



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona

Caracterización del potencial antagónico de suelos agrícolas frente *Meloidogyne spp.*

Trabajo final de grado

Ingeniería Agroambiental y del Paisaje

Autor: Ismael Marín López

Tutores: F. Javier Sorribas

Ariadna Giné

25 / Septiembre / 2016

Resum

Meloidogyne spp. és una limitació molt important en els cultius hortícoles de les zones mediterrànies. Els productors han confiat en nematicides químics per gestionar les pèrdues de producció per aquesta causa, obviant la capacitat pròpia del sòl de regular les poblacions de patògens. A causa de la preocupació per l'ús d'agroquímics, les conseqüències d'aquests sobre el medi ambient i la regulació en el seu ús, es fa necessari l'estudi d'estratègies per a una gestió correcta i eficient dels ecosistemes agrícoles.

Els sòls supresius son aquells amb certa capacitat per a prevenir o reduir la propagació de patògens. Es van prendre sis sòls de parcel·les agrícoles comercials sota dos sistemes de producció diferents, integrada i ecològica; cinc varen caracteritzar-se com sòls supresius y un com a conductiu. Es van realitzar dos tractaments per a cada sol agrícola, un no es va esterilitzar i l'altre es va esterilitzar amb l'objectiu d'eliminar les interaccions biòtiques amb les plantes de tomàquet. Els sòls foren barrejats amb sorra esterilitzada (1:1 v/v) on es va cultivar tomàquet cv. Durinta susceptible a *Meloidogyne spp.* Es van inocular les plantes amb juvenils de *Meloidogyne incognita*. Es va mantenir l'assaig fins que es va registrar temperatura acumulada suficient per a que els nematodes foren complert una generació. La supresivitat a *Meloidogyne spp.* es va determinar en funció del nombre d'ous parasitats per fong. Els ous extrets de les arrels es van sembrar en medi de creixement restrictiu i foren valorats a les 24, 48 i 72 hores. *Pochonia chlamydosporia* fou l'únic fong aïllat en els cinc sòls supresius, parasitant entre el 13,5 i el 43,7% dels ous. Es va comprovar com els sòls esterilitzats van generar major massa radiculars així com major tasa de reproducció dels nematodes, fent palès que l'eliminació de la biota del sòl fomenta la reproducció dels nematodes en no tenir antagonistes. Es va observar ,per tant, major parasitisme en els sòls sota gestió ecològica i tractaments sense esterilitzar, sent M10.55 amb 43,7% d'ous parasitats el sòl amb major potencial antagònic.

Paraules clau: Control biològic, hortalisses, producció ecològica, producció integrada, supresivitat.

Resumen

Meloidogyne spp. es una limitación muy importante en los cultivos hortícolas de las zonas mediterráneas, los productores han confiado en nematicidas químicos para gestionar las pérdidas de producción por esta causa, obviando la capacidad propia del suelo de regular las poblaciones de patógenos. Debido a la preocupación por el uso de agroquímicos, las consecuencias de estos sobre el medio ambiente y la regulación en su uso, se hace necesario el estudio de estrategias para una gestión correcta y eficiente de los ecosistemas agrícolas.

Los suelos supresivos son aquellos con cierta capacidad para prevenir o reducir la propagación de patógenos. Se tomaron seis suelos de parcelas agrícolas comerciales bajo dos sistemas de producción diferente, integrada y ecológica; cinco se caracterizaron como suelos supresivos y uno como conductivo. Se realizaron dos tratamientos por cada suelo agrícola, uno no se esterilizó y el otro se esterilizó con el objetivo de eliminar las interacciones bióticas con las plantas de tomate. Los suelos fueron mezclados con arena esterilizada (1:1 v/v) donde se cultivó tomate cv. Durinta susceptible a *Meloidogyne spp.* Se inocularon las plantas con juveniles de *Meloidogyne incognita*. Se mantuvo el ensayo hasta que se registró temperatura acumulada suficiente para que los nematodos hubieran cumplido una generación. La supresividad a *Meloidogyne spp.* se determinó en función del número de huevos parasitados por hongos. Los huevos extraídos de las raíces se sembraron en medio de crecimiento restrictivo y se valoró el parasitismo a las 24,48 y 72 horas. *Pochonia chlamydosporia* fue el único hongo aislado en los cinco suelos supresivos, parasitando entre el 13,5 y el 43,7% de los huevos. Se comprobó como los suelos esterilizados generaron mayor masa radicular así como mayor tasa de reproducción de los nematodos, haciendo patente que la eliminación de la biota del suelo fomenta la reproducción de los nematodos al carecer de antagonistas. Se observó, por tanto, mayor parasitismo en los suelos bajo gestión ecológica y tratamiento sin esterilizar, siendo M10.55 con 43,7% de huevos parasitados el suelo con mayor potencial antagónico.

Palabras clave: Control biológico, hortalizas, producción ecológica, producción integrada, supresividad.



Abstract

Meloidogyne spp. is a very important horticultural crops limitation at the mediterranean's zones, where the farmer has relied on chemical nematicides to manage the production losses for this cause, obviating the soil's ability to regulate pathogen populations. Due to concerns about the use of agrochemicals, the consequences of these on the environment and regulation in use, it is necessary to study strategies for proper and efficient management of agricultural ecosystems.

The suppressive soils are those with some ability to prevent or reduce the spread of pathogens. Six soils of commercial agricultural plots were taken under two different production systems, integrated and organic; five were characterized as suppressive soils and one conductive. Two treatments per agricultural land were conducted, one sterilized and one not, with the goal of eliminating biotic interactions with tomato plants. Soils were mixed with sterile sand (1: 1 v / v) where tomato cv. Durinta, susceptible to *Meloidogyne spp.*, was cultivated. The plants were inoculated with *Meloidogyne incognita* juveniles. The assay was maintained until enough accumulated temperature was recorded for the nematodes had fulfilled a generation. The supresiveness to *Meloidogyne spp.* was determined according to the number of eggs parasitized by fungi. The eggs extracted from the roots were seeded in restrictive growth medium and parasitism was evaluated 24, 48 and 72 hours later. *Pochonia chlamydosporia* was the only fungus isolated in the five suppressive soils, infesting between 13.5 and 43.7% of the eggs. It was verified that the sterilized soils generated greater root mass and higher rate of nematode reproduction, making clear that the removal of soil biota encourages reproduction of nematodes because of the lack of antagonists. It was observed, therefore, greater parasitism in soils under ecological management and unsterile treatment, being M10.55, with eggs parasitized 43.7%, the soil with more antagonistic potential.

Key words: Biological control, vegetables, organic production, integrated production, suppressivness.

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	6
AGRADECIMIENTOS	7
1. INTRODUCCIÓN	8
Nematodos Fitoparásitos	10
<i>Meloidogyne spp.</i>	11
Suelos supresivos	14
2. OBJETIVO	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	19
Suelos: localización de las parcelas, toma de muestras y gestión de los mismos.....	19
Inóculo	21
Caracterización del potencial supresor del suelo a <i>Meloidogyne</i>	21
Tratamiento estadístico	24
4. RESULTADOS	25
5. DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	30

Índice de figuras

Figura 1:

Ciclo patológico de *Meloidogyne spp.* (Fuente Agrios, 2005)

Pag12

Figura 2:

Mesas de cultivo donde se observan las plantas de tomate. (Agrópolis 2015)

Pag 22

Figura 3:

a) Huevo parasitado por *Pochonia chlamydosporia*.

B) Placa de evaluación de parasitismo de huevos de *Meloidogyne spp.*

Pag23

Índice de tablas

Tabla 1.

Relación de los códigos de las parcelas, localización y gestión de las mismas. (Giné et al., 2013)

Pag 19

Tabla 2.

