iniciales de nemátodos homogéneas en cada ensayo. Cada año se realizaron análisis ANOVA, para comprobar la homogeneidad de las densidades de nemátodos antes de los tratamientos.

Las restantes parcelas no incluidas en el diseño experimental, se plantaron cada año tanto con clavel cv. Master (susceptible a *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* pero resistente a

Meloidogyne spp.) (Martini *et al.*, 1991), para comprobar y descartar la presencia de síntomas de marchitez por *Fusarium* o con cv. Pícaro (susceptible a *Meloidogyne* spp.), para mantener un rango de densidades de nemátodos en suelos en diferentes parcelas.

Los tratamientos aplicados a los suelos (cantidades y fechas de aplicación), las fechas de plantación del clavel y los periodos de cosecha, para cada ensayo de campo, se muestran en la tabla 39. Todos los tratamientos se repitieron al menos dos veces durante los tres años de ensayos.

Tabla 39. Tratamientos aplicados al suelo en una finca infestada por *M. incognita*, antes de la plantación de clavel cv. Pícaro, con indicación de las dosis aplicadas, fechas de plantación y periodos de cosecha.

| Ensayo 1(2005-06) | Ensayo 2(2007-2008) | Ensayo 3(2009-2010) |
|--|---|--|
| Control sin tratar | Control sin tratar | Control sin tratar |
| Solarización (24 junio- 22 julio, 2006) | Solarización (5 junio - 20 julio, 2007) | |
| Solarización + Gallinaza fresca (5 kg/m ²) (24 junio - 22 julio, 2005) | Solarización + Gallinaza fresca (2,5 kg/m ²) (5 junio - 20 julio, 2007) | Solarización + Gallinaza fresca (2,5 kg/m ²) (14 julio - 17 agosto, 2009) |
| | Solarización + Gallinaza pellet (3 kg/m ²) (5 junio - 20 julio, 2007) | Solarización + Gallinaza pellet (1,5 kg/m ²) (14 julio - 17 agosto, 2009) |
| 1,3-dicloropropeno 81,9% + cloropicrina 46,5% (40 ml/m ²) (7 julio-22 julio, 2005) | 1,3-dicloropropeno 81,9% + cloropicrina 46,5% (40 ml/m ²) (22 junio - 14 julio, 2007) | 1,3-dicloropropeno 81,9% + cloropicrina 46,5% (40 ml/m ²) (5 agosto - 17 agosto, 2009) |
| Fecha plantación: 28 julio, 2005 | Fecha plantación: 20 julio, 2007 | Fecha plantación: 27 agosto, 2009 |
| Periodo de cosecha: Diciembre 2005-Mayo 2006 | Periodo de cosecha: Diciembre 2007-Mayo 2008 | Periodo de cosecha: Diciembre 2009- Abril 2010 |

Las temperaturas del suelo a 15 y 30 cm de profundidad se registraron cada 5 minutos, en tratamientos de suelo solarizado y gallinaza, usando un registrador de temperatura Campbell, además de para el control no tratado, a lo largo del periodo de tratamiento del suelo. Las máximas temperaturas por hora de cada día se compararon para los diferentes tratamientos anteriormente mencionados.

1.4. APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS AL SUELO

Previamente a todos los tratamientos, el suelo de cada parcela individual fue minuciosamente arado, utilizando un cultivador (Rotavator, Howard Iberica S.A., Granollers, España), y, posteriormente, regado cada dos días (un total de 58 litros de agua por m²), para asegurar la humedad del suelo a una profundidad mínima de al menos 20 cm.

1.4.1. APLICACIONES DE GALLINAZA FRESCA O PELETIZADA

La gallinaza fresca sin tratar tuvo un contenido de 38,72% C y 3,42% N y se obtuvo desde granjas avícolas cercanas, mientras un producto comercial, Orgevit[®] (Memon B. V., Arnhem, Países Bajos) se utilizó como gallinaza peletizada (44,99% C, 5,33% N). Ambos productos se distribuyeron uniformemente sobre la superficie del suelo, antes de ser incorporados en la capa superior de 15 cm realizando un arado transversal y riego por goteo, hasta que el suelo alcanzó capacidad de campo (Figura 47). Las dosis de enmiendas orgánicas se redujeron al 50% desde el segundo año de aplicación. Cada parcela se cubrió con un film transparente de polietileno por el periodo indicado en la tabla 39.

Figura 47. Aplicación de gallinaza al suelo.

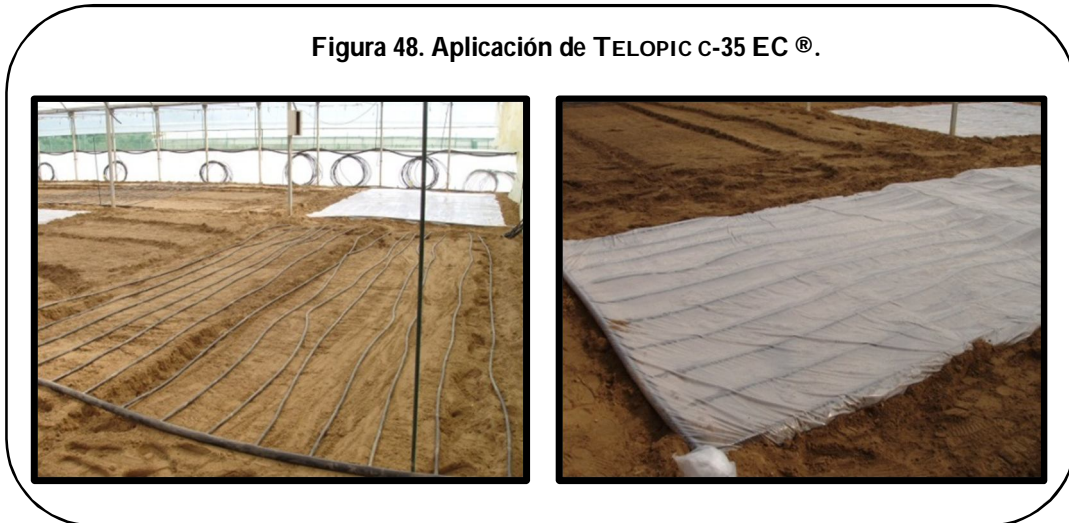


1.4.2. APLICACIÓN DE TELOPIC C-35 EC ®

Sobre el suelo de cada parcela a fumigar se colocó una red de 14 tubos de polietileno para riego por goteo (separados 25 cm) interconectados en el borde de la parcela. Los tubos de goteo (4 l por h) se espaciaron a intervalos de 33 cm (12 puntos de goteo por m²). El Telopic c-35 EC se aplicó en suelo a las dosis indicadas por el fabricante (40 ml/m²), utilizando este sistema de riego con un dispositivo tipo Venturi que inyectó la dosis del compuesto simultáneamente con un flujo de agua (22 litros m²). Se usaron films virtualmente impermeables (VIF) para cubrir las parcelas tratadas, lo cual fue precedido por un riego con agua (11 litros m⁻²), para humedecer ligeramente el suelo y seguido de un riego final similar, para lavar los tubos (Figura 48).

Después de 12 a 33 días, se eliminaron todos los films plásticos y se dejó airear el suelo durante 5 días. Se crearon montículos elevados (0,8 x 6 m) con los suelos tratados, en el centro de cada parcela, para la plantación de esquejes enraizados de clavel.

Figura 48. Aplicación de TELOPIC C-35 EC ®.



1.5. MANEJO DEL CULTIVO

Aproximadamente 120 esquejes enraizados de clavel cv. Picaro (susceptible a nemátodos agalladores) se plantaron en montículos elevados con cuatro líneas de plantas por parcela (20 cm entre líneas y con un espacio de 20 cm entre plantas dentro de cada línea) (Figura 49). A lo largo del periodo de crecimiento, se emplearon las prácticas de cultivo estándares de la zona, incluyendo un sistema de riego por goteo para proporcionar riego y nutrientes (ferti-irrigación). Las malas hierbas se eliminaron manualmente durante y entre cultivos. A los 9 meses se estableció una valoración estándar de la estación de crecimiento. Al término de cada ciclo de cultivo, se utilizó glifosato 36% (Roundup) (6 litros ha⁻¹) para matar las plantas, que fueron eliminadas del invernadero.

Figura 49. Manejo del cultivo.



1.6. VALORACIÓN DE LA INCIDENCIA Y SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD, INFESTACIONES Y PRODUCTIVIDAD DEL CLAVEL

Para valorar la severidad de la enfermedad a los seis y nueve meses tras la plantación, se desenterraron desde el suelo cuatro sistemas radicales por microparcela y se determinó el índice de agallas sobre una escala proporcional de 0 a 10, representado el 0 un sistema radical bien desarrollado y sano y 10 una planta muerta (Bridge y Page, 1980). A excepción del periodo desde principios de junio a octubre, el número acumulado de plantas muertas se registró a intervalos de 3 a 6 semanas, hasta el final de los ensayos, con un total de ocho valoraciones por ensayo. Sobre estos datos, expresados como porcentajes del total de plantas, se trazaron las curvas epidémicas para el desarrollo de la enfermedad y se calculó el

área estandarizada bajo la curva de progreso de la enfermedad (stAUDPC) a lo largo del periodo experimental, según la siguiente fórmula:

$$\text{stAUDPC} = (L_1 + 2(L_2 + L_3 + L_4 \dots + L_{N-1}) + L_N) \times T/2$$

Dónde:

L = Lectura (expresada en porcentaje)

L_N = Última lectura

L_{N-1} = Penúltima lectura

T = Tiempo entre lecturas

En todo el periodo de cultivo, la cosecha se realizó cuando las flores habían alcanzado el estado "paintbrush" (las flores están medio abiertas y los primeros pétalos perpendiculares al tallo); 80 plantas en los ensayos 1 y 2 y 88 en el ensayo 3 de un total de 120. Todas las plantas se tomaron del centro de cada parcela, para ignorar cualquier posible efecto "borde". La productividad se expresó como el número acumulado de tallos de flores (tallos por m²) al final de cada ensayo. La calidad de las producciones se valoró mediante la clasificación dentro de tres categorías comerciales estándares, en base a la longitud del tallo (extra: 60 a 70 cm, de primera: 50 a 60 cm, y de segunda < 50 cm). Los tallos de pobre calidad no se cosecharon. Aunque los valores de sus porcentajes sobre el total de la producción no se muestran, pueden ser fácilmente calculados mediante la diferencia entre el 100% y la suma de los porcentajes de las tres categorías comerciales.

1.7. VALORACIÓN DE LAS DENSIDADES DE POBLACIÓN DE NEMATODOS EN SUELO

Se recolectaron muestras de suelo compuestas, formadas por diez catas de suelo espaciadas alrededor de las zonas de crecimiento radicular del cultivo, hasta una profundidad de 20 cm con un tomador de muestras de tipo Auger (2,5 cm de diámetro), antes de los tratamientos (Pi), en el momento de plantar (P0), y 6 (P6) y 9 (P9) meses tras la plantación. Las muestras se mezclaron concienzudamente y los nemátodos se extrajeron de submuestras de 250 cm³ de suelo, utilizando el método de las bandejas de Whitehead (Whitehead y Hemming, 1965). Los juveniles (J2) que migraron al agua se recogieron tras 1

semana, fueron concentrados mediante filtrado a través de un tamiz de 25 μm de poro, contados y expresados como J2s por 100 cm^3 de suelo (media \pm error estándar).

1.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Statistix 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL). Se realizó ANOVA y análisis de correlación de Pearson entre variables para: a) densidades de nemátodos en suelo a diferentes tiempos de muestreo, b) índice de agallas a los 6 y 9 meses tras la plantación, c) porcentaje de plantas muertas, d) área estandarizada bajo la curva de progreso de la enfermedad (stAUDPC), e) producción acumulada de tallos, y f) porcentaje de productividad de las categorías de calidad. Los test de Shapiro-Wilk y Levene sirvieron para comprobar la normalidad y homocedasticidad de las variables. En el caso de ser significativos, los datos numéricos se transformaron con $\log(x+1)$ y los porcentajes fueron transformados con raíz cuadrada de arcoseno antes de ser analizados mediante ANOVA. Cuando los valores de F fueron significativos ($P < 0,05$), las medias se compararon mediante el test LSD protegido de Fisher al 95% de nivel de confianza. Los test de Kruskal-Wallis se utilizaron para los datos que no pudieron ser analizados con estadística paramétrica.

2. RESULTADOS

Los rangos de temperaturas del suelo máximas por hora en parcelas control no tratadas fueron [29,3-36,2°C] y [28,4-32,1°C] a 15 y 30 cm de profundidad respectivamente, lo cual contrasta con los respectivos rangos de [32,3-47,6°C] y [31,5-39,1°C] en parcelas con suelo solarizado. Para el tratamiento de gallinaza fresca + solarización, los rangos de temperatura máxima por hora fueron, respectivamente [33,5-41,0 °C] y [31,0-38,5 °C]. Cuando se comparó con las parcelas no tratadas, la solarización del suelo incrementó la temperatura entre 3 y 12 °C a los 15 de profundidad y entre 2 y 7°C a los 30 cm, mientras que los respectivos incrementos en el tratamiento gallinaza fresca + solarización estuvieron entre 4 y 5 °C y 2 y 7 °C, a los 15 y 30 cm de profundidad, respectivamente.

No se observó ningún síntoma de marchitez por *Fusarium* sobre el cultivar susceptible Master. Tampoco se aisló ningún hongo desde las plantas sintomáticas. Otros nemátodos fitoparásitos como *Tylenchus* sp., *Merlinius* sp. o *Paratylenchus* sp. se encontraron a muy bajas densidades (menos de 5 individuos por 100 cm³ de suelo). Sin embargo, estas especies no han sido documentadas como perjudiciales para clavel. En consecuencia, cualquier síntoma de enfermedad encontrado en las plantas, como retraso en el crecimiento, amarilleamiento, agallas en la raíz o muerte, fue atribuida a *M. incognita*.

2.1. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS DEL SUELO SOBRE LA INCIDENCIA Y SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD, INFESTACIONES Y PRODUCCIONES DE CLAVEL

Los datos de la enfermedad causada por *M. incognita* sobre plantas de clavel y sus productividades se muestran en la tabla 40.

Tabla 40. Incidencia de la enfermedad, severidad y producción de clavel cv. Pícaro cultivado en un campo infestado por *M. incognita*.

| Tratamientos ^v | Porcentaje plantas muertas | | Índice de agallas | | stAUDPC | Productividad ^x | Categorías (% tallos) ^y | | |
|---------------------------|----------------------------|------------------|-------------------|------------------|---------|----------------------------|------------------------------------|---------|---------|
| | 6 m ^z | 9 m ^z | 6 m ^z | 9 m ^z | | | Extra | Primera | Segunda |
| 2005-2006 | | | | | | | | | |
| No tratado | 21,8 a | 72,5 a | 4,1 a | 5,0 a | 77,8 a | 75 a | 47,3 a | 18,3 a | 4,7 a |
| SS | 8,4 a | 64,0 a | 4,4 a | 4,9 a | 70,8 a | 145 ab | 56,0 a | 22,3 a | 5,7 a |
| Gallinaza fresca+SS | 1,0 a | 22,8 b | 2,9 ab | 3,8 a | 48,5 b | 223 b | 54,0 a | 22,7 a | 13,7 b |
| 1,3D+Pic | 0,9 a | 8,7 b | 0,5 b | 0,8 b | 20,8 c | 362 b | 42,7 a | 24,3 a | 23,7 c |
| 2007-2008 | | | | | | | | | |
| No tratado | 21,7 a | 100,0 a | 3,1 a | 4,1 a | 43,0 a | 3 a | 0,0 a | 0,0 a | 33,3 a |
| SS | 5,8 a | 49,2 b | 2,9 a | 3,6 a | 16,0 ab | 76 ab | 5,7 ab | 40,3 b | 38,3 a |
| Gallinaza fresca+SS | 2,5 a | 10,0 bc | 2,7 a | 3,3 a | 3,1 b | 154 c | 12,7 b | 49,3 b | 30,7 a |
| Gallin. peletizada+SS | 0,0 a | 25,4 bc | 1,3 ab | 2,2 ab | 3,2 b | 134 bc | 14,3 bc | 46,7 b | 30,7 a |
| 1,3D+Pic | 0,0 a | 0,0 c | 0,8 b | 1,1 b | 0,0 b | 183 c | 14,3 b | 58,7 b | 22,0 a |
| 2009-2010 | | | | | | | | | |
| No tratado | 95,8 a | 100,0 a | 8,0 a | 8,0 a | 79,1 a | 0 a | 0,0 a | 0,0 a | 0,0 a |
| Gallinaza fresca+SS | 0,0 b | 7,6 b | 1,3 bc | 2,2 b | 2,1 b | 117 b | 0,0 a | 41,7 b | 51,0 b |
| Gallin. peletizada+SS | 0,0 b | 4,2 bc | 1,9 b | 3,2 b | 0,6 b | 118 b | 0,0 a | 38,3 b | 53,7 b |
| 1,3D+Pic | 0,0 b | 0,0 c | 0,5 c | 1,6 b | 0,0 b | 141 b | 0,0 a | 41,0 b | 52,3 b |

^v Abreviaturas: 1,3D (1,3-dicloropropeno); Pic (cloropicrina); SS (solarización del suelo).

^x Productividad expresada como tallos m⁻².

^y Categorías basadas en la longitud de los tallos: extra (60-70 cm), primera (50-60 cm) y segunda (<50 cm).

^z Tiempo tras el inicio del cultivo (meses).

Los valores medios para cada experimento y en cada columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente a $P < 0,05$, según el test LSD protegido de Fisher o el de Kruskal-Wallis.

2.1.1. EXPERIMENTO 1 (2005-2006)

Seis meses después del inicio del cultivo, el porcentaje promedio de plantas muertas en las parcelas no tratadas fue alrededor del 21,8% mientras que, en los tratamientos de fumigación química y gallinaza no tratada este porcentaje fue menor del 1%. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en estos porcentajes entre tratamientos. Tres meses más tarde, la incidencia de plantas muertas se incrementó a 64 y 72,5% en parcelas solarizadas y control no tratadas, respectivamente. Estos porcentajes fueron significativamente mayores en comparación con las parcelas fumigadas químicamente, con una incidencia por debajo de 9%, y en comparación con las parcelas con gallinaza fresca con una incidencia de 22,8% ($P=0,0004$) (Tabla 40). Además, los índices de agallas y los valores stAUDPC, calculados desde las curvas de enfermedad para los diferentes tratamientos, mostraron un modelo similar, con los valores más elevados observados en parcelas no tratadas y en las solarizadas, contrastando con los valores más bajos en los tratamientos fumigados químicamente ($P=0,0007$). Finalmente, las parcelas con gallinaza fresca obtuvieron el triple de producción, en comparación con el control no tratado. La producción total de clavel se mejoró, en gran parte, con la fumigación del suelo con 1,3-dicloropropeno + cloropicrina, antes del establecimiento del cultivo. Sin embargo, no se observaron diferencias en la calidad del tallo, excepto en la mayor proporción de tallos de segunda categoría producidos en las parcelas con gallinaza fresca y las químicamente fumigadas, ya que en las parcelas no tratadas y en las solarizadas el porcentaje de tallos no cosechados fue mayor (Tabla 40).

2.1.2. EXPERIMENTO 2 (2007-2008)

Durante este ensayo se observó la muerte total de las plantas en los controles no tratados, tan solo 9 meses después del inicio del cultivo. Este hecho contrasta con los valores nulos encontrados en los tratamientos fumigados químicamente y los bajos valores en parcelas tratadas con enmiendas orgánicas ($P= 0,0032$) (Tabla 40). Además, los índices de agallas fueron mayores en parcelas no tratadas, que en aquellas parcelas fumigadas químicamente, tanto a los 6 meses ($P=0,0021$) como a los 9 meses tras el inicio del cultivo ($P=0,0010$). El modelo stAUDPC fue análogo al de las incidencias de plantas muertas, y se observó una relación inversa para las producciones totales ya que, las producciones en parcelas fumigadas químicamente y en las tratadas con gallinaza fueron mayores que en las parcelas control no tratadas ($P=0,0008$). La calidad en la producción, tanto en tratamiento

químico del suelo como en orgánico, se mejoró, en comparación con las parcelas control no tratadas ($P=0,0160$ y $P= 0,0001$ para categorías extra y de primera, respectivamente). Se encontraron valores intermedios de todas las variables analizadas para el tratamiento de solarización del suelo, el cual mantuvo la incidencia de muerte por debajo de la mitad que el control (Tabla 40).

2.1.3. EXPERIMENTO 3 (2009-2010)

Todas las parcelas tratadas en el experimento 3 mostraron incidencias de muerte nulas en las plantas a los 6 meses tras el inicio del cultivo, en contraste con la incidencia media del 95,8% en las parcelas control no tratadas. Tres meses más tarde, la incidencia de plantas muertas en parcelas control fue del 100%, en oposición a las parcelas tratadas con 1,3-dicloropropeno + cloropicrina con una incidencia cero o a las parcelas enmendadas con gallinaza con incidencia inferior al 8% ($P=0,0002$). Los índices de agallas más elevados (8,0) se observaron en muestras de raíces de clavel procedentes de parcelas control no tratadas, tanto a los 6 como a los 9 meses tras el inicio del cultivo, en contraste con los valores de 0,5 y 1,6 para 1,3-dicloropropeno + cloropicrina y los valores de 1,3-1,9 y 2,2-3,2 para tratamientos con gallinaza, respectivamente a los 6 y 9 meses ($P=0,0001$). Similarmente, se encontró una reducción significativa en stAUDPC en todas las parcelas tratadas, en comparación con el control no tratado ($P=0,0001$). Mientras la producción de clavel fue nula en las parcelas control, la productividad en parcelas tratadas con 1,3-dicloropropeno + cloropicrina y en las parcelas enmendadas con gallinaza presentó una media de 125 tallos m^{-2} . La calidad del tallo también fue superior en estos tratamientos del suelo, dado que se produjeron mayores proporciones de tallos de primera categoría ($P=0,0001$) y, a pesar de eso, no se obtuvieron tallos de calidad extra (Tabla 40).

2.2. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS DEL SUELO SOBRE LAS DENSIDADES DE POBLACIÓN DE *MELOIDOGYNE* EN SUELO

Las densidades de población de nemátodos de los tres experimentos se muestran en la tabla 41. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las medias de las poblaciones iniciales de J2 de *M. incognita* encontradas en los diferentes tratamientos del suelo, en ninguno de los ensayos ($P=0,0001$).

