

# Muestreo, cuantificación y caracterización patogénica de hongos y nematodos fitopatógenos en el suelo: implicaciones para el control de enfermedades

Rafael M. Jiménez Díaz, Pablo Castillo Castillo y Juan A. Navas Cortés (Instituto de Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Córdoba).

Rafael M. Jiménez Díaz (Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes, Universidad de Córdoba, Córdoba)

## INTRODUCCIÓN

Un número importante de hongos y nematodos fitopatógenos pueden sobrevivir prolongadamente en el suelo, bien mediante estructuras especializadas (p.ej., clamidosporas, microesclerocios, quistes, rizomorfos, etc.) que permanecen libres y quiescentes en el ambiente edáfico hasta que son estimuladas por las actividades de un potencial huésped, o merced a su capacidad de crecimiento saprofito en ausencia de éste (p.ej., hongos necrotrofos facultativos). Dichos agentes infectan tejidos subterráneos de la planta susceptible (p.ej., raíces, hipocotilo, cotiledones seminales) y causan enfermedades de gran significación para la producción agrícola por la magnitud de las pérdidas que ocasionan y la dificultad para combatirlos eficientemente, como son las Agallas radicales (*Meloidogyne* spp.), Lesiones necróticas y Podredumbres del sistema radical (p.ej., *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., *Pratylenchus* spp.), Marchiteces vasculares (p.ej., *Fusarium oxysporum* ff. sp., *Verticillium* spp.), Muerte de plántulas (p.ej., *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*) y Quistes radicales (*Globodera* spp., *Heterodera* spp.).

La complejidad del ecosistema edáfico, y en particular de las enfermedades que afectan al sistema radical de la planta, dificultan el control eficiente de éstas y delimitan que las acciones y medidas más adecuadas para ello deban ser de naturaleza preventiva y requieran su aplicación en una estrategia de control integrado; y, en ambos casos, obedezcan a toma de decisiones basadas en el conocimiento e información disponibles acerca de las características del patosistema en cuestión.

Uno de los elementos básicos de dicho conocimiento e información concierne a la relación entre la cantidad de enfermedad que se desarrolla y el potencial del inóculo en el suelo (*sensu* Garret). En esta Ponencia se analizan las relaciones entre la densidad y virulencia del inóculo (dos de los componentes del concepto anterior) y la cantidad de enfermedad, utilizando como modelo los patosistemas *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*/garbanzo y *Verticillium dahliae*/algodón, así como casos seleccionados de nematodos fitopatógenos.

## Distribución y muestreo de propágulos de hongos y nematodos en el suelo

Cuantificar el inóculo de patógenos residente en el suelo requiere un plan adecuado para el muestreo de éste, así como procedimientos para la separación, aislamiento, identificación y valoración de la viabilidad de los propágulos capaces de completar la infección de los tejidos vegetales. El plan de muestreo del suelo previo a su análisis debe considerar la distribución espacial de los propágulos y llevarse a cabo en relación con el estado del cultivo en que aquéllos pueden actuar como inóculo primario, de manera que la información proporcionada por el análisis pueda ser interpretada epidemiológicamente. La importancia de tales aspectos ha sido reconocida en la investigación epidemiológica reciente a fin de mejorar el muestreo y cuantificación de hongos y nematodos fitopatógenos en el suelo (2, 7).

De los tres patrones de distribución espacial de propágulos posibles en el suelo (agregada, aleatoria o uniforme), los hongos y nematodos fitopatógenos suelen