Características fisicoquímicas de los suelos estudiados. (Giné et al., 2013)

Pag 20

Tabla 3:

Efecto de la esterilización del suelo y de la no esterilización de los suelos M10.16, M10.41, M10.55, M10.56, M10.45, M10.43, sobre el peso fresco de la raíz, huevos llenos corregidos totales, la tasa de reproducción, el número total de nematodos por planta y el porcentaje de huevos parasitados.

Pag25

Tabla 4:

Aumento relativo de peso radicular en los tratamientos esterilizados.

Pag 27



Agradecimientos

Agradecer especial y sinceramente a mis tutores Xavier Sorribas y Ariadna Giné por la oportunidad de trabajar con ellos y compartir pacientemente su conocimiento. Así como a todos los compañeros del Lab-20 con los que he podido compartir horas de trabajo y me han soportado, sobre todo a Anna y Sergi por estar ahí des del primer día.

1. Introducción

El suelo es un componente de vital importancia en la producción agrícola que a menudo se descuida, o sólo se considera como un soporte físico para el crecimiento de las plantas. Sin embargo, este debe ser considerado como un sistema vivo (Ramirez et al.,1996.) y debe ser tratado como tal (Alabouvette, 2007). La intensificación de la actividad agraria junto con la reducción de la diversidad vegetal que se sucede en rotación y el uso desmesurado de agroquímicos ha comportado el desarrollo de plagas y patógenos que limitan la producción vegetal y con ello un empobrecimiento de la biodiversidad y de los procesos biológicos del suelo, favoreciendo el establecimiento de agentes nocivos para los vegetales dando lugar a suelos conductivos a plagas y enfermedades que requieren del uso de métodos drásticos de gestión para controlarlos, como son la desinfección de los suelos por métodos químicos o físicos. Sin embargo, la adopción por parte de los agricultores de sistemas de producción vegetal que anteponen el uso de métodos de regulación natural de agentes nocivos a los biocidas, podrían favorecer el desarrollo de suelos supresivos a plagas y enfermedades. Es decir, suelos en los que los agentes nocivos no se pueden establecer, o si lo hacen, el desarrollo de las poblaciones y el daño que causan es limitado en relación a un suelo conductivo.

La supresividad del suelo frente a plagas y/o enfermedades es un concepto holístico que se ha pretendido explicar y manejar infructuosamente bajo un enfoque reduccionista a través del aislamiento de antagonistas específicos contra plagas y enfermedades y su reintroducción en el suelo en cantidades ingentes para conseguir el control biológico del agente nocivo. En relación a los nematodos fitoparásitos, el control biológico utilizando antagonistas microbianos es una alternativa potencial a los nematicidas químicos (Burkett-Cadena et al., 2008). Se conocen una gran variedad de organismos del suelo depredadores o parásitos de nematodos fitoparásitos (Stirling, 1991). Algunos de estos antagonistas han sido bastante eficaces en la supresión de las poblaciones de nematodos, incluyendo *Pasteuria penetrans* contra *Meloidogyne arenaria* (Chen y Dickson, 2004b) y hongos parásitos de huevos contra varios nematodos formadores de quistes (*Heterodera spp.*) (Chen y Dickson, 2004a; Westphal y Becker, 2001). En términos de supresividad, el parasitismo ha de concebirse como parte de la trama de la vida, constituido por componentes que interactúan a diferentes niveles de organización (Bautista-calles et al., 2008).



La comprensión de las causas de la supresividad natural de nematodos y la identificación de suelos supresivos es quizás el mayor reto en el control biológico de nematodos (Pyrowolakis et al. ,2002). La complejidad es precursora de la estabilidad, y la propiedad de auto organización de los sistemas complejos, considerada en ecología del suelo, puede conducir a la supresividad, estado que pretende ser alcanzado para dar estabilidad al sistema.

Nematodos Fitoparásitos

Los nematodos son el grupo de animales más numeroso del mundo, con más de 150.000 especies descritas, después de los artrópodos. Se pueden encontrar en hábitats muy diversos, en aguas saladas, aguas dulces, y en el suelo, sea como saprofitos, bacteriófagos, micófitos, patógenos y depredadores de animales y parásitos de plantas (Agrios, 2005).

Los nematodos fitoparásitos son parásitos obligados de las plantas, y obtienen su alimento de las células de órganos subterráneos (raíces y tallos subterráneos), mayoritariamente, aunque algunas especies pueden obtenerlo de órganos aéreos como tallos y hojas, mediante el estilete que tienen en la región cefálica y que les sirve para romper los tejidos de la planta, penetrar y/o alimentarse (Agrios, 2005).

En el pasado, los daños causados por los nematodos a los cultivos, frecuentemente se atribuían a otras causas, debido a que los nematodos fitoparásitos son de medida microscópica, y no se disponía de información clara sobre su poder patógeno. Hoy se sabe que son agentes patógenos que afectan al rendimiento y calidad de los cultivos (Agrios, 2005).

Los síntomas causados por nematodos se localizan tanto en la parte aérea como en la parte subterránea de la planta. En la parte aérea, los síntomas son inespecíficos y parecidos a los producidos por otros agentes bióticos o abióticos. Las plantas afectadas se disponen en rodales, por la distribución agregada de los nematodos del suelo, y se aprecian zonas de menor crecimiento del cultivo, síntomas de deficiencias nutricionales, fitotoxicidad, marchitamiento excesivo con clima cálido y seco, deformaciones, agallas, necrosis, podredumbres y muerte de plántulas, lo que se traduce en menor producción de las plantas y baja calidad de los productos. Los síntomas de la parte subterránea están representados por nódulos, necrosis, proliferaciones y deformaciones de las puntas de las raíces (Agrios, 2005).

Los nematodos más importantes en cultivos hortícolas son los nematodos agalladores del género *Meloidogyne spp.* Las pérdidas de producción causadas por el nematodo en tomate, pepino, calabacín, sandía y lechuga pueden alcanzar hasta el 60%, 88%, 80%, 37%, y 30%, respectivamente (Verdejo-Lucas et al., 1994; Ornat et al., 1997; Sorribas et al., 2003; Giné et al., 2014; López-Gómez et al., 2014 i 2015; Vela et al., 2014).



Meloidogyne spp.

El género *Meloidogyne spp.* comprende los nematodos endoparásitos sedentarios formadores de agallas. Actualmente hay descritas cerca de 100 especies, de las cuales *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica*, son las que se encuentran mayormente distribuidas en el mundo y las principales causantes de las pérdidas de producción a nivel mundial (Hunt y Handoo, 2009). El ciclo de vida de *Meloidogyne* (Figura 1) comprende 6 etapas de desarrollo: huevo, 4 etapas juveniles (J1 - J4) y adultos. Sin planta huésped, *Meloidogyne* sobrevive en el estadio de huevo, en el interior de la masa de huevos, sea indiferenciado o diferenciado en J1 o J2. También puede sobrevivir como J2 en el suelo. El ciclo de vida comienza cuando el J2, la única etapa infecciosa y móvil, se mueve en el agua adherida al suelo atraído por exudados de la planta huésped, penetra en la raíz y migra a través de los espacios intercelulares. El J2 establece el punto de infección justo detrás del ápice radicular estableciendo un sitio de alimentación inducido por la diferenciación de las células adyacentes al punto de infección y que conduce a la formación de las células gigantes. Las células gigantes se producen a causa de cambios morfológicos, fisiológicos y moleculares causadas por la infección de J2 en las raíces de las plantas susceptibles.