Tabla 41. Densidades de población de *M. incognita* en suelo en diferentes momentos durante los ciclos de clavel cv. Picaro en tres experimentos.

| Tratamientos ^x | Densidades de poblaciones de nemátodos (J2) en suelo ^y | | | |
|---------------------------|---|--------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | Inicial (P _i) | Inicio del cultivo (P ₀) | 6 m ^z (P ₆) | 9 m ^z (P ₉) |
| 2005-2006 | | | | |
| No tratado | 73,7 ± 3,6 a | 46,8 ± 6,8 a | 472,8 ± 61,7 a | 666,3 ± 93,6 a |
| SS | 70,2 ± 6,2 a | 47,3 ± 8,0 a | 592,2 ± 91,9 a | 742,7 ± 102,5 a |
| Gallinaza fresca+SS | 72,8 ± 5,2 a | 16,8 ± 2,3 b | 151,8 ± 23,7 c | 208,3 ± 32,4 c |
| 1,3D+Pic | 80,8 ± 5,5 a | 8,8 ± 0,7 c | 224,8 ± 20,2 b | 301,3 ± 28,2 b |
| 2007-2008 | | | | |
| No tratado | 59,5 ± 3,2 a | 55,8 ± 6,5 a | 125,8 ± 33,7 a | 227,3 ± 55,0 a |
| SS | 59,0 ± 4,5 a | 21,7 ± 3,4 b | 63,8 ± 16,2 ab | 130,3 ± 36,3 ab |
| Gallinaza fresca+SS | 61,3 ± 2,6 a | 16,8 ± 3,4 bc | 118,0 ± 25,0 a | 256,7 ± 52,4 a |
| Gallin. peletizada+SS | 52,0 ± 2,2 a | 11,5 ± 1,7 cd | 81,5 ± 27,6 ab | 127,3 ± 37,3 ab |
| 1,3D+Pic | 56,0 ± 4,1 a | 10,5 ± 3,6 d | 4,3 ± 0,7 b | 9,7 ± 1,6 b |
| 2009-2010 | | | | |
| No tratado | 25,3 ± 2,2 a | 18,2 ± 0,8 a | 233,7 ± 19,5 a | 926,7 ± 102,0 a |
| Gallinaza fresca+SS | 26,0 ± 2,1 a | 8,5 ± 0,6 b | 54,3 ± 9,2 b | 109,7 ± 20,0 bc |
| Gallin. peletizada+SS | 26,7 ± 1,4 a | 9,5 ± 0,8 b | 65,0 ± 14,7 b | 230,0 ± 48,0 b |
| 1,3D+Pic | 24,0 ± 1,1 a | 2,7 ± 0,3 c | 33,0 ± 4,5 b | 50,1 ± 6,4 c |

^x Abreviaturas: 1,3D (1,3-dicloropropeno); Pic (cloropicrina); SS (solarización del suelo).

^y Los valores se expresan como la media ± error estándar. Los valores medios para cada experimento y en cada columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente a $P < 0,05$, según el test LSD protegido de Fisher o el de Kruskal-Wallis.

^z Tiempo tras el inicio del cultivo (meses).

2.2.1. EXPERIMENTO 1 (2005-2006)

Al inicio del cultivo, las densidades de nemátodos en suelo se redujeron significativamente en las parcelas con gallinaza fresca y en las que fueron fumigadas con 1,3-dicloropropeno + cloropicrina ($P=0,0001$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre parcelas solarizadas y no tratadas. A los 6 y 9 meses de cultivo, las densidades de nemátodos en suelo en las parcelas con gallinaza fresca y en las fumigadas químicamente permanecieron alrededor de 2-3 veces más bajas que en las parcelas solarizadas y en las control no tratadas. Curiosamente, las densidades de nemátodos en suelo de las parcelas con gallinaza fresca fueron incluso más bajas que en aquellas fumigadas químicamente ($P= 0,0060$) (Tabla 41).

2.2.2. EXPERIMENTO 2 (2007-2008)

Las densidades de nemátodos en el inicio del cultivo se redujeron en todos los tratamientos del suelo, incluyendo parcelas que fueron únicamente solarizadas, pero estas reducciones fueron significativamente mayores en parcelas químicamente fumigadas y en las tratadas con gallinaza peletizada ($P=0,0001$). Sin embargo, solo las parcelas tratadas con 1,3-dicloropropeno + cloropicrina mantuvieron las densidades más bajas que las parcelas no tratadas a los 6 meses ($P=0,0029$) y a los 9 meses de cultivo ($P=0,0026$) (Tabla 41).

2.2.3. EXPERIMENTO 3 (2009-2010)

Todos los tratamientos fueron efectivos en la reducción de las densidades de nemátodos en suelo al inicio del cultivo ($P=0,0001$). Los tratamientos con gallinaza y 1,3-dicloropropeno + cloropicrina fueron efectivos manteniendo las densidades de nemátodos más bajas que los controles no tratados tras 6 ($P=0,0016$) y 9 meses ($P=0,0003$) de crecimiento del clavel (Tabla 41).

2.3. CORRELACIÓN DE DENSIDADES DE POBLACIÓN DE NEMATODOS EN SUELO, INCIDENCIA DE LA ENFERMEDAD Y PRODUCCIONES DE CLAVEL

Las correlaciones entre las densidades de nemátodos J2 en suelo y las variables relacionadas con la enfermedad en los tres experimentos realizados se muestran en la tabla 42. Las poblaciones en suelo de J2 de *M. incognita* a los 6 o 9 meses estuvieron correlacionadas positivamente, en la mayoría de los casos, con los índices de agallas (excepto para el experimento 1), la incidencia de plantas muertas principalmente a los 9 y también a los 6 meses tras el inicio del cultivo (excepto para experimento 2) y stAUDPC (excepto para experimento 2). Además, en estos experimentos, las densidades de nemátodos a los 6 o 9 meses, tras el inicio del cultivo, se correlacionaron negativamente de forma significativa con las producciones de clavel (excepto para Y9 en el experimento 1). En el experimento 3, las poblaciones de J2 post-tratamiento y a los 6 y 9 meses se correlacionaron significativamente con todas las variables de enfermedad.

Tabla 42. Coeficientes de correlación lineal entre las densidades de población de *M. incognita* en suelo, incidencia y severidad de la enfermedad producida por los nemátodos agalladores y productividades del clavel cv. Pícaro.

| Variables enfermedad-productividad ^y | Post-tratamiento (J2) ^z | | | 6 meses (J2) ^z | | | 9 meses (J2) ^z | | |
|---|------------------------------------|----------------------|----------------------|---------------------------|----------------------|----------------------|---------------------------|----------------------|----------------------|
| | 2005-2006 | 2007-2008 | 2009-2010 | 2005-2006 | 2007-2008 | 2009-2010 | 2005-2006 | 2007-2008 | 2009-2010 |
| GI6 | 0,7575 (0,0043) | 0,1823 (0,5156) | 0,8551 (0,0004) | 0,5284 (0,0788) | 0,6898 (0,0044) | 0,9258 (0,0000) | 0,5384 (0,0709) | 0,7214 (0,0024) | 0,9356 (0,0000) |
| GI9 | 0,7797 (0,0028) | 0,2526 (0,3676) | 0,8223 (0,0010) | 0,4668 (0,1261) | 0,7678 (0,0008) | 0,8986 (0,0001) | 0,4792 (0,1150) | 0,7954 (0,0004) | 0,9578 (0,0000) |
| DP6 | 0,2125 (0,5073) | 0,6413 (0,0100) | 0,6771 (0,0156) | 0,6092 (0,0355) | 0,2867 (0,3001) | 0,8725 (0,0002) | 0,6111 (0,0348) | 0,3014 (0,2750) | 0,8216 (0,0010) |
| DP9 | 0,5480 (0,0651) | 0,8025 (0,0003) | 0,7434 (0,0056) | 0,7421 (0,0057) | 0,6443 (0,0095) | 0,9361 (0,0000) | 0,7201 (0,0083) | 0,6213 (0,0134) | 0,8891 (0,0001) |
| stAUDPC | 0,5059 (0,0934) | 0,7753 (0,0007) | 0,6866 (0,0137) | 0,6598 (0,0196) | 0,3883 (0,1526) | 0,8797 (0,0002) | 0,6284 (0,0286) | 0,3770 (0,1660) | 0,8317 (0,0008) |
| Y6 | - 0,4241 (0,1695) | - 0,5623 (0,0291) | - 0,7001 (0,0112) | - 0,7323 (0,0066) | - 0,7626 (0,0007) | - 0,6683 (0,0175) | - 0,7371 (0,0062) | - 0,7689 (0,0008) | - 0,7008 (0,0111) |
| Y9 | - 0,2682 (0,3994) | - 0,7509 (0,0013) | - 0,7809 (0,0027) | - 0,4621 (0,1304) | - 0,6266 (0,0124) | - 0,9062 (0,0000) | - 0,4832 (0,1115) | - 0,6011 (0,0178) | - 0,8782 (0,0002) |

^y Abreviaturas: GI6 y GI9 = log (índice de agallas 6 o 9 meses tras el tratamiento + 1); DP6 y DP9 = datos con transformación angular del porcentaje de plantas muertas a los 6 o 9 meses tras el tratamiento; stAUDPC = área estandarizada bajo la curva de progreso de la enfermedad; Y6 y Y9: productividades acumuladas de clavel a los 6 o 9 meses tras el tratamiento.

^z Densidades de nemátodos en suelo con transformación logarítmica (densidades de población de J2 en suelo +1). Entre paréntesis, niveles de significancia de valores de *P* para los coeficientes de correlación

3. DISCUSIÓN

En los últimos años se han alcanzado grandes avances en el control de varias enfermedades de plantas en numerosos cultivos mediante la aplicación de enmiendas orgánicas al suelo, generalmente, en conjunción con la cobertura plástica durante algunas semanas (Stapleton y Heald, 1991; Kaplan y Noe, 1993; Stapleton y Duncan, 1998; Lazarovits, 2001; Conn *et al.*, 2005; Lazarovits *et al.*, 2005; Lazarovits *et al.*, 2008). No obstante, el caso de la enfermedad causada por *Meloidogyne* en clavel es particularmente difícil de combatir dado que, la movilidad de sus juveniles les confiere la habilidad de escapar de las capas del suelo que presentan elevada temperatura, desplazándose a capas más profundas donde las temperaturas son inferiores. Este patógeno también tiene la habilidad de escapar de los compuestos tóxicos que gradualmente se liberan procedentes de la descomposición de la materia orgánica. Además, las plantas hospedadoras con ciclos de cultivo largos (frecuentemente bianual) proporcionan tiempo suficiente para que las poblaciones de nemátodos incrementen dentro del hospedador a lo largo de varias generaciones ya que, las temperaturas dentro de los invernaderos plásticos son óptimas para que *M. incognita* prospere la mayoría del año. Dados los satisfactorios resultados obtenidos con estos métodos de control contra la marchitez del clavel causada por *Fusarium* (Melero-Vara *et al.*, 2011), se podría esperar un razonable control de *M. incognita* en suelos moderadamente infestados por este nemátodo.

En todos los tratamientos y experimentos realizados en este estudio, las poblaciones del suelo de J2 de *M. incognita* y los índices de agallas incrementaron durante el periodo de 9 meses tras el inicio del cultivo y fueron, en muchos casos, significativa y positivamente correlacionados con la incidencia de plantas muertas y stAUDPC, y negativamente correlacionados con las productividades comerciales, pero se observó un marcado descenso en las densidades de nemátodos en suelo en todas las parcelas, durante periodos de ausencia del cultivo hospedador entre experimentos. Las temperaturas del suelo moderadamente altas, registradas durante estos periodos, podrían haber contribuido a la baja supervivencia de nemátodos entre cultivos, a pesar del nivel elevado de reproducción al final de cada ciclo de cultivo. El descenso en las densidades de población de nemátodos entre cultivos fue negativamente correlacionado con incrementos acumulados de temperatura del suelo durante ese periodo (Goodell y Ferris, 1989).

La fumigación química del suelo con 1,3-dicloropropeno+cloropicrina alcanzó reducciones significativas de densidades de J2 en suelo, índices de agallas e incidencias de plantas muertas durante al menos 9 meses en los tres experimentos, en comparación con los controles no tratados. La fumigación química, por tanto, fue el tratamiento más efectivo para reducir las densidades de nemátodos en suelo y para mantener bajos niveles en toda la estación de crecimiento. En consecuencia, el porcentaje más elevado de plantas muertas en este tratamiento, tras los primeros 9 meses de crecimiento, estuvo por debajo del 9%. Esto sugiere que, los suelos tratados con 1,3-dicloropropeno + cloropicrina en el estado de pre-plantación podrían sustentar producciones aceptables de tallos de clavel durante más de 9 meses o probablemente para más de un año, incluso cuando estos patógenos están presentes en el suelo. Además, este método de fumigación química ha demostrado una elevada efectividad en el control de la marchitez causada por *Fusarium*, con frecuencia la enfermedad más dañina y extendida del clavel a nivel mundial (Basallote-Ureba *et al.*, 2010).

Las bajas reducciones de las poblaciones de J2 de *M. incognita*, los mínimos niveles de control de la enfermedad y la semejanza de producciones para parcelas no tratadas y parcelas con suelo solarizado sugiere que, la solarización aplicada de forma individual no es suficientemente efectiva para el control de nemátodos en cultivos de clavel en áreas costeras del sur de España. La razón para esta falta de efecto probablemente puede atribuirse a un incremento insuficiente de la temperatura en las capas de suelo más profundas y una duración insuficiente del tratamiento. Estos resultados están apoyados en estudios previos (Stapleton y Heald, 1991; Gamliel y Stapleton, 1993a; Nico *et al.*, 2003) que mostraron que, para un control efectivo de *M. incognita* mediante la solarización del suelo se requería alcanzar unas temperaturas medias máximas superiores a 45°C (Wang y McSorley, 2008), las cuales solo se alcanzaron ocasionalmente a 15 cm de profundidad en el experimento 2. Esta temperatura es difícil de conseguir en esta región en otros periodos distintos a los meses óptimos para solarización de Julio a Agosto que, desafortunadamente, coinciden con la estación de inicio del cultivo más apropiada.

A pesar de una reducción del 50% en las dosis de las enmiendas con gallinaza en los experimentos 2 y 3, la aplicación repetida para las mismas parcelas en los tres experimentos dio lugar a un control eficaz de las poblaciones de nemátodos en suelo en el experimento 3. En los experimentos 1 y 3, las reducciones de las densidades de nemátodos en suelo se alcanzaron en el inicio del cultivo y a los 6 y 9 meses de crecimiento, en comparación a las

parcelas control no tratadas. Sin embargo, solamente se alcanzó un moderado control del patógeno en el experimento 2. Aunque en este experimento ambos tratamientos con gallinaza alcanzaron reducciones de densidades en el comienzo del cultivo, estas no se mantuvieron a los 6 o 9 meses de crecimiento. En cambio, las incidencias de plantas muertas, stAUDPC y las producciones de clavel tras los tratamientos de gallinaza en suelo no difirieron significativamente de aquellos obtenidos por los tratamientos químicos del suelo. Ninguna de las calidades de los tallos de las flores se vio afectada en ninguno de los tres experimentos y, a pesar de que las poblaciones de nemátodos fueron mayores, las productividades fueron similares a las obtenidas en parcelas fumigadas químicamente. Por tanto, pensamos que un sistema radical más saludable, un mejor nivel de nutrientes en la planta o condiciones medioambientales más favorables podrían haber contribuido a unos niveles más altos de reproducción de nemátodos.

En el control de nemátodos agalladores, los resultados de este estudio señalan niveles análogos de efectividad entre el actual tratamiento químico estándar y los dos tratamientos de enmiendas del suelo con gallinaza utilizados en este trabajo de investigación. Sin embargo, tras 9 meses, los índices de agallas más elevados observados en parcelas con gallinaza, en comparación con las parcelas fumigadas químicamente en experimentos 1 y 2, sugiere limitaciones para el control de la enfermedad a largo plazo, al menos durante los primeros años de tratamiento, destacando la necesidad de re-aplicaciones sucesivas al comienzo de cada nuevo ciclo de cultivo.

Esto sugiere que, estas enmiendas del suelo podrían también tener efectos favorables sobre los microorganismos beneficiosos, lo que podría contribuir a largo plazo al control de patógenos mediante mecanismos de supresión (Stapleton y Heald, 1991). La investigación, actualmente, está dirigida a establecer que otros mecanismos, aparte de los tóxicos volátiles liberados por la descomposición de la materia orgánica con una relativamente baja relación C: N, podrían estar involucrados en el control de patógenos del suelo (Gamliel y Stapleton, 1993a; Gamliel y Stapleton, 1993b; Gamliel *et al.*, 2000; Lazarovits, 2001; Tenuta y Lazarovits, 2004; Lazarovits *et al.*, 2005; Lazarovits *et al.*, 2008). Además, tras las enmiendas orgánicas del suelo, el mayor vigor de la planta debido a una mejoría de las características del suelo por una parte y a unos niveles de nutrientes mayores por la otra, ha permitido reducciones en la ferti-irrigación durante la estación de crecimiento sin afectar los rendimientos.

En años recientes, el uso de gallinaza sin tratar se está extendiendo y su eficacia como agente de control de patógenos está confirmándose, a nivel práctico por los mismos agricultores. Sin embargo, la utilización de la gallinaza peletizada como agente de control, que aporta un nivel similar de efectividad que la gallinaza sin tratar, podría ser una alternativa deseable debido a razones sanitarias o de comodidad para el agricultor. Este es el primer trabajo de investigación para contrastar la efectividad de la combinación de gallinaza sin tratar o peletizada y el método de solarización con la fumigación química con 1,3-dicloropropeno sobre las poblaciones del suelo de *Meloidogyne* y productividades de clavel.

Nuestros resultados muestran que, la implementación de enmiendas de gallinaza requiere mayor investigación para optimizar una efectividad sostenida. Aunque, el ahorro de costes asociados con la disponibilidad local, las bajas cuantías de transporte y el reciclaje de productos residuales de las granjas son factores que necesitan ser tomados en cuenta.

CONCLUSIONES

CAPÍTULO I

1. Los asesores técnicos estiman que un 17,7 % de las parcelas en la zona de Almería estaban infestadas por *Meloidogyne*, dentro de ellas un 18,8% de su superficie mostró síntomas de enfermedad causada por nemátodos, por lo que el área total cultivable infestada por *Meloidogyne* pudo estimarse próxima al 2,0% y las pérdidas de producción debidas a *Meloidogyne* en un 30,8%.
2. Un 38,1% de los técnicos consideró que, los problemas debidos a nemátodos agalladores se habían incrementado en los últimos 5 años.
3. El tratamiento más usual frente a *Meloidogyne* fue la fumigación química del suelo, mencionada en un 78,3 % de los casos.
4. Según los técnicos, los tratamientos más eficaces frente a *Meloidogyne* fueron la aplicación de nematicidas fumigantes en combinación con la solarización del suelo y el uso de variedades resistentes e injertos.
5. *Meloidogyne javanica* fue la especie más prevalente, seguida de *M. incognita* y *M. arenaria*. *Meloidogyne javanica* apareció con mayor frecuencia en áreas dedicadas al cultivo de tomate, mientras que *M. incognita* y *M. arenaria* predominaron en rotaciones que incluyeron pimiento.

CAPÍTULO II

1. La micorrización de plantas de tomate por especies de *Glomus* redujo la población final de *M. incognita* y, comparativamente, esta reducción fue mayor por *Glomus mosseae* que por *G. intraradices*.
2. *Pasteuria penetrans* fue más eficaz que las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en la reducción de la enfermedad causada por *M. incognita*, mostrándose el parasitismo como el mecanismo más eficaz en la lucha contra el nemátodo.
3. La colonización de las raíces de tomate por *B. megaterium* compensó la reducción del crecimiento vegetal ocasionada por *M. incognita* y redujo las poblaciones finales de *M. incognita*, en mayor grado que con la bacteria rizosférica *P. putida*.
4. No se detectó incremento en la eficacia en la reducción de las poblaciones de nemátodos por la combinación de AMFs y PGPRs para nuestras especies ensayadas.

5. La inoculación con *T. harzianum* y la aplicación de extractos vegetales y aceites esenciales en tomate cv. Durinta, redujeron la severidad de la enfermedad y la población final de *M. incognita*; sin embargo, en el cv. Josefina, únicamente redujeron la severidad de la enfermedad.
6. De entre los cuatro fitoquímicos ensayados, el aceite procedente de *A. indica* se presentó como el tratamiento más efectivo en la reducción de la densidad final de nemátodos.

