

Valor de los Subproductos Vitivinícolas en la Mejora y Biodesinfección de Suelos



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE MEDIO AMBIENTE
Y MEDIO RURAL Y MARINO

Valor de los Subproductos Vitivinícolas en la Mejora y Biodesinfección de Suelos

**María Rosa González López
Miguel Ángel Díez Rojo
Concepción Iglesias González
José Antonio López Pérez
Antonio Bello Pérez**

Centro Agrario de Marchamalo (Guadalajara),
Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha

Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola,
Universidad Politécnica de Madrid



2011

“La agricultura ... necesita personas prácticas y pacientes, que sepan estercolar, arar, sembrar, coger, limpiar las mieses, conservar y beneficiar los frutos, cosas ... que no pueden ser enseñadas con el espíritu científico. “

Gaspar Melchor de Jovellanos, 1787

Portada: Balsa de acumulación de vinazas de la industria vitivinícola procedentes de la obtención de alcohol, es importante la presencia de vegetación en los bordes.

Versión: Julio 2011

El trabajo se ha realizado dentro del proyecto: *“Fitorremediación de suelos cultivados mediante la aplicación de productos obtenidos de melazas de remolacha”*, que coordina el Prof. D. Pedro Urbano Terrón, en colaboración con el proyecto de la CYCIT: *“Implicaciones medioambientales de los procesos inducidos por la biofumigación y su relación con la diversidad estructural y funcional de suelos”* (Ref. CTM2006-07309) y el proyecto del Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino: **“Prevención de la contaminación en suelos mediante el uso de biopesticidas y mejoradores orgánicos obtenidos a partir de subproductos agroindustriales y ganaderos”** (Ref. 027/2006/2-1.2) que coordina el Prof. D. Antonio Bello Pérez, perteneciente al Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC.

Secretaría General Técnica

Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino

NIPO: 770-11-226-4

PRESENTACION

ÍNDICE

Presentación	
ÍNDICE	7
I. INTRODUCCIÓN	9
II. ANTECEDENTES	15
II.1. Subproductos agrarios y mejora de suelos cultivados	15
II.2. Características de los nematodos fitopatógenos	21
II.3. Epidemiología de los nematodos vectores de virus de la vid en España	44
II.4. Manejo agronómico de nematodos en viñedo	56
II.5. Biodesinfección en viñedos	60
II.6. Nematodos formadores de nódulos del género <i>Meloidogyne</i> y manejo agronómico	62
II.6.1. Posición sistemática y morfología	62
II.6.2. Biología	64
II.6.3. Especies del género <i>Meloidogyne</i>	66
II.6.4. Descripción de las especies de interés	67
II.6.5. Relación <i>Meloidogyne</i> -hospedero	78
II.6.6. Efecto de la temperatura sobre <i>M. incognita</i>	80
III. OBJETIVOS	85
IV. METODOLOGÍA	87
IV.1. Agroecología de las áreas estudiadas	87
IV.2. Muestreos y técnicas de extracción	93
IV.2.1. Muestreos	94
IV.2.2. Procesos previos a la extracción	95
IV.2.3. Extracción a partir de suelo	95
IV.3. Estudio cuantitativo y cualitativo de nematodos	98
IV.4. Estudio de las características edáficas	102
IV.5. Estudio de índices de madurez	102
IV.6. Determinación de la actividad biodesinfectante	104
IV.6.1. Determinación <i>in vitro</i> de la actividad biodesinfectante	104
IV.6.2. Estudio en laboratorio de la actividad biodesinfectante en suelo	104
IV.6.3. Determinación de la actividad biodesinfectante en campo	106
IV.7. Efecto de la biodesinfección sobre la planta	106
IV.8. Caracterización de la virulencia en las poblaciones de <i>Meloidogyne</i>	108
IV.9. Métodos estadísticos	111

V. RESULTADOS	113
V.1. Determinación <i>in vitro</i> de la actividad biodesinfectante	114
V.2. Determinación de la actividad biodesinfectante en suelos en condiciones de laboratorio	116
V.3. Determinación de la actividad biodesinfectante en campo	127
V.3.1. Cultivos hortícolas (El Perelló, Valencia)	127
V.3.2. Viñedo (Socuéllamos, Ciudad Real).....	135
V.4. Determinación del índice de madurez	139
V.5. Caracterización de razas en las poblaciones de nematodos “formadores de nódulos”	141
V.6. Relación de <i>M. incognita</i> con la flora arvense.....	144
V.7. Efecto sobre la nutrición de la planta y la calidad del mosto.....	145
VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	149
VI.1. Valoración de subproductos de la industria vitivinícola en el manejo de nematodos fitoparásitos	149
VI.2. Evaluación de subproductos de la industria vitivinícola como mejoradores de suelo	159
VI.3. Manejo agronómico de subproductos agrarios y biodesinfección	167
- CONCLUSIONES	181
Resumen	185
Summary	186
Abreviaturas	187
Agradecimientos	189
BIBLIOGRAFÍA	191
ANEXOS	219