El tejido de la raíz se distorsiona debido a la hiperplasia (intensa multiplicación celular) e hipertrofia (incremento del tamaño de las células) dando lugar a la formación de las agallas. Una vez que el nematodo establece el sitio de alimentación, se convertirá en sedentario y crecerá en longitud y anchura. En esta etapa, el nematodo pasa por tres mudas dando lugar al J3, J4, y adulto. El estadio adulto presenta dimorfismo sexual. El macho es vermiforme y móvil, mientras que la hembra tiene el cuerpo en forma de pera y es sedentaria. La reproducción es partenogenética. La evolución de los juveniles a machos o hembras dependerá de las condiciones ambientales. Cuando estas son desfavorables para el desarrollo de la población evolucionan a machos, lo que representa un mecanismo de regulación de la densidad de población para evitar la competencia intraespecífica. Si las condiciones son favorables, los juveniles se desarrollan en hembras, las cuales producen huevos que se mantienen en una matriz gelatinosa o masa de huevos, compuesta por glicoproteínas producidas por las glándulas rectales y que los protege de las condiciones adversas. Las masas de huevos se encuentran, sobre todo, fuera de las agallas, pero también se pueden encontrar en el interior de las mismas dependiendo de la densidad de inóculo, de la distribución de los nematodos en las raíces y de la planta huésped. La embriogénesis dará lugar a un J1 que mudará dentro del huevo para dar lugar al J2, que se mantendrá en el

interior del mismo hasta que las condiciones sean favorables para emerger al suelo (Moens et al., 2009).

La duración del ciclo de vida dependerá de la temperatura del suelo al tratarse de organismos poiquiloterms. Existen modelos fenológicos que permiten estimar el tiempo de generación según la especie de *Meloidogyne* y el cultivo (Maleita et al., 2012; Giné et al., 2014; López-Gómez et al., 2014; 2015; Vela et al., 2014).

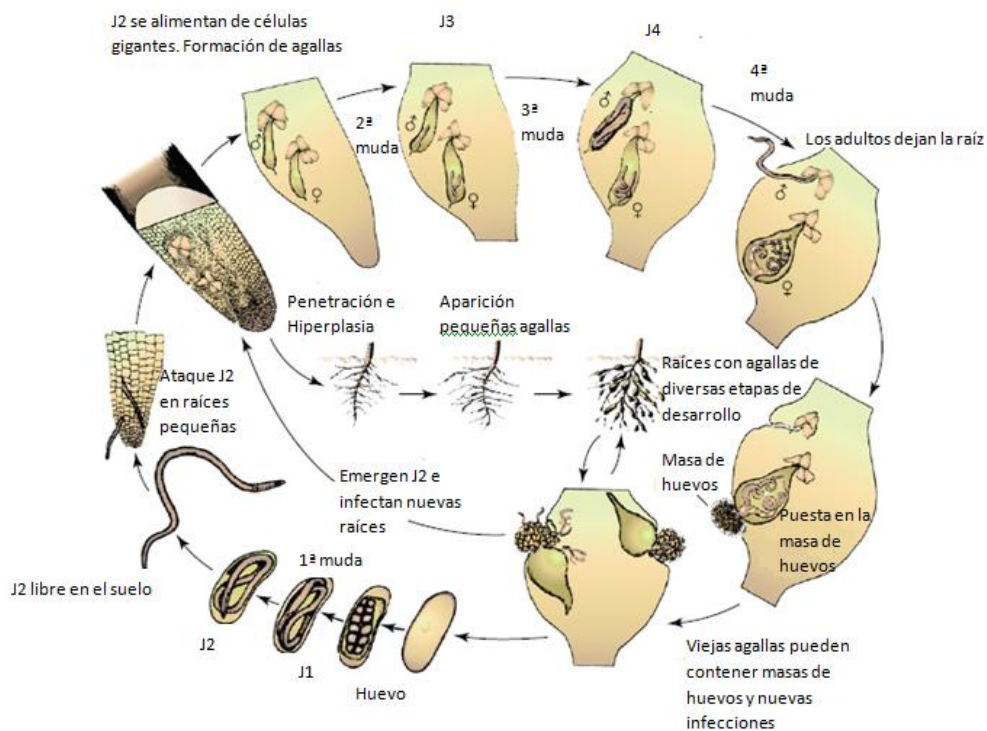


Figura 1: Ciclo patológico de *Meloidogyne* spp. (Fuente Agrios, 2005)

Meloidogyne es el principal nematodo limitante de la producción de cultivos hortícolas (Sikora y Fernández, 2005). El control del nematodo se ha basado principalmente en el uso de fumigantes del suelo y nematicidas. Sin embargo, la necesidad de reducir la dependencia de algunos agroquímicos debido a su impacto negativo en la salud humana y el medio ambiente ha impulsado a los investigadores a explorar métodos alternativos no químicos para el control de nematodos. La Directiva de la Comisión Europea 2009/128 / CE relativa a la utilización sostenible de pesticidas estableció un marco para promover medidas para el uso de la gestión integrada de plagas y alternativas a los plaguicidas no químicos. Uno de estos enfoques es la conservación y mejora de los organismos beneficiosos. Los sistemas sostenibles de producción (es decir, la agricultura integrada y ecológica) son buenos candidatos para el desarrollo de métodos de control biológico basados en la diversidad microbiana. En España, la superficie agrícola destinada a la producción de hortalizas bajo producción ecológica e integrada en 2010 fue de 10.156 y 29.210 ha, respectivamente, y ha aumentado de forma constante durante la última década (Generalitat de Catalunya, 2012, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2011).

Existe una gran diversidad de organismos antagonistas de nematodos fitoparásitos entre los que se hallan bacterias, hongos, protozoos, tardígrados, nematodos, enchitreidos, ácaros, colémbolos y otros insectos (Stirling, 1991). Sin embargo, son los hongos y las bacterias los grupos que revisten mayor importancia. Hongos como *Arthrobotrys oligospora*, *Catenaria Dactylella*, *Hirsutella Nematophthora*, *Purpureocillium lilacinus*, *Pochonia chlamydosporia*, y *Verticillium lecanii*, han sido descritos como parásitos de nematodos, así como la bacteria *Pasteuria penetrans* (Agrios, 2005). Estos y otros microorganismos antagonistas de nematodos fitoparásitos están presentes de forma natural en los suelos de cultivo, y ejercen un cierto nivel de regulación de las densidades del patógeno (Giné et al., 2012). Los seres humanos, sin embargo, han estado tratando de aumentar la efectividad de los antagonistas mediante la introducción de nuevos antagonistas, o aumentando la densidad de los antagonistas nativos y/o su actividad biológica mediante la adición de enmiendas de suelo (Moosavi et al., 2010).

Suelos supresivos

Los suelos supresivos han sido definidos por Baker y Cook (1974) como aquellos en los que la incidencia y gravedad de la enfermedad es baja a pesar de la presencia del patógeno que la causa, de la presencia de una planta huésped susceptible, y de darse las condiciones climáticas favorables para el desarrollo de la enfermedad. Sikora (1992) la define como 'la capacidad del suelo, a través de factores bióticos, para prevenir o reducir la propagación de un patógeno, parásito u otro agente perjudicial'. Hasta la fecha se han descrito suelos supresivos de enfermedades causadas por hongos, bacterias y nematodos fitoparásitos (Schneider, 1982; Cook y Baker, 1983; Schippers, 1992; Westphal y Becker, 2001; Alabouvette, 2007). De hecho, el componente biológico de la supresividad puede demostrarse ya que la esterilización por calor, fumigación, radiación o cualquier otro medio elimina por completo la supresividad (Hornby, 1983). Es por tanto el componente microbiano de los suelos el responsable de la supresividad. Si existe un suelo supresor a ciertos fitopatógenos, hay que conservar su estructura y si se desea inducir supresividad a un suelo donde las enfermedades causan devastación, hay que empezar por hacer cambios profundos en su estructura. Otros mecanismos de regulación que parecen inducir la supresividad, son la incorporación de abonos verdes y los suplementos de materia orgánica (Rodríguez-Kábana et al., 1987), así como la introducción de complejos de antagonistas aislados de suelos supresivos, es decir, la fertilidad del suelo en todos los ámbitos, tanto fisicoquímico como biológico. Sin embargo, la evolución del manejo integrado de plagas y manejo integrado de la fertilidad de los suelos ha progresado separadamente (Altieri et al., 2003), a pesar de saberse que muchas prácticas de manejo del suelo influyen en el manejo de plagas, por lo que no tiene sentido ecológico continuar con enfoques reduccionistas (Nichols y Altieri, 2006). Nichols y Altieri (2008) refieren varias investigaciones que demuestran la capacidad de un cultivo de resistir o tolerar el ataque de insectos plaga y de enfermedades ligada a las propiedades físicas, químicas y particularmente biológicas del suelo. Suelos con alto contenido de materia orgánica y de actividad biológica generalmente exhiben buena fertilidad, cadenas tróficas complejas con la presencia y abundancia de organismos beneficiosos que previenen la infección.