presentar, en general, una distribución agregada en el perfil de suelo que explora el desarrollo radical de los cultivos. Esta distribución puede resultar de la introducción del patógeno en suelos libres de él con el material de plantación (semillas, plántulas y plantones infectados; o substratos infestados) y el cultivo subsiguiente y repetido de plantas susceptibles; ejemplos relevantes de dicho proceso son la introducción de *Ditylenchus dipsaci* en semilla de ajo, alfalfa y cebolla (9) y de quistes de *Globodera* spp. en la patata de siembra (33), o la utilización de semillas de garbanzo infectadas por *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* y plantones de olivo infectados por *V. dahliae*. La distribución espacial de los propágulos se ha estudiado principalmente mediante análisis de índices de dispersión o de la distribución de frecuencias del número de aquéllos por unidad de suelo (p.ej., 24); pero recientemente se comienzan a realizar análisis de autocorrelación espacial y emplear métodos geoestadísticos, a fin de corregir las deficiencias de los primeramente referidos al desestimar la posición relativa de las zonas muestreadas en el suelo. Utilizando estos últimos procedimientos, Bejarano Alcázar y Jiménez Díaz (5) concluyeron que *V. dahliae* presentaba una distribución agregada en el suelo de parcelas de algodón

en Andalucía y que el nivel de agregación variaba entre ellas, de manera que la agregación tenía un patrón aleatorio e isotrópico en unas parcelas pero agrupado y variable según la dirección de cultivo en otras.

La adecuación del plan de muestreo a la distribución de los propágulos del patógeno en el suelo no es fácil de satisfacer. Una de las opciones adoptadas con frecuencia es el muestreo sistemático (i.e., a intervalos fijos), que puede ser uno de los más convenientes para asegurar que cualquier zona del suelo es muestreada, independientemente de la magnitud de la infestación (22). No obstante, la elección de los puntos de muestreo dependerá del cultivo y objetivos del mismo, y puede hacerse completamente al azar, o según un patrón en X, de zig-zag, en líneas paralelas a una diagonal, etc. en parcelas con plantas herbáceas o sin cultivo, o alrededor del tronco de varios árboles (incluyendo zonas externas e internas del área de la copa) (21). Asimismo, la profundidad de la toma de muestras en el perfil del suelo debe tener en cuenta la naturaleza del patógeno; p.ej., la mayoría de nematodos fitopatógenos se distribuyen en el perfil 0-30 cm, pero para determinados patosistemas, como los nematodos transmisores de virus/víid, nematodos anillados/frutales, esta distribución puede alcanzar los 50-70 cm de profundidad (22).

### Cuantificación de la densidad de inóculo de hongos y nematodos en el suelo

Existen numerosos métodos para cuantificar el inóculo de patógenos que resi-

den en el suelo (6, 29), pero la decisión respecto de cual es el más adecuado en un caso determinado debe considerar el propósito original para el que fue diseñado y el objetivo particular para el que va a ser utilizado. En cualquier caso, antes de su adopción se deben valorar críticamente su *fiabilidad* (capacidad relativa para identificar el patógeno diana correctamente), *reproducibilidad* (capacidad relativa para proporcionar resultados similares en análisis repetidos de una muestra), *exactitud* (proximidad del valor obtenido respecto del real) y *eficiencia* (coste por unidad de la información obtenida).

### Nematodos

La extracción de nematodos por centrifugación (10) es considerado el método más adecuado para determinar la densidad de inóculo de nematodos fitopatógenos en el suelo, debido a su rapidez, posibilidad de cuantificación, independencia de la especie de nematodo y tipo de suelo, y robustez en relación con el operador. En muchas ocasiones, el inóculo diana consiste en huevos libres o juveniles de segunda edad, que hace prácticamente imposible la identificación específica del organismo. En estos casos, dicho diagnóstico específico requiere que con posterioridad se realicen estudios microbiológicos (i.e., morfología y morfometría de estados adultos, ensayos de patogenicidad sobre huéspedes diferenciales), que eventualmente conducirán a la identificación específica e incluso permitirán determinar las variantes patógenas del nematodo (p.ej., razas patógenas de *D. dipsaci* y *Meloidogyne* spp., patotipos de *Globodera* spp.). Además, el diagnóstico morfológico debe ser complementado en ocasiones por análisis

FUNGICIDA  
**POWMYL®**

FUNGICIDA ESPECÍFICO PARA EL CONTROL DE BOTRITIS RESISTENTE

Novedad

Rompe las Resistencias

 **KENOGARD**  
CULTIVAMOS LA INVESTIGACIÓN

## Evolución del riesgo de plagas y enfermedades

de naturaleza bioquímica (análisis de isoenzimas) o molecular (secuenciación de regiones ITS) (8) para asegurar la identidad particular del agente.