I. INTRODUCCIÓN

La vid es uno de los cultivos con mayor extensión en el mundo, pero es la cuenca mediterránea la zona que tiene mayor riqueza y tradición en el cultivo. España ocupa el primer lugar del mundo en superficie, con más de un millón de hectáreas que representan más del 7% de las tierras cultivadas, siendo además el 3^{er} cultivo en extensión en nuestro país, después de los cereales y el olivar. Según datos publicados por el MARM (2009) referentes al año 2008, la superficie en plantación regular de viñedo es de 1.109.049 ha, dedicándose 1.088.334 ha para vinificación y 18.221 ha para el consumo como uva de mesa. Sin embargo, la producción se encuentra muy por debajo de la media mundial y europea (Tabla 1), esto se puede deber, no solo a las condiciones climáticas, tipos de suelo, variedades cultivadas en cada zona, sino también, en gran parte, al estado sanitario de los viñedos y a las técnicas empleadas en el manejo agronómico del cultivo.

Tabla 1. Superficie y producción mundial de la vid, año 2009.

País	Superficie (.000 ha)	País	Producción (.000.000hl)
España	1113	Italia	47,7
Francia	840	Francia	45,6
Italia	818	España	35,2
Turquía	505	EE UU	20,6
China	470	Argentina	12,1
EE UU	398	China	12,0
Irán	330	Australia	11,6
Portugal	243	Chile	9,9
Argentina	228	Sudáfrica	9,8
Rumanía	206	Alemania	9,2
Chile	200	Rusia	7,0
Australia	173	Rumanía	6,7

OIV.2010.Organización de la Viña y el Vino.

Entre los factores que actualmente determinan los bajos rendimientos de la vid se encuentran las enfermedades producidas por nematodos y virus, que son el objetivo fundamental de nuestro trabajo, llevando a cabo el estudio de su epidemiología y la búsqueda de alternativas de manejo. Es difícil estimar el porcentaje de pérdidas ocasionadas por estos patógenos, pero está demostrada su importancia en la producción de la vid, y en la calidad de esta,

tanto en uva de mesa como de transformación, así como en la duración de la vida productiva de las plantaciones.

Analizando la información del Grupo de Trabajo de Sanidad Vegetal del Viñedo (1987, 1988, 1999, 2001), perteneciente al MAPA, a lo largo de los últimos 25 años, se encuentra que entre las plagas y enfermedades que afectan al viñedo, ya en el año 1987 consideraban, que las más generalizadas eran sobre todo: **“las virosis problema grave sobre las cuales los viticultores tenían un gran desconocimiento, tanto de los agentes causantes de estas enfermedades como de las medidas de control que se deben aplicar para prevenir y reducir los efectos que causan en el viñedo”**. Se puede afirmar que esta situación se mantiene en los momentos actuales, siendo un problema grave en general en otras regiones vitivinícolas (Branas 1948, Dias y Harrison 1963, Martelli *et al.* 1965, 1977, Martelli y Quacquarelli 1972, Ramsdell y Myers 1979, Boulila *et al.* 1990, Bovey y Martelli 1992, Ouertani *et al.* 1992, Martelli 1993).

Entre las plagas y enfermedades de la vid, tiene una gran repercusión económica la virosis del “entrenudo corto infeccioso de la vid” (GFLV) y su nematodo vector *X. index* que se ha encontrado en la mayor parte de las zonas pertenecientes a Denominaciones de Origen (DO) de las diferentes Comunidades Autónomas. Ambos patógenos están ampliamente distribuidos en el Archipiélago Canario, apareciendo el virus principalmente en las nuevas plantaciones, en Castilla-La Mancha el GFLV se encuentran con una frecuencia del 30%, lo que provoca un interés por conocer la epidemiología del virus y su manejo. En estas dos comunidades se ha observado que los focos de GFLV-*X. index* se mantienen en rodales muy localizados, que se extienden muy lentamente bajo las técnicas agrícolas tradicionales, y que con la introducción de riego se ve favorecido el aumento de las poblaciones del nematodo y la dispersión de ambos patógenos. En Castilla y León, el GFLV está en todas las DO, aunque *X. index* no se ha encontrado en El Bierzo y Rueda. También se ha señalado la presencia de GFLV y *X. index* en Andalucía en los viñedos de Jerez, Cataluña, Galicia, Murcia, Navarra, La Rioja y Comunidad Valenciana, así como en Extremadura, donde se ha determinado que la producción de las vides afectadas por el GFLV es significativamente menor y mueren prematuramente (Arias *et al.* 1997a,b).

Los nematodos parásitos de las plantas son después de los hongos, los organismos del suelo que causan mayores pérdidas en los cultivos, tomando como referencia las pérdidas estimadas para 1970 por la **Society of Nematologist** (1971), las valoraciones de Sasser y Freckman (1987) y el valor medio de la producción vegetal final para el cuatrienio 1997-2000, según datos publicados en el Anuario de Estadística Agroalimentaria MAPA (2004a), puede señalarse que los viñedos, con un 12,5% de pérdidas causadas por nematodos, pueden representar **218,97 millones de €**.