La evidencia de que un suelo es supresor se puede obtener al observar el resultado de añadir suelo supresor a un suelo enfermo, en que la cantidad de incidencia y/o severidad de la enfermedad es significativamente menor debido a presencia de microorganismos antagónicos del



patógeno. Por ejemplo, en un suelo que contiene una cepa de una especie de *Streptomyces spp.* antagónica a *Streptomyces scabies*, la causa de la sarna de la patata, dio lugar a tubérculos de patata significativamente libres de costras (Agrios, 2005).

Una manera de cambiar la biología del suelo para mejorar la supresión de los nematodos parásitos de las plantas es aumentar el nivel de aportes de materia orgánica en los suelos. Cuando se añade materia orgánica al suelo, bacterias y hongos comienzan el proceso de descomposición y se multiplican rápidamente, mientras que las poblaciones de otros organismos del suelo (por ejemplo, protozoos y algas) también aumentan. Las bacterias y los hongos nematófagos se multiplican mientras hay alimento disponible. Por último, hay un aumento en el número de omnívoros, nematodos depredadores y en la actividad de los hongos depredadores tales como los hongos que atrapan nematodos. Esto resulta en una red trófica más compleja con una mayor actividad de control biológico (Stirling, 1991). Stirling et al. (2005) observaron que un mes después de la aplicación de enmiendas orgánicas la biomasa microbiana, y el número de bacterias y hongos en el suelo aumentaba y se mantenía hasta 4 meses.

La supresividad de un suelo puede ser general o específica. La supresión general se consigue a causa de la comunidad microbiana presente en el mismo. En este caso, es el aumento de la actividad de la comunidad microbiana como un todo, en lugar de los cambios en la actividad de unos pocos organismos antagonistas específicos. La competencia por los recursos y la producción de sustancias antimicrobianas reduce la capacidad de los agentes patógenos resultando en niveles de enfermedad más bajos. La supresión general está relacionada con el concepto biostasis. Está directamente relacionada con la cantidad total de la actividad microbiológica en un momento crítico para el patógeno (Cook y Baker, 1983; Alabouvette, 2007). La supresión específica es la debida a componentes específicos de la comunidad microbiana, que responden a la presencia del patógeno, o a la de una especie vegetal que estimula su desarrollo hasta inhibir al patógeno.

Los mecanismos por los que los suelos son supresivos a diferentes patógenos no son siempre muy claros pero pueden implicar factores bióticos y/o abióticos y pueden variar con el patógeno. En la mayoría de los casos, sin embargo, parece que operan principalmente por la presencia en estos suelos de uno o varios microorganismos antagonistas al patógeno. Tales antagonistas, mediante los antibióticos que producen, a través de las enzimas líticas, por competencia trófica, o

parasitismo, consiguen regular suficientemente al patógeno evitando que cause enfermedades graves.

La teoría moderna de la complejidad postula que a través de las organización espontanea los sistemas de elevada complejidad, encuentran por si mismos las formas óptimas de organización y funcionamiento (Bautista-Calles et al., 2008). Estipula también que los controles externos deben mantenerse a un mínimo, ya que son los que vulneran el sistema y lo llevan al colapso. La capacidad supresora, es un ejemplo de propiedad de autoorganización de los sistemas de alta complejidad. Es probable que la supresividad a ciertas especies de patógenos, observada de manera general en ecosistemas naturales, se deba a la elevada complejidad tanto estructural como de comportamiento de las especies de microorganismos que interactúan en ellos. Es factible que surja supresividad en el suelo de un agroecosistema estimulando la complejidad de este, por ejemplo, al incrementar la diversidad microbiana beneficiosa en el suelo (Bautista-Calles et al., 2008). Bajo un enfoque holístico, y de la teoría de la complejidad, la supresividad del suelo es una propiedad emergente del sistema que resulta de su propio estado complejo de organización; el fenómeno no se puede explicar y manejar diseccionando el sistema para conocer los elementos que lo componen, ya que ninguno de esos componentes puede explicar por si solo la capacidad supresora de un suelo (Bautista *et al.*, 2008). El concepto de supresividad a fitopatógenos por parte de ciertos suelos está bien documentado en diversas partes del mundo (Cook y Baker, 1983; Linderman *et al.*, 1983), lo que ha contribuido a su aceptación generalizada para ser empleada en el control biológico. Sin embargo, el fenómeno aún no está suficientemente entendido como para ser aplicado en campo. Se han identificado suelos supresivos a los nematodos fitoparásitos, es decir, sistemas de producción en los cuales se mantiene un equilibrio entre las poblaciones de nematodos y sus enemigos naturales permitiendo la permanencia de cultivos susceptibles durante varios años sin presentar una reducción en su rendimiento (Kerry *et al.*, 1982; Sikora, 1992).

En España se han llevado a cabo diversos estudios para conocer de la presencia de antagonistas de *Meloidogyne spp.*, mayoritariamente hongos (Verdejo-Lucas *et al.*, 1997, 2002 y 2013; Olivares-Bernabeu & López-Llorca, 2002; Giné *et al.*, 2013). Entre los hongos más frecuentes se hallan diversas especies de *Fusarium* y *Pochonia chlamydosporia*, encontrándose, esta ultima especie, ampliamente distribuida en Cataluña como muestran los resultados de la última prospección llevada a cabo por Giné y colaboradores (2013) en esta zona. Un aspecto destacable



del estudio es la diversidad de antagonistas detectada en una misma parcela, lo que induce a pensar en la posibilidad de que algunos de estos suelos puedan tener potencial supresor del nematodo. En un estudio posterior llevado a cabo en dos parcelas destinadas a la producción comercial de hortalizas y en las que se detectaban niveles bajos de enfermedad a pesar de las densidades del nematodo en suelo, se concluyó que eran supresivas del nematodo a partir del estudio de la fluctuación de las densidades del nematodo en campo y el porcentaje de parasitismo de huevos durante dos años consecutivos, así como la comprobación mediante bioensayos. Además, se pudo apreciar una mayor similitud de los perfiles microbianos, principalmente de bacterias, entre los suelos supresivos que entre estos suelos y uno conductivo al nematodo (Giné *et al.*, 2016). Estos han sido hasta la fecha los únicos suelos supresivos a *Meloidogyne* caracterizados en España, aunque podría haber más dados los niveles de parasitismo detectados en el estudio de Giné y colaboradores (2013). La caracterización de dichos suelos y el estudio en profundidad de los perfiles microbianos existentes en ellos pueden aportar una información valiosa para conocer la base biológica de la supresividad, es decir, la presencia y abundancia de los grupos funcionales implicados en la misma, como fluctúan en el tiempo y como les afecta la gestión de las parcelas.

2. Objetivo

El objetivo del trabajo fue caracterizar la potencial supresividad de suelos destinados a la producción comercial de hortalizas en los que se habían detectado diferentes niveles de parasitismo de huevos de *Meloidogyne* en un estudio precedente (Giné et al., 2013).



