



Universidad de Almería

Escuela Superior de Ingeniería

Trabajo Fin de Máster

**EVALUACIÓN DE DOS TÉCNICAS
ANALÍTICAS PARA LA DETECCIÓN Y
CUANTIFICACIÓN DE NEMATODOS DEL
GÉNERO *MELOIDOGYNE* EN MUESTRAS
DE SUELO**

Máster de Producción Vegetal de Cultivos
Protegidos.

Alumna: Judith Pozo de la Hoz

Tutor: Julio César Tello Márquina

EVALUACIÓN DE DOS TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE NEMATODOS DEL GÉNERO *MELOIDOGYNE* EN MUESTRAS DE SUELO.

Resumen

Los nematodos fitoparásitos producen problemas fitosanitarios que tienen una incidencia económica muy importante a escala mundial. Las especies del género *Meloidogyne* constituyen el principal problema nematológico de la horticultura española. En la costa de Almería la pérdida media de rendimiento se estima en alrededor de 30,8% de la producción total de hortalizas. El diagnóstico nematológico y el conocimiento de la distribución y densidades poblacionales de los nematodos fitoparásitos es un requisito imprescindible a la hora de planificar estrategias de control, ya que las posibles pérdidas de producción causadas por los nematodos, son función de sus densidades en suelo en el momento de la siembra o trasplante. En este trabajo se comparan dos técnicas analíticas para evaluar poblaciones en el suelo de un invernadero cultivado con tomate. Los resultados evidencian las diferencias entre ambos procedimientos. Diferencias que parecen más ligadas a la propia muestra del suelo que a la técnica utilizada para su análisis.

Palabras clave: *Meloidogyne*, suelo, tomate, desinfección.

INTRODUCCIÓN

Los nematodos son organismos vermiformes de sección circular protegidos por una espesa cutícula quitinoide. De origen acuático, han colonizado prácticamente todos los medios en todas las latitudes. En el suelo los nematodos constituyen la fracción más importante de la biomasa microbiana (Dijan-Caporalino *et al.*, 2004). Los nematodos fitoparásitos producen problemas fitosanitarios que tienen una incidencia económica muy importante a escala mundial, sin embargo frecuentemente su presencia ha pasado inadvertida y dicha ignorancia se ha cubierto con el término general de "fatiga de suelo" (Dijan-Caporalino *et al.*, 2004). Aunque sus daños son difícilmente cuantificables se considera que provocan unas pérdidas no inferiores al 10% de la producción mundial, es decir, aproximadamente un tercio de las pérdidas atribuidas a las plagas y enfermedades (Whitehead, 1998). Están ampliamente distribuidos en suelos naturales y cultivados de todas las regiones del mundo y la magnitud de las pérdidas depende fundamentalmente de las densidades de población en suelo y/o raíces, de la susceptibilidad del cultivo, y de las condiciones medioambientales (Verdejo-Lucas y Castillo, 2011).

Las especies del género *Meloidogyne* son endoparásitos sedentarios de naturaleza polífaga y constituyen el principal problema nematológico de la horticultura española (Navas *et al.*, 2001; Robertson *et al.*, 2006; Téliz *et al.*, 2007). En España se han citado 10 especies del género *Meloidogyne* como patógenos de plantas (Andrés *et al.*, 1998; Castillo *et al.*, 2003; Gómez Barcina *et al.*, 1989; Peña-Santiago *et al.*, 2004; Palomares-Rius *et al.*, 2007). *Meloidogyne incognita* y *M. javanica* son las especies de mayor distribución (Rodríguez Rodríguez, 1984, 1989; Gómez-Barcina *et al.*, 1989; Sorribas y Verdejo-Lucas, 1994; Espárrago y Navas, 1995; Ornat *et al.*, 2001; Peña-Santiago *et al.*, 2004.) y ambas especies presentan una elevada incidencia en tomate y otros cultivos agrícolas en Andalucía (Talavera *et al.*, 1999; Verdejo-Lucas *et al.* 2002; Castillo y Jiménez-Díaz, 2003). La mayor parte de la información disponible sobre el

daño y las pérdidas de producción que ocasiona *Meloidogyne* en España se refiere al tomate debido a la importancia económica de este cultivo. Las pérdidas de producción en tomate representan entre un 10 y un 15% de promedio (Bello *et al.*, 1996). Sin embargo en suelos altamente infestados las pérdidas son mayores y pueden alcanzar entre un 30 y un 60% en cultivos protegidos. La predisposición de las plantas infectadas por el nematodo a infecciones secundarias por hongos o bacterias suele agravar aún más el efecto perjudicial sobre la planta (Castillo y Jiménez-Díaz, 1996). En la costa de Almería *Meloidogyne javanica* es la especie más frecuente seguido de *M. incognita* y *M. arenaria*. El 17,7% de los campos están infestados con nematodos. La pérdida media de rendimiento se estima en alrededor de 30,8% de la producción total de hortalizas (Talavera *et al.*, 2012). En España se han identificado las razas 1 y 2 de *M. incognita* y la raza 2 de *M. arenaria* (Castillo *et al.*, 2001; Omat y Verdejo-Lucas, 1999).