El Reglamento (CE) 1493/1999 por el que se establece la organización común del mercado vitivinícola supone una modificación a la normativa comunitaria del Reglamento (CE) 822/87. Entre las modificaciones que se introducen están las relativas al viñedo desarrolladas en el Reglamento (CE) 1227/2000, que en España se regula por el Real Decreto (RD) 1472/2000 de 4 de agosto. En el Anexo II de dicho decreto, se establecen los costes de reestructuración y reconversión del viñedo, entre los que figuran las ayudas para desinfección de viñedos por un valor de 2.104 € ha⁻¹ (BOE 187 de 5 de agosto de 2000). Por otro lado, el Real Decreto de 21 de febrero (BOE 48 de 25 de febrero de 2003) señala en el Anexo V que los viveros deben estar libres de *Xiphinema* sp. y *Longidorus* sp., aunque debemos recordar que solo algunas especies de estos géneros son vectores de virus, por lo que se debería señalar cuál es la especie concreta que está sujeta a esta regulación.

Según los datos de Goitia (2004), el promedio del número de hectáreas de viñedo reestructuradas y reconvertidas es de **26.289 ha** durante las campañas 2001-2002 y 2002-2003 y están repartidas por Comunidades Autónomas (CCAA) del modo siguiente: Castilla-La Mancha 11.338 ha, Extremadura 3.319,5 ha, Aragón 2.131 ha, Cataluña 2.094,5 ha, C. Valenciana 1.821 ha, Castilla y León 1.480 ha, Andalucía 739 ha, Murcia 664 ha, La Rioja 643,5 ha, Navarra 641 ha, Galicia 332 ha, Madrid 320,5 ha, Canarias 222 ha, País Vasco 152 ha, Baleares 89,5 ha, Asturias 2 ha.

Para subvencionar los planes de reestructuración y reconversión del viñedo en España, se han transferido 171 millones de € del Fondo Europeo de Orientación y Garantía Agraria (FEOGA-Garantía) para la campaña 2000-2001, 189,5 millones de € para 2001-2002, 160 millones de € para 2002-2003 y 151 millones de € para la campaña 2003-2004, lo que supone una media anual para las cuatro campañas

desde que está en vigor el RD 1472/2000 de 167,8 millones de €/campaña, estas ayudas son gestionadas por las Comunidades Autónomas y conforme al Anexo II del RD, citado anteriormente, los costes subvencionables por hectárea se consideran costes máximos y, de acuerdo a la información suministrada por el sector vitivinícola, la subvención generaliza asciende a un 70% de la máxima, por lo tanto para el apartado de desinfección del terreno la subvención a considerar es de 1.500 €/ha año.

Dada la inexistencia de datos oficiales publicados sobre el número exacto de hectáreas que se han desinfectado acogiendo a la subvención, el sector estima que la mayoría de las hectáreas replantadas previamente han desinfectado el terreno, lo que implica para las 26.289 ha/año reestructuradas y reconvertidas **39,433 millones €/año para la utilización de desinfectantes químicos.**

Como alternativas de manejo están en primer lugar las medidas fitosanitarias, sobre todo el empleo de material certificado libre de virus y la limpieza de aperos, que son eficaces especialmente en el caso de los nematodos vectores de virus, como el **GFLV, así como las prácticas culturales, el barbecho o las enmiendas orgánicas** que permiten regular las poblaciones de nematodos. También se vienen utilizando plantas resistentes, agentes de control biológico y métodos físicos como la solarización o la aplicación de vapor de agua, especialmente para la desinfección de sustratos, y la termoterapia para el control de GFLV (Rüdel 1988; Bello *et al.* 2004).

En el 8º Symposium Nacional de Sanidad Vegetal se analiza por Garijo (2003) la situación del viñedo y la sanidad del cultivo ante el nuevo marco legal de la ley de Sanidad Vegetal. El primero de los objetivos definidos en la nueva Ley 43/ 2002 de 20 de noviembre de Sanidad Vegetal, se refiere: “a la necesidad de proteger los vegetales y los productos vegetales de los daños ocasionados por las plagas, en el territorio nacional y en la UE, así como de la introducción de plagas de cuarentena para los vegetales y productos vegetales u otros objetos y evitar la propagación de los ya existentes”. **Los restantes objetivos responden a las exigencias de la sociedad actual, demandando que la actividad agraria se realice dentro de los principios de una agricultura sostenible.**

La Administración ha puesto en marcha un plan, para detectar estos problemas y conocer el origen de los mismos, exigiendo que se tomen las medidas sanitarias procedentes. La Ley de Sanidad Vegetal en su Art. 5, Cap. I establece: “que los viticultores, comerciantes, importadores y profesionales que ejerzan actividades relacionadas con la defensa fitosanitaria, deberán vigilar su cultivo, facilitando la información sobre su estado fitosanitario o de síntomas de enfermedad en el viñedo” (Artolapichi 2003). Conforme al Art. 41 de la Ley de Sanidad Vegetal: “los viticultores deben llevar a cabo buenas prácticas fitosanitarias, debiendo estar capacitados para el manejo y aplicación de los productos fitosanitarios; deben interpretar correctamente las advertencias e indicaciones, para la adecuada utilización de los mismos; deben aplicar el mayor número de medidas de las contempladas en los Reglamentos de Producción Integrada; deben cumplir las disposiciones relativas a la eliminación de envases”.