### Hongos

La cuantificación de las poblaciones de hongos fitopatógenos en el suelo se ha basado fundamentalmente en el aislamiento de éstos mediante diluciones de la muestra de suelo dispersadas sobre medios semiselectivos en placas petri, y la identificación de las colonias que se desarrollan tras su incubación a temperaturas óptimas para la especie diana. Obviamente, la utilidad de tales procedimientos exige asociación inequívoca entre las características morfológicas de valor taxonómico en las colonias y las de patogenicidad del hongo; por lo cual no son válidos para las formas especiales de *Fusarium oxysporum* -que comparten morfología con los aislados no patogénicos de la especie que prevalecen en el suelo-, con la excepción de casos como la raza 4 de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* cuyas colonias laciniadas en el medio de Komada modificado son claramente diagnósticas (31).

En el caso de *V. dahliae*, los métodos al uso para dicha cuantificación pueden servir de ejemplo de los que han tenido más éxito y amplia adopción para tal fin, e incluyen el *tamizado en seco* o de Andersen -por el que una muestra de suelo desecado a temperatura ambiente y molido para constituir un polvo fino es distribuida a presión sobre el medio de Sorensen que contiene poligalacturonato sódico (PGS) (método Andersen)- y el método del *tamizado húmedo*, en el que la referida muestra de suelo molido se suspende en agua, se tamiza entre tamaños de malla que retienen partículas entre 35 y 150 micras y las partículas retenidas y suspendidas en agua se distribuyen sobre el medio anterior. La incubación de los cultivos a 23-25°C durante no menos de 2 semanas permite identificar las colonias de *V. dahliae* que se desarrollan y referir el número de ellas al de microesclerocios en la muestra de suelo analizada. La amplia adopción de dichos métodos no les exime de dificultades que pueden cuestionar su uso sin las oportunas precauciones; por ejemplo, Termorshuizen (32) encontró amplia variabilidad en los resultados de diferentes laboratorios del análisis de muestras comunes de suelo de variada naturaleza por el método Andersen. Dicha variabilidad puede ser asociada, en parte, a inexactitud en la identificación de las colonias de *V. dahliae*, que pueden ser confundidas con las de otras especies próximas (p.ej., *V. tricorpus*) si el observado no posee el entrenamiento adecuado. Una dificultad adicional puede derivarse de la disponibilidad y calidad de los componentes del medio semiselectivo necesario para los dos métodos de análisis anteriores. Zabir *et al.* (36) han resaltado la pérdida de eficacia que origina el uso en el medio de Sorensen del formulado P-3889 de PGS, con el que el proveedor ha reemplazado recientemente el formulado P-1897 que existía anteriormente en el mercado; afortunadamente, la adición de NaOH 0,025N corrige satisfactoriamente el problema.

Además de las restricciones indicadas antes para el caso de *F. oxysporum* ff.sp., la cuantificación del inóculo de hongos fitopatógenos en el suelo basada en las tecnologías microbiológicas referidas es costosa en tiempo y recursos, y en la mayoría de los casos no permiten diferenciar a los variantes patogénicos de aquéllos. Una de las expectativas respecto de la aplicación de la biotecnología microbiana para la puesta en práctica de estrategias de control integrado de enfermedades, concierne la utilización de marcadores moleculares (sondas de ADN, amplicones producidos en análisis PCR, etc.) específicos de los variantes patogénicos para la detección y cuantificación de los mismos en el suelo, y con ello su utilización con fines diagnósticos y predictivos. Las investigaciones de nuestro Grupo (AGR-136 Sanidad Vegetal) para la caracterización molecular y genética de las poblaciones de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* y *V. dahliae*, han desarrollado tecnologías basadas en la PCR para el diagnóstico es-