CAPÍTULO III

1. La solarización aplicada de forma individual no es suficientemente efectiva para el control de nemátodos en cultivos de clavel en áreas costeras del sur de España, ya que la estación de crecimiento del clavel en esta región coincide, parcialmente, con el periodo más efectivo para la solarización.
2. La fumigación química del suelo con 1,3-dicloropropeno+cloropicrina fue el tratamiento más efectivo para reducir las densidades de nemátodos en suelo y para mantener bajos niveles en toda la estación de crecimiento.
3. La combinación de la solarización del suelo y la gallinaza, sin tratar o peletizada, fue ligeramente menos efectiva en el control del patógeno, en comparación con el actual tratamiento químico estándar; sin embargo, las producciones, tras nueve meses de crecimiento, fueron similares a aquellas obtenidas tras la fumigación química del suelo.
4. Las parcelas tratadas con gallinaza mostraron limitaciones para el control de la enfermedad a largo plazo, por lo que se necesitan re-aplicaciones sucesivas al comienzo de cada nuevo ciclo de cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Aalten, P. M., Vitour, D., Blanvillain, D., Gowen, S. R., Sutra, L., 1998. Effect of rhizosphere fluorescent *Pseudomonas* strains on plant parasitic nematodes *Radopholus similis* and *Meloidogyne* spp. *Letters in Applied Microbiology* 27: 357–361.
- Abbasi, P. A., Riga, E., Conn, K. L., Lazarovits, G., 2005. Effect of neem cake soil amendment on reduction of damping-off severity and population densities of plant-parasitic nematodes and soilborne plant pathogens. *Canadian Journal of Plant Pathology* 27: 38–45.
- Abbott, L. K., Robson, A. D., 1985. Formation of external hyphae in soil by four species of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 99: 257–265.
- Adekunle, O. K., Akinsanmi, O. A., 2005. Bioactivity of *Fusarium oxysporum* f. sp. glycines and *Sclerotium rolfsii* filtrates on egg hatching, survival and infectivity of juveniles of *Meloidogyne incognita* race 2. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 45 (1): 99-102.
- Affokpon, A., Coyne, D. L., Cho, C., Dossou, R., Lawouin, L., Coosemans, J., 2011a. Biocontrol potential of native *Trichoderma* isolates against root-knot nematodes in West African vegetable production systems. *Soil Biology and Biochemistry* 43 (3): 600-608.
- Affokpon, A., Coyne, D. L., Lawouin, L., Tossou, C., Dossou Agbèdè, R., Coosemans, J., 2011b. Effectiveness of native West African arbuscular mycorrhizal fungi in protecting vegetable crops against root-knot nematodes. *Biology and Fertility of Soils* 47 (2): 207-217.
- Afolabi, P., Davies, K. G., O’Shea, P. S., 1995. The electrostatic nature of the spore of *Pasteuria penetrans*, the bacterial parasite of root-knot nematodes. *Journal of Applied Bacteriology* 79: 244-249.
- Agbenin, N.O., Emechebe, A. M., Marley, P. S., 2004. Evaluation of neem seed powder for *Fusarium* wilt and *Meloidogyne* control on tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 37: 319-326.
- Agbenin, N. O., Emechebe, A. M., Marley, P. S., Akpa, A. D., 2005. Evaluation of nematicidal action of some botanicals on *Meloidogyne incognita* in vivo and in vitro. *Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics* 106: 29–39.
- Agra-Ceas Consulting, 2002. Integrated Crop Management Systems in the EU. European Commission, D. G. Environment. Brussels, Belgium. 141 pp.
- Ahmad, F., Rather, M. A., Siddiqui, M. A., 2010. Nematicidal activity of leaf extracts from *Lantana camara* L. against *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood and its use to manage roots infection of *Solanum melongena* L. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53(3): 543-548.
- Ahmad, J. S., Baker, R., 1987. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 77: 182-189.
- Ahmed, R., 1990. Studies on the infection of *Pasteuria penetrans* for the biological control of *Meloidogyne* species. Ph. D. dissertation, University of Reading, Reading, United Kingdom.
- Akhtar, M., Mahmood, I., 1994. Potentiality of phytochemicals in nematode control: a review. *Bioresource Technology* 48: 189–201.
- Akhtar, M. S., Siddiqui, Z. A., 2008a. Biocontrol of a root-rot disease complex of chickpea by *Glomus intraradices*, *Rhizobium* sp. and *Pseudomonas straita*. *Crop Protection* 27: 410-417.
- Akhtar, M. S., Siddiqui, Z. A., 2008b. *Glomus intraradices*, *Pseudomonas alcaligenes*, and *Bacillus pumilus*: effective agents for the control of root-rot disease complex of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of General Plant Pathology* 74 (1): 53-60.
- Akhtar, M. S., Siddiqui, Z. A., 2009. Use of plant growth-promoting rhizobacteria for the biocontrol of root-rot disease complex of chickpea. *Australasian Plant Pathology* 38: 44-50.
- Akhtar, Y., Yeoung, Y. R., Isman, M. B., 2008. Comparative bioactivity of selected extracts from Meliaceae and some commercial botanical insecticides against two noctuid caterpillars, *Trichoplusia ni* and *Pseudaletia unipuncta*. *Phytochemistry Reviews* 7: 77-88.
- Akköprü, A., Demir, S., 2005. Biological control of *Fusarium* Wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by AMF *Glomus intraradices* and some rhizobacteria. *Journal of Phytopathology* 153: 544-550.
- Akut, A. H., 1991. Unpublished B.Sc. Agriculture thesis of the Department of Crop Protection, Ahmadu Bello University, Zaria.

- Ali, N. I., Siddiqui, I. A., Shaukat, S. S., Zaki, M. J., 2002. Nematicidal activity of some strains of *Pseudomonas* spp. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 1051–1058.
- Al-Raddad, A. M., 1995. Interaction of *Glomus mosseae* and *Paecilomyces lilacinus* on *Meloidogyne javanica* of tomato. *Mycorrhiza* 5 (3): 233-236.
- Al-Rehiyani, S., Hafez, S. L., Thornton, M., Sundararaj, P., 1999. Effects of *Pratylenchus neglectus*, *Bacillus megaterium*, and oil radish or rapeseed green manure on reproductive potential of *Meloidogyne chitwoodi* on potato. *Nematopica* 29 (1): 37-49.
- Altomare, C., Norvell, W.A., Björkman, T., Harman, G. E., 1999. Solubilisation of phosphates and micronutrients by the plant-growth promoting biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Applied Environmental Microbiology* 65: 2926-2933.
- Al-Yahya, F. A., Alderfasi, A. A., Al-Hazmi, A. S., Ibrahim, A. A. M., Abdul-Razig, A. T., 1998. Effects of cereal cyst nematode on growth and physiological aspects of wheat under field conditions. *Pakistan Journal of Nematology* 16(1): 55-62.
- An, Q. L., Yang, X. J., Dong, Y. M., Feng, L. J., Kuang, B. J., Li, J. D., 2001. Using confocal laser scanning microscope to visualize the infection of rice roots by GFP-labelled *Klebsiella oxytoca* SA2, an endophytic diazotroph. *Acta Botanica Sinica* 43: 558-564.
- Analistas Económicos de Andalucía, 2009. Informe Anual del Sector Agrario en Andalucía 2009 Analistas Económicos de Andalucía. UNICAJA. Málaga, España. 439 pp.
- Anastasiadis, I. A., Giannakou, I. O., Prophetou-Athanasidou, D. A., Gowen, S. R., 2008. The combined effect of the application of a biocontrol agent *Paecilomyces lilacinus*, with various practices for the control of root-knot nematodes. *Crop Protection* 27: 352-361.
- Andrade, G., Mihara, K. L., Linderman, R. G., Bethlenfalvay, G. J., 1997. Bacteria from rhizosphere and hyphosphere soils of different arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 192: 71–79.
- Andreu-López, M., Salmerón-Parra, T., Martínez-Sierra, V., Tobar-Jiménez, A., 1986. Nemátodos fitoparásitos de los cultivos hortícolas de Trigueros (Huelva). *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas* 12: 319-322.
- Andrews, J. H., Harris, R. F., 2000. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annual Review of Phytopathology* 38: 145-180.
- Angelini, L. G., Carpanese, G., Cioni, P. L., Morelli, I., Macchia, M., Flamini, G., 2003. Essential oils from Mediterranean Lamiaceae as weed germination inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(21): 6158 – 6164.
- Anglés, M., 2001. Relaciones entre la temperatura del aire y de la planta. *Horticultura* 155: 1-8.
- Anitha, R., Murugesan, K., 2005. Production of gliotoxin on natural substrates by *Trichoderma virens*. *Journal of Basic Microbiology* 45: 12–19.
- Artursson, V., Finlay, R. D., Jansson, J. K., 2006. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology* 8: 1–10.
- Atibalentja, N., Jakstys, B. P., Noel, G. R., 2004. Life cycle, ultrastructure, and host specificity of the North American isolate of *Pasteuria* that parasitizes the soybean cyst nematode. *Journal of Nematology* 36 (2): 171-180.
- Augustin, B., Graf, V., Laun, N., 2002. Einfluss der Temperatur auf die Effizienz von Tomatenveredlungen gegenüber Wurzelgallenälchen (*Meloidogyne arenaria*) und der Korkwurzelkrankheit (*Pyrenochaeta lycopersica*). *Journal of Plant Diseases and Protection* 109: 371-383.
- Azcón, R., 1987. Germination and hyphal growth of *Glomus mosseae* in vitro: effect of rhizosphere bacteria and cell-free culture media. *Soil Biology and Biochemistry* 19: 417-419.
- Azcón, R., 1989. Selective interaction between free-living rhizosphere bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 21: 639-644.
- Azcón-Aguilar, C., Bago, B., 1994. Physiological characteristics of the host plant promoting an undisturbed functioning of the mycorrhizal symbiosis. In: Gianinazzi, S., Schüepp, H. (Eds.) *Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems*. Birkhäuser, Basel. Pp. 47-60.

- Azcón-Aguilar, C., Barea, J. M., 1992. Interactions between mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms. In: Allen, M. J. (Ed.) *Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process*. Chapman and Hall, New York. Pp. 163-198.
- Azcón-Aguilar, C., Barea, J. M., 1995. Saprophytic growth of arbuscular-mycorrhizal fungi. In: Hock, B., Varma, A. (Ed.) *Mycorrhiza structure, function, molecular biology and biotechnology*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany. Pp. 391-407.
- Azcón-Aguilar, C., Barea, J. M., 1996. Arbuscular mycorrhiza and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 6: 457-464.
- Azcón-Aguilar, C., Jaizme-Vega, M. C., Calvet, C., 2002. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil-borne plant pathogens. In: *Mycorrhizal Technology in Agriculture*. Gianinazzi, S., Schüepp, H., Barea, J. M., Haselwander, K. (Eds.) Birkhäuser Verlag, Switzerland. Pp. 187-197.
- Bagnasco, P., De La Fuente, L., Gaultieri, G., Noya, F., Arias, A., 1998. Fluorescent *Pseudomonas* spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 1317–1323.
- Bailey, B. A., Lumsden, R. D., 1998. In: *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 2 (Eds.) Kubicek, C. P., Harman, G. E. Taylor and Francis, London. Pp. 185–204.
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., Vivanco, J. M., 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annuals Review of Plant Biology* 57: 233-266.
- Baker, R. 1990. An overview of current and future strategies and models for biological control. In Hornby, D. (Ed) *Biological control of soil-borne plant pathogens*. CAB International, Wallingford, UK. Pp. 375–388.
- Barbosa, P., Lima, A. S., Vieira, P., Dias, L. S., Tinoco, M. T., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Figueiredo, A. C., Mota, M., 2010. Nematicidal activity of essential oils and volátiles derived from Portuguese aromatic flora against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of Nematology* 42(1): 8-16.
- Barea, J. M., 1997. Mycorrhizal/bacteria interactions on plant growth promotion. In: Ogoshi, A., Kobayashi, L., Homma, Y., Kodama, F., Kondon, N., Akino, S. (Eds.) *Plant growth-promoting rhizobacteria, present status and future prospects*, OECD, Paris. Pp. 150-158.
- Barea, J. M., Andrade, G., Bianciotto, V., Dowling, D., Lohrke, S., Bonfante, P., O’Gara, F., Azcón-Aguilar, C., 1998. Impact on arbuscular mycorrhiza formation of *Pseudomonas* strains used as inoculants for the biocontrol of soil-borne plant fungal pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2304–2307.
- Barea, J. M., Azcón, R., Azcón-Aguilar, C., 2002. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 343-351.
- Barea, J. M., Azcón-Aguilar, C., 1983. Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. In: Brady, N. C. (Ed.) *Advances in Agronomy*, vol. 36. Academic Press, New York. Pp. 1-54.
- Barea, J. M., Azcón-Aguilar, C., Azcón, R., 1996. Interactions between mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms within the context of sustainable soil-plant systems. In: *Multitrophic interactions in terrestrial systems*. Gange, A. C., Brown, V. K. (Eds.) Blackwell, Oxford, US. Pp. 195-212.
- Barker, K. R., Pederson, G. A., Windham, G. L., 1998. *Plant and nematode interactions*. Madison: American Society of Agronomy.
- Barrek, S., Paise, O., Grenier-Loustalot, M. F., 2004. Analysis of neem oils by LC-MS and degradation kinetics of azadirachtin-A in a controlled environment. Characterization of degradation products by HPLC-MS-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378: 753-763.
- Basallote-Ureba, M. J., Vela-Delgado, M. D., Macías, F. J., López-Herrera, C. J., Melero-Vara, J. M., 2010. Soil chemical treatments for the control of *Fusarium* wilt of carnation in Spain. *Acta Horticulturae* 883: 175-179.
- Becker, J. O., Zavaleta-Mejia, E., Colbert, S. F., Schroth, M. N., Weinhold, A. R., Hancock, J. G., Van Gundy, S. D., 1988. Effects of rhizobacteria on root-knot nematodes and gall formation. *Phytopathology* 78: 1466-1469.

- Bello, A., Arias, M., López-Pérez, J. A., García-Álvarez, A., Fresno, J., Escuer, M., Arcos, S. C., Lacasa, A., Sanz, R., Gómez, P., Díez-Rojo, M. A., Piedra-Buena, A., Goitia, C., de la Horra, J. L., Martínez, C., 2004. Biofumigation, fallow, and nematode management in vineyard replant. *Nematropica* 34 (1): 53-64.
- Bello, A., Escuer, M., Pastrana, J. A., 1994. Nemátodos fitoparásitos y su control en ambientes mediterráneos. En: *Patología Vegetal*. Llacer *et al.*, (Eds.) Sociedad Española de Fitopatología. Valencia, España. Pp. 1039-1069.
- Bello, A., Escuer, M., Pastrana, M. A., 1996. Nemátodos fitoparásitos y su control en ambientes mediterráneos. En: *Patología vegetal*. Tomo II. Llacer, A., López, M. M., Trapero, A., Bello, A. (Eds.) Sociedad Española de Fitopatología. Madrid, España. Pp. 1039-1069.
- Bello, A., López-Pérez, J. A., Díaz-Viruliche, L., 2000. Biofumigación y solarización como alternativa al bromuro de metilo. En: Castellanos, J. Z., Guerra, F., (Eds.) Memoria del Simposio Internacional de la Fresa, Zamora 2000, INCAPA, México. Pp. 24-50.
- Bello, A., López-Pérez, J. A., García-Álvarez, A., 2003. Biofumigación en agricultura extensiva de regadío. Producción integrada de hortalizas. CSIC-Caja Rural de Alicante, Mundiprensa. Madrid, España. 670 pp.
- Bello, L. Y., Chindo, P. S., Marley, P. S., Alegbejo, M. D., 2006. Effects of some plant extracts on larval hatch of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 39: 253-257.
- Berg, G., Hallmann, J., 2006. Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. In: *Soil biology. Microbial root endophytes*, vol. 9. Schulz, B., Boyle, C., Sieber, T. (Eds.) Springer Heidelberg, Germany. Pp. 53-69.
- Beyeler, M., Keel, C., Michaux, P., Haas, D., 1999. Enhanced production of indole-3-acetic acid by a genetically modified strain of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 affects root growth of cucumber, but does not improve protection of the plant against *Pythium* root rot. *FEMS Microbiology Ecology* 28: 225-233.
- Bhagawati, B., Goswami, B. K., Singh, C. S., 2000. Management of disease complex of tomato caused by *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through bioagent. *Indian Journal of Nematology* 30: 16-22.
- Bharadwaj, A., Sharma, S., 2006. Biocontrol of *Meloidogyne incognita* in *Lycopersicon esculentum* with AM fungi and oil cakes. *Journal of Plant Pathology* 5: 166-172.
- Bharadwaj, A., Sharma, S., 2007. Effect of some plant extracts on the hatch of *Meloidogyne incognita* eggs. *International Journal of Botany* 3(3): 312-316.
- Bhat, M. S., Mahmood, I., 2000. Role of *Glomus mosseae* and *Paecilomyces lilacinus* in the management of root knot nematode on tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 33: 131-140.
- Bi, H. H., Song, Y. Y., Zeng, R. S., 2007. Biochemical and molecular responses of host plants to mycorrhizal infection and their roles in plant defence. *Allelopathy Journal* 20: 15-27.
- Bianciotto, V., Bonfante, P., 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi: a specialized niche for rhizospheric and endocellular bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 81: 365-371.
- Bianciotto, V., Perotto, S., Ruiz-Lozano, J. M., Bonfante, P., 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria: from cellular investigations to biotechnological perspectives. In: Gianinazzi, S., Schüepp, H., Barea, J. M., Haselwandter, K. (Eds.) *Mycorrhiza technology in agriculture: from genes to bioproducts*. Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag. Pp. 19-31.
- Bird, A. F., 1986. The influence of the actinomycete, *Pasteuria penetrans*, on the host-parasite relationship of the plant-parasitic nematode, *Meloidogyne javanica*. *Parasitology* 93: 571-580.
- Bird, A. F., Brisbane, P. G., 1988. The influence of *Pasteuria penetrans* in weld soils on the reproduction of root-knot nematodes. *Revue de Nématologie* 11: 75-81.
- Bird, A. F., Brisbane, P. G., McClue, S. G., Kimber, R. W. L., 1990. Studies on the properties of the spores of some populations of *Pasteuria penetrans*. *Journal of Invertebrate Pathology* 55: 169-178.
- Bird, G. W., 1981. Integrated nematode management for plant protection. In: *Plant parasitic nematodes*, vol. II. Zucherman *et al.* (Eds.) Academic Press. New York, USA. Pp. 355-375.

- Brand, D., Roussos, S., Pandey, A., Zilioli, P. C., Pohl, J., Soccol, C. R., 2004. Development of a bionematicide with *Paecilomyces lilacinus* to control *Meloidogyne incognita*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 118: 81–88.
- Bridge, J., Page, S. L., 1980. Estimation of root-knot nematode infestation levels on roots using a rating chart. *Tropical Pest Management* 26: 296-298.
- Brimner, T. A., Boland, G. J., 2003. A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 100: 3-16.
- Brown, S. M., Kepner, J. L., Smart, G. C. Jr., 1985. Increased crop yields following application of *Bacillus penetrans* to field plots infested with *Meloidogyne incognita*. *Soil Biology and Biochemistry* 17: 483-486.
- Brussaard, L., Kuyper, T. W., de Goede, R. G. M., 2001. On the relationship between nematodes, mycorrhizal fungi and plants: functional composition of species and plant performance. *Plant and Soil* 232: 155-165.
- Burkett-Cadena, M., Kokalis-Burelle, N., Lawrence, K. S., van Santen, E., Kloepper, J. W., 2008. Suppressiveness of root-knot nematodes mediated by rhizobacteria. *Biological Control* 47: 55-59.
- Butt T. M., Jackson, C., Magan, N., 2001. Fungal biological control agents – appraisal and recommendations. In: *Fungi as Biocontrol Agents*. Butt, T. M., Jackson, C. and Magan, N. (Eds.) CAB International. Wallingford, Oxon, UK. Pp. 377-384.
- Caboni, P., Cabras, M., Angioni, A., Russo, M., Cabras, P., 2002. Persistence of azadirachtin residues on olives after field treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3491-3494.
- Caboni, P., Ntalli, N. G., Aissani, N., Cavoški, I., Angioni, A., 2012. Nematicidal activity of (E, E)-2, 4-decadienal and (E)-2-decenal from *Ailanthus altissima* against *Meloidogyne javanica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 1146-1151.
- Caboni, P., Sarais, G., Angioni, A., Garcia, A. J., Lai, F., Dedola, F., Cabras, P., 2006. Residues and persistence of neem formulations on strawberry after field treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 10026-10032.
- Calvet, C., Barea, J. M., Pera, J., 1992. *In Vitro* interactions between the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and some saprophytic fungi isolated from organic substrates. *Soil Biology and Biochemistry* 8: 775–780.
- Calvet, C., Pera, J., Barea, J. M., 1989. Interactions of *Trichoderma* spp. with *Glomus mosseae* and two wilt pathogenic fungi. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 29: 56-65.
- Calvet, C., Pera, J., Barea, J. M., 1993. Growth response of marigold (*Tagetes erecta* L.) to inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Pythium ultimum* in a peat-perlite mixture. *Plant Soil* 148: 1–6.
- Calvet, C., Pinochet, J., Camprubi, A., Estaún, V., Rodríguez-Kabana, R., 2001a. Evaluation of natural chemical compounds against root-lesion and root-knot nematodes and side-effects on the infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi. *European Journal of Plant Pathology* 107: 601-605.
- Calvet, C., Pinochet, J., Hernández-Dorrego, A., Estaún, V., Camprubi, A., 2001b. 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.
- Camporota, P., 1985. Antagonisme *in vitro* de *Trichoderma* spp. vis à vis de *Rhizoctonia solani* Khün. *Agronomie* 5: 613–620.
- Camprubi, A., Calvet, C., Estaún, V., 1995. Growth enhancement of *Citrus reshni* after inoculation with *Glomus intraradices* and *Trichoderma aureoviride* and associated effects on microbial populations and enzyme activity in potting mixes. *Plant and Soil* 173: 233-238.
- Camprubi, A., Pinochet, J., Calvet, C., Estaún, 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 and Soil* 153: 223–229.
- Cannayane, I., Sivakumar, C. V., 2001. Nematode egg-parasitic fungus I: *Paecilomyces lilacinus*-a review. *Annual Review of Phytopathology* 22: 79–86.