La promoción de Agrupaciones de Viticultores, para luchar en común contra las plagas del viñedo, aplicando lo establecido anteriormente con el fin de reducir y optimizar el uso de los medios de defensa fitosanitaria, ha tenido una respuesta favorable desde la publicación de la OM 26 de julio 1983, por la que se crean y regulan las Agrupaciones de Tratamientos Integrados en Agricultura (ATRIAs), funcionando en el año 2002 un total de 115 ATRIAAs, cuya distribución por Comunidades Autónomas es la siguiente: 30 Murcia, 16 Castilla-La Mancha, 15 Canarias, 14 Galicia, 12 Andalucía y Valencia, 6 Aragón, 5 Castilla y León, y una en Asturias, Baleares, Cataluña, Extremadura y La Rioja respectivamente. En Producción Integrada (PI) algunas Comunidades Autónomas, han publicado Reglamentos Específicos de Producción Integrada para el Viñedo.

En relación a la posible contaminación de las aguas subterráneas por vertidos de vinazas de la industria vitivinícola, debemos tener en cuenta que la calidad natural de las aguas subterráneas, entendiendo como tal su comportamiento original, es producto de la interacción del agua de infiltración y los materiales con los que entra en contacto durante el ciclo hidrológico. Determinados factores externos, principalmente de origen antrópico, pueden provocar alteraciones en dicha composición al introducir sustancias ajenas susceptibles de modificar su naturaleza original. El embalsamiento superficial y la acumulación de residuos líquidos de diversa procedencia (balsas de evaporación o de concentración, balsas de infiltración de industrias o de estabulaciones ganaderas, etc.) depositados en excavaciones naturales o artificiales, incluso los vertederos poco o

nada controlados, pueden provocar la contaminación de las aguas subterráneas. Especial trascendencia reviste la situación en que el embalsamiento entra en contacto directo con la zona saturada (caso frecuente en graveras abandonadas), por cuanto el contaminante encuentra entonces una vía de acceso directo hasta el acuífero. **La contaminación del acuífero manchego por residuos de las alcoholeras ejemplifica claramente este tipo de procesos. El vertido al terreno de las vinazas residuales de las alcoholeras ha dado lugar a un doble fenómeno de contaminación subterránea del agua, por aporte de materia orgánica, potasio y otras sales; y de la zona no saturada, por emisión de metano por degradación anaeróbica de la carga orgánica aportada,** como se recoge en el libro blanco del agua en España (MMA 2000).

II. ANTECEDENTES

Se describen efectos de los subproductos agrarios en la mejora de suelos cultivados (II.1), características de los nematodos fitopatógenos (II.2), epidemiología de los nematodos vectores de virus de la vid en España (II.3) y manejo agronómico de nematodos en el viñedo (II.4).

II.1. Subproductos agrarios y mejora de suelos cultivados

En el trabajo se pretende poner a punto una metodología de desinfección de suelo basada en la utilización de recursos locales, que reduzca el empleo de agroquímicos, que además de suponer un gasto adicional, pueden tener gran impacto contaminante sobre el ambiente y sobre todo afectan a la biodiversidad edáfica, con lo que disminuye la capacidad de autorregulación del suelo para los organismos causantes de enfermedades en las plantas. Se planifican una serie de experimentos para el estudio de la eficacia de la biodesinfección como técnica de manejo de los nematodos del suelo. Los trabajos experimentales de campo se han realizado en viñedos de la Denominación de Origen “La Mancha” (Ciudad Real), debido a que se han detectado focos de *X. index* y representa la mayor superficie de viñedo (198.918 ha), el 35% de la Comunidad de Castilla – La Mancha, así como en suelos dedicados a cultivos hortícolas en la localidad de El Perelló (Sueca, Valencia).

Entre las publicaciones sobre biodesinfección destaca, por ser pionera en viticultura, la desinfección de suelos previa a la plantación de viñedo, mediante biodesinfección empleando una dosis de 50 t·ha⁻¹ de estiércol de cabra más gallinaza (proporción 7:3), cuando se aplica a toda la superficie. Se puede cubrir el suelo biodesinfectado con una lámina de polietileno, para retener los gases resultantes de la descomposición de la materia orgánica, que actúan como desinfectantes en el manejo de patógenos de origen edáfico, manteniendo además la humedad del suelo y pudiendo tener un efecto similar a la biosolarización, cuando esta se realiza en los meses de verano. También se ha comprobado que el estiércol de oveja es eficaz en el tratamiento de biodesinfección (Gómez Soriano *et al.* 2006).