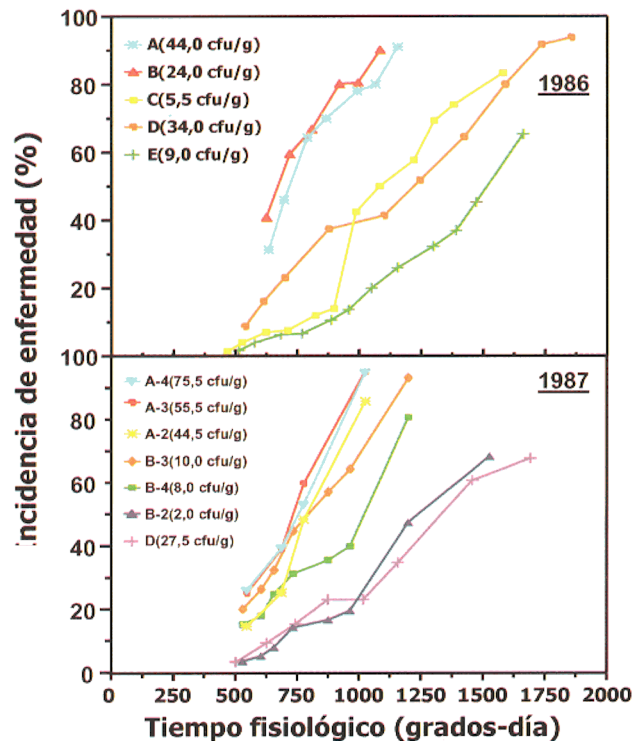


Figura 1. Curvas de incremento de Verticilosis en algodón cv. Coker 310 en las Marismas del Guadalquivir, según la densidad de inóculo de microesclerocios de los patotipos defoliante (A-C, 1986; A-2 a B-4, 1987) y no defoliante (D-E, 1986; D, 1987) de *Verticillium dahliae* en el suelo.

pecífico de la forma especial y sus razas patogénicas en el primer caso, y de los patotipos defoliante y no-defoliante de *V. dahliae*, con las que es posible la identificación inequívoca -pero no su cuantificación- de las variantes del patógeno correspondiente a partir de ADN extraído de su micelio (19, 25) y del suelo infestado (14, 26). Dichas tecnologías son de utilidad para caracterizar patogénicamente las colonias que se desarrollen en los análisis basados en la dilución de suelo en placas petri, en tanto que en las investigaciones en curso desarrollamos modificaciones en los procedimientos de análisis que aseguren la cuantificación del ADN de los variantes patogénicos extraído del suelo y determinemos su relación con el inóculo de ellos en el suelo.

### Relación entre densidad de inóculo y cantidad de enfermedad

La relación que pueda existir entre la densidad de inóculo (DI) del patógeno determinada en los análisis de suelo y la cantidad de enfermedad (CE) esperada -y eventualmente la magnitud del perjuicio que ésta puede causar en el cultivo- ha sido objeto de investigación para desarrollar modelos funcionales entre ellas y generado intensas controversias entre los fitopatólogos estudiosos de la epidemiología de enfermedades del sistema radical (p.ej., 1), porque en definitiva es la que determina la posibilidad de tomar decisiones con vistas a las estrategias de control integrado de aquéllas. La complejidad del tema dificulta la traslación inmediata al ambiente natural de las relaciones CE-DI desarrolladas en experimentos en ambiente controlado -i.e., en los que se mantienen constantes y estandarizados los parámetros ambiente y planta susceptible-, por la heterogeneidad que pueden presentar los factores que influyen sobre ellas -genotipo vegetal, condiciones ambientales, variante patogénico prevalente en el suelo-