3. Materiales y métodos.

Suelos: localización de las parcelas, toma de muestras y gestión de los mismos

Se tomaron muestras de suelo de 6 parcelas de producción hortícola en febrero de 2015. La relación de los códigos de las parcelas, siguiendo la notación usada en el trabajo realizado por Giné y colaboradores (2013), la localización y la gestión de las mismas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Relación de los códigos de las parcelas, localización y gestión de las mismas.

(Fuente: Giné et al., 2013)

Suelo	Localización	Gestión de la parcela
M10.43	Mataró	Integrada
M10.41	Amposta	Ecológica
M10.16	Pontons	Ecológica
M10.55	Alcanar	Ecológica
M10.45	Mataró	Integrada
M10.56	Alcanar	Ecológica

Las características fisicoquímicas del suelo de cada parcela se presentan en la Tabla 2.

En cada parcela se tomó una muestra de suelo compuesta de 48 submuestras, de acuerdo a un muestreo sistemático en zig-zag, tomadas de los 30 primeros centímetros del suelo con una azada. La muestra fue homogenizada y tamizada a través de un tamiz de 4mm de luz de poro para eliminar las piedras y raíces.

Tabla 2. Características fisicoquímicas de los suelos estudiados. (Giné et al., 2013)

Variable	Suelos					
	M10.43	M10.41	M10.55	M10.16	M10.45	M10.56
Arena (%)	75	33	68	50	67	53
Limo (%)	15	38	0	30	14	29
Arcilla (%)	10	29	32	20	19	18
Textura (USDA)	Franco arenoso	Franco arcilloso	Franco arcillo limoso	Franco	Franco arenoso	Franco arenoso
pH (1:2.5 en agua)	8.13	8.17	8.10	8.25	7.77	8.32
Materia orgánica (w/w)	1.51	4.38	2.50	1.20	2.50	4.29
Conductividad eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) (1:5)	155.60	516.00	1069.00	300.00	332.00	415.00
B (ppm)	2.82	5.33	1.12	2.62	0.75	1.21
Cambiable Ca ($\text{meq } 100 \text{ g}^{-1}$)	7.18	14.88	18.16	14.15	9.98	15.89
Disponibile Ca ($\text{meq } 100 \text{ g}^{-1}$)	8.14	14.70	18.99	15.74	10.74	16.96
CaCO ₃ (%)	1.00	4.00	4.10	6.00	3.80	5.10
Capacidad intercambio catiónico ($\text{meq } 100 \text{ g}^{-1}$)	9.12	14.06	25.70	26.84	12.22	22.89
Cu (ppm)	28.31	2.50	2.50	2.50	28.77	2.50
Disponibile P (ppm)	57.94	247.47	75.79	118.25	86.92	80.19
Fe (ppm)	239.07	5.00	5.00	5.00	79.72	5.00
Cambiable Mg ($\text{meq } 100 \text{ g}^{-1}$)	0.91	4.80	2.97	1.37	1.41	2.21
Disponibile Mg ($\text{meq } 100 \text{ g}^{-1}$)	1.06	4.43	3.66	1.43	1.58	2.72
Mn (ppm)	92.23	92.44	2.50	55.54	54.26	2.50
N (ppm)	629.80	2388.70	1497.70	522.90	1824.90	2209.80
Cambiable K ($\text{meq } 100 \text{ g}^{-1}$)	0.15	1.47	0.67	0.59	0.35	0.62
Disponibile K ($\text{meq } 100 \text{ g}^{-1}$)	0.18	1.67	0.69	0.79	0.43	1.05
C/N	13.87	10.64	9.68	13.36	7.94	11.26
Cambiable Na ($\text{meq } 100 \text{ g}^{-1}$)	0.34	0.57	0.54	0.46	0.36	0.37
Disponibile Na ($\text{meq } 100 \text{ g}^{-1}$)	0.36	1.85	3.17	0.38	0.54	0.62
Zn (ppm)	24.63	7.19	2.5	2.64	24.52	2.50
Ca + Mg/K	53.93	13.39	31.54	26.31	32.54	29.20
P/N	0.09	0.10	0.05	0.23	0.05	0.04
Fluoresceína diacetato de hidrólisis ($\mu\text{g fluoresceína h}^{-1} \times \text{g soil}$)	2.79	4.44	0.95	2.85	3.58	3.86
b-glucosaminidasa ($\mu\text{mols } p\text{-nitrophenol h}^{-1} \times \text{g soil}$)	0.20	0.30	0.10	0.11	0.33	0.42
Ureasa ($\mu\text{mols N-NH}_4 \text{ h}^{-1} \times \text{g soil}$)	0.57	2.24	0.87	0.57	1.21	1.34
Proteasa ($\mu\text{g tyrosine h}^{-1} \times \text{g soil}$)	8.89	5.42	12.42	5.02	9.49	8.79

Del total de la muestra de suelo se esterizaron 20 L en autoclave a 121°C durante una 1 hora y este proceso se repitió 24h después. El resto de la muestra se conservó en cámara frigorífica a 4°C hasta el inicio del ensayo. El suelo esterilizado se mezcló con arena esterilizada, siguiendo el mismo procedimiento explicado anteriormente, en proporción volumétrica 1:1 para evitar su compactación en las macetas y favorecer el desarrollo de la planta. La misma operación se realizó con la muestra de suelo sin esterilizar. La mezcla se llevó a cabo con una hormigonera. Primero se mezclaron los suelos esterilizados y seguidamente los no estériles con la finalidad de reducir las

posibles contaminaciones entre los suelos. Después de cada mezcla se limpiaba la hormigonera con agua y después de secarla se limpiaba el interior con alcohol de 70°.

Inóculo

El inóculo consistió en J2 de *Meloidogyne incognita* procedente de la colección de poblaciones que mantiene el grupo de Nematología de la UPC en tomate. Para obtenerlo, se extrajeron los huevos de las raíces de tomate por el procedimiento Hussey y Barker (1973), y se dispusieron en bandejas de Baermann (Whitehead y Hemming, 1965) durante una semana a 27 ± 2 ° C. Al final del periodo, la suspensión se filtró por un tamiz de 250 μm de abertura de malla para concentrarlos y traspasarlos a un vial que se mantuvo a 9 °C hasta su utilización.

Caracterización del potencial supresor del suelo a *Meloidogyne*

Se extrajeron los nematodos de cada una de las mezclas suelo: arena a partir de dos muestras de 250 cm^3 el método de centrifugación flotación (Jenkins, 1964) para determinar la densidad de nematodos al inicio del experimento. A continuación, plantas de tomate cv Durinta (susceptible al nematodo) con 4 hojas bien desarrolladas se trasplantaron individualmente a macetas de 3 L de capacidad que contenían las mezclas de suelo. Seguidamente, el suelo de cada maceta se inoculó con la dosis necesaria para conseguir un total de 3000 J2 por maceta, es decir, 1 J2 / 1 cm^3 de suelo. El inóculo se añadió en dos orificios opuestos de 3 cm de profundidad y a 2 cm del tallo. Cada combinación de suelo esterilizado o no esterilizado se repitió doce veces, es decir, un total de 144 macetas que se dispusieron en bandejas de cultivo en el invernadero de vidrio en Agròpolis, desde el 15 de mayo al 7 de julio de 2015, tiempo suficiente para que el nematodo completase una generación.

Las plantas se regaron según las necesidades del cultivo mediante sistema de goteo y se fertilizaron con un abono de liberación lenta (15N + 10P + 12K + 2MgO + microelementos). La temperatura y el contenido hídrico del suelo se registraron a 8 cm de profundidad a intervalos de una hora.



Figura 2: Mesas de cultivo donde se observan las plantas de tomates. Agrópolis 2015.