El ciclo vital de *Meloidogyne* consta de huevo, 4 estadios juveniles y adultos machos y hembras. La hembra se encuentra generalmente dentro de los nódulos y deposita los huevos en una matriz gelatinosa. Los huevos evolucionan pasando por sucesivos estadios embrionarios hasta formar el juvenil de primer estadio. La primera muda tiene lugar dentro del huevo del cual eclosiona el J2 que constituye el estadio infectivo y el único libre en el suelo (Verdejo-Lucas y Castillo, 2011).

La dificultad para combatir eficientemente a los nematodos, y su capacidad de supervivencia hace que los nematodos fitoparásitos persistan durante muchos años en los suelos agrícolas infestados, y en la práctica, resulte muy difícil su erradicación (Ornat *et al.*, 1999). La concienciación sobre la problemática de *Meloidogyne spp.* en cultivos hortícolas se ha incrementado en los últimos tiempos debido a la disminución de las desinfecciones del suelo como resultado de la prohibición del uso de los principales fumigantes químicos (Bromuro de metilo) por la Unión Europea (Reglamento (CE) 2037/2000, consecuente con el Protocolo de Montreal).

El diagnóstico nematológico y el conocimiento de la distribución y densidades poblacionales de los nematodos fitoparásitos es un requisito imprescindible a la hora de planificar estrategias de control, ya que las posibles pérdidas de producción causadas por los nematodos, son función, entre otros factores, de sus densidades en suelo en el momento de la siembra o trasplante (Seinhorst, 1970). El crecimiento del brote y la raíz en plantas susceptibles de tomate está intensamente relacionado con la densidad de la población inicial de *Meloidogyne incognita*, hay una fuerte relación lineal entre la longitud de la raíz, el índice de nodulación y el crecimiento del follaje (Ornat *et al.*, 1997; Verdejo-Lucas *et al.*, 1994; Sorribas *et al.*, 2005).

Como no es posible examinar todo el ambiente en el que se encuentran los nematodos, es necesario realizar muestreos que permita determinar los géneros y especies presentes y sus densidades poblacionales medias por volumen de suelo o por gramo de raíz con la mayor precisión posible. La precisión de la estimación mejorará con el incremento del número de catas por superficie muestreada en una parcela. Se recomiendan densidades de toma de entre 30 y 60 catas por hectárea, para optimizar costes y tiempo (Talavera, 2011).

Una vez tomadas las muestras existen muchas técnicas para la extracción de nematodos filiformes del suelo. En general, las más utilizadas son aquellas basadas en la capacidad de migrar del suelo al agua a través de un filtro, como el embudo de Baermann (Baermann, 1917) o las bandejas de Whitehead (Whitehead y Hemming, 1965), las que se basan en su peso y tamaño, método del tamizado y decantación (Cobb, 1918) o en su densidad específica, por centrifugaciones diferenciales en gradientes de sacarosa o diferentes sales (Coolen, 1979) Estas técnicas presentan varios inconvenientes: la dificultad para la identificación de las distintas especies o razas de

Meloidogyne, lo costoso del análisis de un número significativo de muestras y que no miden la capacidad infectiva de las distintas poblaciones de patógenos, que puede variar entre razas o poblaciones distintas.

El embudo de Baermann es un método de referencia ampliamente usado para la extracción de nematodos vermiformes. No es aconsejable para la extracción de *Meloidogyne*, según el "test ring" realizado por Den Nijs y Van den Beg (2013) este método arrojó varianzas mayores que técnicas similares. Existen variaciones del embudo de Baermann que permiten extraer nematodos de muestras mayores como la bandeja de Whitehead. Este método se puede optimizar para la extracción de *Meloidogyne* (Bell y Watson, 2001) La Bandeja de Whitehead tiene la ventaja de ser un método sencillo, no requerir equipamiento específico y poder emplearse sin conocimientos técnicos de aparatos de laboratorio. Tiene el inconveniente de necesitar que los nematodos estén vivos y con su movilidad intacta y es inexacto con bajas temperaturas de suelo (Xing y Westphal, 2012). El porcentaje de recuperación de J2 de *Meloidogyne* depende del tipo de suelo y el método empleado (Bell y Watson, 2001).