- Cantrell, I. C., Linderman, R. G., 2001. Preinoculation of lettuce and onion with mycorrhizal fungi reduces deleterious effects of soil salinity. *Plant and Soil* 233: 269-281.
- Cardenas-Ortega, N. C., Zavala-Sanchez, M. A., Aguirre-Rivera, J. R., Perez-Gonzalez, C., Perez-Gutierrez, S., 2005. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Chrysactinia mexicana* Gray. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4347-4349.
- Castilla, N., 2005. Análisis económico. Análisis medio-ambiental. En: *Invernaderos de plástico: Tecnología y Manejo*. Castilla, N. (Ed.) Mundi-Prensa. Madrid, España. Pp. 343-355.
- Castilla, N., 2007. *Invernaderos de plástico: Tecnología y Manejo*. Mundi-Prensa. Madrid, España. 462 pp.
- Céspedes, A. J., García, M. C., Pérez, J. J., Cuadrado, I. M., 2009. Caracterización de la explotación hortícola protegida almeriense. FIAPA. Almería, España. 178 pp.
- Cetintas, R., Yarba, M. M., 2010. Nematicidal effects of five plant essential oils on the southern root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* race 2. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9: 222-225.
- Channer, A. G., Gowen, S. R., 1988. Preliminary studies on the potential of *Pasteuria penetrans* to control *Meloidogyne* species. Proceedings of Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases, Brighton, UK, The British Crop Protection Council.
- Channer, A. G., Gowen, S. R., 1992. Selection for increased host resistance and increased pathogen specificity in the *Meloidogyne*-*Pasteuria penetrans* interaction. *Fundamental and Applied Nematology* 15: 331-9.
- Chellemi, D., 2002. Nonchemical management of soilborne pests in fresh market vegetable production systems. *Phytopathology* 92 (12): 1367-1372.
- Chen, J., Abawi, G. S., Zuckerman, B. M., 2000. Efficacy of *Bacillus thuringiensis*, *Paecilomyces marquandii*, and *Streptomyces costaricanus* with and without organic amendments against *Meloidogyne hapla* infecting lettuce. *Journal of Nematology* 32 (1): 70-77.
- Chen, L. L., Liu, L. J., Shi, M., Song, X. Y., Zheng, C. Y., Chen, X. L., Zhang, Y. Z., 2009. Characterization and gene cloning of a novel serine protease with nematicidal activity from *Trichoderma pseudokoningii* SMF2. *Fems Microbiology Letters* 299 (2): 135-142.
- Chen, Z. X., Dickson, D. W., 1997. A case study of nematode biocontrol using *Pasteuria penetrans*. *Journal of Nematology* 29: 573.
- Chen, Z. X., Dickson, D. W., 1998. Review of *Pasteuria penetrans*: biology, ecology, and biological control potential. *Journal of Nematology* 30 (3): 313-340.
- Chen, Z. X., Dickson, D. W., 2004. Biological control of nematodes with bacterial antagonists, in *nematology: Advances and perspectives*. vol. 2. *Nematode management and utilization* (Eds.) Chen, Z. X., Chen, S. Y., Dickson, D. W. Cambridge, MA: Tsinghua University Press and CABI Publishing. Pp. 1041-1082.
- Chen, Z. X., Dickson, D. W., McSorley, R., Mitchell, D. J., Hewlett, T. E., 1996. Suppression of *Meloidogyne arenaria* race 1 by soil application of endospores of *Pasteuria penetrans*. *Journal of Nematology* 28: 159-168.
- Chet, I., 1987. *Trichoderma*-application, mode of action, and potential as biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: Chet, I. (Ed.) *Innovative approaches to plant disease control*. John Wiley and Sons, New York. Pp. 137-160.
- Chet, I., Inbar, J., Hadar, Y., 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow, S. (Ed.) *Mycota environmental and microbial relationships*, vol. IV. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. Pp. 165-184.
- Chiarini, L., Bevivino, A., Tabacchioni, S., Dalmastrì, C., 1998. Inoculation of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter* sp on *Sorghum bicolor*: root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 81-87.
- Chitwood, D. J., 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual Review of Phytopathology* 40: 221-249.
- Cho, M. R., Kim, J. Y., Song, I. C., Ko, J. Y., Na, S. Y., Yiem, M. S., 1996. Screening of carnation cultivars for resistance to *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology* 28: 639-642.
- Chu, F. F., Wu, W. S., 1981. Antagonistic action of *Trichoderma* spp. and *Penicillium* spp. on *Rhizoctonia solani*. *Memoirs of the College of Agriculture*, vol. 21. National Taiwan University, Taipei. Pp 4-18.

- Ciancio, A., 1995. Phenotypic adaptations in *Pasteuria* spp. nematode parasites. *Journal of Nematology* 27 (3): 328-338.
- Cobb, N. A. 1918. Estimating the nema population of the soil. Agricultural Technology Circular Bureau. Plant Industry U.S. Department of Agriculture, N. 1.
- Cofcewicz, E. T., Medeiros, C. A. B., Carneiro, R. M. D. G., Pierobom, C. R., 2001. Interaction of arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus etunicatum* and *Gigaspora margarita* and root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in tomato. *Fitopatologia Brasileira* 26: 65-70.
- Coleman, D. C., Crossley, D., Hendrix, P., 2004. *Fundamentals of Soil Ecology* (2nd Ed.) Academic Press. New York, USA. 408 pp.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C., Barka, E. A., 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied Environmental Microbiology* 71: 4951-4959.
- Conn, K. L., Tenuta, M., Lazarovits, G., 2005. Liquid swine manure can kill *Verticillium dahliae* microsclerotia in soil by volatile fatty acids, nitrous acid, and ammonia toxicity. *Phytopathology* 95: 28-35.
- Cook, R. J., Baker, K. F., 1983. *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. St. Paul, MN: APS. 539 pp.
- Coolen, W. A., 1979. Methods for the extraction of *Meloidogyne* spp. and other nematodes from roots and soil. In: *Root-Knot Nematodes (Meloidogyne species) Systematics, Biology and Control*. Lamberti, F., Taylor, C. E. (Eds.) Academic Press. London, UK. Pp. 317-329.
- Cooping, L. G., 2001. *The Biopesticide Manual*, 2nd Edition. British Crop Protection Council. Alton, Hampshire, UK. 510 pp.
- Coosemans, J., 2005. Dimethyl disulphide (DMDS): a potential novel nematicide and soil disinfectant. *Acta Horticulturae* 698: 57-63.
- Cortada, L., Sorribas, F. J., Ornat, C., Andrés, M. F., Verdejo-Lucas, S., 2009. Response of tomato rootstocks carrying the Mi resistance gene to populations of *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* and *M. javanica*. *European Journal of Plant Pathology* 124: 337-343.
- Costa, S. S. R., Santos, M. S. N., Ryan, M. F., 2003. Effect of *Artemisia vulgaris* rhizome extracts on hatching mortality and plant infectivity of *Meloidogyne megadora*. *Journal of Nematology* 35: 437-442.
- Cotec, 2009. *Invernaderos de plástico*. Documentos Cotec sobre oportunidades tecnológicas 26. Fundación Cotec. Madrid, España. 102 pp.
- Coyne, D. L., Nicol, J. M., Claudius-Cole, B., 2007. *Practical Plant Nematology: A field and laboratory guide*. SP-IPM Secretariat. International Institute of Tropical Agriculture. Cotonou, Benim. 92 pp.
- Cristobal-Alejo, J., Tun-Suárez, J. M., Moguel-Catzin, S., Mabana-Mendoza, N., 2006. *In vitro* sensitivity of *Meloidogyne incognita* to extracts from native yucatecan plants. *Nematropica* 36: 89-97.
- Cuadra, R., Cruz, X., Fajardo, J. L., 1996. Cultivos de ciclo corto como plantas trampas para el control del nemátodo agallador. *Nematropica* 30: 241-246.
- Curtis, R. H. C., Robinson, A. F., Perry, R. N., 2009. Hatch and host location. In: Perry, R. N., Moens, M., Starr, J. L. (Eds.) *Root-knot nematodes*. CAB International, Wallingford. Pp. 139-162.
- Dababat, A. A., Hauschild, R., Sikora, R., 2006. Comparative effect of *Trichoderma* spp. and the mutualistic endophyte *Fusarium Oxysporum* 162 on *Meloidogyne incognita* infestation of tomato, 58th International Symposium on Crop Protection, Ghent University, (Abstract).
- Dababat, A. A., Sikora, R. A., 2007. Use of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* for the biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato. *Jordan Journal of Agricultural Science* 3 (3): 297-309.
- Dabiré, K. R., Mateille, T., 2004. Soil texture and irrigation influence the transport and the development of *Pasteuria penetrans*, a bacterial parasite of root-knot nematodes. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 539-543.
- Dabiré, R. K., Ndiaye, S., Mounport, D., Mateille, T., 2007. Relationships between abiotic soil factors and epidemiology of the biocontrol bacterium *Pasteuria penetrans* in a root-knot nematode *Meloidogyne javanica*-infested field. *Biological Control* 40: 22-29.

- Daferera, D. J., Ziogas, B. N., Polissiou, M. G., 2000. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungi toxicity on *Penicillium digitatum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48(6): 2576-2581.
- Daferera, D. J., Ziogas, B. N., Polissiou, M. G., 2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Crop Protection 22: 39-44.
- Dalmaso, A. A., Bergé, J. B., 1978. Molecular polymorphism and phylogenetic relationship in some *Meloidogyne* spp. Application to the taxonomy of *Meloidogyne*. Journal of Nematology 10: 323-332.
- Darban, D. A., Markhand, G. S., Jiskani, M. M., Chachar, Q., Mahar, A. N., 2005a. The effect of different initial spore concentrations of *Pasteuria penetrans* on the infection of root-knot nematodes over three host crop cycles. Indus Journal of Biological Sciences 2 (1S): 143-148.
- Darban, D. A., Pathan, M. A., Bhatti, A. G., Maitelo, S. A., 2005b. The effect of different initial densities of nematode (*Meloidogyne javanica*) on the build-up of *Pasteuria penetrans*. Journal of Zhejiang University Science 6: 113-118.
- Darban, D. A., Pembroke, B., Gowen, S. R., 2004. The relationship of time and temperature to body weight and number of endospores in *Pasteuria penetrans* infected *Meloidogyne javanica* females. Nematology 6: 33-36.
- Datnoff, L. E., Nemeč, S., Pernezny, K., 1995. Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. Biological Control 5: 427-431.
- Davies, K. G., 2005. Interactions between nematodes and microorganisms: bridging ecological and molecular approaches. Advances in Applied Microbiology 57: 53-78.
- Davies, K. G., 2009. Understanding the interaction between an obligate hyperparasitic bacterium, *Pasteuria penetrans* and its obligate plant-parasitic nematode host, *Meloidogyne* spp. Advances in Parasitology 68: 211-245.
- Davies, K. G., Flynn, C. A., Laird, V., Kerry, B. R., 1990. The life cycle, population dynamics, and host specificity of a parasite of *Heterodera avenae*, similar to *Pasteuria penetrans*. Revue de Nématologie 13: 303-309.
- Davies, K. G., Kerry, B. R., Flynn, C. A., 1988. Observations on the pathogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. Annals of Applied Biology 112: 491-501.
- Davies, K. G., Laird, V., Kerry, B. R., 1991. The mobility, development and infection of *Meloidogyne incognita* encumbered with spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. Revue de Nématologie 14: 611-618.
- De Araujo, F. F., Marchesi, G. V. P., 2009. Uso de *Bacillus subtilis* no controle da meloidoginose e na promoção do crescimento do tomateiro. Ciencia Rural 39 (5): 1558-1561.
- De Boer, M., Van der Sluis, I., Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., 1997. *In vitro* compatibility between fluorescent *Pseudomonas* spp. strains can increase effectivity of *Fusarium* wilt control by combinations of these strains. In Ogoshi, A., Kobayashi, K., Homma, Y., Kodama, F., Kondo, N., Akino, S. (Eds.) Plant growth-promoting rhizobacteria-present status and future prospects. Proceedings of the Fourth International Workshop on Plant Growth-promoting Rhizobacteria. OECD Workshop, Japan. Pp. 380-382.
- De Boer, M., Van der Sluis, I., Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., 1999. Combining fluorescent *Pseudomonas* sp. strains to enhance suppression of *Fusarium* wilt of radish. European Journal of Plant Pathology 105: 201-210.
- Decraemer, W., Hunt, D., 2006. Taxonomy and Principal Genera. Structure and classification. In: Plant Nematology. Perry, R., Moens, M. (Eds) CAB International. Wallingford, UK. Pp. 3-32.
- Dehne, H. W., 1982. Interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. Phytopathology 72: 1115-1119.
- De la Peña, E., Echeverría, S. R., Van der Putten, H. H., Freitas, H., Moens, M., 2006. Mechanism of control of root-feeding nematodes by mycorrhizal fungi in the dune grass *Ammophila arenaria*. New Phytologist 169: 829-840.

- Demir, S., Akkopru, A., 2005. Using of arbuscular mycorrhizal fungi for biocontrol of soil-borne fungal pathogens. In: Biological Control of Plant Diseases: Current Concepts. Chincholkar, S. B., Mukerji, K. G. (Eds.). Howarth Press, New York, USA.
- Deprasad, R. D., Singh, R. P., Ray, D., 2000. Chemical examination and nematicidal activity of the volatile and non-volatile fractions of *Tagetes erecta*. Annual Plant Protection Society 8: 212 – 217.
- Di Vito, M., Alba, V., Alba, E., Catalano, F., 2007. Effect of pokeweed (*Phytolacca americana* L.) extract on hatching of *Globodera rostochiensis* and *Meloidogyne* spp. Nematología Mediterránea 35: 41-45.
- Diedhiou, P. M., Hallmann, J., Oerke, E.-C., Dehne, H. W., 2003. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* on *Meloidogyne incognita* infestation on tomato. Mycorrhiza 13: 199–204.
- Diez, J. A., Dusenbery, D.B., 1989. Preferred temperature of *Meloidogyne incognita*. Journal of Nematology 21 (1): 99-104
- Djian, C., Pijaroufski, L., Ponchet, M., Arpin, N., 1991. Acetic acid, a selective nematicidal metabolite from culture filtrate of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samsan and *Trichoderma longibrachiatum* Rifai. Nematologica 37:101–102.
- Dong, L. Q., Zhang, K. Q., 2006. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. Plant and Soil 288: 31-45.
- Douda, O., Zouhar, M., Mazáková, J., Nováková, E., Pavela, R., 2010. Using plant essences as alternative mean for northern root-knot nematode (*Meloidogyne hapla*) management. Journal of Pest Science: 217-221.
- Dropkin, V. H., 1969. The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. Phytopathology 59: 1632–1637.
- Dube, B., Smant, G., 1987. Biological Control of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Pasteuria penetrans*. Journal of Nematology 19 (2): 222-227.
- Dudai, N., Poljakaoff-Mayber, A., Mayer, A. M., Putievsky, E., Lerner, H. R., 1999. Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. Journal of Chemistry and Ecology 25: 1079-1089.
- Duffy, B. K., 2001. Competition. In: Maloy, O. C., Murray, T. D. (Ed.) Encyclopedia of plant pathology. John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y. Pp. 243–244.
- Duke, J. A., James, L. F., Keeler, R. F., Bailey, E. M., Cheeke, P. R., Hegarty, M. P., 1992. Biting the biocide bullet. In: Duke J. A., Keeler R. F., Bailey E. M., Cheeke P. R., Hegarty M. P. (Eds.) Proceedings of the Third International Symposium "Poisonous Plants". Iowa State University Press, Ames, USA. Pp. 474–478.
- Duponnois, R., Ba, A., Mateille, T., 1999. Beneficial effects of *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas mendocina* for biocontrol of *Meloidogyne incognita* with the endospore-forming bacterium *Pasteuria penetrans*. Nematology 1 (1): 95-101.
- Durán, J. M., Retamal, N., Moratiel, R., 2009. Cuestiones relevantes, referidas al sector hortícola, para la definición de la política de seguros agrarios: situación actual y tendencias a corto y medio plazo. Centro de Estudios e Investigación para la Gestión de Riesgos Agrarios y Medioambientales (CEIGRAM). Madrid, España. 124 pp.
- Eapen, S. J., Beena, B., Ramana, K. V., 2005. Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. Journal of Invertebrate Pathology 88: 218–225.
- Ebert, D., Rainey, P., Embley, T. M., Scholz, D., 1996. Development, life cycle, ultrastructure and phylogenetic position of *Pasteuria ramosa* Metchnikoff 1888: rediscovery of an obligate endoparasite of *Daphnia magna* Straus. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 351: 1689–1701.
- Elbadri, G. A. A., Lee, D. W., Park, J. C., Yu, H. B., Choo, H. Y., Lee, S. M., Lim, T. H., 2008. Nematocidal screening of essential oils and herbal extracts against *Bursaphelenchus xylophilus*. Plant Pathology Journal 24: 178-182.
- Ehrler, W. L., Idso, S. B., Jackson, R. D., Reginato, R. J., 1978. Wheat canopy temperature in relation to plant water potential. Agronomy Journal 70: 251-256.

- El-Hadad, M. E., Mustafa, M. I., Selim, S. M., Mahgoob, A. E. A., El-Tayeb, T. S., Abdel-Aziz, N. H., 2010. *In vitro* evaluation of some bacterial isolates as biofertilizers and biocontrol agents against the second stage juveniles of *Meloidogyne incognita*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26: 2249-2256.
- Elad, Y., 1996. Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. *European Journal of Plant Pathology* 102: 719-732.
- Elad, Y., 1999. Plant Diseases in Greenhouses. In: *Greenhouse Ecosystems*. Stanhill, G., Enoch, H. Z. (Eds.) Elsevier. Paris, Francia. Pp. 199-211.
- Elsen, A., Declerck, S., De Waele, D., 2002. Effects of three arbuscular mycorrhizal fungi on root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) infection of *Musa*. *Infomusa* 11: 21-23.
- Elsen, A., Gervacio, D., Swennen, R., Waele, D. D., 2008. AMF-induced biocontrol against plant parasitic nematodes in *Musa* sp.: a systemic effect. *Mycorrhiza* 18:251-256.
- El-Sherif, A. G., Ismail, A. F. A., 2009. Integrated management of *Meloidogyne incognita* infecting soybean by certain organic amendments, *Bacillus thuringiensis*, *Trichoderma harzianum* and oxamyl with reference to NPK and total chlorophyll status. *Plant Pathology Journal* 8: 159-164.
- Enan, E., 2001. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry and Physiology* 130C: 325-337.
- Environmental Protection Agency (EPA), 2010. Pesticide Product Registrations; Conditional Approval of Paladin® DMDS. *Federal Register* (75) 195: 62387-62388.
- Esbenshade, P. R., Triantaphyllou, A. C., 1985. Electrophoretic methods for the study of root-knot nematode enzymes. In: Barker, K. R., Carter, C. C., Sasser, J. N., (Eds.) *An Advanced Treatise on Meloidogyne*, vol. II. Methodology. Raleigh, USA, North Carolina State University. Pp. 115-123.
- European Commission, 2007. Commission decision of 20 September 2007 concerning the non-inclusion of 1,3-dichloropropene in annex I to council directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorizations for plant protection products containing that substance. *Official Journal of the European Union*, L249 (50): 11-13.
- European Commission, 2009a. Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides. *Official Journal of the European Union* L309: 71-86.
- European Commission, 2009b. Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. *Official Journal of the European Union* L309: 1-50.
- Evans, H. C., Holmes, K. A., Thomas, K. A., 2003. Mycobiota of an indigenous *Theobroma* species (*Sterculiaceae*) in Ecuador: assessing its potential for biological control of cocoa diseases. *Mycology Progress* 2: 149-160.
- Facelli, E., Smith, S. E., Smith, F. A., 2009. Mycorrhizal symbiosis – overview and new insights into roles of arbuscular mycorrhizas in agro and natural ecosystems. *Australasian Plant Pathology* 38: 338-344.
- Ferris, H., McKenry, M. V., Jaffee, B. A., Anderson, C. E., Jurma, A., 2004. Population characteristics and dosage trajectory analysis for *Mesocriconema xenoplax* in California *Prunus* orchards. *Journal of Nematology* 36: 505-516.
- Filion, M., St-Arnaud, M., Fortin, J. A., 1999. Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rhizosphere microorganisms. *New Phytologist* 141: 525-533.
- Fiori, A. C. G., Schwan-Estrada, K. R. F., Stangarlin, J. R., Vida, J. B., Scapim, C. A., Cruz, M. E. S., Pascholati, S. F., 2000. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. *Journal of Phytopathology* 148: 483-487.
- Flores, G., Hilje, L., Mora, G. A., Carballo, M., 2008. Antifeedant activity of botanical crude extracts and their fractions on *Bemisia tabaci* (Homoptera : Aleyrodidae) adults: III. *Quassia amara* (Simaroubaceae). *Revista de Biología Tropical* 56(4): 2131-2146.

- Fracchia, S., Mujica, M. T., García-Romera, I., García-Garrido, J. M., Martín, J., Ocampo, J. A., Godeas, A., 1998. Interactions between *Glomus mosseae* and arbuscular mycorrhizal sporocarp-associated saprophytic fungi. *Plant and Soil* 200: 131–137.
- Gahukar, R. T., 1995. Problem and prospective of neem products. In: Gahukar, R.T. (Ed.) *Neem in plant protection*. Agri-Horticultural Publishing House, Nagpur, India. Pp. 110–113.
- Galleguillos, C., Aguirre, C., Barea, J. M., Azcón, R., 2000. Growth promoting effect of two *Sinorhizobium meliloti* strains (a wild type and its genetically modified derivative) on non-legume plant species in specific interaction with two arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Science* 159: 57-63.
- Gamalerò, E., Trotta, A., Massa, N., Copetta, A., Martinotti, A. G., Berta, G., 2004. Impact of two fluorescent pseudomonads and an arbuscular mycorrhizal fungus on tomato plant growth, root architecture and P acquisition. *Mycorrhiza* 14:185–192.
- Gamliel, A., Austerweil, M., Kritzman, G., 2000. Non-chemical approach to soilborne pest management organic amendments. *Crop protection* 19: 847-853.
- Gamliel, A., Katan, J., 2009. Control of plant disease through soil solarization. In: *Disease Control in Crops: Biological and Environmentally Friendly Approaches*. Walters, D., (Ed.) Blackwell Publishing Ltd., Edinburgh, UK. Pp. 196-220.
- Gamliel, A., Stapleton, J. J., 1993a. Effect of soil amendment with chicken compost or ammonium phosphate and solarization on pathogen control, rhizosphere microorganisms, and lettuce growth. *Plant Disease* 77: 886-891.
- Gamliel, A., Stapleton, J. J., 1993b. Characterization of antifungal volatile compounds evolved from solarized soil amended with cabbage residues. *Phytopathology* 83: 899-905.
- Gaur, A. C., 1990. *Phosphate solubilizing microorganisms* asb., 1st Edition. Omega Scientific Publishers, New Delhi, India.
- Gaur, H. S., Beane, J., Perry, R., 2000. The influence of root diffusate, host age and water regimes on hatching of the root-knot nematode, *Meloidogyne triticooryzae*. *Nematology* 2: 191-199.
- Gera-Hol, W. H., Cook, R., 2005. An overview of arbuscular mycorrhizal fungi-nematode interactions. *Basic and Applied Ecology* 6: 489-503.
- Germida, J. J., Walley, F. L., 1996. Plant growth-promoting rhizobacteria alter rooting patterns and arbuscular mycorrhizal fungi colonization of field-grown spring wheat. *Biology and Fertility of Soils* 23: 113–120.
- Gianinazzi-Pearson, V., Tollot, M., Seddas, P. M. A., 2009. Dissection of genetic cell programmes driving early arbuscular mycorrhiza interactions. In: Azcón-Aguilar, C., Barea, J. M., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V. (Eds.) *Mycorrhizas — functional processes and ecological impact*. Springer Verlag, Berlin. Pp. 33-45.
- Giannakou, I. O., Karpouzias, D. G., 2003. Evaluation of chemical and integrated strategies as alternatives to methyl bromide for the control of root-knot nematodes in Greece. *Pest Management Science* 59: 883-892.
- Giannakou, I. O., Pembroke, B., Gowen, S. R., Douloupaka, S., 1999. Effect of fluctuating temperature and different host plants on development of *Pasteuria penetrans* in *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology* 31: 312-318.
- Glick, B. R., 1995. The enhancement of plant growth by free living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41: 1376–1381.
- Godeas, A., Fracchia, S., Mujica, M. T., Ocampo, J. A., 1999. Influence of soil impoverishment on the interaction between *Glomus mosseae* and saprobe fungi. *Mycorrhiza* 9: 185–189.
- Goicoechea, N., Antolin, M. C., Sánchez-Díaz, M., 2000. The role of plant size and nutrient concentrations in associations between *Medicago* and *Rhizobium* and/or *Glomus*. *Plant Biology* 43: 221-226.
- Gómez, L., Rodríguez, M. G., De la Noval, B., Miranda, I., Hernández, M. A., 2008. Interacción entre el Ecomic® y una población cubana de *Meloidogyne incognita* en tomate. *Revista de Protección Vegetal* 23(2): 90-98.