Al finalizar el experimento se retiraron las plantas de las macetas. El suelo de cada maceta se homogenizó y se tamizó a través de un tamiz de abertura 4 mm para separar las raíces del suelo. Los juveniles se extrajeron de una sub-muestra de 500 cm³ de suelo mediante bandejas de Baermann (Whitehead y Hemming, 1965), tal y como se ha explicado anteriormente. Seguidamente, se limpiaron las raíces con agua para eliminar los restos de suelo, se eliminó el exceso de humedad con papel de filtro, se determinó el índice de agallas según la escala de 0 a 10 de Zeck (1971), donde 0 indica que la raíz no tiene ninguna agalla, y 10 que las raíces y la planta están muertas, seguidamente se cortaron y pesaron las raíces. A continuación, se cogieron 3 o 4 masas de huevos de cada planta por suelo y tratamiento de la mezcla, y se colocaron inmediatamente en un vidrio de reloj con agua destilada esterilizada. El exceso de matriz gelatinosa que envuelve los huevos se eliminó con unas pinzas con el fin de eliminar los posibles colonizadores presentes en la superficie de la misma. Las masas de huevos se colocaron en un tubo Eppendorf al que se le añadió 0,1 mL de agua destilada estéril. Los huevos se dispersaron de la masa gelatinosa utilizando un embolo estéril. Posteriormente se añadió 0,9 mL de agua destilada estéril. La suspensión se homogeneizó con una pipeta en cámara de flujo laminar, y alícuotas de 0,33 mL de la suspensión de huevos se dispensaron y extendieron en cada una de tres placas de Petri de 9 cm de diámetro que contenían medio de crecimiento restrictivo

(estreptomomicina, 50 mg L⁻¹; cloranfenicol, 50 mg L⁻¹; clortetraciclina, 50 mg L⁻¹; Rosa de Bengala, 50 mg L⁻¹; tritón, 1 mL⁻¹, y 1% de agar) (López-Llorca y Duncan, 1986).

Las placas se incubaron a 25 °C ± 0,5 °C. El número de huevos parasitados se contabilizó a las 24, 48 y 72 horas utilizando un microscopio de disección y una placa de Petri con una matriz cuadrada dibujada para facilitar el recuento. Se calculó el porcentaje de parasitismo a partir del número de huevos parasitados por placa referido al número total de huevos por placa. Se consideró que el huevo estaba parasitado cuando las hifas crecían desde el interior.

Para estimar la reproducción del nematodo se extrajeron los huevos de las raíces siguiendo el procedimiento de maceración de Hussey y Barker (1973) y se contabilizaron al microscopio óptico. Se calculó la tasa de multiplicación del nematodo a partir del número de huevos no parasitados por planta respecto la dosis de inóculo inicial utilizada en el ensayo (Sorribas *et al.*, 2003; Giné *et al.*, 2016).

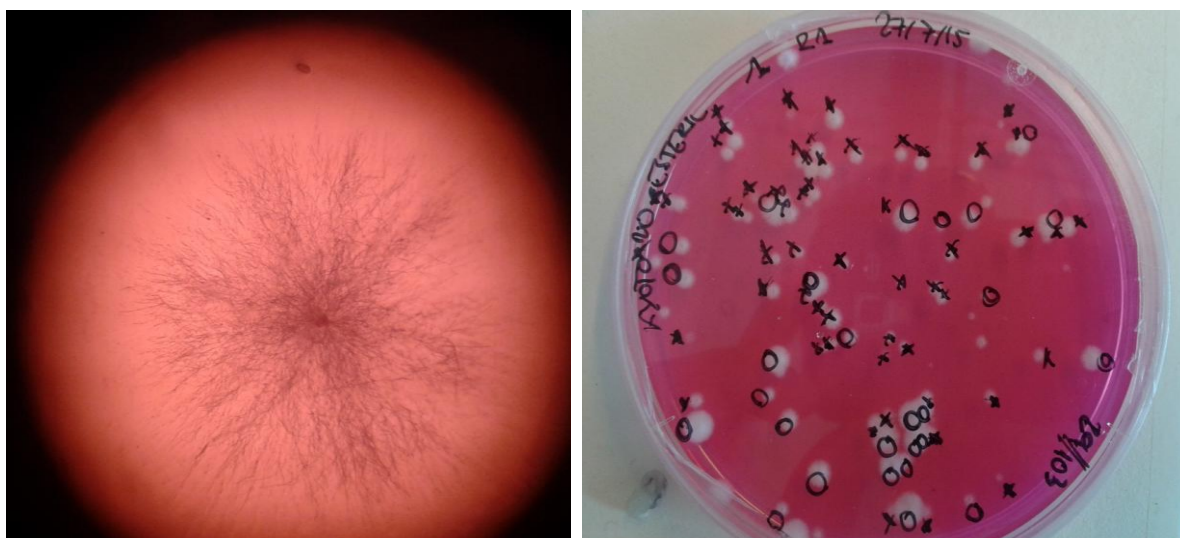


Figura 3: a) Huevos parasitado por *Pochonia chlamydosporia*. B) Placa de evaluación de parasitismo de huevos de *Meloidogyne spp.*

Tratamiento estadístico

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el paquete estadístico SAS V9.2. Los datos de peso de raíz, índice de agallas, número de huevos por planta, número de nematodos por planta y tasa de multiplicación se normalizaron, cuando fue necesario, mediante la transformación raíz cuadrada ($x+0,5$) y se contrastaron entre mezcla de suelo esterilizada y no esterilizada para cada suelo mediante la prueba t de Student. Se consideró que un suelo tenía potencial supresor de *Meloidogyne incognita*, la especie utilizada en el experimento, cuando la severidad de la enfermedad y/o la densidad de nematodos al final del experimento era menor en la mezcla de suelo no estéril que en mezcla estéril.



4. Resultados

Los resultados obtenidos en este estudio se encuentran en la Tabla 3.

Los suelos estériles desarrollaron un promedio de 46% más de masa radicular que los no esterilizados. La mayor diferencia de peso radicular entre tratamientos se observó en el suelo M10.45.

Los suelos estériles presentaron, también, mayor número de huevos llenos, mayor tasa de reproducción y mayor cantidad total de nematodos por planta. M10.56 muestra la menor tasa de reproducción de los suelos no esterilizado. Las diferencias en la tasa de reproducción son mayores con gestión ecológica.

Se observaron huevos parasitados en M10.16, M10.41, M10.55, M10.56 y M10.43, en los tratamientos no esterilizados, en los suelos estériles no se observó parasitismo de huevos. M10.45 fue el único suelo caracterizado como conductivo, no mostrando mas diferencias relevantes con el resto de suelos.

Pochonia chlamydosporia fue la única especie de hongo aislado e identificado visualmente bajo una lupa binocular. En los suelos bajo producción integrada el parasitismo de huevos oscila entre 0 y 16,5%, mientras que en las parcelas bajo manejo ecológico van de 13,5 a 43,7%.

M10.56 y M10.43 son los suelos con mayor diferencia entre las tasas de reproducción de los tratamientos estériles y de los no esterilizados, de cada suelo. También son los suelos supresivos con menor parasitismo de huevos de nematodos, 13,5% y 16,5% respectivamente. Esto hace pensar en la presencia de otros antagonistas que no se han detectado en este ensayo.

Tabla 3: Efecto de la esterilización del suelo y de la no esterilización de los suelos M10.16, M10.41, M10.55, M10.56, M10.45, M10.43, sobre el peso fresco de la raíz, huevos llenos corregidos totales, la tasa de reproducción, el número total de nematodos por planta y el porcentaje de huevos parasitados.