La biodesinfección se define: “como un proceso por el cual las sustancias volátiles liberadas durante la descomposición de enmiendas orgánicas o directamente por los microorganismos del suelo o las raíces de las plantas, tienen capacidad para controlar organismos patógenos, artrópodos y plantas adventicias”. Esta técnica está resultando una alternativa eficaz a la desinfección convencional de suelos por métodos químicos, con excelentes resultados en el manejo de patógenos vegetales de origen edáfico (Bello *et al.* 1997b, 2003, García Álvarez *et al.* 2004). En la actualidad esta práctica se ha extendido a gran escala en el cultivo de pimiento y tomate en los invernaderos de nuestro litoral, resultando de gran efectividad en el control de hongos, nematodos y plantas adventicias (Lacasa *et al.* 2004).

En este Trabajo se destacan los ensayos de biodesinfección realizados en la zona de Socuéllamos (Ciudad Real) con la finalidad de poner a disposición de nuestros agricultores los resultados y con ello poder determinar una posible aplicación de este método de biodesinfección de suelos no solo en la replantación de viñedos, sino también en su posible reconversión (Bello *et al.* 2004), y de la misma manera en la zona de El Perelló (Valencia) se valorará su aplicación para el control de nematodos. Se estudia la optimización de la biodesinfección, mediante la utilización de diferentes subproductos para que puedan ser autorizados en agricultura ecológica, como es el caso de las vinazas, que son respectivamente subproductos de la fermentación alcohólica de la industria vitivinícola, con el fin de reducir costes y obtener una mayor eficacia en el control de organismos patógenos.

La descomposición de la materia orgánica produce la liberación de compuestos orgánicos volátiles y gases tóxicos, como el amoníaco con efecto biodesinfectante. En las zonas estudiadas y en verano las altas temperaturas permiten la combinación de la biodesinfección con solarización (biosolarización), que actúa como una pasteurización del suelo, ya que la temperatura aumenta por encima de 50 °C bajo el plástico durante las horas de mayor insolación. Ambos fenómenos consiguen eliminar de manera selectiva los patógenos del suelo o reducir su capacidad parasitaria, propiciando un incremento de los organismos saprófagos que intervienen en la descomposición de la materia orgánica.

La biodesinfección estimula la actividad microbiana en el suelo, actuando además como biomejorador del mismo, el incremento de la actividad microbiana favorece el aumento de los niveles de enzimas en el suelo y produce amonio, nitratos, sulfhídrico y gran número de sustancias volátiles y ácidos orgánicos, siendo, de todos los productos químicos obtenidos en la descomposición de la materia orgánica por la actividad de los microorganismos que pueden tener acción nematicida, el amonio el más estudiado. La actividad nematicida del amonio fue reconocida por Eno *et al.* (1955), siendo la cantidad de amonio producido variable en función del nitrógeno del sustrato orgánico de partida, pero debemos tener en cuenta que el contenido de nitrógeno no es el único factor considerado cuando la materia orgánica es utilizada como nematicida, el carbono es también importante, puesto que de él depende la metabolización del N por los microorganismos para convertirlo en proteína y otros compuestos. En ausencia de fuentes de carbono, el amonio y los nitratos se pueden acumular y causar fitotoxicidad, se ha demostrado que la materia orgánica con una relación C/N entre 8-20 tiene actividad nematicida sin efecto fitotóxico (Rodríguez Kábana *et al.* 1987).

Por otro lado, resaltar que no se ha observado que la biodesinfección tenga efectos negativos en la salud de los consumidores, ni en el medio ambiente, no tiene limitaciones de uso dentro de los reglamentos de producción integrada o de agricultura ecológica, permitiendo la utilización de recursos locales en el control de patógenos de las plantas, disminuye los costes de producción y convierte a la agricultura en una alternativa para evitar problemas de impacto ambiental, como son los originados por los restos de cosechas y de la agroindustria. La efectividad nematicida de la biodesinfección es similar a la de los productos fitosanitarios convencionales (Bello *et al.* 2004).

La **relación de costes entre biodesinfección y desinfección química** para una hectárea en suelos de textura media es de $924 \text{ €} / 2175 \text{ €} = \mathbf{0,42}$, lo que indica que el coste de la desinfección de una hectárea mediante biodesinfección supone un 42% con respecto a la desinfección química (100%). Por tanto el total, de aproximadamente **40 millones de € por campaña** para la desinfección del viñedo en España utilizando recursos públicos, **podría reducirse a la mitad utilizando biodesinfección**. Consultado al sector, la desinfección química se realiza mayoritariamente utilizando 1,3-D y de acuerdo a la información suministrada por el *Vademecum* de productos fitosanitarios

(Liñán de 2004), las patentes de dicha materia activa en sus distintas formulaciones son propiedad de empresas no nacionales, lo que además incide en la balanza de intercambios comerciales y monetarios. Por otro lado, hay que considerar como efecto favorable añadido de la biodesinfección el aporte de nutrientes de los subproductos agrarios y la mejora en la estructura del suelo, aunque a nivel de costo subvencionable por la normativa no se puede considerar, ya que la subvención específica por abonado con materia orgánica no está incluida en el Anexo II del Real Decreto 1472/2000 que lo regula.