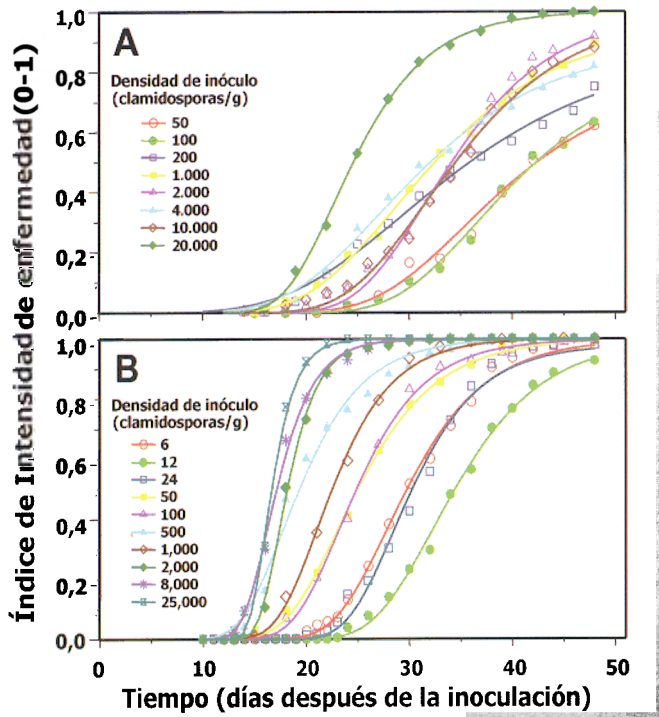


Figura 2. Curva de incremento en el tiempo de un índice de intensidad de Fusariosis Vascular en el cv. P2245 de garbanzo desarrollado en suelo infestado con diferentes densidades de inóculo de las razas 0 (A) y 5 (B) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Cada punto es media de los valores calculados con datos de cuatro bloques al azar de 12 plantas cada uno. La línea continua representa la curva de incremento de enfermedad calculada por regresión no lineal de los datos experimentales al modelo de Gompertz.

en los diferentes lugares de aplicación. Por ejemplo, 10 microesclerocios (ms) de *V. dahliae*/g de suelo son suficientes para una incidencia de 50% de Verticilosis en coliflor (35), mientras que en tomate esta incidencia se alcanza con 0,5 ms/g y 6 ms/g de suelo causan 100% de enfermedad (15) y en fresa esta misma incidencia se produce con 2 ms/g de suelo (16).

**Nematodos**

En nematodos fitopatógenos, la relación CE-DI (nº de huevos y/o juveniles de segunda edad/cm<sup>3</sup> de suelo) más ampliamente aceptada entre las varias que se han descrito, y que mejor expresa el resultado de su interacción con plantas cultivadas, es la denominada curva de Seinhorst:  $y = m + (1-m)z^{P-T}$ , donde  $y$  = crecimiento o productividad relativa de la planta,  $m$  = crecimiento o productividad mínimos con elevadas densidades de inóculo;  $Z$  = una constante < 1 con  $Z^T = 1,05$ ,  $T$  = umbral de tolerancia (máxima densidad de inóculo que no origina pérdida de crecimiento o productividad); y  $P$  = densidad de inóculo inicial en el suelo (13, 28). No obstante, tanto la diversidad en la gama de plantas huésped del nematodo, como la diversidad patogénica que caracteriza a varias de las especies de mayor relevancia fitopatológica (p.ej., 30 razas en *D. dipsaci*, 4 en *Meloidogyne incognita*, 2 en *M. arenaria*, 16 en *Heterodera glycines*, 5 patotipos en *Globodera rostochiensis*, y 5 biotipos en *Tylenchulus semipenetrans*) (17, 18, 27, 28), pueden influir sobre dicha relación. Así, por ejemplo, el valor del umbral  $T$  varía entre especies de nematodos y los variantes patogénicos de éstas. Ejemplo de ello son los valores  $T$  de *Meloidogyne incognita* en tomate,  $T = 3,3$  (12) y berenjena,  $T = 0,054$  (11); y los que caracterizan las infecciones de café por *M. incognita* ( $T = 2,09$ ) y *M. javanica* ( $T = 1,34$ ) (34).