Gestión	Suelo	Tratamiento	Peso raíz (g)	Huevos llenos corregidos totales($\times 10^3$)	Tasa de reproducción	Nematodos totales por planta($\times 10^3$)	Parasitismo (%)
Ecológica	M10.16	No estéril	*8,3 \pm 1,2	*58 \pm 9	*20,1 \pm 3,2	*58 \pm 9	17,4
		Estéril	19,2 \pm 2,7	256 \pm 41	111,4 \pm 18,5	323 \pm 54	0
	M10.41	No estéril	*26,5 \pm 2,8	250 \pm 25	*86,8 \pm 8,8	*252 \pm 25	23,5
		Estéril	44,1 \pm 3,6	258 \pm 18	127,8 \pm 9,6	370 \pm 28	0
	M10.55	No estéril	25,3 \pm 2,4	*82 \pm 15	*28,7 \pm 5,2	*83 \pm 15	43,7
		Estéril	34,1 \pm 3,8	163 \pm 28	83,2 \pm 15,3	241 \pm 44	0
M10.56	No estéril	*11,7 \pm 2,4	*48 \pm 5	*16,7 \pm 1,7	*48 \pm 5	13,5	
	Estéril	24,3 \pm 2,3	221 \pm 31	86 \pm 11,4	249 \pm 33	0	
Integrada	M10.45	No estéril	*20,5 \pm 1,5	*165 \pm 21	78 \pm 10,4	226 \pm 30	0
		Estéril	45,9 \pm 3,2	258 \pm 23	90,5 \pm 7,9	262 \pm 23	0
	M10.43	No estéril	*21,9 \pm 1,9	*119 \pm 14,4	*54,6 \pm 54,6	*158 \pm 19	16,5
		Estéril	39,4 \pm 3,2	245 \pm 27	84,9 \pm 9,4	246 \pm 27	0

Datos de tratamientos de cada suelo con * indican diferencias significativas según la t-Student ($P < 0.05$)

Cada dato es promedio \pm error estándar de 12 repeticiones.

Tabla 4: Aumento relativo de peso radicular en los tratamientos esterilizados.

Gestión	Suelo	%
Ecológica	M10.16	44,4
	M10.41	39,9
	M10.55	25,8
	M10.56	51,9
Integrada	M10.45	55,3
	M10.43	56,8

5. Discusión

En este trabajo, se han identificado cinco suelos con potencial antagónico a *Meloidogyne spp.* y uno conductivo.

La comunidad de nematodos puede estar afectada directa o indirectamente por una variedad de propiedades de los suelos. La textura de los suelos tiene una gran influencia. Los suelos con mayor contenido de arcillas, tienden a un aumento en la capacidad de retención de agua que puede mejorar la tolerancia de los cultivos susceptibles a los nematodos (McSorley y Frederick ,2002). En este estudio M10.55 presenta un 43% de huevos parasitados, siendo el suelo con más parasitismo con diferencia, siendo también el que tiene mayor contenido de arcilla (Tabla2) ya que los suelos de esta textura tienden a retener mayor parte de las clamidosporas producidas por hongos nematofagos, por tener menores perdidas por lixiviación y mayor probabilidad de que un nematodo entre en contacto con una clamidospora. M10.41 y M10.16 siguen la misma tendencia con 29% y 20% de arcilla presentando 23,5% y 17,4% de huevos parasitados, respectivamente. Además en los suelos con poros grandes los huevos de *Meloidogyne* eclosionan antes y en mayor numero que en los suelos finos (Evans y Perry 2009). Por lo tanto, en estos suelos, los huevos sin eclosionar de las masas de huevos podrían quedar más expuestos a hongos parásitos de huevos durante más tiempo (Giné et al., 2013).

Los resultados del presente trabajo sugieren que el único antagonista activo de *Meloidogyne spp.* fue *Pochonia chlamydosporia* porque no se aislaron otros hongos de los huevos. Los niveles más altos de parasitismo se encontraron en los suelos provenientes de producción ecológica. Esto tiene sentido según el enfoque de varios autores que postulan que el potencial antagónico de un suelo a nematodos es mayor en suelos naturales o menos perturbados que en suelos agrícolas convencionales(McSorley et al., 2008; Pyrowolakis et al., 2002).

La diferencia positiva en el crecimiento es un efecto secundario conocido de la esterilización del suelo (Tabla 4). La razón principal para el aumento de peso fresco de las raíces en el suelo esterilizado son las deformidades generadas por las agallas al sufrir mayores cantidades de inóculo al no tener competencia o antagonistas. (Pyrowolakis et al., 2002)

En M10.56 se observó una mayor diferencia en el número de huevos llenos por gramo de raíz entre los dos tratamientos. Esto puede explicarse ya que es el suelo con mayor relación C/N. Los suelos con mayor relación C/N parecen ser más efectivos en el control de nematodos durante más tiempo probablemente debido a que actúan a través de la biología del suelo más que por procesos químicos (Stirling, 2011).

Es ampliamente aceptado que la materia orgánica mejora la estructura del suelo, la fertilidad aumenta el control biológico ya que actúa como un sustrato para microorganismos del suelo, incluyendo los antagonistas de nematodos. Aunque en el presente trabajo no se correlacionaron dichos parámetros.

El sistema de cultivo puede influir en la dinámica de las poblaciones de nematodos, debido a los cambios en el potencial antagonista de los suelos, por tanto, puede afectar a la relación entre las pérdidas de rendimiento y la densidad de población de nematodos. Se deben realizar estudios a largo plazo para determinar el efecto de los hongos parásitos de huevos sobre la dinámica de las poblaciones de los nematodos agalladores de la raíz y el rendimiento de los cultivos en las rotaciones más comunes, así como, para mejorar las prácticas agronómicas que mejoren la supresión de los nematodos parásitos de plantas (Giné et al., 2013).



Conclusiones

- La esterilización del suelo provoca aumento en la masa radicular. Así como mayor actividad biológica del patógeno por la eliminación de antagonistas.
- Se caracterizaron cinco de los seis suelos como supresivos frente a *Meloidogyne spp* , los huevos parasitados en estos suelos osciló entre el 13,5% y el 43,7%.
- Solo uno de los suelos bajo gestión integrada y todos los suelos bajo gestión ecológica de este estudio se mostraron supresivos a *Meloidogyne incognita*.
- La tasa de reproducción de los nematodos en los suelos ecológicos es menor que en los suelos con gestión integrada en proporción a los tratamientos esteriles.esto les otorga mayor valor como suelos supresivos al reducir la propagación del patógeno.
- Los suelos manejados ecológicamente, evaluados en este estudio, presentaron mayor cantidad de huevos parasitados que los suelos con gestión integrada. Lo que sugiere mayor potencial antagónico en la gestión ecológica.

Bibliografía

- Agrios, G. N.(2005). *Fitopatología*. Ed. Linusa.
- Alabouvette, C., Janvier, C., Villeneuve, F., Edel-Hermann, V., Mateille, T., & Steinberg, C. (2007). Soil health through soil disease suppression: which strategy from descriptors to indicators?. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(1), 1-23.
- Altieri, M. A., do Nascimento Silva, E., & Nicholls, C. I. (2003). O papel da biodiversidade no manejo de pragas. Ribeirão Preto: Holos.
- Baker, K. F., and Cook, R. J. 1974. Biological control of plant pathogens *WH Freeman company, San Francisco, USA*.
- Bautista-Calles, J. et al.(2008).Inducción de supresividad a fitopatógenos del suelo. Un enfoque holístico al control biológico, 33,pp.96–102.
- 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(1), 55-59.
- Chen, S., Dickson, D. W. (2004). Biological control of nematodes by fungal antagonists. *Nematology: advances and perspectives*, 2, 343-403.
- Chen, Z. X., Dickson, D. W. (2004). Biological control of nematodes with bacterial antagonists. *Nematology-Advances and perspective*, 2, 1052-1067.
- Cook, R. J., & Baker, K. F. (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens. *American Phytopathological Society*.
- Evans, A., y Perry, R. (2009). Meloidogyne Species—a diverse group of novel and important plant parasites. *Root-knot nematodes. Wallingford, CABI*, 201-222.
- Giné, A., Bonmatí, M., Sarro, A., Stchiegel, A., Valero, J., Ornat, C., Sorribas, F. J. (2013). Natural occurrence of fungal egg parasites of root-knot nematodes, Meloidogyne spp. in organic and integrated vegetable production systems in Spain. *BioControl*, 58(3), 407-416.
- Giné, A., Carrasquilla, M., Martínez-Alonso, M., Gaju, N., & Sorribas, F. J. (2016). Characterization of soil suppressiveness to root-knot nematodes in organic horticulture in plastic greenhouse. *Frontiers in plant science*, 7.