- Gommers, F. J., 1981. Biochemical interactions between nematodes and plants and their relevance to control. *Helminthology Abstracts* 50B: 9–24.
- Goodell, P. B., Ferris, H., 1989. Influence of environmental factors on the hatch and survival of *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology* 21: 328-334.
- Google Earth ©. <http://earth.google.es>
- Gortari, M. C., Hours, R. A., 2008. Fungal chitinases and their biological role in the antagonism onto nematode eggs. A review. *Mycological Progress* 7 (4): 221-238.
- Goswami, J., Pandey, R. K., Tiwari, J. P., Goswami, B. K., 2008. Management of root-knot nematode on tomato through application of fungal antagonists *Acremonium strictum* and *Trichoderma harzianum*. *Journal of Environment Science and Health Part-B, Pesticide Food Contaminants and Agricultural Wastes* 43: 237-240.
- Goswami, J., Tiwari, D. D., 2007. Management of *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* disease complex on tomato by *Trichoderma harzianum*, *Tinopsisora longifolia* and *Glomus fasciculatum*. *Pesticide Research Journal* 19: 51-55.
- Gowen, S. R., Ahmed, R., 1990. *Pasteuria penetrans* for control of pathogenic nematodes. *Aspects of Applied Biology* 24: 25–31.
- Gowen, S. R., Tzortzakakis, E. A., 1994. Biological control of *Meloidogyne* spp, with *Pasteuria penetrans*. *Bulletin OEPP/EPPO* 24: 495–500.
- Grandison, G., 1992. The investigation of chemical derivatives from neem (*Azadirachta indica*) as environmentally safe method of control of plant parasitic nematodes. In: Schmutterer, H. (Ed.) *The Neem Tree*. VCH, Weinheim, Germany, p. 140.
- Gray, E. J., Smith, D. L., 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 395-412.
- Greco, N., 2000. Alternatives to methyl bromide to control plant parasitic nematodes in greenhouses. *FAO, Plant Production and Protection Paper*. 3 pp.
- Green, H., Larsen, J., Olsson, P. A., Jensen, D. F., Jakobsen, I., 1999. Suppression of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* by mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in root-free soil. *Applied Environmental Microbiology* 65: 1428-1434.
- Griffiths, B. S., Ritz, K., Ebbelwhite, N., Dobson, G., 1999. Soil microbial community structure: effects of substrate loading rates. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 145-153.
- Gryndler, M., 2000. Interactions of arbuscular mycorrhizal fungi with other soil organisms. In: Kapulnik, Y., Douds, D. D. Jr (Ed.) *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. Pp. 239– 262.
- Guetsky R., Shtienberg, D., Elad, Y., Fischer, E., Dinoor, A., 2002. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. *Phytopathology* 92: 976–985.
- Habte, M., Zhang, Y. C., Schmitt, D. P., 1999. Effectiveness of *Glomus* species in protecting white clover against nematode damage. *Canadian Journal of Botany* 77: 135–139.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., Kloepper, J. W., 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 895-914.
- Hamdan, H., Weller, D. M., Thomashow, L. S., 1991. Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4-80R. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 3270-3277.
- Hameeda, B., Srijana, M., Rupela, O. P., Reddy, G., 2007. Effect of bacteria isolated from composts and macrofauna on sorghum growth and mycorrhizal colonization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 883–887.
- Harman, G. E., 2000. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84: 377–393.
- Harman, G. E., 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96 (2): 190–194.

- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004. *Trichoderma* spp. -opportunistic avirulent plant symbionts. *Nature Microbiology Reviews* 2: 43–56.
- Harman, G. E., Kubicek, C. P., 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Harman, G. E., Kubicek, C. P., (Eds.) *Enzymes, biological control and commercial applications*, vol. 2. London: Taylor and Francis Ltd.
- Harrier, L. A., Watson, C. A., 2004. The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems. *Pest Management Science* 60: 149-157.
- Hartman, K. M., Sasser, J. N., 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal-pattern morphology. In: Barker, K. R., Carter, C. C., Sasser, J. N. (Eds.) *An Advanced treatise on Meloidogyne*, vol. I. Biology and control. Raleigh, USA, North Carolina State University. Pp.: 69-77.
- Hashem, M., Abo-Elyousr, K.A., 2011. Management of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato with combinations of different biocontrol organisms. *Crop Protection* 30: 285-292.
- Hatz, B., Dickson, D. W., 1992. Effect of temperature on attachment, development, and interactions of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology* 24: 512-521.
- Hervas, A., Landa, B., Datnoff, L. E., Jimenez-Diaz, R. M., 1998. Effects of commercial and indigenous microorganisms on *Fusarium* wilt development in chickpea. *Biological Control* 13: 166-176.
- Hewlett, T. E., Dickson, D. W., Mitchell, D. J., Kannwischer-mitchell, M. E., 1988. Evaluation of *Paecilomyces lilacinus* as a biocontrol agent of *Meloidogyne javanica* on tobacco. *Journal of Nematology* 20 (4): 578-584.
- Hewlett, T. E., Thomas, E., Stetina, S. R., Schmidt, L. M., Waters, J. P., Simmons, L. J., Rich, J. R., 2009. Identification of *Pasteuria* spp. that parasitize *Rotylenchulus reniformis*. *Journal of Nematology* 41: 338.
- Hoel, B. O., Solhaug, K. A., 1998. Effect of irradiance on chlorophyll estimation with the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. *Annals of Botany* 82: 389-392.
- Hoffmann-Hergarten, S., Gulati, M.K., Sikora, R.A., 1998. Yield response and biological control of *Meloidogyne incognita* on lettuce and tomato with rhizobacteria. *Journal of Plant Diseases and Protection* 105 (4): 349-358.
- Hong, Y., Glick, B. R., Pasternak, J. J., 1991. Plant-microbial interactions under gnotobiotic conditions: a scanning electron microscope study. *Current Microbiology* 23: 111-114.
- Hooper, D. J., 1986. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. Reference Book 402. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Technical Bulletin 2: 133-154.
- Howell, C. R., 2002. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 92: 177-180.
- Howell, C. R., 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87 (1): 4-10.
- Huang, Y., Xu, C., Ma, L., Zhang, K., Duan, C., Mo, M., 2010. Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3. 25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. *European Journal of Plant Pathology* 126: 417-422.
- Hussey, R. S., 1985. Host-parasite relationship and associated physiological changes. In: *An advanced treatise on Meloidogyne. Biology and Control*. Sasser, J. N., Carter, C. C., (Eds.) Raleigh, N. C., USA. Pp. 144-153.
- Hussey, R. S., Barker, K. R., 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57: 1025-8.
- Hussey, R. S., Janssen, G. J. W., 2002. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. In: *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*. Starr, J. L., Cook, R., Bridge, J. (Eds.) CAB International. Wallingford, Oxon, UK. Pp. 43-70.
- Hussey, R. S., Roncadori, R. W., 1982. Vesicular arbuscular mycorrhizal fungi may limit nematode activity and improve plant growth. *Plant Disease* 66: 9–14.
- Immaraju, J. A., 1998. The commercial use of azadirachtin and its integration into viable pest control programmes. *Journal of Pesticide Science* 54: 285-289.

- Inman-Bamber, N. G., De Jager, J. M., 1986. Effect of water stress on growth, leaf resistance and canopy temperature in field-grown sugarcane. Proceedings of The South African Sugar Technologists' Association: 156-161.
- Insunza, V., Aballay, E. Macaya, J., 2001a. Nematicidal activity of aqueous plant extracts on *Xiphinema index*. Nematología Mediterránea 29: 35-40.
- Insunza, V., Aballay, E. Macaya, J., 2001b. *In vitro* nematicidal activity of aqueous plant extracts on clilean populations of *Xiphinema americanum sensu lato*. Nematropica 31: 47-54.
- Ipsilantis, I., Samourelis, C., Karpouzas, D. G., 2012. The impact of biological pesticides on arbuscular mycorrhizal fungi. Soil Biology and Biochemistry 45: 147-155.
- Isman, M., 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annual Review of Entomology 51: 45-66.
- Isman, M. B., Koul, O., Luczynski, A., Kaminskis, J., 1990. Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content. Journal of Agricultural and Food Chemistry 38: 1406-1411.
- Jaizme-Vega, M. C., 2002. Técnicas biológicas de fertilización: aplicación de micorrizas en viña, tomate y platanera ecológicas. Jornadas de Agricultura y ganadería ecológicas, 20-25 Mayo. Teide, Gran Canaria.
- Jaizme-Vega, M. C., Rodríguez-Romero, A. S., Barroso-Núñez, L. A., 2006. Effect of the combined inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant-growth promoting rhizobacteria on papaya (*Carica papaya* L.) infected with the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Fruits 61 (3): 1-12.
- Jaizme-Vega, M. C., Tenoury, P., Pinochet, J., Jaumot, M., 1997. Interactions between the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and *Glomus mosseae* in banana. Plant and Soil 196 (1): 27-35.
- Janssen, A. M., Sheffer, J. J. C., Baerheim Svendsen, A., 1987. Antimicrobial activity of essential oils. A 1976-1986 literature review: aspects of the test methods. Planta Medica 53: 395-398.
- Jarvis, A. P., Johnson, S., Morgan, E. D., 1998. Stability of the natural insecticide azadirachtin in aqueous and organic solvents. Journal of Pest Science 53: 217-222.
- Javed, N., El-Hassan, S., Gowen, S., Pemproke, B., Inam-ul-Haq, M., 2008. The potential of combining *Pasteuria penetrans* and neem (*Azadirachta indica*) formulation as a management system for root-knot nematodes on tomato. European Journal of Plant Pathology 120: 53-60.
- Javed, N., Gowen, S. R., Inam-ul-Haq, M., Abdullah, K., Shahina, F., 2007. Systemic and persistent effect of neem (*Azadirachta indica*) formulations against root-knot nematodes, *Meloidogyne javanica* and their storage life. Crop Protection 26: 911-916.
- Jenkins, W., Taylor, D., 1967. Plant nematology. Reinhold, New York.
- Jones, D. L., Hodge, A., Kuzyakov, Y., 2004. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. New Phytologist 163: 459-480.
- Jothi, G., Sundarababu, R., 2000. Interaction of four *Glomus* spp. with *Meloidogyne incognita* on brinjal (*Solanum melongena* L.). International Journal of Tropical Plant Diseases 18(1-2): 147-156.
- Jung, C., Wyss, U., 1999. New approaches to control plant parasitic nematodes. Applied Microbiology and Biotechnology 51: 439-446.
- Jung, W. J., Jung, S. J., An, K. N., Jin, Y. L., Park, R. D., Kim, K. Y., Shon, B. K., Kim, T. H., 2002. Effect of chitinase-producing *Paenibacillus illinoisensis* KJA-424 on egg hatching of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). Journal of Microbiology and Biotechnology 12 (6): 865-871.
- Kaloshian, I., Williamson, V. M., Miyao, G., Lawn, D. A., Westerdahl, B. B., 1996. "Resistance-breaking" nematodes identified in California tomatoes. California Agriculture 50: 18-19.
- Kaplan, M., Noe, J. P., 1993. Effects on chicken-excrement amendments on *Meloidogyne arenaria*. Journal of Nematology 25: 71-77.
- Kariuki, G. M., Brito, J. A., Dickson, D. W., 2006. Effects of *Pasteuria penetrans* endospore rate of attachment on root penetration and fecundity of *Meloidogyne arenaria* race. Nematropica 36: 261-267.

- Katooli, N., Moghadam, E. M., Taheri, A., Nasrollahnejad, S., 2010. Management of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on cucumber with the extract and oil of nematicidal plants. *International Journal of Agricultural Research* 5: 8.
- Kerry, B. R., 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 38: 423-441.
- Kerry, B. R., Crump, D. H., 1998. The dynamics of the decline of the cereal cyst nematode, *Heterodera avenae*, in four soils under intensive cereal production. *Fundamental and Applied Nematology*, 21 (5): 617-625.
- Khan, A., Williams, K. L., Nevalainen, H. K. M., 2006. Control of plant-parasitic nematodes by *Paecilomyces lilacinus* and *Monacrosporium lysipagum* in pot trials. *BioControl* 51: 643-658.
- Khan, M. R., Tarannum, Z., 1999. Effects of field application of various microorganisms on *Meloidogyne incognita* on tomato. *Nematologia Mediterránea* 27: 233-238.
- Khan, Z., Kim, S. G., Jeon, Y. H., Khan, H. U., Son, S. H., Kim, Y. H., 2008. A plant growth promoting rhizobacterium, *Paenibacillus polymyxa* strain GBR-1, suppresses root-knot nematode. *Bioresource Technology* 99 (8): 3016-3023.
- Khyami-Horani, H., Hajaj, M. Charles, J.F., 2003. Characterization of *Bacillus thuringiensis* ser. *jordanica* (Serotype H71), a novel serovariety isolated in Jordan. *Current Microbiology* 47 (1): 26-31.
- Kiewnick, S., 2004. Biological control of plant parasitic nematodes with *Paecilomyces lilacinus*, strain 251. In: *Multitrophic Interactions in Soil*. Sikora, R. A., Gowen, S., Hauschild, R., Kiewnick, S. (Eds.) IOBC/WPRS Bulletin 27: 133-143.
- Kiewnick, S., Sikora, R. A., 2006. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. *Biological Control* 38: 179-187.
- Kim, D. G., Riggs, R. D., 1992. Biological control. In: *Biology and management of the soybean cyst nematode*. Riggs, R. D., Wrather, J. A. (Eds.) American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN, USA. Pp. 133-142.
- Kim, J., Lee, Y. S., Lee, S. G., Shin, S. C., Park, I. K., 2008. Fumigant antifungal activity of plant essential oils and components from West Indian bay (*Pimenta racemosa*) and thyme (*Thymus vulgaris*) oils against two phytopathogenic fungi. *Flavour and Fragrance Journal* 23: 272-277.
- Kim, K. Y., Jordan, D., McDonald, G. A., 1998. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biology and Fertility of Soils* 26: 79-87.
- Kim, S. G., Liem, A., Stewart, B. C., Miller, J. A., 1999. New studies on trans-anethole oxide and trans-ascarone oxide. *Carcinogenesis* 20: 1303-1307.
- Kleifeld, O., Chet, I., 1992. *Trichoderma harzianum* interaction with plants and effect on growth response. *Plant and Soil* 144: 267-272.
- Kloepper, J. W., Rodríguez-Kabana, R., Zehnder, G. W., Murphy, J., Sikora, E., Fernandez, C., 1999. Plant root-bacteria interactions in biological control of soil borne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australasian Plant Pathology* 28: 27-33.
- Kloepper, J. W., Ryu, C-M., 2006. Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance. *Soil Biology* 9: 33-52.
- Kluepfel, D. A., Nyczepir, A. P., Lawrence, J. E., Wechter, W. P., Leverentz, B., 2002. Biological control of the phytoparasitic nematode *Mesocriconema xenoplax* on peach trees. *Journal of Nematology* 34: 120-123.
- Knoblock, K., Weis, K., Wergant, R., 1989. Mechanism of anti-microbial activity of essential oils. In: *37th Annual Congress on Medical Plant Research*, Braunschweig. Pp. 5-9.
- Ko, M. P., Bernard, E. C., Schmitt, D. P., Sipes, B. S., 1995. Occurrence of *Pasteuria*-like organisms on selected plant parasitic nematodes of pineapple in the Hawaiian Islands. *Journal of Nematology* 27: 395-408.
- Korayem, A. M., Hasabo, S. A., Ameen, H. H., 1993. Effects and mode of action of some plant extracts on certain plant parasitic nematodes. *Anz. Schaedl.-Kde. Pfl. Schutz Umweltschutz* 66(2): 32-36.

- Koske, R. E., Gemma, J. H., 1989. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycological Research* 92: 86-95.
- Kostyukovsky, M., Rafaeli, A., Gileadi, C., Demchenko, N., Shaaya, E., 2002. Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. *Pest Management Science* 58: 1101-1106.
- Kovtunovych, G., Lar, O., Kamalova, S., Kordyum, V., Kleiner, D., Kozyrovskaya, N., 1999. Correlation between pectate lyase activity and ability of diazotrophic *Klebsiella oxytoca* VN13 to penetrate into plant tissues. *Plant Soil* 215: 1-6.
- Krueger, R., McSorley, R., 2008. Nematode management in organic agriculture. University of Florida IFAS Extension. Pp. 1-9.
- Kuc, J., 2001. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *European Journal of Plant Pathology* 107: 7-12.
- Kurita, N., Miyaji, M., Kurane, R., Takahara, Y., 1981. Antifungal activity of components of essential oils. *Agricultural and Biological Chemistry* 45: 945-952.
- Kwok, O. C. H., Plattner, R., Weisleder, D., Wicklow, D. T., 1992. A nematicidal toxin from *Pleurotus ostreatus* NRRL 3526. *Journal of Chemical Ecology* 18 (2): 127-136.
- Labeena, P., Sreenivasa, M. N., Lingaraju, S., 2002. Interaction effects between arbuscular mycorrhizal fungi and root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato. *Indian Journal of Nematology* 32: 118-120.
- Lahlou, M., 2004. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research* 18: 435-448.
- Larkin, R. P., Fravel, D. R., 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato. *Plant Disease* 82: 1022-1028.
- Lazarovits, G., 2001. Management of soil-borne plant pathogens with organic soil amendments: a disease control strategy salvaged from the past. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23: 1-7.
- Lazarovits, G., Conn, K. L., Abbasi, P. A., Soltani, N., Kelly, W., McMillan, E., Peters, R. D., Drake, K. A., 2008. Reduction of potato tuber diseases with organic soil amendments in two Prince Edward Island fields. *Canadian Journal of Plant Pathology* 30(1): 37-45.
- Lazarovits, G., Conn, K. L., Abbasi, P. A., Tenuta, M., 2005. Understanding the mode of action of organic soil amendments provides the way for improved management of soilborne plant pathogens. *Acta Horticulturae* 698: 215-224.
- Lee, J. H., Ma, K. C., Ko, S. J., Kang, B. R., Kim, I. S., Kim, Y. C., 2011. Nematicidal activity of a nonpathogenic biocontrol bacterium, *Pseudomonas chlororaphis* O6. *Current Microbiology* 62 (3): 746-51.
- Leeman, M., Den Ouden, F. M., Van Pelt, J. A., Cornelissen, C., Bakker, P. A. H. M., Schippers, B., 1996. Suppression of *Fusarium* wilt of radish by co-inoculation of fluorescent *Pseudomonas* spp. and root colonizing fungi. *European Journal of Plant Pathology* 102: 21-31.
- Leonardi, C., Romano, D., 2004. Recent issues on vegetable grafting. *Acta Horticulturae* 631: 163-174.
- Li, G. H., Zhang, K. Q., Xu, J. P., Dong, J. Y., Liu, Y. J., 2007. Nematicidal substances from fungi. *Recent Patents on Biotechnology* 1: 212-233.
- Linderman, R., 1988. Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. *Phytopathology* 78: 366-371.
- Linderman, R. G., 2000. Effects of mycorrhizas on plant tolerance to disease. In: *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Kapulnik, Y. (Ed.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. Pp. 345-367.
- Lioussanne, L., Beaugard, M. S., Hamel, C., Jolicoeur, M., St-Arnaud, M., 2009. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and soil microorganisms. In: *Advances in mycorrhizal science and technology*. NRC Research Press, Ottawa. Pp. 51-69.
- Liu, J., Maldonado-Mendoza, I., Lopez-Meyer, M., Cheung, F., Town, C. D., Harrison, M. J., 2007. Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *The Plant Journal* 50: 529-544.

- Liu, R., Dai, M., Wu, X., Li, M., Liu, X., 2012. Suppression of the root-knot nematode [*Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood] on tomato by dual inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria. *Mycorrhiza* 22: 289-296.
- Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E. R. B., Taghavi, S., Mezgey, M., Van der Lelie, D., 2002. Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21: 583-606.
- López-Bucio, J., Campos-Cuevas, J. C., Hernández-Calderón, E., Velásquez-Becerra, C., Farías-Rodríguez, R., Valencia-Cantero, E., 2007. *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20 (2): 207-217.
- López-Pérez, J. A., Escuer, M., Díez-Rojo, M.A., Robertson, L., Piedra-Buena, A., López-Cepero, J., Bello, A., 2011. Host range of *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949 (Nematoda: Meloidogynidae) in Spain. *Nematopica* 41: 130-140.
- López-Robles, J., de Aymerich-Vadillo, B., González-Carcedo, S., 2001. Manejo de poblaciones de *Heterodera schachtii* en remolacha azucarera en Castilla, basada en rotaciones y cultivos intercalares. *Investigación Agraria. Producción y Protección Vegetales* 16 (3): 407-415.
- Lorito, M., Woo, S. L., D'Ambrosio, M., Harman, G. E., Hayes, C. K., Kubicek, C. P., Scala, F., 1996. Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9: 206-213.
- Lu, Z., Tombolini, R., Woo, S., Zeilinger, S., Lorito, M., Jansson, J. K., 2004. *In vivo* study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (5): 1073-1081.
- Ma, W., Zalec, K., Glick, B. R., 2001. Biological activity and colonization pattern of the bioluminescence-labeled plant growth-promoting bacterium *Kluyvera ascorbata* SUD165/26. *FEMS Microbiology Ecology* 35: 137-144.
- Malecha, M. A., Tarigopula, S., Malecha, M. J., 2006. Successful treatment of *Paecilomyces lilacinus* keratitis in a patient with a history of herpes simplex virus keratitis. *Cornea* 25 (10): 1240-1242.
- Mancebo, F., Hilje, L., Mora, G. A., Salazar, R., 2000. Antifeedant activity of *Quassia amara* (Simaroubaceae) extracts on *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera : Pyralidae) larvae. *Crop Protection* 19: 301-305.
- Mankau, R., 1980. Biological control of nematodes pests by natural enemies. *Annual Review of Phytopathology* 18: 415-440.
- Marla, S. R., Huettel, R. N., Mosjidis J., 2008. Evaluation of *Crotalaria juncea* populations as hosts and antagonistic crops to manage *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis*. *Nematopica* 38 (2): 155-162.
- MARM, 2010. Anuario de Estadística 2010. Madrid, España, Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino. 990 pp.
- Martínez, A., Obertello, M., Pardo, A., Ocampo, J. A., Godeas, A., 2004. Interactions between *Trichoderma pseudokoningii* strains and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Gigaspora rosea*. *Mycorrhiza* 14: 79-84.
- Martínez-Medina, A., Pascual, J. A., Lloret, E., Roldán, A., 2009. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum* and their effects on *Fusarium* wilt in melon plants grown in seedling nurseries. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89 (11): 1843-1850.
- Martínez-Medina, A., Roldán, A., Pascual, J. A., 2011. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum* under conventional and low input fertilization field condition in melon crops: growth response and *Fusarium* wilt biocontrol. *Applied Soil Ecology* 47: 98-105.
- Martini, P., Moreno, E., Garibaldi, A., 1991. Resistenza del garofano a patotipo diversi di *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Colture Protete* 10: 97-102.
- Marulanda-Aguirre, A., 2006. Estudio de los mecanismos implicados en la resistencia de las plantas a estreses osmóticos inducidos por microorganismos autóctonos promotores del crecimiento vegetal (hongos micorrízicos arbusculares y bacterias). Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 145 pp.