La desinfección de suelos mediante **biodesinfección**, que incluye gran parte de los objetivos de este trabajo, puede formar parte de la producción ecológica e incluso de la producción integrada, por todo ello debemos resaltar los datos de un estudio reciente realizado por encargo del MAPA, en el que la diferenciación porcentual media de la estimación de **precios** de los productos ecológicos respecto a los procedentes de la agricultura convencional **es del 51,5% superior**, y **el coste** de producir conforme a los cánones ecológicos se viene considerando en **un 22% superior** al coste de realizarlo convencionalmente, la producción ecológica incrementa la renta de los productores, dispone de mercados garantizados y es una vía de fijación de la población rural. En este trabajo se plantea el estudio de la influencia de la biodesinfección sobre los nematodos del suelo, especialmente *X. index*, vector del virus causante del “entrenudo corto infeccioso de la vid” (GFLV), que produce pérdidas graves al reducir el contenido de clorofila en las hojas, entrenudo corto en los pámpanos, corrimiento de la uva en el racimo y un decaimiento progresivo de la planta, así como la destrucción del sistema radicular causado por la acción directa de *X. index* (Fig. 1). Las parcelas donde se han desarrollado los ensayos para el estudio del efecto de las vinazas sobre los nematodos del suelo están situadas en la localidad de Socuéllamos (Ciudad Real) y en El Perelló (Valencia).

Socuéllamos (Ciudad Real), situada en la parte meridional de la Submeseta Sur de la península, dentro de la región natural de La Mancha. Se encuentra enclavada en concreto en el extremo noroeste de la provincia de Ciudad Real, en la subcuenca del río Záncara, afluente del Guadiana. Su término municipal tiene una superficie total de 37.100 ha. La parcela donde se han realizado los experimentos se ha cultivado dedicando su producción a la industria

alcoholera, donde se ha experimentado el riego con vinazas durante los últimos 5 años.

La zona se caracteriza por tener un clima mediterráneo continental, con una pluviometría media anual de 396 mm/año, con grandes irregularidades estacionales. Los inviernos son fríos con mínimas de 0,6 °C, mientras que en verano se alcanzan los 33,7 °C. Hay que señalar que desde finales de septiembre hasta junio las temperaturas medias son inferiores a 14 °C, y en este sentido cabe destacar que *X. index* por debajo de los 16 °C tiene una actividad muy baja. Por el contrario las temperaturas superiores a 30 °C (período comprendido entre junio y septiembre) no afectan significativamente al ciclo del nematodo debido a la sombra que genera la cubierta vegetal de la vid, que reduce la temperatura del suelo. También se ha comprobado que en las condiciones de clima mediterráneo continental, el nematodo solo desarrolla una generación al año, que tiene lugar principalmente entre marzo y mayo (Arias *et al.* 1997a,b). El número medio de horas de sol es de 2656 (www.inm.es). Las parcelas experimentales están situadas en una llanura con una pendiente del 0-2%, el suelo tiene un horizonte superior arenoso (84% arena y 10% arcilla), un contenido en materia orgánica entre 0,10-0,85%, carbonatos 7,9-27,2% y un pH comprendido entre 7,80-8,05 (Carlevaris *et al.* 1992) El suelo ha sido clasificado como Arenosol calcárico, siguiendo el sistema de clasificación de suelos de la FAO (1989).

El Perelló (Valencia), localidad perteneciente al municipio de Sueca, que con 9.344 ha constituye el municipio más importante de la Comarca Valenciana de la Ribera Baja. Es una comarca litoral muy llana atravesada por el río Júcar. La zona se caracteriza por tener un clima mediterráneo levantino-balear con pluviométrica anual de 454 mm, con un máximo en otoño, lo cual es típicamente mediterráneo, y en primavera, con sequía en verano. Las temperaturas medias de 17-18 °C, con inviernos suaves de 8 °C en promedio y veranos cálidos rondando una media de 28 °C. Cabe señalar una humedad relativa del 65% anual, al igual que la insolación alcanza las 2.660 horas de luz anuales (Capel Molina 1981, MAPA 2002).

Hay que señalar que durante el mes de septiembre se alcanza un período de temperaturas que se aproximan a los 30 °C, donde se permite el desarrollo de nematodos del género *Meloidogyne* (Díaz Viruliche 2000). Según el MAPA

(1981), los terrenos son mesozoicos, terciarios y principalmente pleistocenos. Está constituido por calizas compactas en las que se intercalan algunos niveles margosos. Sus materiales constitutivos son estratos de caliza alternando ocasionalmente con lechos de margas. El Perelló y Perellonet constituyen lo que los geomorfólogos denominan “golas” naturales, es decir, salidas naturales de la Albufera al mar.

El MAPA (1981) define a los suelos presentes como Aridisoles, Entisoles e Inceptisoles. Díaz Viruliche (2000) describe tres perfiles de suelos bajo uso hortícola, que corresponden a Arenosoles. El suelo no se encuentra en su estado natural, son suelos dedicados al cultivo hortícola bajo plástico, han sido alterados por la acción humana a través del laboreo continuo e intensivo, así como por el aporte de dosis de abonado. El horizonte superior es de textura arenoso-franca, de color oscuro debido a la materia orgánica que posee, bastante elevada en relación con la de un suelo de estas características. La parcela elegida está situada en un llano con una pendiente del 0-2%, el suelo tiene un horizonte superior arenoso (83% arena y 8% arcilla), un contenido en materia orgánica entre 0,58-3,13%, carbonatos 23,64-26,18% y un pH comprendido entre 7,44-7,71 (Bello *et al.* 2004). El suelo ha sido clasificado como Arenosol calcárico, siguiendo el sistema de clasificación de suelos de la FAO (1989).