- Giné, A., López-Gómez, M., Vela, M. D., Ornat, C., Talavera, M., Verdejo-Lucas, S., & Sorribas, F. J. (2014). Thermal requirements and population dynamics of root-knot nematodes on cucumber and yield losses under protected cultivation. *Plant pathology*, 63(6), 1446-1453.
- Hornby, D. (1983). Suppressive soils. *Annual review of phytopathology*, 21(1), 65-85.
- Hunt, D. J., & Handoo, Z. A. (2009). Taxonomy, identification and principal species. *Root-knot nematodes*, 1, 55-88.
- Hussey, R. S., & Barker, K. R. (1973). Comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne spp.*, including a new technique. *Plant disease reporter*.
- Kerry, B. R., Crump, D. H., & Mullen, L. A. (1982). Studies of the cereal cyst-nematode, *Heterodera avenae* under continuous cereals, 1975–1978. II. Fungal parasitism of nematode females and eggs. *Annals of Applied Biology*, 100(3), 489-499.
- Linderman, R. G., Moore, L. W., Baker, K. F., & Cooksey, D. A. (1983). Strategies for Detecting and Characterizing Systems fo. *Plant Disease*, 67(10), 1059.
- López Gómez, M. F. (2015). *Meloidogyne* species in cucurbit crops: characterization and quantification of the host-parasite relationship.
- López-Gómez, M., Gine, A., Vela, M. D., Ornat, C., Sorribas, F. J., Talavera, M., & Verdejo-Lucas, S. (2014). Damage functions and thermal requirements of *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne incognita* on watermelon. *Annals of Applied Biology*, 165(3), 466-473.
- Lopez-Llorca, L. V., & Duncan, J. M. (1986). New media for the estimation of fungal infection in eggs of the cereal cyst nematode, *Heterodera avenae* Woll. *Nematologica*, 32(4), 486-489.
- Lopez-Llorca, L. V., Bordallo, J. J., Salinas, J., Monfort, E., & López-Serna, M. L. (2002). Use of light and scanning electron microscopy to examine colonisation of barley rhizosphere by the nematophagous fungus *Verticillium chlamyosporium*. *Micron*, 33(1), 61-67.
- Maleita, C., Curtis, R., & Abrantes, I. (2012). Thermal requirements for the embryonic development and life cycle of *Meloidogyne hispanica*. *Plant Pathology*, 61(5), 1002-1010.
- McSorley, R., & Frederick, J. J. (2002). Effect of subsurface clay on nematode communities in a sandy soil. *Applied Soil Ecology*, 19(1), 1-11.
- McSorley, R., Wang, K. H., & Church, G. (2008). Suppression of root-knot nematodes in natural and agricultural soils. *applied soil ecology*, 39(3), 291-298.

- Moens, T., Yeates, G. W., Ferris, H., & Putten, W. (2009). 1. The role of nematodes in ecosystems. *Nematodes as environmental indicators*, 1-44.
- Moosavi, M. R., Zare, R., Zamanizadeh, H. R., & Fatemy, S. (2010). Pathogenicity of *Pochonia* species on eggs of *Meloidogyne javanica*. *Journal of invertebrate pathology*, 104(2), 125-133.
- Nicholls, C. I., & Altieri, M. (2006). Manejo de la fertilidad de suelos e insectos plaga: armonizando la salud del suelo y la salud de las plantas en los agroecosistemas. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)*, 77(8), 8-16.
- Nicholls, C. I., & Altieri, M. A. (2008). Suelos saludables, plantas saludables: la evidencia agroecológica. *Leisa Revista de Agroecología*, 24(2), 6-8.
- Olivares-Bernabeu, C. M., & López-Llorca, L. V. (2002). Fungal egg-parasites of plant-parasitic nematodes from Spanish soils. *Revista Iberoamericana de Micología*, 19(2), 104-110.
- Ornat, C., Verdejo-Lucas, S., & Sorribas, F. J. (1997). Effect of the previous crop on population densities of *Meloidogyne javanica* and yield of cucumber. *Nematropica*.
- Pyrowolakis, A., Westphal, A., Sikora, R. A., & Becker, J. O. (2002). Identification of root-knot nematode suppressive soils. *Applied Soil Ecology*, 19(1), 51-56.
- Ramirez, C. (1996). Efecto de las prácticas agrícolas sobre la microflora del suelo: Oportunidades en la fitoprotección. In *X Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales* (pp. 8-12).
- Rodriguez-Kabana, R., Morgan-Jones, G., & Chet, I. (1987). Biological control of nematodes: Soil amendments and microbial antagonists. *Plant and soil*, 100(1-3), 237-247.
- Schippers, B. (1992). Prospects for management of natural suppressiveness to control soilborne pathogens. In *Biological Control of Plant Diseases* (pp. 21-34). Springer US.
- Schneider, R. W. (1982). Suppressiveness soils and plant disease. *American Phytopathological Society*.
- Sikora, R. A. (1992). Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for the biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, 30(1), 245-270.
- Sikora, R. A., Luc, M., & Bridge, J. (Eds.). (2005). *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Cabi.



- 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.
- Stirling, G. R. (2011). Suppressive biological factors influence populations of root lesion nematode (*Pratylenchus thornei*) on wheat in vertosols from the northern grain-growing region of Australia. *Australasian Plant Pathology*, 40(4), 416-429.
- Stirling, G. R., Wilson, E. J., Stirling, A. M., Pankhurs, C. E., Moody, P. W., Bell, M. J., & Halpin, N. (2005). Amendments of sugarcane trash induce suppressiveness to plant-parasitic nematodes in a sugarcane soil. *Australasian Plant Pathology*, 34(2), 203-211.
- Stirling, G.R. (1991.) Biological control of plant-parasitic nematodes. *Wallingford, UK, CAB International*. 282 pp.
- Vela, M. D., Giné, A., López-Gómez, M., Sorribas, F. J., Ornat, C., Verdejo-Lucas, S., & Talavera, M. (2014). Thermal time requirements of root-knot nematodes on zucchini-squash and population dynamics with associated yield losses on spring and autumn cropping cycles. *European journal of plant pathology*, 140(3), 481-490.
- Verdejo Lucas, S., Español Pons, M., Ornat Longarón, C., & Sorribas Royo, F. J. (1997). Occurrence of *Pasteuria* spp. in the northeastern Spain. *Nematologia mediterranea*, 25, 109-112.
- Verdejo Lucas, S., Sorribas, J., & Puigdomènech, P. (1994). Perdidas de produccion en lechuga y tomate causadas por *Meloidogyne javanica* en invernadero. *Instituto Nacional de Investigacion y Tecnologia Agraria y Alimentaria, Madrid (España)*.
- Verdejo-Lucas, S., Blanco, M., Talavera, M., Stchigel, A. M., & Sorribas, F. J. (2013). Fungi recovered from root-knot nematodes infecting vegetables under protected cultivation. *Biocontrol Science and Technology*, 23(3), 277-287.
- 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, Spain. *Journal of Nematology*, 34(4), 405.
- Westphal, A., & Becker, J. O. (2001). Components of soil suppressiveness against *Heterodera schachtii*. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(1), 9-16.
- Zeck, W. M. (1971). Rating scheme for field evaluation of root-knot nematode infestations. *Pflanzenschutz nachrichten*.