- Marulanda-Aguirre, A., Azcón, R., Ruíz-Lozano, J. M., Aroca, R., 2008. Differential effects of a *Bacillus megaterium* strain on *Lactuca sativa* plant growth depending on the origin of the arbuscular mycorrhizal fungus coinoculated: physiologic and biochemical traits. *Journal of Plant Growth Regulation* 27: 10-18.
- Masadeh, B., von Alten, H., Grunewaldt-Stoecker, G., Sikora, R. A., 2004. Biocontrol of root-knot nematodes using the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and the antagonist *Trichoderma viride* in two tomato cultivars differing in their suitability as hosts for the nematodes. *Journal of Plant Diseases and Protection* 111: 322-333.
- Mateille, T., Duponnois, R., Diop, M. T., 1995. Influence of abiotic soil factors and the host plant on the infection of phytoparasitic nematodes of the genus *Meloidogyne* by the actinomycete parasitoid *Pasteuria penetrans*. *Agronomie* 15: 581-591.
- Matthiesen, J. N., Kirkegaard, J. A., 1993. Biofumigation, a new concept for "clean and green" pest and disease control. *Western Australian Potato Grower* October 1993: 14-15.
- Maximiniano, C., Campos, V. P., De Souza, R. M., Almedia, A. R., 2001. Flutuação populacional de *Meloidogyne exigua* em cafezal naturalmente infestado por *Pasteuria penetrans*. *Nematologia Brasileira* 25: 63-69.
- McAllister, C. B., García-Romera, I., Godeas, A., Ocampo, J. A., 1994a. *In vitro* interactions between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*. *Soil Biology and Biochemistry* 26: 1369-1374.
- McAllister, C. B., García-Romera, I., Godeas, A., Ocampo, J. A., 1994b. Interactions between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*: effects on plant growth, arbuscular mycorrhizas and the saprophyte inoculants. *Soil Biology and Biochemistry* 26: 1363-1367.
- McAllister, C. B., García-Romera, I., Martín, J., Godeas, A., Ocampo, J. A., 1995. Interaction between *Aspergillus niger* and *Glomus mosseae*. *New Phytologist* 129: 309-316.
- McCully, M. E., 2001. Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. *Australian Journal of Plant Physiology* 28: 983-990.
- McKenry, M. V., 1978. Selection of preplant fumigation. *California Agriculture* 32: 15-16.
- McSorley, R., Wang, K. H., Roskopf, E. N., Kokalis-Burelle, N., Hans Petersen, H. N., Gill, H. K., Krueger, R., 2009. Nonfumigant alternatives to methyl bromide for management of nematodes, soil-borne disease, and weeds in production of snapdragon (*Antirrhinum majus*). *International Journal of Pest Management* 55 (4): 265-273.
- Medina, A., Probanza, A., Manero, F. J. G., Azcón, R., 2003. Interactions of arbuscular-mycorrhizal fungi and *Bacillus* strains and their effects on plant growth, microbial rhizosphere activity (thymidine and leucine incorporation) and fungal biomass (ergosterol and chitin). *Applied Soil Ecology* 22: 15-28.
- Meier, S., Borie, F., Curaqueo, G., Bolan, N., Cornejo, P., 2012. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on metallophyte and agricultural plants growing at increasing copper levels. *Applied Soil Ecology* 61: 280-287.
- Mekete, T., Hallmann, J., Kiewnick, S., Sikora, R., 2009. Endophytic bacteria from ethiopian coffee plants and their potential to antagonise *Meloidogyne incognita*. *Nematology* 11 (1): 117-127.
- Melakeberhan, H., Webster, J. M., 1993. The phenology of plant-nematode interaction and yield loss. In: *Nematode Interactions*. Khan, M. W. (Ed.) Aligarh University. Aligarh, Uttar Pradesh, India. Pp. 26-41.
- Melero-Vara, J. M., López-Herrera, C. J., Prados-Ligero, A. M., Vela-Delgado, M. D., Navas-Becerra, J. A., Basallote-Ureba, M. J., 2011. Effects of soil amendment with poultry manure on carnation *Fusarium* wilt in greenhouses in southwest Spain. *Crop Protection* 30: 970-976.
- Mendoza, A. R., Sikora, R. A., Kiewnick, S., 2007. Influence of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 on the biological control of the burrowing nematode *Radopholus similis* in banana. *Nematropica* 37 (2): 203-213.
- Meneses, J. F., Castilla, N., 2009. Protected cultivation in Iberian horticulture. *Chronica Horticulturae* 49: 37-39.
- Metcalfe, D. D., Wilson, C. R., 2001. The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. *Plant Pathology* 50: 249-257.

- Meyer, S., Roberts, P. D., 2002. Combinations of biocontrol agents for management of plant-parasitic nematodes and soilborne plant-pathogenic fungi. *Journal of Nematology* 34: 1–8.
- Meyer, S. L. F., 2003. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service. Research programs on microbes for management of plant parasitic nematodes. *Pest Management Science* 59: 665-670.
- Meyer, S. L. F., Massoud, S. I., Chitwood, D. J., Roberts, D. P., 2000. Evaluation of *Trichoderma virens* and *Burkholderia cepacia* for antagonistic activity against root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Nematology* 2: 871-879.
- Meyer, S. L. F., Roberts, D. P., Chitwood, D. J., Carta, L. K., Lumsden, R. D., Mao, W. 2001. Application of *Burkholderia cepacia* and *Trichoderma virens*, alone and in combinations, against *Meloidogyne incognita* on bell pepper. *Nematropica* 31: 75-86.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2002. Real Decreto 1201/2002, de 20 de noviembre, por el que se regula la producción integrada de productos agrícolas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Boletín Oficial del Estado 287: 42028-42040.
- Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, 2010. Anuario de Estadística 2010. Madrid, España, Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, 990 pp.
- Mishra, A., Shukla, B. N., 1997. Interactions between *Glomus fasciculatum* and *Meloidogyne incognita* on tomato. *Journal of Mycology and Plant Pathology* 27: 199–202.
- Mitchell, D. T., 1993. Mycorrhizal associations. In: Exploitation of Microorganisms. Jones, D. G. (Ed.) Chapman y Hall. Norwell, Massachusetts, U.S.A. Pp. 169-196.
- Miyazawa, M., Watanabe, H., Umemoto, K., Kameoka, H., 1998. Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oils of *Mentha* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 3431-3434.
- Mohandas, S., Manjula, R., Rawai, R. D., Lakshmikantha, H. C., Chakraborty, S., Ramachandra, Y. L., 2010. Evaluation of arbuscular mycorrhiza and other biocontrol agents in managing *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* infection in banana cv. neyipoovan. *Biocontrol Science and Technology* 20 (2): 165-181.
- Molla, A. H., Shamsuddin, Z. H., Halimi, M. S., Morziah, M., Puteh, A. B., 2001. Potential for enhancement of root growth and nodulation of soybean co-inoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* in laboratory systems. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 457-463.
- Monfort W. S., Csinos, A. S., Desaeger, J., Seebold, K., Webster, T.M., Díaz-Pérez J.C., 2007. Evaluating *Brassica* species as an alternative control measure for root-knot nematode (*M. incognita*) in Georgia vegetable plasticulture. *Crop Protection* 26 (9): 1359-1368.
- Montero, J. I., Stanghellini, C., Castilla, N., 2009. Greenhouse technology for sustainable production in mild winter climate: Trends and needs. International Symposium "Strategies towards sustainability of protected cultivation in mild winter climate. Antalya, Turkey, 6-11 April, 2008. *Acta Horticulturae* 807: 33-44.
- Muller-Riebau, F., Berger, B., Yegen, O., 1995. Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 43: 2262–2266.
- Nagesh, M., Reddy, P. P., 1997. Management of *Meloidogyne incognita* on *Crossandra undulataefolia* using vesicular arbuscular mycorrhiza, *Glomus mosseae*, and oil cakes. *Mycorrhiza News* 9: 12–14.
- Nagesh, M., Reddy, P. P., Kumar, M. V. V., Nagaraju, B., 1999a. Studies on correlation between *Glomus fasciculatum* spore density, root colonization and *Meloidogyne incognita* infection on *Lycopersicon esculentum*. *Journal of Plant Diseases and Protection* 106 (1): 82-87.
- Nagesh, M., Reddy, P. P., Rao, M. S., 1999b. Comparative efficacy of VAM fungi in combination with neem cake against *Meloidogyne incognita* on *Crossandra undulataefolia*. *Mycorrhiza News* 11: 11-13.
- Naseby, D. C., Pascual, J. A., Lynch, J. M., 2000. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. *Journal Applied Microbiology* 88: 161-169.

- Natarajan, N., Cork, A., Boomathi, N., Pandi, R., Velavan, S., Dhakshnamoorthy, G., 2006. Cold aqueous extracts of African marigold *Tagetes erecta* for control tomato root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Crop Protection* 25: 1210-1213.
- Neipp, P. W., Becker, J. O., 1999. Evaluation of biocontrol activity of rhizobacteria from *Beta Vulgaris* against *Heterodera schachtii*. *Journal of Nematology* 31: 54-61.
- Nico, A. I., Jiménez-Díaz, R. M., Castillo, P., 2003. Solarization of soil in piles for the control of *Meloidogyne incognita* in olive nurseries in southern Spain. *Plant Pathology* 52: 770-778.
- Nicolas, H., Rivoal, R., Duchesne, J., Lili, Z., 1991. Detection of *Heterodera avenae* infestations on winter wheat by radiothermometry. *Revue de Nématologie* 14(2): 285-290.
- Nielsen, T. H., Sorensen, J., 2003. Production of cyclic lipopeptides by *Pseudomonas fluorescens* strains in bulk soil and in the sugar beet rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 69(2): 861-868.
- Nisen, A., Grafiadellis, M., Jiménez, R., La Malfa, G., Martínez-García, P. F., Monteiro, A., Verlodt, H., Villele, O., Zabeltitz, C. H., Denis, J. C., Baudoin, W., Garnaud, J. C., 1988. Cultures protégées en climat méditerranéen. FAO. Roma, Italia. 317 pp.
- Noling, J. W., 2000. Effects of continuous culture of a resistant tomato cultivar on *Meloidogyne incognita* soil population density and pathogenicity. *Journal of Nematology* 32: 452.
- Noling, J. W., Becker, J. O., 1994. The challenge of research and extension to define and implement alternatives to methyl bromide. *Supplement to Journal of Nematology* 26 (4S): 573-586.
- Ntalli, N. G., Menkissoglu-spiroudi, U., Giannakou, I., 2010. Nematicidal activity of powder and extracts of *Melia azedarach* fruits against *Meloidogyne incognita*. *Annals of Applied Biology* 156: 309-317.
- Ntalli, N. G., Menkissoglu-spiroudi, U., Giannakou, I. O., Prophetou-Athanasiadou, D. A., 2009. Efficacy evaluation of a neem (*Azadirachta indica* A. Juss) formulation against root-knot nematodes *Meloidogyne incognita*. *Crop Protection* 28 (6): 489-494.
- O'Callaghan, K. J., Dixon, R. A., Cocking, E. C., 2001. *Arabidopsis thaliana*: a model for studies of colonization by non-pathogenic and plant-growth-promoting rhizobacteria. *Australian Journal of Plant Physiology* 28: 975-982.
- Ocampo, J. A., Martin, J., Hayman, D. S., 1980. Influence of plant interactions on vesicular-arbuscular mycorrhizal infections. I. Host and non-host plants grown together. *New Phytologist* 84: 27-35.
- Oka, Y., 2012. Nematicidal activity of *Verbesina encelioides* against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* and effects on plant growth. *Plant Soil* 355: 311-322.
- Oka, Y., Daniel, B. H. B., Cohen, Y., 2001. Nematicidal activity of powder and extracts of *Inula viscosa*. *Nematology* 3: 735-742.
- Oka, Y., Koltai, H., Bar-Eyal, M., Mor, M., Sharon, E., Chet, I., Spiegel, Y., 2000a. New strategies for the control of plant parasitic nematodes. *Pest Management Science* 56: 983-988.
- Oka, Y., Nacar, S., Putievsky, E., Ravid, U., Yaniv, Z., Spiegel, Y., 2000b. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. *Phytopathology* 90: 710-715.
- Oka, Y., Shapira, N., Fine, P., 2007. Control of root-knot nematodes in organic farming systems by organic amendments and soil solarization. *Crop Protection* 26: 1556-1565.
- Olatinwo, R.O., Borneman, J., Becker, J.O., 2006. Induction of beet-cyst nematode suppressiveness by the fungi *Dactylella oviparasitica* and *Fusarium oxysporum* in field microplots. *Phytopathology* 96 (8): 855-859.
- Olivares-Bernabeu, C. M., López-Llorca, L. V., 2002. Fungal egg-parasites of plant-parasitic nematodes from Spanish soils. *Revista Iberoamericana de Micología* 19: 104-110.
- Oliveira, D. F., Campos, V. P., Amaral, D. R., Nunes, A. S., Pantaleão, J. A., Costa, D. A., 2007. Selection of rhizobacteria able to produce metabolites active against *Meloidogyne exigua*. *European Journal of Plant Pathology* 119 (4): 477-479.
- Olthof, T. H. H. A., Townshend, J. L., 1991. Effect of oxamyl treatment of potato seed pieces on *Pratylenchus penetrans* and yield. *Supplement to Journal of Nematology* 23 (4S): 699-705.

- Oostendorp, M., Dickson, D. W., Mitchell, D. J., 1990. Host range and ecology of isolate of *Pasteuria* spp. from the southeastern United States. *Journal of Nematology* 22: 525–531.
- Oostendorp, M., Dickson, D. W., Mitchell, D. J., 1991. Population development of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology* 23: 58–64.
- Oostendorp, M., Sikora, R. A., 1990. *In vitro* interrelationships between rhizosphere bacteria and *Heterodera schachtii*. *Revue de Nématologie* 13: 269–274.
- Ordookhani, K., Khavazi, K., Moezzi, A., Rejali, F., 2010. Influence of PGPR and AMF on antioxidant activity, lycopene and potassium contents in tomato. *Journal of Agricultural Research* 5(10): 1108–1116.
- Ornat, C., Verdejo-Lucas, S., Sorribas, F. J., 2001. A population of *Meloidogyne javanica* in Spain virulent to the Mi resistance gene in tomato. *Plant Disease* 85: 271–276.
- Ornat, C., Verdejo-Lucas, S., Sorribas, F. J., Santero, I., 1999. El nemátodo *Meloidogyne* en los cultivos hortícolas de los invernaderos de Almería. *Phytoma España* 106: 27–34.
- Orui, Y., 1997. Effect of spore sonication on attachment and host-attachment range of *Pasteuria penetrans* to the root-knot nematode. *Applied Entomology and Zoology* 32: 101–107.
- Oyekanmi, E. O., Coyne, D. L., Fagade, O. E., Osonubi, O., 2007. Improving root-knot nematode management on two soybean genotypes through the application of *Bradyrhizobium japonicum*, *Trichoderma pseudokoningii* and *Glomus mosseae* in full factorial combinations. *Crop Protection* 26: 1006–1012.
- Ozgonen, H., Erkilic A., 2007. Growth enhancement and Phytophthora blight (*Phytophthora capsici* Leonian) control by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation in pepper. *Crop Protection* 26: 1682–1688.
- Ozone Secretariat of the United Nations Environment Programme, 2006. Handbook for the Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer. Seventh edition (2006). UNEP, Nairobi, Kenya. 494 pp.
- Padgham, J. L., Sikora, R. A., 2007. Biological control potential and modes of action of *Bacillus megaterium* against *Meloidogyne graminicola* on rice. *Crop Protection* 26: 971–977.
- Pandey, G., Pandey, R. K., Pant, H., 2003. Efficacy of different levels of *Trichoderma viride* against root-knot nematode in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Annual Plant Protection Sciences* 11 (1): 96–98.
- Pandey, P., Maheshwari, D. K., 2006. Two-species microbial consortium for growth promotion of *Cajanus cajan*. *Current Science* 92: 1137–1141.
- Pandey, R., Kalra, A., Tandon, S., Mehrotra, N., Singh, H. N., Kumar, S., 2000. Essential oils as potent source of nematicidal compounds. *Journal of Phytopathology* 148: 501–502.
- Panizzi, L., Flamini, G., Cioni, P. L., Morelli, I., 1993. Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. *Journal of Ethnopharmacology* 39(3): 167–170.
- Park, I. K., Park, J. Y., Kim, K. H., Choi, K. S., Choi, I. H., Kim C. S., Shin, S. C., 2005. Nematicidal activity of plant essential oils and components from garlic (*Allium sativum*) and cinnamon (*Cinnamomum verum*) oils against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Nematology* 7: 767–774.
- Park, I. K., Shin, S. C., 2005. Fumigant activity of plant essential oils and components from garlic (*Allium sativum*) and clove bud (*Eugenia caryophyllata*) oils against the Japanese termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4388–4392.
- Parvatha Reddy, P., Nagesh, M., Rao, M. S., 1997. Management of root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita* in tomato nursery by integration of endomycorrhiza, *Glomus fasciculatum* with castor cake. *Pest Management in Horticultural Ecosystem* 3: 25–31.
- Paster, N., Juven, B. J., Shaaya, E., Menasherov, M., Nitzan, R., Weisslowicz, H., Ravid, U., 1990. Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 11: 33–37.
- Paulitz, T. C., Belanger, R. R., 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology* 39: 103–133.
- Paulitz, T. C., Linderman, R. G., 1991. Mycorrhizal interactions with soil organisms. In: Arora, D.K., Rai, B., Mukerji, K.G., Knudsen, G. (Eds.) *Handbook of applied mycology*. Dekker, New York. Pp. 77–129.

- Pembroke, B., Gowen, S., 2006. Exploiting the potential of *Pasteuria penetrans* for biological control of root-knot nematodes. International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants 29: 123-125.
- Peterson, C. A., Moon, G. J., 1993. The effect of lateral root out-growth on the structure and permeability of the onion root exodermeis. Botanica Acta 106: 411-418.
- Pettigrew, W. T., 2003. Relationships between insufficient potassium and crop maturity in cotton. Agronomy Journal 95: 1323-1329.
- Phillips, J. M., Hayman, D. S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. Transactions of the British Mycological Society 55: 158-161.
- Piedra-Buena, A., García-Álvarez, A., Díez-Rojo, M. A., Bello, A., 2006. Use of crop residues for the control of *Meloidogyne incognita* under laboratory conditions. Bioresource Technology 98: 2846-2851.
- Pinochet, J., Fernández, C., de Carmen Jaizme, M., Tenoury, P., 1997. Micropropagated banana infected with *Meloidogyne javanica* responds to *Glomus intraradices* and phosphorus. HortScience 32: 101-103.
- Plaza, B. M., Jiménez, S., Vela, M. D., Pérez, M., Lao, M. T., 2008. El sector ornamental en Andalucía. Horticultura 204: 12-19.
- Ploeg, A., 2007. Effect of different winter cover crops, used as biofumigants, on *Meloidogyne incognita* population levels and yield and infestation of summer-grown tomato. Journal of Nematology 39 (1): 101-102.
- Ploeg, A., 2002. Effects of selected marigold varieties on root-knot nematodes and tomato and melon yields. Plant Disease 86 (5): 505-508.
- Ploeg, A., Edwards, S., 2007. *Meloidogyne incognita* host status and biofumigant effect of brassica crop cultivars. Journal of Nematology 39 (1): 102.
- Pocasangre, L. E., Zum-Felde, A., Cañizares, C., Riveros, A. S., Rosales, F. E., Sikora, R., 2004. Manejo alternativo de fitonemátodos en banano y plátano. En: Memorias, XVI reunión internacional de ACORBAT. Oaxaca, México. Pp. 106-112.
- Polonsky, J., 1973. Quassinoid bitter principles. Fortschr Chemistry of Organic Natural Products 30: 101-150.
- Porter, W. M., 1979. The most probable number method for enumerating infective propagules of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. Australian Journal of Soil Research 17: 515-519.
- Preston, J. F., Dickson, D. W., Maruniak, J. E., Nong, G., Brito, J. A., Schmidt, L. M., Giblin-Davis, R. M., 2003. *Pasteuria* spp.: systematics and phylogeny of these bacterial parasites of phytopathogenic nematodes. Journal of Nematology 35: 198-207.
- Prokarel, N. P., Kruchina, S. N., 1991. Effects of *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 and *Meloidogyne hapla* Chitwood, 1949 on the macro-nutrient content of *Trifolium pratense* L. Archives of Phytopathology and Plant Protection 27 (1): 41-44.
- Qureshi, S. A., Ruqqia, Sultana, V., Ara, J., Ehteshamul-Haque, S., 2012. Nematicidal potential of culture filtrates of soil fungi associated with rhizosphere and rhizoplane of cultivated and wild plants. Pakistan Journal of Botany 44(3): 1041-1046.
- Racke, J., Sikora, R. A., 1992. Isolation, formulation and antagonistic activity of rhizobacteria toward the potato cyst nematode *Globodera pallida*. Soil Biology and Biochemistry 24: 521-526.
- Radwan, M. A., Farrag, S. A. A., Abu-Elamayem, M. M., Ahmed, N. S., 2012. Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato using bioproducts of microbial origin. Plant Pathology 56: 58-62.
- Rao, M. S., Gowen, S. R., 1998. Bio-management of *Meloidogyne incognita* on tomato by integrating *Glomus deserticola* and *Pasteuria penetrans*. Journal of Plant Diseases and Protection 105: 49-52.
- Rao, M. S., Kerry, B. R., Gowen, S. R., Bourne, J. M., Reddy, P. P., 1997a. Management of *Meloidogyne incognita* in tomato nurseries by integration of *Glomus deserticola* with *Verticillium chlamyosporium*. Journal of Plant Diseases and Protection 104: 419-422.