La biodesinfección podría tener grandes posibilidades en las zonas vitivinícolas y en los cultivos hortícolas españoles, debido a que es importante la producción de un gran número de toneladas de residuos industriales. Además existe una gran tradición de cultivos forrajeros que pueden utilizarse como abono verde y actuar como biodesinfectante, especialmente en el caso de las crucíferas que como se ha demostrado tienen una gran eficacia para el control de nematodos en la remolacha (López Robles 1991). Por otro lado, existe una gran producción de champiñón, especialmente en Castilla-La Mancha y La Rioja, cuyos residuos pueden utilizarse como biodesinfectantes, a la vez que también pueden emplearse los subproductos de las industrias láctea, vitivinícola y oleícola (Bello *et al.* 2003, López Pérez 2004); especialmente en el caso de las dos primeras donde el porcentaje de aporte hídrico es muy considerable hoy en día.

II.2. Características de los nematodos fitopatógenos

La mayor parte de los nematodos fitopatógenos que viven en el suelo son ecto o endoparásitos del sistema radicular de las plantas, pero algunos son parásitos de las partes aéreas (hojas, tallos, bulbos, flores, semillas) y la sintomatología que producen puede ser muy variable, dependiendo de la especie de nematodo, el tipo y edad del hospedador, la parte afectada y las condiciones generales de crecimiento. Así, las plantas parasitadas por nematodos en su sistema radicular muestran en su parte aérea una sintomatología similar a la causada por estados nutricionales carenciales, aunque dependiendo del tipo de nematodo, se pueden observar en las raíces síntomas más específicos, tales como formación de nódulos (*Meloidogyne* spp.), pequeños engrosamientos en los ápices radiculares (nematodos vectores de virus: *Xiphinema* spp., *Longidorus* spp., *Trichodorus* spp., o en las raicillas secundarias como *Tylenchulus semipenetrans*, nematodo de los cítricos), proliferación excesiva y crecimiento anormal de las raíces secundarias (*Heterodera* spp. y *Meloidogyne* spp.), necrosis en el punto de alimentación en nematodos ectoparásitos y en general en zonas necróticas, en el caso de los nematodos endoparásitos del género *Pratylenchus*, en especial cuando están en interacción con otros organismos patógenos como bacterias u hongos. Para la identificación y descripción de nematodos es esencial el estudio de la morfometría, siendo necesaria la medición precisa de distintos parámetros y calcular determinados índices, tales como la longitud total del cuerpo y del estilete, posición de la vulva y del ano en las hembras o de la cloaca en los machos, etc., que pueden medirse directamente mediante la utilización de un micrómetro ocular (Hunt 1993, Siddiqi 2000).

Un problema importante en el estudio de los organismos del suelo es que la muestra seleccionada puede no ser representativa del universo de interés; por tanto debe planificarse un muestreo que considere los requerimientos biológicos y ecológicos de los nematodos, y que permita una valoración de la población que tenga una medida y nivel aceptable de precisión. Uno de los factores más importantes a tener en cuenta en la planificación de un muestreo es el modelo de distribución espacio-temporal que presentan los nematodos. Aunque teóricamente los nematodos pueden presentar una distribución regular, al azar o en agregados, la distribución espacial típica de los nematodos fitoparásitos es de tipo agregado o contagiosa, como consecuencia de las

pautas de micro y macro distribución relacionadas con la biología y fuente de alimento.

La distribución temporal y las fluctuaciones estacionales de las poblaciones de nematodos están determinadas por la biología, ciclo de vida y dinámica de población de las especies objeto de estudio, así como por las relaciones huésped-parásito y las interacciones con el medio ambiente. El conocimiento básico de la biología de estos organismos es imprescindible para poder considerar los datos de un muestreo representativo de la población, ya que en ocasiones es necesario muestrear en diferentes épocas del año para determinar las fluctuaciones estacionales. El conocimiento de las relaciones huésped-parásito es también fundamental para localizar y estimar correctamente la densidad de población de muchas especies. Así, por ejemplo, las especies de *Ditylenchus* y *Pratylenchus* son endoparásitas y pueden pasar inadvertidas en muestras de suelo recogidas durante la primavera-principios de verano, puesto que la mayoría de los individuos están en el interior de los tejidos del tallo o raíces.