La fitopatometría de suelos no es una técnica de extracción en sí misma y la originalidad de este método analítico hace necesaria una explicación detallada del interés y fundamentos del mismo. La decisión de denominar a la técnica fitopatometría no es casual. En un principio los investigadores que utilizaban esta técnica la denominaron fitopatómetro (De Cara *et al.*, 2006). En posteriores publicaciones británicas se abrió una discusión respecto a esta terminología (en inglés "phytopathometer"). No fue aceptada por los revisores de la revista "Geomicrobiology Journal" que prefirieron el uso de "soil phytopathometry". También podría haberse asimilado el término genérico "bioensayo" como aproximación técnica puesto que este término incluye a cualquier tipo de prueba utilizada en Protección Vegetal en la que intervengan seres vivos. Bioensayos basados en los mismos preceptos han sido utilizados en tomate y otros cultivos con éxito (Gugino *et al.*, 2008; Maleita *et al.*, 2012; Kamran *et al.*, 2013; Xing y Westphal, 2012). En español hay poco espacio para la discusión puesto que el diccionario de Ciencias Hortícolas (1999) define fitopatometría como: Medida y evaluación de las enfermedades de las plantas. Requiere conocimiento de los efectos y daños de las enfermedades y es muy utilizada en la evaluación de productos químicos y en la resistencia de un hospedador (sic). La técnica que describimos en este trabajo cumple estos preceptos ya que, el patosistema tomate-*Meloidogyne* se puede mantener en condiciones controladas o "in vitro" y la presencia de inóculo infectivo que desencadena la patología es observable en estas condiciones.

La fitopatometría se basa en el uso de plantas trampa que capturan los patógenos telúricos. Consiste en mezclar una proporción de suelo con vermiculita desinfectada. Distribuir la mezcla en macetas desinfectadas y sembrar semillas, desinfectadas previamente, del hospedador sensible al patógeno o patógenos que se deseen detectar (De Cara *et al.*, 2006; Tello Marquina *et al.*, 2011; Gómez *et al.*, 2012).

El objetivo de este trabajo es comparar los resultados obtenidos de una misma muestra mediante dos técnicas analíticas: la fitopatometría de suelos y las extracciones clásicas (bandeja de Whitehead). Comprobar las ventajas y desventajas del uso de ambos para la detección de las posibles poblaciones de nematodos existentes en el suelo y si existe una relación entre los resultados obtenidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Localización

El ensayo está localizado en Venta Gaspar en el paraje “Barranco Hondo” perteneciente al término municipal de Almería. Es un invernadero con estructura de raspa y amagado y suelo enarenado. En él que se cultiva tomate de la variedad KUMATO (SX-387) injertado sobre patrón ARNOLD con un marco de plantación de 1 planta·m⁻². En dicho invernadero, la evaluación de los problemas por *Meloidogyne incognita* ha arrojado cifras elevadas de plantas muertas antes de finalizar el cultivo. Cifras que han sobrepasado el 50% según las zonas del invernadero.



Figura 1.- Vista aérea del invernadero.

Una parte del invernadero se dividió en 24 parcelas elementales, cada una con una superficie de 25 m². En las parcelas se realizaron distintos tratamientos de desinfección que no son objetivos de este trabajo. Se realizaron 6 muestreos:

Tabla 1.- Fecha de los muestreos.

Muestreo	Fecha	Días después del primer muestreo
M1	16/07/12	-
M2	02/08/12	15
M3	20/08/12	33
M4	04/09/12	48
M5	17/12/12	152
M6	09/04/13	263

2.- Muestreo

Cada muestra estaba compuesta por tres catas de la misma parcela, tomadas en la diagonal de la parcela elemental en cada una de las 3 líneas de siembra de cada parcela. Las tres catas que componen cada muestra se mezclaron en el campo, se etiquetaron y se embolsaron para su transporte al laboratorio. Las herramientas se desinfectaron flameándolas antes de la toma de cada una de las muestras (al cambiar de una parcela elemental a otra). Cuando no fue posible el procesamiento de las muestras el mismo día estas se conservaron en una cámara fría (4-10°C) un máximo de un día.

Las muestras se mezclaron y homogeneizaron mecánicamente en el laboratorio. De cada una de las muestras se tomaron dos porciones o submuestras, una de 100cc de suelo para la extracción clásica de J2 y otra de 10 gr para la fitopatometría.

2.- Extracción clásica.

Para la extracción clásica se eligió, por los motivos anteriormente mencionados la bandeja de Whitehead.

Las muestras de 100cc de suelo se colocaron sobre un filtro compuesto de dos pañuelos de celulosa sostenidos por un tamiz metálico de 0,5-2 mm de apertura de malla.

En un bol plástico de 0.9 L de capacidad (15 cm de diámetro x 10 cm de altura) se añadió agua (unos 150ml) en una cantidad suficiente para mojar la muestra, entrando en contacto con la parte inferior del tamiz.

Se colocó el tamiz con la muestra de suelo encima del bol con el agua y se comprobó que todas las muestras estaban en contacto con ella. Es importante que durante todo el proceso el agua sea suficiente para mantener el contacto con la parte inferior del filtro y la muestra mojada, para así posibilitar la migración de los nematodos.

Transcurridas 48 horas se recolectó el agua con los nematodos en suspensión y se repitió el proceso cambiando el agua y recogiendo las suspensiones con los nematodos 72 y 96 h después de la preparación de las muestras.



Figura 2.- Batería de muestras durante la extracción (bandeja de Whitehead).



Figura 3.- Detalle del punto de contacto entre la muestra y el agua.

Todas las suspensiones recogidas fueron etiquetadas y mantenidas en el frigorífico (7°C) hasta su identificación y conteo. Para ello se tomaron 4 alícuotas de 2ml por extracción (48, 72 y 96 h), es decir 48 ml por cada muestra.