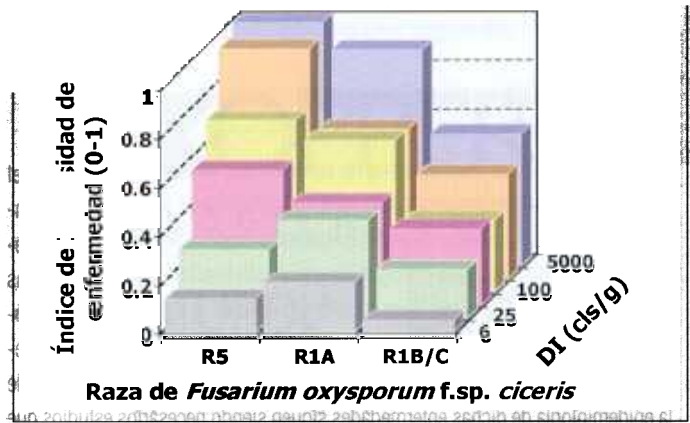


Figura 3. Histograma del índice de intensidad final de Fusariosis Vascular en el cv. PV 61 de garbanzo desarrollado en suelo infestado con diferentes densidades de inóculo (DI) de las razas 1A, 1B/C y 5 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Cada barra es media de los valores calculados con datos de cuatro bloques al azar de 12 plantas cada uno 48 días después de la inoculación.

**Hongos**

La influencia de las diferencias en virulencia asociadas a los variantes patogénicos, sobre las relaciones CE-DI en hongos fitopatógenos, son claramente ilustradas en los patosistemas *V. dahliae*/algodón y *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*/garbanzo. Bejarano Alcázar et al. (3) estudiaron el desarrollo de Verticilosis en parcelas de algodón 'Coker 310' en las Marismas del Guadalquivir infestadas de forma natural con diferentes densidades de inóculo de los patotipos defoliante (D) o no defoliante (ND) de *V. dahliae*, y concluyeron que el progreso de la cantidad de enfermedad en el tiempo es adecuadamente descrito por modelos de regresión lineal simple, independientemente de la densidad de inóculo y patotipo de *V. dahliae* presentes en el suelo (Figura 1). Sin embargo, en parcelas con similar densidad de inóculo de uno y otro patotipo, el desarrollo de la Verticilosis comenzó antes y progresó con una tasa 1,6 a 1,7 veces mayor en suelo infestado con el patotipo D que en parcelas infestadas con el patotipo ND; o en otros términos, densidades de inóculo de 2 a 8 ms/g suelo seco del patotipo D determinaron tasas de progreso e incidencias final de enfermedad (68-99%) similares a las originadas por 27,5 a 34 ms/g suelo seco del patotipo ND. Tales diferencias en los parámetros que describen el desarrollo epidémico de la Verticilosis repercuten significativamente sobre los componentes del rendimiento del cultivo, ya que tanto el nº total de cápsulas desarrolladas, como el de cápsulas abiertas y el rendimiento en fibra, están positiva y negativamente correlacionados, respectivamente, con el tiempo desde la siembra hasta que se inicia la epidemia y la tasa de progreso de ella (4). Similarmente, además de la patogenicidad cultivar-específica que las caracterizan las razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* también difieren en virulencia sobre cultivos susceptibles de garbanzo, lo cual incide claramente en las relaciones CE-DI en la Fusariosis Vascular. Así, a temperatura óptima para el desarrollo de la enfermedad, 25°C, bastaron 6-50 clamsporas (cls)/g de suelo de la raza 5 (patotipo de Marchitez) para causar una reacción severa en el cv. P 2245, pero fueron necesarias 20.000 cls/g de suelo de la raza 0 (patotipo de Amarillez) para causar igual cantidad de enfermedad en el mismo cultivar (23) (Figura 2). Asimismo, cuando la virulencia de la raza 1B/C (patotipo de Amarillez) se comparó con la de las razas 1A y 5 (patotipo de Marchitez) en el cv. PV 61 (resistente a la raza 0), la máxima cantidad de enfermedad se alcanzó con 1.000 cls/g de suelo de la raza 5 y 5.000 cls/g de suelo de la raza 1A, pero una densidad de inóculo de 5.000

cls/g de suelo de la raza 1B/C originó una cantidad de enfermedad equivalente a la producida por 1.000 cls/g de suelo de la raza 1A (20) (Figura 3).