- Rao, M. S., Naik, D., Shylaja, M., Reddy, P. P., 2003. Management of *Meloidogyne incognita* on eggplant by integrating endomycorrhiza, *Glomus fasciculatum* with bio-agent *Verticillium chlamyosporium* under field conditions. *Indian Journal of Nematology* 33: 29–32.
- Rao, M. S., Reddy, P., Das, S. M., 1995. Effect of integration of endomycorrhiza (*Glomus mosseae*) and neem cake on the control of root-knot nematode on tomato. *Journal of Plant Diseases and Protection* 102: 526-529.
- Rao, M. S., Reddy, P. P., Mohandas, M. S., 1998. Biointensive management of *Meloidogyne incognita* on eggplant by integrating *Paecilomyces lilacinus* and *Glomus mosseae*. *Nematología Mediterránea* 26: 213-216.
- Rao, M. S., Reddy, P. P., Somasekhar, N., Nagesh, M., 1997b. Management of root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita* in tomato nursery by integration of endomycorrhiza, *Glomus fasciculatum* with castor cake. *Pest Management in Horticultural Ecosystem* 3: 31–35.
- Ratnasoma, H. A., Gowen, S. R., Hague, N. G. M., 1991. Observations on the detachment of spores of *Pasteuria penetrans* from pre-parasitic second-stage juveniles of *Meloidogyne* spp. *Nematologia Mediterranea* 19: 225-227.
- Ratti, N., Kumar, S., Verma, H. N., Gautam, S. P., 2001. Improvement in bioavailability of tricalcium phosphate to *Cymbopogon martinii* var. *motia* by rhizobacteria, AMF and *Azospirillum* inoculation. *Microbiological Research* 156: 145–149.
- Ravichandra, N. G., Reddy, B. M. R., 2008. Efficacy of *Pasteuria penetrans* in the management of *Meloidogyne incognita* infecting tomato. *Indian Journal of Nematology* 38: 172-175.
- Ravnkov, S., Nybroe, O., Jakobsen, I., 1999. Influence of an arbuscular mycorrhizal fungus on *Pseudomonas fluorescens* DF57 in rhizosphere and hyphosphere soil. *New Phytologist* 142: 113–122.
- Reddy, P. P., 1974. Studies on the action of amino acids on the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Ph. D. Thesis, University of Agricultural Sciences, Bangalore, India. 276 pp.
- Reddy, P. P., Nagesh, M., Devappa, V., Kumar, M. V. V., 1998. Management of *Meloidogyne incognita* on tomato by integrating endomycorrhiza, *Glomus mosseae* with oil cakes under nursery and field conditions. *Journal of Plant Diseases and Protection* 105 (1): 53-57.
- Regaieg, H., Ciancio, A., Raouani, N. H., Rosso, L., 2011. Detection and biocontrol potential of *Verticillium leptobactrum* parasitizing *Meloidogyne* spp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27 (7): 1615-1623.
- Reimann, S., Hauschild, R., Hildebrandt, U., Sikora, R. A., 2008. Interrelationships between *Rhizobium etli* G12 and *Glomus intraradices* and multitrophic effects in the biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato. *Journal of Plant Diseases and Protection* 115: 108-113.
- Reina, Y., Crozzoli, R., Greco, N., 2002. Efecto nematocida del extracto acuoso de hojas de algodón de seda (*Calotropis procera*) sobre diferentes especies de nemátodos fitoparasitarios. *Fitopatología Venezolana* 15: 44–49.
- Reino, J. L., Guerrero, R. F., Hernández-Galán, R., Collado, I. G., 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews* 7:89–123.
- Revsbech, N. P., Pedersen, O., Reichardt, W., Briones, A., 1999. Microsensor analysis of oxygen and pH in the rice rhizosphere under field and laboratory conditions. *Biology and Fertility of Soils* 29: 379-385.
- Rey, M., Delgado-Jarana, J., Rincón, A. M., Limón, M. C., Benítez, T., 2000. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. *Revista Iberoamericana de Micología* 17: 31-36.
- Rharrabti, Y., 2001. Adaptación del trigo duro al ambiente mediterráneo: rendimiento, calidad y parámetros morfofisiológicos de selección para resistencia a la sequía. Ph. D. Dissertation. University of Granada (Ed.) Pp. 224.
- Rich, J. R., Olson, S. M., 1999. Utility of Mi gene resistance in tomato to manage *Meloidogyne javanica* in North Florida. *Journal of Nematology* 31: 715-718.
- Riga, E., Lacey, L. A., Guerra, N., 2008. *Muscodor albus*, a potential biocontrol agent against plant-parasitic nematodes of economically important vegetable crops in Washington State, USA. *Biological Control* 45 (3): 380-385.

- Rivera, R., Fernández, F., Hernández, A., Martín, J. R., Fernández-Kalyanne, 2003. El manejo efectivo de la simbiosis micorrícica, una vía hacia una agricultura sostenible. Estudio de caso: El Caribe. INCA, La Habana, Cuba.
- Roberts, P. A., Thomason, I. J., 1989. A review of variability in four *Meloidogyne* spp. measured by reproduction on several hosts including *Lycopersicon*. *Agricultural Zoology Reviews* 3: 225-252.
- Robertson, L., López-Pérez, J. A., Bello, A., Díez-Rojo, M. A., Escuer, M., Piedra-Buena, A., Ros, C., Martínez, C., 2006. Characterization of *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* and *M. hapla* populations from Spain and Uruguay parasitizing pepper (*Capsicum annuum* L.). *Crop Protection* 25: 440-445.
- Rodgers, P. B., 1989. Potential of biological control organisms as a source of antifungal compounds for agrochemical and pharmaceutical product development. *Pesticide Science* 27: 155-164.
- Rodríguez, H., Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17: 319-339.
- Rodríguez-Kabana R., Simmons L., 2005. Fungicidal, herbicidal, and nematicidal activities of essential oils in slow-release formulations. In: XXVII Annual Meeting of ONTA, 17-21 October, Viña del Mar, Chile: 96.
- Ros, M., García, C., Hernández, M. T., Lacasa, A., Fernandez, P., Pascual, J. A., 2008. Effects of biosolarization as methyl bromide alternative for *Meloidogyne incognita* control on quality of soil under pepper. *Biology and Fertility of Soils* 45: 37-44.
- Rossner, J., Zebitz, C. P., 1986. Effect of neem products on nematodes and growth of tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants. *Proceedings of the Third International Neem Conference, Nairobi*. Pp. 611 – 621.
- Rousseau, A., Benhamou, N., Chet, I., Piché, Y., 1996. Mycoparasitism of the extramatrical phase of *Glomus intraradices* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 86: 434-443.
- Rumbos, C., Reimann, S., Kiewnick, S., Sikora, R. A., 2006. Interactions of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 with the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*: Implications for *Meloidogyne incognita* control on tomato. *Biocontrol Science and Technology* 16 (9): 981-986.
- Ryan, M. F., Byrne, O., 1988. Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *Journal of Chemical Ecology* 14: 1965 – 1975.
- Ryan, N. A., Deliopoulos, T., Jones, P., Haydock, P. P., 2003. Effects of a mixed-isolate mycorrhizal inoculum on the potato-potato cyst nematode interaction. *Annals of Applied Biology* 143: 111-119.
- Rydlová, J., Püschel, D., Sudová, R., Gryndler, M., Mikanová, O. and Vosátka, M., 2011. Interaction of arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia: effects on flax yield in spoil-bank clay. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 174: 128-134.
- Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., Pare, P. W., 2004a. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 134: 1017-1026.
- Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Wei, H. X., Pare, P. W., Kloepper, J. W., 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 100: 4927-4932.
- Ryu, C. M., Murphy, J. F., Mysore, K. S., Kloepper, J. W., 2004b. Plant growth-promoting rhizobacteria systemically protect *Arabidopsis thaliana* against cucumber mosaic virus by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid-dependent signaling pathway. *Plant Journal* 39: 381-392.
- Sahebani, N., Hadavi, N., 2008. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biology and Biochemistry* 40 (8): 2016-2020.
- Saleh, H., Sikora, R. A., 1984. The relationship between *Glomus fasciculatum* root colonization of cotton and its effect on *Meloidogyne incognita*. *Nematologica* 30: 230-237.
- Salmerón, T., Cabello, T., 1989. Incidencia de *Meloidogyne incognita* en cultivos de tabaco de la vega de Granada (SE de España). *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas* 14: 307-314.
- San Martín, R., Magunacelaya, J. C., 2005. Control of plant-parasitic nematodes with extracts of *Quillaja saponaria*. *Nematology* 7 (4): 577-585.

- Sankaranarayanan, C., Sundarababu, R., 1997. Effect of oil cakes and nematicides on the growth of blackgram (*Vigna mungo*) inoculated with VAM fungus (*Glomus fasciculatum*) and root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). *Indian Journal of Nematology* 27: 128-130.
- Sanz, R., Escuer, M., López-Pérez, J. A., 1998. Alternatives to methyl bromide for root-knot nematode control in cucurbits. In: Bello, A., González, J. A., Arias, M., Rodríguez-Kabana, R. (Eds.) Alternatives to methyl bromide for the Southern European countries. Valencia, Spain, Phytoma. Pp. 73-84.
- Sariah, M., Choo, C. W., Zakaria, H., Norihan, M. S., 2005. Quantification and characterisation of *Trichoderma* spp. from different ecosystems. *Mycopathologia* 159: 113-117.
- Sasanelli, N., Anton, A., D'Addabbo, T., Takacs, T., 2007. Nematicidal properties of leaf extracts of *Ruta graveolens* inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Russian Journal of Nematology* 15 (1): 65-73.
- Satyandra, Chaubey, A. K., 2010. Management of root knot nematode, *Meloidogyne incognita* using biocontrol agents on tomato, *Lycopersicon Esculentum* Mill. *Journal of Experimental Zoology, India* 13(1): 285-287.
- Sayre, R. M., 1980. Biocontrol: *Bacillus penetrans* and related parasites of nematodes. *Journal of Nematology* 12: 260-270.
- Sayre, R. M., 1993. *Pasteuria*, Metchnikoff, 1888. In: *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics. Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., R. Losick, R., (Eds.) American Society for Microbiology. Washington, USA. Pp. 101-111.
- Sayre, R. M., Start, M. P., 1989. Genus *Pasteuria* Metchnikoff, 1888. In: *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Williams, S. T., Sharpe, M. E., Holt, J. G., (Eds.) Williams and Wilkins. Baltimore, USA. Pp. 2601-2615.
- Schenck, N. C., Perez, Y., 1988. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi, 2nd edition. Florida, University of Florida. 241 pp.
- Schmutterer, H., 1988. Potential of azadirachtin-containing pesticides for integrated pest control in developing and industrialized countries. *Journal of Insect Physiology* 34: 713-719.
- Scholte, K., 2005. Growth and development of plants with potential for use as trap crops for potato cyst nematodes and their effects on the numbers of juveniles in cysts. *Annals of Applied Biology* 137 (1): 31-42.
- Seinhorst, J. W., 1960. Overhet papelen von door aaltj veroozaakte of frensverminndering by culturogrwassen. *Meded Landb Hoogeschool Gent*. 25: 1026-1039.
- Shaban, G. M., El-Komy, H. M. A., 2001. Survival and proliferation of alginate encapsulated *Trichoderma* spp. in Egyptian soil in comparison with allyl alcohol soil fumigation. *Mycopathologia* 151: 139-146.
- Shakil, N. A., Panka, J., Kumar, J., Pandey, R. K., Saxena, D. B., 2008. Nematicidal prenylated flavanones from *Phyllanthus niruri*. *Phytochemistry* 69: 759-764.
- Sharon, E., Bar-Eyal, M., Chet, I., Herrera-Estrella, A., Kleifeld, O., Spiegel, Y., 2001. Biocontrol of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 91: 687-693.
- Sharon, E., Chet, I., Viterbo, A., Bar-Eyal, M., Nagan, H., Samuels, G. J., Spiegel, Y., 2007. Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix. *European Journal of Plant Pathology* 118: 247-258.
- Shoresh, M., Yedidia, I., Chet, I., 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* 95: 76-84.
- Siddique, M. R. B., Hamid, A., Islam, M. S., 2000. Drought stress effects on water relation of wheat. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 41(1): 35-39.
- Siddiqui, I. A., Ehteshamul-Haque, S., 2001. Suppression of the root rot-root knot disease complex by *Pseudomonas aeruginosa* in tomato: The influence of inoculum density, nematode populations, moisture and other plant-associated bacteria. *Plant and Soil* 237 (1): 81-89.
- Siddiqui, I. A., Qureshi, A., Sultana, V., Ehteshamul-Haque, S., Ghaffar, A., 2000. Biological control of root rot-root knot disease complex of tomato. *Plant and Soil* 227 (1-2): 163-169.
- Siddiqui, I. A., Shaikat, S. S., 2003a. Endophytic bacteria: prospect and opportunities for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Nematologia Mediterranea* 31: 111-120.

- Siddiqui, I. A., Shaukat, S. S., 2003b. Non-pathogenic *Fusarium solani* represses the biosynthesis of nematocidal compounds *in vitro* and reduces the biocontrol of *Meloidogyne javanica* by *Pseudomonas fluorescens* in tomato. Letters in Applied Microbiology 37 (2): 109-114.
- Siddiqui, I. A., Shaukat, S. S., 2004a. Systemic resistance in tomato induced by biocontrol bacteria against the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* is dependent of SA production. Phytopathology 152: 48-54.
- Siddiqui, I. A., Shaukat, S. S., 2004b. *Trichoderma harzianum* enhances the production of nematocidal compounds *in vitro* and improves biocontrol of *Meloidogyne javanica* by *Pseudomonas fluorescens* in tomato. Letters in Applied Microbiology 38 (2): 169-175.
- Siddiqui, I. A., Shaukat, S. S., Khan, A., 2004. Differential impact of some *Aspergillus* species on *Meloidogyne javanica* biocontrol by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0. Letters in Applied Microbiology 39: 74-83.
- Siddiqui, Z. A., 2004. Effects of plant growth promoting bacteria and composed organic fertilizers on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and tomato growth. Bioresource Technology 95 (2): 223-227.
- Siddiqui, Z. A. 2006. PGPR: Prospective biocontrol agents of plant pathogens. In: PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Siddiqui, Z. A. (Ed.) Springer, The Netherlands. Pp. 111-142.
- Siddiqui, Z. A., Akhtar, M. S., 2008a. Effects of organic wastes, *Glomus intraradices* and *Pseudomonas putida* on the growth of tomato and on the reproduction of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Phytoparasitica 36 (5): 460-471.
- Siddiqui, Z. A., Akhtar, M. S., 2008b. Synergistic effects of antagonistic fungi and a plant growth promoting rhizobacterium, an arbuscular mycorrhizal fungus, or composted cow manure on populations of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. Biocontrol Science and Technology 18: 279-290.
- Siddiqui, Z. A., Akhtar, M. S., 2009a. Effect of plant growth promoting rhizobacteria, nematode parasitic fungi and root-nodule bacterium on root-knot nematodes *Meloidogyne javanica* and growth of chickpea. Biocontrol Science and Technology 19 (5): 511-521.
- Siddiqui, Z. A., Akhtar, M. S., 2009b. Effects of antagonistic fungi, plant growth-promoting rhizobacteria, and arbuscular mycorrhizal fungi alone and in combination on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. Journal of General Plant Pathology 75: 144-153.
- Siddiqui, Z. A., Akhtar, M.S., 2009c. Effects of antagonistic fungi and plant growth-promoting rhizobacteria on growth of tomato and reproduction of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Australasian Plant Pathology 38: 22-28.
- Siddiqui, Z. A., Baghel, G., Akhtar, M.S., 2007. Biocontrol of *Meloidogyne javanica* by *Rhizobium* and plant growth-promoting rhizobacteria on lentil. World Journal of Microbiology and Biotechnology 23 (3): 435-441.
- Siddiqui, Z. A., Iqbal, A., Mahmood, I., 2001. Effects of *Pseudomonas fluorescens* and fertilizers on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. Applied Soil Ecology 16 (2): 179-185.
- Siddiqui, Z. A., Mahmood, I., 1993. Biological-control of *Meloidogyne incognita* race-3 and *Macrophomina phaseolina* by *Paecilomyces lilacinus* and *Bacillus subtilis* alone and in combination on chickpea. Fundamental and Applied Nematology 16 (3): 215-218.
- Siddiqui, Z. A., Mahmood, I., 1996. Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: A review. Bioresource Technology 58 (3): 229-239.
- Siddiqui, Z. A., Mahmood, I., 1998. Effect of a plant growth promoting bacterium, an AM fungus and soil types on the morphometrics and reproduction of *Meloidogyne javanica* on tomato. Applied Soil Ecology 8: 77-84.
- Siddiqui, Z. A., Mahmood, I., 2001. Effects of rhizobacteria and root symbionts on the reproduction of *Meloidogyne javanica* and growth of chickpea. Bioresource Technology 79: 41-45.
- Siddiqui, Z. A., Mahmood, I., 2003. Effects of plant straws and plant growth promoting bacteria on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. Biological Agriculture and Horticulture 21 (1): 53-62.
- Siddiqui, Z. A., Qureshi, A., Akhtar, M. S., 2009. Biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates on *Pisum sativum*. Archives of Phytopathology and Plant Protection 42(12): 1154-1164.

- Siddiqui, Z. A., Singh, L. P., 2005. Effects of fly ash, *Pseudomonas straita* and *Rhizobium* on the reproduction of nematode *Meloidogyne incognita* and on the growth and transpiration of pea. *Journal of Environmental Biology* 26 (1): 117-122.
- Sidhu, T. S., Zhang, X., Al-Basri, F., Sachdev, M. S., 2003. New DFT-based technique for removal of decaying DC offset from phasor estimates. *IEE Proceedings C-Generation, Transmission and distribution* 150: 745-752.
- Sieverding, E., 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Federal Republic of Germany: Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (Gtz) GMBH. Eschborn, Germany. 371 pp.
- Sikora, R. A., Niere, B., Kimenju, J., 2003. Endophytic microbial biodiversity and plant nematode management in African agriculture. In: Neuenschwander, P., Borgermeister, C., Langewald, J., (Eds.) *Biological Control in IPM Systems in Africa*: 179-192.
- Sikora, R. A., Pocasangre, L., Zum-Felde, A., Niere, B., Vu, T. T., Dababat, A. A., 2008. Mutualistic endophytic fungi and *in-planta* suppressiveness to plant parasitic nematodes. *Biological Control* 46 (1): 15-23.
- Sikora, R. A., Schäfer, K., Dababat, A. A., 2007. Modes of action associated with microbially induced *in planta* suppression of plant-parasitic nematodes. *Australasian Plant Pathology* 36: 124-134.
- Singh, P., Siddiqui, Z.A., 2010. Biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by the isolates of *Bacillus* on tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 43 (6): 553-564.
- Singh, S., Mathur, N., 2010a. *In vitro* studies of antagonistic fungi against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Biocontrol Science and Technology* 20 (3): 275-282.
- Singh, S., Mathur, N., 2010b. Biological control of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* infesting tomato. *Biocontrol Science and Technology* 20 (8): 865-874.
- Sivasithamparan, K., Ghisalberti, E. L., 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In *Trichoderma and Gliocladium*, vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics (Kubicek, C. P., Harman, G. E., (Eds.) Taylor & Francis, London. Pp. 139-191.
- Smiley, R. W., Whittaker, R. G., Gourlie, J. A., Easley, S. A., 2005a. Suppression of wheat growth and yield by *Pratylenchus neglectus* in the Pacific Northwest. *Plant Disease*: 89(9): 958-968.
- Smiley, R. W., Whittaker, R. G., Gourlie, J. A., Easley, S. A., 2005b. *Pratylenchus thornei* associated with reduced wheat yield in Oregon. *Journal of Nematology* 37(1): 45-54.
- Smith, G. S., Kaplan, D. T., 1988. Influence of mycorrhizal fungus, phosphorus, and burrowing nematode interactions on growth of rough lemon citrus seedlings. *Journal of Nematology* 20: 539-544.
- Smith, K. P., Handelsman, J., Goodman, R. M., 1997. Modeling dose-response relationships in biological control: partitioning host responses to the pathogen and the biocontrol agent. *Phytopathology* 87: 720-729.
- Smith, S. E., Read, D. J., 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press. Cambridge, UK. 605 pp.
- Society of Nematologists, 1994. *Plant and Soil Nematodes: Societal impact and focus for the future*. Cooperative State Research Service and U. S. Department of Agriculture. Athens, GA, USA. 12 pp.
- Soler-Serratos, A., Kokalis-Burelle, N., Rodríguez-Kábana, R., Weaver, C. F., King, P. S., 1996. Allelochemicals for control of plant-parasitic nematodes. 1. *In vivo* nematicidal efficacy of thymol and thymol/benzaldehyde combinations. *Nematropica* 26: 57-71.
- Son, S. H., Khan, Z., Kim, S. G., Kim, Y. H., 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria, *Paenibacillus polymyxa* and *Paenibacillus lentimorbus* suppress disease complex caused by root-knot nematode and fusarium wilt fungus. *Journal of Applied Microbiology* 107: 524-532.
- Sood, S. G., 2003. Chemotactic response of plant-growth-promoting bacteria towards roots of vesicular-arbuscular mycorrhizal tomato plants. *FEMS Microbiology Ecology* 45: 219-227.
- Sorribas, F. J., Ornat, C., Galeano, M., Verdejo-Lucas, S., 2003. Evaluation of a native and introduced isolate of *Pochonia chlamydosporia* against *Meloidogyne javanica*. *Biocontrol Science and Technology* 13 (8): 707-714.