Con ayuda de un microscopio óptico y una placa de recuento se identificaron y contaron los nematodos presentes, discriminando entre los pertenecientes al género *Meloidogyne* y otros nematodos denominados "de vida libre".

Se calculó el número de *Meloidogyne* en el volumen total de cada extracción y se sumó a las otras dos extracciones de la misma muestra para obtener el número total de nematodos en los 100cc de suelo.

Para la identificación se tuvo en cuenta la presencia de estilete, la longitud del cuerpo, máxima anchura, distancia de la vulva al extremo anterior del cuerpo, número total de anillos (De Man, 1880), la posición relativa del poro excretor, la morfología de la cola, y la morfología de la región anterior de los machos (Eisenback, 1985) (Figura 4).



Figura 4.- *Meloidogyne incognita* (Ruanpanun *et al.*, 2010)

3.- Fitopatometría.

El fitopatómetro consta de 2 partes fundamentales: el sustrato contenedor de los incitantes de la enfermedad, y las plantas-trampa.

El sustrato es una mezcla del suelo con vermiculita esterilizada. La alta capacidad de la vermiculita para la retención de agua fácilmente disponible por la planta, nos evita dar riegos excesivos y minimiza el riesgo de la pérdida de juveniles por drenaje debido al exceso de riego.

La preparación de la fitopatometría de suelos requiere de unos materiales fácilmente asequibles:

- 10 g de muestra de suelo procedentes de cada una de las parcelas elementales del invernadero.
- 120 g de vermiculita, (mineral exfoliado del número 2 TERMITA esterilizada en autoclave a 121°C durante una hora)
- Vasos de plástico de 1 L de capacidad perforados en los laterales a 4 cm de altura para permitir el drenaje.
- 6 semillas de tomate de la variedad Rio Grande, susceptibles al ataque de *Meloidogyne* previamente desinfectadas con lejía comercial (30-40 g de cloro activo por L) durante 30 minutos y aclaradas con agua limpia.

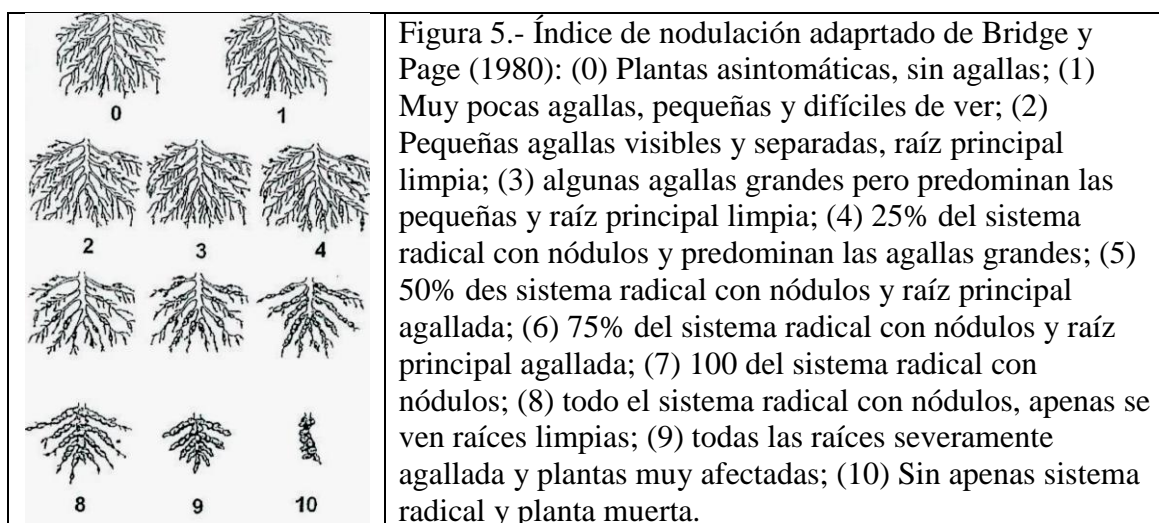
La forma de proceder es la siguiente:

- La vermiculita autoclavada se mezcla, en un bote desinfectado y cerrado, con los 10 g de la muestra de suelo, agitándolo continuamente hasta la homogenización del sustrato.
- El contenido del bote se vierte en las macetas preparadas para este efecto y se da un riego sin que llegue a drenar. Este aspecto es muy importante puesto que trabajamos con organismos acuáticos y la pérdida de agua por drenaje comporta una importante pérdida de inóculo.
- Se colocan las 6 semillas de tomate, se cubre con una fina capa de vermiculita y se da un riego.

Todo el conjunto se mantiene 60 días en cámara climatizada con un fotoperiodo de 12 horas de luz (12.000 lux a la altura de la planta) y temperaturas oscilando entre una máxima de 25°C y mínimas de 18°C.