### Necesidades y conclusiones

La puesta en práctica de programas de control integrado de enfermedades del sistema radical de las plantas, como medio para satisfacer la creciente demanda de una agricultura eficiente y ambientalmente respetuosa, constituye un reto importante para los fitopatólogos ya que el establecimiento de estrategias de control adecuadas depende de su conocimiento de la ecología de los patógenos y la epidemiología de las enfermedades que causan. A pesar del progreso que se ha alcanzado durante los últimos años, para la mejor comprensión de la epidemiología de dichas enfermedades siguen siendo necesarios estudios que mejoren nuestra capacidad de cuantificar el inóculo de los patógenos en el suelo y la relación que guarda su densidad con la cantidad de enfermedad, a fin de poder llevar a cabo acciones predictivas en la toma de decisión sobre estrategias de control integrado. Tales estudios deben tener necesariamente un com-

ponente importante de investigación en campo, que proporcione los datos empíricos y de calidad imprescindibles para validar los modelos CE-DI teóricos. Sin embargo, la magnitud del esfuerzo que ello requiere en relación con la productividad científica esperada, y los procedimientos que prevalecen actualmente en las formas de financiación de la investigación y de promoción de los investigadores, hace dudoso que este campo de la investigación fitopatológica atraiga suficientemente a investigadores jóvenes comprometidos con el progreso científico de la disciplina.