- Sorribas, F. J., Ornat C., Verdejo-Lucas. S., Galeano, M., Valero, J., 2005. Effectiveness and profitability of the Mi-resistant tomatoes to control root-knot nematodes. *European Journal of Plant Pathology* 111: 29-38.
- Sorribas, F. J., Verdejo-Lucas, S., 1994. Survey of *Meloidogyne* spp. in tomato production fields of Baix Llobregat County, Spain. *Journal of Nematology* 26: 731-736.
- Sosa, M. E., Lancelle, H. G., Tonn, C. E., Andres, M. F., Gonzalez-Coloma, A., 2012. Insecticidal and nematocidal essential oils from Argentinean *Eupatorium* and *Baccharis* spp. *Biochemical Systematics and Ecology* 43: 132-138.
- Sotomayor, D., Allen Jr., L. H., Chen, Z., Dickson, D. W., Hewlett, T., 1999. Anaerobic soil management practices and solarization for nematode control in Florida. *Nematropica* 29 (2): 153-170.
- Spaull, V. W., 1984. Observations on *Bacillus penetrans* on the penetration and multiplication of *Heterodera cajani* in *Vigna unguiculata* roots. *Nematologia Mediterranea* 22: 159-262.
- Spiegel, Y., Chet, I., 1998. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against soil-borne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. *Integrated Pest Management Reviews* 3: 169-175.
- Spiegel, Y., Sharon, E., Bar-Eyal, M., Van Assche, A., Van Kerckhove, S., Vanachter, A., Viterbo, A., Chet, I., 2006. Evaluation and mode of action of *Trichoderma* isolates as a biocontrol agent against plant-parasitic nematodes. In: Proceedings of IOBC Meeting, Spa, Belgium, IOBC Bulletin.
- Srivastava, R., Khalid, A., Singh, U. S., Sharma A. K., 2010. Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus , fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of tomato wilt. *Biological Control* 53 (1): 24-31.
- Stapleton, J. J., 2000. Soil solarization in various agricultural production systems. *Crop Protection* 19: 837-841.
- Stapleton, J. J., Duncan, R. A., 1998. Soil disinfestation with cruciferous amendments and sublethal heating: effects on *Meloidogyne incognita*, *Sclerotium rolfsii* and *Pythium ultimum*. *Plant Pathology* 47: 737-742.
- Stapleton, J. J., Heald, C. M., 1991. Management of phytopathogenic nematodes by soil solarization. In: Soil Solarization. Katan, J., Devay, J. E., (Eds.) CRC Press, Boca Raton, FL. USA. Pp. 51-60.
- Stark, J. D., Walter, J. F., 1995. Persistence of azadirachtin A and B in soil: effects of temperature and microbial activity. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 30: 685-698.
- Stirling, G. R., 1981. Effect of temperature on infection of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. *Nematologica* 27: 458-462.
- Stirling, G. R., 1984. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. *Phytopathology* 74: 55-60.
- Stirling, G. R., 1985. Host specificity of *Pasteuria penetrans* within the genus *Meloidogyne*. *Nematologica*: 203-209.
- Stirling, G. R., 2000. Nematode monitoring strategies for vegetable crops. RIRDC publication N° 00/25. Rural Industries Research and Development Corporation. Kingston, Australia. 40 pp.
- Stirling, G. R., Sharma, R. D., Perry, J., 1990. Attachment of *Pasteuria penetrans* spores to the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in soil and its effects on infectivity. *Nematologica* 36: 246-252.
- Stirling, G. R., Smith, L. J., 1998. Field tests of formulated products containing either *Verticillium chlamydosporium* or *Arthrobotrys dactyloides* for biological control of root-knot nematodes. *Biological Control* 11 (3): 231-239.
- Stirling, G. R., Wachtel, M F., 1980. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. *Nematologica* 26: 308-312.
- Suárez, B., Llobell, A., 2004. Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65:46-55
- Subbotin, S., Moens, M., 2006. Molecular taxonomy and phylogeny. In: Perry, R., Moens, M. (Eds.) *Plant Nematology*. CAB International. Wallingford, Oxon, UK. Pp. 33-51.

- Sundaram, K. M. S., 1996. Azadirachtin biopesticide: a review of studies conducted on its analytical chemistry, environmental behaviour and biological effects. *Journal of Environmental Science and Health* 31: 913-948.
- Sundaram, K. M. S., Sundaram, A., Curry, J., Sloane, L., 1997. Dissipation kinetics of azadirachtin in some forest matrices and its systemic translocation in conifers for spruce budworm control. *Journal of Environmental Science and Health* 32: 803-829.
- Suresh, C. K., 1980. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhiza and root-knot nematode in tomato. M.Sc. (Agric.). Thesis, University of Agriculture Sciences, Bangalore, India, 104 pp.
- Talavera, M., 2004. Manual de Nematología. IRFAP, Conselleria d'Agricultura i Pesca de les illes Balears. Palma, España. 28 pp.
- Talavera, M. 2011. Detección, extracción y diagnóstico de nemátodos fitoparásitos. En: "Enfermedades causadas por nemátodos fitoparásitos en España". Andrés-Yeves, M. F., Verdejo-Lucas, S. (Eds.) Sociedad Española de Fitopatología -Phytoma España. Madrid, España. Pp. 41-59.
- Talavera, M., Itou, K., Mizukubo, T., 2001. Reduction of nematode damage by root colonization with arbuscular mycorrhiza (*Glomus* spp.) in tomato-*Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Meloidogynidae) and carrot-*Pratylenchus penetrans* (Tylenchida: Pratylenchidae) pathosystems. *Applied Entomology and Zoology* 36: 387-392.
- Talavera, M., Itou, K., Mizukubo, T., 2002. Combined application of *Glomus* sp. and *Pasteuria penetrans* for reducing *Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Meloidogynidae) populations and improving tomato growth. *Applied Entomology and Zoology* 37 (1): 61-67.
- Talavera, M., Valor, H., Tobar, A., 1999. Nemátodos parásitos de los cultivos intensivos bajo plástico en las áreas de Carchuna (Granada) y Balanegra (Almería). *Cuadernos de Fitopatología* 60: 4-7.
- Talavera, M., Verdejo-Lucas, S., Ornat, C., Torres, J., Vela, M. D., Macias, F. J., Cortada, L., Arias, D. J., Valero, J., and Sorribas, F. J., 2009. Crop rotations with Mi gene resistant and susceptible tomato cultivars for management of root-knot nematodes in plastic houses. *Crop Protection* 28: 662-667.
- Tanda, A.S., Atwal, A.S., Bajaj, Y.P.S., 1989. *In vitro* inhibition of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by sesame root exudate and its amino acids. *Nematologica* 35 (1): 115-124.
- Tariq, M., Dawar, S., Mehdi, F. S., Zaki, M. J., 2007. Use of *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. in the control of root knot nematode *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood on okra and mash bean. *Turkish Journal of Biology* 31: 225-230.
- Tarkalson, D. D., Payero, J. O., 2008. Comparison of nitrogen fertilization methods and rates for subsurface drip irrigated corn in the semi-arid great plains. *Transactions of the American Society of Agricultural and Biological Engineers* 51 (5): 1633-1643.
- Tawaray, K., Naito, M., Wagatsuma, T., 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by hyphal exudates of arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Nutrition* 29: 657-665.
- Tenuta, M., Lazarovits, G., 2004. Ammonia and nitrous acid from nitrogenous amendments kill microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 92: 255-264.
- Terefe, M., Tefera, T., Sakhuja, P. K., 2009. Effect of a formulation of *Bacillus firmus* on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infestation and the growth of tomato plants in the greenhouse and nursery. *Journal of Invertebrate Pathology* 100: 94-99.
- Thoden, T. C., Boppré, M., Hallmann J., 2007. Pyrrolizidine alkaloids of *Chromolaena odorata* act as nematocidal agents and reduce infection of lettuce roots by *Meloidogyne incognita*. *Nematology* 9: 343- 349.
- Thoeming, G., Poehling, H. M., 2006. Soil application of different neem products to control *Ceratothripoides claratris* (Thysanoptera: Thripidae) on tomatoes grown under protected cultivation in the humid tropics (Thailand). *International Journal of Pest Management* 52: 239-248.
- Thomas, G. E., Kiwanga, S. S., 1993. Use of ranking and scoring methods in the analysis of ordered categorical data from factorial experiments. *Journal of the Royal Statistical Society. Series D (The Statistician)* 42(1): 55-67.

- Thrane, C., Tronsmo, A., Jensen, D. F., 1997. Endo-1,3- β -glucanase and cellulase from *Trichoderma harzianum*: purification and partial characterization, induction of and biological activity against plant pathogenic *Pythium* spp. *European Journal of Plant Pathology* 103: 331–344.
- Tobar, A., Valor, H., Talavera, M., 1996. On the field anhydrobiotic ability of *Pratylenchus thornei* and *Merlinius brevidens*. *Fundamental and Applied Nematology* 19 (1): 43-46.
- Tomczak, A., Koropacka, K., Smant, G., Goverse, A., Bakker, E., 2009. Resistant plant responses. In: *Cell Biology of Plant Nematode Parasitism*. Berg, R. H., Taylor, C. G. (Eds.) *Plant Cell Monographs*, vol. 15. Springer-Verlag. Berlin, Germany. Pp. 83-113.
- Toro, M., Azcón, R., Barea, J. M., 1997. Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (32P) and nutrient cycling. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4408-4412.
- Trappe, J. M., Molina, R., Castellano, M., 1984. Reactions of mycorrhizal fungi and mycorrhiza formation to pesticides. *Annual Review of Phytopathology* 22: 331-359.
- Trouvelot, A., Kough, J. L., Gianinazzi-Pearson, V., 1986. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de methods d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*. Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi S. (Eds.) INRA, Paris (France). Pp. 101-109.
- Trudgill, D. L., Blok, V. C., 2001. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 39: 53-77.
- Trudgill, D. L., Bolla, G., Blok, V. C., Daudi, A., Davies, K. G., Gowen, S. R., Fargette, M., Madulu, J. D., Mateille, T., Mwangui, W., et al., 2000. The importance of tropical root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and factors affecting the utility of *Pasteuria penetrans* as a biocontrol agent. *Nematologica* 2: 823-845.
- Twomey U., Rolfe R. N., Warrior P., Perry R.N., 2002. Effects of the biological nematicide, DiTera®, on movement and sensory responses of second stage juveniles of *Globodera rostochiensis*, and stylet activity of *G. rostochiensis* and fourth stage juveniles of *Ditylenchus dipsaci*. *Nematology* 4 (8): 909-915.
- Tworkoski, T., 2002. Herbicide effects of essential oils. *Weed Science* 50: 425–431.
- Tzortzakakis, E. A., Channer, A. G. D., Gowen, S. R., Ahmed, R. E. A., 1997. Studies on the potential use of *Pasteuria penetrans* as a biocontrol agent of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Plant Pathology* 46 (1): 44-55.
- Tzortzakakis, E. A., Gowen, S. R., 1994. Evaluation of *Pasteuria penetrans* alone in combination with oxamyl, plant resistance and solarization for control of *Meloidogyne* spp. on vegetables grown in greenhouses in Crete. *Crop Protection* 13: 455–462.
- Tzortzakakis, E. A., Gowen, S. R., Goumas, D. E., 1996. Decreased ability of *Pasteuria penetrans* spores to attach to successive generations of *Meloidogyne javanica*. *Fundamental and Applied Nematology* 19: 201-204.
- Tzortzakakis, E. A., Verdejo-Lucas, S., Ornat, C., Sorribas, F. J., Goumas, D. E., 1999. Effect of a previous resistant cultivar and *Pasteuria penetrans* on population densities of *Meloidogyne javanica* in greenhouse grown tomatoes in Crete, Greece. *Crop Protection* 18: 159–162.
- United Nations Environment Programme (UNEP), 1992. Synthesis report of the methyl bromide interim scientific assessment and methyl bromide interim technology and economic assessment. In: *Montreal Protocol Assess, Supplement June 1992*, Nairobi, Kenya. Pp. 33.
- Urban, J., Kokoska, L., Langrova, I., Matejkova, J., 2008. *In Vitro* anthelmintic effects of medicinal plants used in Czech Republic. *Pharmaceutical Biology* 46: 808-813.
- Vagelas, I. K., Pembroke, B., Gowen, S. R., Davies, K. G., 2007. The control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) by *Pseudomonas oryzae* and its immunological detection on tomato roots. *Nematology* 9 (3): 363-370.
- Valdenegro, M., Barea, J. M., Azcón, R., 2001. Influence of arbuscular-mycorrhizal fungi, *Rhizobium* strains and PGPR inoculation on the growth of *Medicago arborea* used as a model legume for revegetation and biological reactivation in a semi-arid Mediterranean area. *Plant Growth Regulation* 34: 233–240.

- Vázquez, M. M., Cesar, S., Azcón, R., Barea, J. M., 2000. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Applied Soil Ecology* 15: 261–272.
- Verdejo-Lucas, S., 1992. Seasonal population fluctuations of *Meloidogyne* spp. and the *Pasteuria penetrans* group in kiwi orchards. *Plant Disease* 76: 1275-1279.
- Verdejo-Lucas, S., 1999. Nematodes. In: *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops*. Albajes, R., Gullino, M. L., Van Lenteren, J. C. (Eds.) Kluwer Academia Press. Dordrecht, Holanda. Pp. 61-68.
- Verdejo-Lucas, S., Cortada, L., Sorribas, F. J., Ornat, C., 2009. Selection of virulent populations of *Meloidogyne javanica* by repeated cultivation of Mi resistance gene tomato rootstocks under field conditions. *Plant Pathology* 58: 990-998.
- Verdejo-Lucas, S., Ornat, C., Sorribas, F. J., Stchiegel, A., 2002. Species of root-knot nematodes and fungal egg parasites recovered from vegetables in Almería and Barcelona. *Journal of Nematology* 34: 405-408.
- Verdejo-Lucas, S., Sorribas, F. J., Ornat, C., Galeano, M., 2003. Evaluating *Pochonia chlamydosporia* in a double-cropping system of lettuce and tomato in plastic houses infested with *Meloidogyne javanica*. *Plant Pathology* 52 (4): 521-528.
- Verma, S. C., Ladha, J. K., Tripathi, A. K., 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology* 91: 127-141.
- Vessey, J. K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255: 571-586.
- Vessey, J. K., Buss, T. J., 2002. *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N accumulation in grain legumes. *Controlled-environment studies*. *Canadian Journal of Plant Science* 82: 282–290.
- Vestberg, A., Kukkonen, S., Saari, K., Parikka, P., Huttunen, J., Tainio, L., Devos, D., Weekers, F., Kevers, C., Thonart, P., Lemoine, M. C., Cordier, C., Alabouvette, C., Gianinazzi, S., 2004. Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry. *Applied Soil Ecology* 27: 243–258.
- Vivas, A., Barea, J. M., Biró, B., Azcón, R., 2006. Effectiveness of autochthonous bacterium and mycorrhizal fungus on *Trifolium* growth, symbiotic development and soil enzymatic activities in Zn contaminated soil. *Journal of Applied Microbiology* 100: 587–598.
- Vivas, A., Vörös, I., Biró, B., Campos, E., Barea, J. M., Azcón, R., 2003. Symbiotic efficiency of autochthonous arbuscular mycorrhizal fungus (*G. mosseae*) and *Brevibacillus* sp. isolated from cadmium polluted soil under increasing cadmium levels. *Environmental Pollution* 126: 179–189.
- Vos, C., Claerhout, S., Mkandawire, R., Panis, B., De Waele, D., Elsen, A., 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi reduce root-knot nematode penetration through altered root exudation of their host. *Plant and Soil* 354 (1-2): 335-345.
- Vos, C. M., Tesfahun, A. N., Panis, B., De Waele, D., Elsen, A., 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi induce systemic resistance in tomato against the sedentary nematode *Meloidogyne incognita* and the migratory nematode *Pratylenchus penetrans*. *Applied Soil Ecology* 61: 1-6.
- Waceke, J. W., Waudu, S. W., Sikora, R., 2001. Response of *Meloidogyne hapla* to mycorrhiza fungi inoculation on pyrethrum. *African Journal of Environmental Science and Technology* 2: 63-70.
- Walia, R. K., Sharma, S. B., Vats, R., 2000. Bacterial antagonists of phytonematodes. In: *Biocontrol Potential and its Exploitation in Sustainable Agriculture: Crop Diseases, Weeds, and Nematodes*, vol. 1. Upadhyay, R. R., Mukerji, K. G., Chamola, B. P., (Eds.) Kluwer Academy Plenum. New York, USA. Pp. 173-186.
- Walia, R. K., Vats, R., 2000. Fungal antagonists of phytonematodes. In: *Biocontrol Potential and its Exploitation in Sustainable Agriculture: Crop Diseases, Weeds, and Nematodes*, vol. 1. Upadhyay, R. R., Mukerji, K. G., Chamola, B. P. (Eds.) Kluwer Academy Plenum. New York, USA. Pp. 155-172.
- Walley, F. L., Germida, J. J., 1997. Response of spring wheat (*Triticum aestivum*) to interactions between *Pseudomonas* species and *Glomus clarum* NT4. *Biology and Fertility of Soils* 24: 365-371.
- Wan, M. T., Rahe, J. E., 1998. Impact of azadirachtin on *Glomus intraradices* and vesicular-arbuscular mycorrhiza in root inducing transferred DNA transformed roots of *Daucus carota*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 2041-2050.

- Wang, K. H., Hooks, C. R., Ploeg, A., 2007. Protecting crops from nematode pests: using marigold as an alternative to chemical nematicides. Cooperative Extension Service. Plant Disease 35: 1-6.
- Wang, K. H., McSorley, R., 2008. Exposure time to lethal temperatures for *Meloidogyne incognita* suppression and its implication for soil solarization. Journal of Nematology 40: 7-12.
- Weibelzahl-Fulton, E., Dickson, D.W., Whitty, E.B., 1996. Suppression of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* by *Pasteuria penetrans* in field soil. Journal of Nematology 28: 43-49.
- Wenke, K., Kai, M., Piechulla, B., 2010. Belowground volatiles facilitate interactions between plant roots and soil organisms. Planta 231: 499-506.
- Whipps, J. M., 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany 52: 487-511.
- Whitehead, A. G., Hemming, J. R., 1965. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. Annals of Applied Biology 55: 25-38.
- Whitelaw, M., 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. Advances in Agronomy 69: 99-151.
- Williams, A. B., Stirling, G. R., Hayward, A. C., Perry, J., 1989. Properties and attempted culture of *Pasteuria penetrans*, a bacterial parasite of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*). Journal of Applied Bacteriology 67: 145-156.
- Windham, M. T., Elad, Y. and Baker, R., 1986. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. Phytopathology 76: 518-521.
- Wood, C. W., Reeves, D. W., Duffield, R. R., Edmisten, K. L., 1992. Field chlorophyll measurements for evaluation of corn nitrogen status. Journal of Plant Nutrition 15 (4): 487-500.
- Wuyts, N., Swennen, R., De Waele, D., 2006a. Effects of plant phenylpropanoid pathway products and selected terpenoids and alkaloids on the behaviour of the plant-parasitic nematodes *Radopholus similis*, *Pratylenchus penetrans* and *Meloidogyne incognita*. Nematology 8: 89-101.
- Wuyts, N., Zin Thu Zar, M., Swennen, R., De Waele, D., 2006b. Banana rhizodeposition: characterization of root border cell production and effects on chemotaxis and motility of the parasitic nematode *Radopholus similis*. Plant and Soil 283:217-228.
- Wyss, P., Boller, T. H., Wiemken, A., 1992. Testing the effect of biological control agents on the formation of vesicular arbuscular mycorrhiza. Plant and Soil 147:159-162.
- Xu, H. L., 2000. Soil-root interface water potential in sweet corn as affected by organic fertilizer and a microbial inoculant. Journal of Crop Production 3: 139-156.
- Yang, Z. S., Li, G. H., Zhao, P. J., Zheng, X., Luo, S. L., Li, L., Niu, X. M., Zhang, K. Q., 2010. Nematicidal activity of *Trichoderma* spp. and isolation of an active compound. World Journal of Microbiology and Biotechnology 26: 2297-2302.
- Yedidia, I., Benhamou, N., Chet, I., 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology 65: 1061-1070.
- Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y., Chet, I., 2000. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. Plant Physiology and Biochemistry 38: 863-873.
- Yedidia, I., Shoshitashvili, M., Kerem, Z., Benhamou, N., Kapulnik, Y., Chet, I., 2003. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and the accumulation of phytoalexins. Applied and Environmental Microbiology 69: 7343-7353.
- Yedidia, I., Srivastva, A. K., Kapulnik, Y., Chet, I., 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. Plant Soil 235: 235-242.
- Zeilinger, S., Galhaup, C., Payer, K., Woo, S. L., Mach, R. L., Fekete, C., Lorito, M., Kubicek, C. P., 1999. Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. Fungal Genetics and Biology 26: 131-140.

- Zhang, G., Raza, W., Wang, X., Ran, W., Shen, Q., 2012. Systemic modification of cotton root exudates induced by arbuscular mycorrhizal fungi and *Bacillus vallismortis* HJ-5 and their effects on *Verticillium* wilt disease. *Applied Soil Ecology* 61: 85-91.
- Zhang, L. D., Zhang, J. L., Christie, P., Li, X. L., 2009. Effect of inoculation with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in cucumber. *Journal of Plant Nutrition* 32 (6): 967-979.
- Zhang, S. X., Zhang, X., 2009. Effects of two composted plant pesticide residues, incorporated with *Trichoderma viride*, on root-knot nematode in balloonflower. *Agricultural Sciences in China* 8(4): 447-454.
- Zijlstra, C., Donkers-Venne D. T. H. M., Fargette, M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterized amplified region (SCAR) based PCR assays. *Nematology* 2: 847-853.
- Zimand, G., Elad, Y., Chet, I., 1996. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathology* 86: 1255–1260.
- Zouhar, M., Douda, O., Lhotsky, D., Pavela, R., 2009. Effect of plant essential oils on mortality of the stem nematode (*Ditylenchus dipsaci*). *Plant Protection Science* 45 (2): 66-73.
- Zum-Felde, A., Pocasangre, L. E., Cañizares-Monteros, C. A., Sikora, R. A., Rosales, F. E., Riveros, A. S., 2006. Effect of combined inoculations of endophytic fungi on the biocontrol of *Radopholus similis*. *InfoMusa* 15: 12–18.