Es importante hacer hincapié en el riego. Durante el ensayo se regó con una solución fertilizante de un abono complejo (15-10-15) a razón de 1g/L. El riego se realizó a demanda, generalmente cada 3-5 días. El criterio usado fue el peso de la maceta, se regó cuando este era similar al del sustrato seco. El control del riego es de especial atención durante el tiempo del fitopatómetro porque como ya hemos explicado antes no se puede permitir la pérdida por drenaje de agua y por consiguiente de inóculo.

Transcurridos 60 días se procedió al arranque de las plantas, el lavado de las raíces y su evaluación ocular con los índices de nodulación propuestos por Bridge y Page (1980) (Figura 5).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados se presentan en la tabla 2. De las 24 parcelas 10 no mostraron presencia de *Meloidogyne* en ninguno de los muestreos realizados con ninguna de las dos técnicas analíticas anteriormente descritas y fueron excluidos de las tablas. Los resultados de las 14 parcelas que mostraron presencia de *Meloidogyne* en alguno de los muestreos se presentan en un cuadro a continuación. Los resultados del método de extracción se presentan como el número de J2 (juveniles infectivos) en 100 centímetros cúbicos de suelo y los resultados del fitopatómetro como el promedio de los índices de nodulación de todas las plantas de cada una de las macetas.

Tabla 2.- Muestras de suelo que presentaron presencia de *Meloidogyne* utilizando la técnica de fitopatometría y por extracción clásica.

Muestra	Número de juveniles 2 en 100cc de suelo						Promedio Índice Nodulación					
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M1	M2	M3	M4	M5	M6
T1R3	1039,5				542		3			0,6	4	
T2R1	363,8											
T2R3										2		
T3R2	6994,3				37,1	720,2	3				2	4,4
T3R3	1095,2				44,5		1,5					
T3R4					29,7							
T4R2	2023,3				363,8		3				3,33	2
T4R3	74,25											
T4R4					61,2							
T5R1	133,6				222,7	1960,2						4,75
T5R2	1061,8	148,5										
T5R4						367,5						
T6R2	4440,1	111,4		2475	297	3415,5	3	0,33	1,5	6		6
T6R4	2316,6	1514,7	163,3	49,5	549,4	297	3	3	4	1,5	7,5	6

Análisis del resultado de los muestreos:

El muestreo 1 se realizó antes de los tratamientos químicos mencionados anteriormente y es en el que más resultados positivos (presencia de *Meloidogyne*) se obtuvieron. Mediante la técnica analítica clásica se detectaron juveniles vivos en 10 parcelas (41.67%) frente a las 6 (24%) en las que se detectó mediante la técnica de la fitopatometría. Para este muestreo la extracción clásica se mostró más eficaz para la detección que el fitopatómetro.

El muestreo 2 detectó presencia en 3 parcelas (12.5%) mediante la técnica clásica y en 2 (8.33%) mediante la fitopatometría, al igual que en el muestreo anterior la técnica clásica se mostró más eficiente.

En el muestreo 3 fue la técnica de la fitopatometría la que detectó presencia de *Meloidogyne* en más parcelas, 2 (8.33%) frente a 1 (4.17%) de la técnica clásica.

En el muestreo 4 es aún más marcada esta diferencia, de nuevo con la fitopatometría con la que más resultados positivos se obtienen, 4 parcelas con presencia de *Meloidogyne* (16.67%) frente a 2 (8.33%) de las bandejas de Whitehead.

En el muestreo 5 esta tendencia se invierte de nuevo, resultando mucho más sensibles los métodos clásicos de extracción, 9 parcelas con presencia del nematodo (37.5%), frente a las 4 parcelas (16.67%) en las que fue detectado con la fitopatometría.

Por último en el muestreo 6 ambas técnicas fueron totalmente coincidentes, ambas detectaron nematodos del género *Meloidogyne* en las mismas 5 parcelas (20.83%).

Tabla 3.- Porcentaje de parcelas donde fue detectada la presencia de nematodos del género *Meloidogyne* mediante cada técnicas analítica.

Técnica analítica	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6
Clásica	41.67%	12.5%	4.17%	8.33%	37.5%	20.83%
Fitoaptometría	24%	8.33%	8.33%	16.67%	16.67%	20.83%

Resumiendo, de los 52 resultados positivos 19 (73%) eran coincidentes en ambos métodos, en 10 (19%) solamente aparecieron en las extracciones clásicas y 4 (7,7%) sólo en el fitopatómetro. Esto denota que ambos métodos pueden utilizarse para la detección de *Meloidogyne* en el suelo. Sin embargo, parece ser más eficiente el de extracción de formas móviles. Eficiencia aparente, como lo muestran las muestras tomadas en los muestreos 3 y 4. Téngase en cuenta en cuenta que la muestra de suelo pesaba 2 kg como máximo y en ese volumen tan pequeño se marcan diferencias en la presencia de *Meloidogyne*.