La disponibilidad de herramientas moleculares para el análisis y tipificación de los agentes fitopatógenos y sus variantes en el suelo ofrece nuevas oportunidades para el estudio de las relaciones CE-DI, que se verán cumplidas cuando puedan ser aplicadas en términos cuantitativos. No obstante, estas mejoras tecnológicas no reducirán las exigencias para la obtención de muestras representativas y fiables de suelos de cultivo que tengan en cuenta las complejidades que ocurren en el ecosistema edáfico, ni las cautelas para que el desarrollo de la enfermedad sea valorado en el contexto fitopatológico.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1 BAKER, R., y DRURY, R. 1981. *Phytopathology* 71: 363-371.
- 2 BARKER, K.R., SCHMITT, D.P., y NOE, J.P. 1985. *Agr. Ecosyst. & Env.* 12: 355-359.
- 3 BEJARANO-ALCÁZAR, J., MELERO-VARA, J.M., BLANCO-LÓPEZ, M.A., y JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M. 1995. *Phytopathology* 85: 1474-1481.
- 4 BEJARANO-ALCÁZAR, J., BLANCO-LÓPEZ, M.A., MELERO-VARA, J.M., y JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M. 1997. *Plant Pathol.* 46: 168-178.
- 5 BEJARANO-ALCÁZAR, J., y JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M. 2000. Pgs. 340-342 en: E.C. TJAMOS, R.C. ROWE, J.B. HEALE, y D.R. FRAVEL (eds.). *Advances in Verticillium Research: Research and Disease Management*. APS Press, St. Paul, MN.
- 6 BENSON, D.M. 1994. Pgs. 1-33 en: C.L. Campbell y D.M. Benson (eds.). *Epidemiology and Management of Root Diseases*. Springer-Verlag, Berlin.
- 7 CAMPBELL, C.L., y NOE, J.P. 1985. *Annu. Rev. Phytopathol.* 23: 129-148.
- 8 CASTILLO, P., VOVLAS, N., SUBBOTIN, S., y TROCCHI, A. 2003. *Phytopathology* 93:1093-1102.
- 9 CAUBEL, G. 1983. *Seed Sci. Technol.* 11:989-996.
- 10 COOLEN, W.A. 1979. Pgs. 317-330 en: F. LAMBERTI y C.E. TAYLOR (eds.). *Root-Knot Nematodes (Meloidogyne species)*. Academic Press, N.Y.
- 11 DI VITO, M., GRECO, N., y CARELLA, A. 1986. *J. Nematol.* 18: 487-490.
- 12 DI VITO, M., y EKANAYAKE, H.M.R.K. 1983. *Nematol. medit.* 11: 151-155.
- 13 DI VITO, M., VOVLAS, N., y CASTILLO, P. 2004. *Plant Pathol.* 53: 508-514.
- 14 GARCÍA-PEDRAJAS, M.D., BAINBRIDGE, B.W., HEALE, J.B., PÉREZ-ARTÉS, E., y JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M. 1999. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 251-259.
- 15 GROGAN, R.G., IOANNU, N., SCHNEIDER, R.W., SALL, M.A., y KIMBLE, K.A. 1979. *Phytopathology* 69: 1176-1180.
- 16 HARRIS, D.C., y YANG, J.R. 1996. *Plant Pathol.* 45: 106-114.
- 17 HARTMAN, K.M., y SASSER, J.N. 1985. Pgs. 69-77 en: K.R. BARKER, C.C. CARTER, y J.N. SASSER (eds.). *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. Vol. 2. *Methodology*. North Carolina State University Graphics, Raleigh.
- 18 INSERRA, R.N., VOVLAS, N., y O'BANNON, J.H. 1980. *J. Nematol.* 12: 283-287.
- 19 JIMÉNEZ-GASCO, M.M., y JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M. 2003. *Phytopathology* 93: 302-307.
- 20 JIMÉNEZ-GASCO, M.M., NAVAS-CORTÉS, J.A., y JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M. 2004. *Internat. Microbiol.* 7: 95-104.
- 21 McSORLEY, R. 1987. Pgs. 13-48 en: R.H. BROWN y B.R. KERRY (eds.). *Principles and Practice of Nematode Control in Crops*. Academic Press, Orlando, FLA.
- 22 McSORLEY, R. 1998. Pgs. 109-133 en: G.A. PEDERSON, K.R. BARKER, y G.L. WINDHAM (eds.). *Plant Nematode Interactions*. American Society of Agronomy, Madison, WI.
- 23 NAVAS-CORTÉS, J.A., ALCALA-JIMÉNEZ, A.R., HAU, B., y JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M. 2000. *Eur. J. Plant Pathol.* 106:135-146.
- 24 NICOT, P.C., ROUSE, D.I., y YANDELL, B.S. 1985. *Phytopathology* 75: 1399-1402.
- 25 PÉREZ-ARTÉS, E., GARCÍA-PEDRAJAS, M.M., BEJARANO-ALCÁZAR, J., y JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M. 2000. *Eur. J. Plant Pathol.* 106: 507-517.
- 26 PÉREZ-ARTÉS, E., MERCADO-BLANCO, J., RUZ-CARRILLO, A.R., RODRÍGUEZ-JURADO, D., y JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M. 2004. *Plant and Soil* (en prensa).
- 27 ROBERTS, P.A., MATTHEWS, W.C., y VEREMIS, J.C. 1998. Pgs.209-238 en: G.A. Pederson, K.R. Barker, y G.L. Windham (eds.). *Plant Nematode Interactions*. American Society of Agronomy, Madison, WI.
- 28 SEINHORST, J.W. 1998. *Fundam. appl. Nematol.* 21: 459-468.
- 29 SINGLETON, L.L., J.D. MIHAIL, y C.M. RUSH. 1992. *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. APS Press, St. Paul, MN.
- 30 STURHAN, D., y BRZESKI, M.W. 1991. Pgs. 423-464 en: W.R. NICKLE (ed.). *Manual of Agricultural Nematology*. Marcel Dekker, N.Y.
- 31 SUN, E.J., SU, H.J., y KO, W.H. 1978. *Phytopathology* 68: 1672-1673.
- 32 TERMORSHUIZEN, A. 2000. Pgs. 122-124 en: E.C. TJAMOS, R.C. ROWE, J.B. HEALE, y D.R. FRAVEL (eds.). *Avances in Verticillium: Research and Disease Management*. APS Press, St. Paul, MN.
- 33 VOVLAS, N. 1996. *Eur. J. Plant Pathol.* 102:743-746.
- 34 VOVLAS, N., y DI VITO, M. 1991. *Nematol. Medit.* 19: 253-258.
- 35 XIAO, C.L., y SUBBARAO, K.V. 1998. *Phytopathology* 88: 1106-1115.
- 36 ZABIR, Z. BHAT, R.G., y SUBBARAO, K.V. 2004. *Plant Dis* 88:49-55.