Si atendemos a la cronología de la toma de las muestras es de interés observar como parcelas en las que se detectan nematodos en unos muestreos pueden dejar de mostrarlos en los siguientes, apareciendo de nuevo tras varios muestreos o no. Esta irregularidad en los resultados se puede deber a la limitación del muestreo en sí, cada muestra se representa a sí misma y debido a la naturaleza de los nematodos y su agregación en rodales es posible tomar muestras sin presencia de nematodos en parcelas infectadas. Si a ello unimos el efecto de las temperaturas en la actividad de los nematodos, y los movimientos durante el ciclo de vida de los mismos es comprensible que los resultados no sean constantes en el tiempo. Solo la parcela T6R4 mostró presencia de *Meloidogyne* en todos los muestreos y con ambas técnicas analíticas, debido a que no recibió ningún tratamiento de desinfección.

Uno de los mayores inconvenientes que hemos encontrado en el desarrollo de la técnica clásica es la identificación de los nematodos. Tarea compleja y pesada, requiriere un ojo experto y ágil para la identificación morfogénica de los nematodos.



Figura 6.- Nematodo de "vida libre".



Figura 7.- Nematodo de vida libre similar a *Meloidogyne*



Figura 8.- *Meloidogyne* sp.

El coste de los análisis puede ser caro atendiendo a la cantidad de muestras que debemos tomar para asegurar que el método evalúa correctamente la distribución de nematodos en el suelo (Gugino *et al.*, 2008).

El fitopatómetro además de ser un método sencillo, no requerir equipamiento específico y poder emplearse sin conocimientos técnicos no necesita de un experto en taxonomía y morfología de nematodos para la identificación porque los nódulos o agallas que aparecen en las raíces son el síntoma distintivo del parasitismo por *Meloidogyne* y tienen valor diagnóstico del género (Verdejo-Lucas y Castillo, 2011). Como los nematodos son parásitos obligados la presencia de las raíces de las plantas trampa atraerán a la mayoría de J2 y nos dará una pista de su patogeneicidad y virulencia.

Otras ventajas de este método son las muchas posibilidades que presenta como realizar la siembra "in situ" de plantones e ir arrancándolos y evaluando sus raíces durante el cultivo o la siembra de huéspedes diferenciales en las macetas de fitopatómetro en cámara para discriminar entre especies del género *Meloidogyne*.

Tiene en su contra que la evaluación es subjetiva y no nos mide cuantitativamente el número de juveniles infectivos aunque nos da una idea de su patogeneicidad y relaciona nodulación con producción..

Por todo esto consideramos que la fitopatometría de suelos es un método simple y de bajo coste que puede complementar la información obtenida de los métodos clásicos de extracción, ya sean los citados en este trabajo, basados en la movilidad de los nematodos, o otros más sofisticados como decantaciones, centrifugaciones o los más recientes con técnicas de PCR en tiempo real ya que ninguno de estos evalúa la patogeneicidad de los nematodos y su capacidad para inducir la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrés, M.J., García-Arenal, F., López, M.M., Melgarejo, P. 1998. Patógenos de plantas descritos en España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. 526 pp.
- Baermann, G. 1917. Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) Larven in Erdproben. *Geneesk. Tijdschr. Ned-Indië*, 57:131-137.
- Bell, N.L. y Watson, R.N. 2001. Optimising the Whitehead and Hemming tray method to extract plant parasitic and other nematodes from two soils under pasture. *Nematology*, 3:179-185.
- Bello A., Escuer, M. y Pastrana, M.A. 1996. Nematodos Fitoparásitos y su control en ambientes mediterráneos. En: *Patología Vegetal* (Eds. Llacer, G., López, M.M., Trapero, A. y Bello, A.). Sociedad Española de Fitopatología. (2):1039-1069.
- Castillo, P. y Jiménez-Díaz, R.M. 1996. Interaccion de nematodos fitoparásitos con otros microorganismos del suelo. En: *Patología vegetal* (Eds. Llácer, G. López, M.M., Trapero, A. y Bello, A.) (2) 1141-1153. Sociedad Española de Fitopatología.
- Castillo, P. y Jiménez-Díaz, R.M. 2003. First Report of *Meloidogyne incognita* infecting spinach in southern Spain. *Plan. Dis.* 87: 874.
- Castillo, P. y Verdejo-Lucas, S. 2011. Nematodos fitoparásitos. En: *Enfermedades causadas por nematodos fitoparásitos en España*. (Eds. Andrés-Yeves, M.F.A. y Verdejo-Lucas) *Phytoma*, España pp. 19-31.
- Castillo, P., Di Vito, M., Vovlas, N. y Jiménez Díaz, R.M. 2001. Host-parasite relationships in root-knot disease of white mulberry. *Plant Dis.* 85:277-281.
- Cobb, N.A. 1918. Estimating the nema population of the soil. *Agric. Tech. Circ. Bur. Pl. Ind. U.S. Dep. Agric, N.1.*
- Coolen, W.A. 1979. Methods for the extraction of *Meloidogyne* spp. and another nematodes from roots and soil. En *Root-knot nematodes(Meloidogyne species)* (Eds. Lamberti, F. y Taylor, C.E.) Acad. Press, London. 317-329.
- De Cara, M., Diáñez, F., Santos, M., Fernández, E., Tello, J., Estrada, F. y Montoya, S. 2006. Presence of *Fusarium oxysporum* sp. *melonis* Race 1 in soils cultivated with Melon in the State of Colima (Mexico). *Geomicrobiology Journal*, 23(5): 319-322.
- De Man, J.G. 1880. Die Einheimischen, frei in der reinen Erde und im süßen Wasser lebenden Nematoden. Vorläufiger Bericht und descriptiv-sistematischer.
- den Nijs, L. y Van Den Berg, W. 2013. The added value of proficiency test: choosing the proper method for extracting *Meloidogyne* second-stage juveniles from soil. *Nematology* 15:143-151.
- Diccionario de Ciencias Hortícolas. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. 1999. Ed: Grupo Mundi-Prensa. Madrid. Barcelona. México. 605 pp.
- Dijan-Caporalino, C., Bourdy, G. y Cayrol, J.-C. 2004. Plantas nematicidas y plantas resistentes a los nematodos. En: *Biopesticidas de origen vegetal* (Eds. Regnault-Roger, C., Philogene, B. J. R. y Vicent, C.) *Mundi Prensa*, España. (12): 191-240.
- Eisenback, J.D. 1985. Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root-knot nematodos (*Meloidogyne* spp.) En: *An Advanced treatise on Meloidogyne. Biology and control*. (Eds. Sasser, J. n. y Carter C.C.) (2):95-112.
- Espárrago, G. y Navas, A. 1995. Nematofauna fitoparásita asociada a cultivos hortícolas y tabaco en regadíos de Extremadura. *Bol. San. Veg. Plagas*, 21:303-317.
- Gómez-Barcina, A., González- París, A. y Castillo, P. 1989. Nematodos del orden Tylenchida (Thorne), 1949 en España. *Rev. iber. Parasitol.* 49:85-109.
- Greco, N. y Esmenjaud, D. 2004. Management strategies for nematode control in Europe. En: *Nematology Monographs & Perspectives*. Proc. Fourth Intl. Congr.

- Nematol., Tenerife, Spain. 8Eds. Cook, R. y Hunt D.J.), Brill, Leiden. The Netherlands. (2):33-43.
- Gómez, M.A., De Cara, M., Palmero, d., rúiz, C. Díaz, m. Camacho, F. y Tello, J.C. 2012. Fitopatometría de suelos para diagnosticar la sanidad de un suelo de ALbuños (Granada) cultivado con tomate. *Actas de Horticultura*, 60: 856-858.
 - Gugino, B.K., Ludwig, J.W. y Abawi, G.S. 2008. An on-farm bioassay for assessing *Meloidogyne hapla* infestations as a decision management tool. *Crop Protection* 27: 785-791.
 - Kamran, M., Anwar, S.S., Javed, N. Khan, S. A., Abbas, H., Iqbal, M.A. y Zohaib, A. 2013. The influence of *Meloidogyne incognita* density on susceptible tomato. *Pakistan Journal of Zoology*, 45(3):727-732.
 - Verdejo-Lucas, S. 1999. Nematodes. En: *Integrated pest and disease management in greenhouse crops*. (Eds. Albajes, R., Gullino, M.L., Van Lanteren, J.C. y Elad, Y) Kluwer Acad. Publ. Dordrecht. The Netherlands 61-68.
 - Maleita, C.M.N., Curtis R.H.C., Powers, S.J. y Abrantes I.M.O. 2012. Inoculum levels of *Meloidogyne hispanica* and *M. javanaica* affect nematode reproduction, and growth of tomatoe genotypes. *Phytopatologia Mediterranea*, 51(3): 566-576.
 - Navas, A. Castagnone-Sereno, P., Blázquez, J. y Espárrago, G. 2001. Genetic structure and diversity within local populations of *Meloidogyne* (Nematoda: Meloidogynidae). *Nematology* 3:243-253.
 - Ornat, C., Verdejo-Lucas, S. y Sorribas, F.J. 1997. Effect of the previous crops on population densities of *Meloidogyne javanaica* and yield of cucumber. *Nematropical*, 27:85-90.
 - Ornat, C., Verdejo-Lucas, S. y Sorribas, F.J. 2001. A population of *Meloidogyne javanaica* in Spain virulence to the resistance gene Mi in tomato. *Plant. Dis.*, 85:271-276.
 - Ornat, C. y Verdejo-Lucas, S. 1999. Distribución y densidad de población de *Meloidogyne* spp. en cultivos hortícolas de la comarca de El Maresme (Barcelona). *Invest. Agr.: Prod. Prot. veg.*, 14:191-201.
 - Palomares Rius, J.E., Vovlas, N., Troccoli, A., Liébanas, G., Landa, B.B. y Castillo, P. 2007. A new root-knot nematode parasitizing sea rocket from Spanish Mediterranean coastal dunes: *Meloidogyne duennsis* n. sp. (Nematodo: Meloidogynidae). *J. Nematol.*, 39:190-202.
 - Peña-Santiago, R., Castillo, P., Escuer, M. Guerrero, P., talavera, M. y Vieira, P. 2004. Tylenchid species (Nematoda, Tylenchida) recorded in the Iberian Peninsula and the Balearic Islands: A Compendium. *Collection "Monographic Papers on Nematology"*. Serv. Publ., Univ. Jaén, Jaén, Spain, 127 pp.
 - Robertson, L., López-Pérez, J.A., Bello, A., Díez-Rojo, M.A., Escuer, M., Piedra-Buena, A., Ros, C. y Martínez, C. 2006. Characterization of *Meloidyne incognita*, *M. arenaria* and *M. hapla* populations from Spain and Uruguay parasitizing pepper (*Capsicum annuum* L.) *Crop Prot.* 25: 440-445.
 - Rodríguez Rodríguez, R. 1984. El género *Meloidogyne* en Canarias. 1 Rastreo geográfico preliminar y especies encontradas. *Xoba*, 4: 41-51.
 - Ruanpanun, P., Laastsch, H., Tangchitsomkid' N. y Lumyong, S. 2010. Nematicidal activity of fervenulin isolated from a nematicidal actinomycete, *Streptomyces* sp. CMU-MH021, on *Meloidogyne incognita*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* Springer. On line [http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11274-010-0588-z/fulltext.html#Fig6]

- Sikora, R.A. y Fernández, E. 2005. Nematode parasites of vegetables. En: *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Second edition. (Eds Luc, M., Sikora, R.A. y Bridge, J.). 319-392. CABI Publ. Wallingford, UK.
- Sorribas, F.J., Ornat, C., Verdejo-Lucas, S., Galeano, M., y Valero, j. 2005. Effectiveness and profitability of the Mi-resistant tomatos to control root-knot nematodes. *European Journal of Pathology*, 111:29-38.
- Sorribas F.J. y Verdejo-Lucas, S. 1994. Survei of *Meloidogyne* Spp. in tomato production fields of Baix Llobregat Country, Spain. *J. Nematol.* 26:731-736.
- Talavera, M., Sayadi, S., Chirisa-Ríos, M., Salmerón, T., Flor-Peregrín, E. y verdejo-Lucas, S. 2012. Perception of the impact of root-knot nematode-induced diseases in horticultural protected crops of south-eastern Spain. *Nematology*, 14(5): 517-527.
- Talavera Rubia, M. 2011. Detección, extracción y diagnóstico de nematodos fitoparásitos. En : *Enfermedades causadas por nematodos fitoparásitos en España*. (Eds. Andrés-Yeves, M.F.A. y Verdejo-Lucas) *Phytoma*, España pp. 41-59.
- Talavera, M., Valor, H. y Tobar, A. 1999. Nematodos parásitos de los cultivos intensivos bajo plástico en las áreas de Carchuna (Granada) y Balanegra (Almería). *Cuad. Fitopatol.* 1: 4-7.
- Téliz, D., Landa, B.B., Rapoport, H.F., Pérez Camacho, F., Jiménez-Díaz, R.M. y Castillo, P. 2007. Plant-parasitic nematodes infecting grape vine in southern Spain and susceptible reaction to root-knot nematodes of rootstocks reported as moderately resistant. *Plant. Dis.* 91:1147-1154.
- Tello Marquina, J., Palmero Llamas, D., De Cara García, M., Ruiz Olmos, C., Lacasa Plasencia, A., Moreno, A. y Montes Zavala, O. 2011. Una Técnica para diagnóstico de la sanidad de suelos y sustratos agrícolas; Fitopatometría. *Terralia*, 81:46-54.
- Verdejo-Lucas, S. 2005 Control biológico de nematodos fitoparásitos. En: *El control biológico de plantas y enfermedades. La sostenibilidad de la agricultura mediterránea*. Colección Medi. Ambient. 5 (Eds. Jacas, J., Caballero, P y Ávila, J.) 153-166. Pvl. Univ. Haume I. Castellón de la Plana.
- Verdejo-Lucas, S. y Castillo, P. 2011. Nódulos en las raíces de tomate (*Meloidogyne* spp.). En: *Enfermedades causadas por nematodos fitoparásitos en España*. (Eds. Andrés-Yeves, M.F.A. y Verdejo-Lucas) *Phytoma*, España pp. 143-154.
- Verdejo-Lucas, S., Ornat, C., Sorribas, F.J. y Stchiegel, A. 2002. Species of root-knot nematodes and fungal egg parasites recovered from vegetables in Almería and Barcelona. *J. Nematol.* 34:405-408.
- Verdejo-Lucas, S., Sorribas, F.J. y Puigdomenech, P. 1994. Pérdidas de producción en lechuga y tomate causadas por *Meloidogyne javanaica* en invernaderos. *Invest. Agr. Fuera de Serie* 2: 395-400
- Whitehead, A.G. y Hemming, J.R. 1965. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. *Ann. Appl. Biol.*, 55:25-38.
- Xing, L. y Westphal, A. 2012. Predicting damage of *Meloidogyne incognita* on watermelon. *Journal of Nematology* 44(2): 127-133.