Los principales tipos de muestreo que se vienen realizando para el estudio de nematodos son al azar, regular y estratificado. El muestreo al azar consiste en la determinación de los puntos de muestreo de un modo aleatorio, cuando el área del muestreo es muy grande se utilizan mapas sobre los cuales por distintos métodos (manuales, informáticos), se eligen al azar los puntos de muestreo. Por el contrario, en el muestreo regular, los puntos se distribuyen uniformemente en el área a muestrear, siguiendo pautas regulares definidas por las distancias fijadas entre ellos. En general, los muestreos regulares dan resultados más fiables en los estudios nematológicos que los muestreos al azar (Goodell y Ferris 1981). Cuando el área de estudio es grande y presenta variaciones bióticas (vegetación, cultivos) o abióticas (edáficas, climáticas) que pueden influir en la biología y distribución de los nematodos, es recomendable realizar muestreos estratificados, para ello se divide el área en función de uno o varios factores ambientales en una serie de estratos uniformes donde se recogen las muestras (al azar o regularmente) para obtener una estimación de la población o poblaciones en cada estrato y de las diferencias entre ellos. El objetivo de la estratificación es reducir al mínimo la varianza entre muestras recogidas en un mismo estrato y aumentar al máximo la variación entre los estratos (Cochran 1977).

Todas las especies de nematodos asociadas al viñedo son edáficas y se alimentan de sus raíces; el daño que producen es, en muchos casos, de muy difícil evaluación debido, por un lado, a su asociación con otros organismos patógenos y, por otro lado, al hecho de que los síntomas que provocan son en general inespecíficos, como falta de vigor, bajo rendimiento, decoloraciones y poca resistencia a la sequía, que pueden confundirse con estrés hídrico o deficiencias nutricionales, que en viñedos establecidos pueden solucionarse total o parcialmente mediante riego y abonado. La aparición de esta sintomatología en rodales dentro del cultivo permite sospechar que está causada por nematodos.

La nematofauna asociada al viñedo está representada por unas 300 especies, pertenecientes a 72 géneros, con especies fitoparásitas, saprófagas o depredadoras. Entre ellas, se han citado 37 especies parásitas de la vid, siendo los nematodos de mayor repercusión en el viñedo los ectoparásitos migratorios vectores de virus de la familia Longidoridae (Arias y Navacerrada 1973, 1976, Arias 1979, 1996), aunque los más importantes por su acción directa sobre el cultivo son los endoparásitos sedentarios del género *Meloidogyne*, endoparásitos migratorios del género *Pratylenchus*, semiendoparásitos, como *Tylenchulus semipenetrans* que origina problemas graves principalmente en los viñedos de Australia, ectoparásitos sedentarios, como *Macroposthonia xenoplax* que produce clorosis y otras alteraciones en viñedos de California y, de menor importancia, *Gracilacus peratica* y algunas especies de *Paratylenchus*, los ectoparásitos migratorios de los géneros *Helicotylenchus*, *Rotylenchus* y *Tylenchorhynchus* s.l. aparecen frecuentemente asociados al cultivo, pero se conoce poco de su posible patogenicidad (Lamberti 1989, Brown *et al.* 1995).

Ectoparásitos. Se han citado más de 120 especies de nematodos ectoparásitos asociadas al viñedo, de los que cabe destacar, entre los vectores de virus *Xiphinema index*, *X. diversicaudatum* y *X. rivesi*. Entre los sedentarios *Macroposthonia xenoplax* que en las vides de la cuenca mediterránea produce clorosis y falta de vigor y *M. maskaka* que se encuentra en Sudáfrica, así como algunas especies de *Hemicycliophora*, *Paratylenchus* y *Rotylenchus macrodoratus*. De los ectoparásitos migratorios, *Belonolaimus longicaudatus* causa problemas en el sureste de EE UU, así como algunas especies de *Longidorus*: *L. africanus*, *L. apulus*, *L. attenuatus*, *L. diadecturus*, *L. elongatus*,

L. juvenilis y *L. macrosoma*, sin embargo, existe poca información sobre la importancia de estas especies para el viñedo.

Endoparásitos migratorios. Las principales especies pertenecen al género *Pratylenchus* del que se han citado 17 especies asociadas al viñedo, que pueden considerarse patógenos potenciales para el cultivo, pues producen necrosis en las raíces de las plantas. Varias especies se han encontrado asociadas a rodales de vid con escaso crecimiento (Raski y Krusberg 1984), pero las especies más importantes son *P. scribnieri* que causa problemas graves en los viñedos de Burdeos (Francia) (Scotto La Massese *et al.* 1988), *P. vulnus* que está asociado a rodales de plantas enfermas que muestran detención del crecimiento en California (Allen y Jensen 1951), también se han encontrado otras especies asociadas a rodales de bajo crecimiento en áreas muy concretas. El efecto de estos nematodos sobre la vid es muy grave ya que, una vez establecida la infestación, la viña no responde a las prácticas culturales.

Semiendoparásitos. Entre estos nematodos podemos destacar *Tylenchulus semipenetrans*, el nematodo de los cítricos, que tiene una distribución mundial similar al cultivo de cítricos y su presencia en viñedos está muy localizada, incluso en aquellos viñedos que están próximos a zonas citrícolas. Se citó por primera vez en viñedos de California y Australia, encontrándose posteriormente en Egipto y Filipinas, donde es uno de los nematodos más importantes para el viñedo, provocando una considerable reducción de vigor, mayor susceptibilidad al estrés hídrico, presentando las cepas síntomas de marchitamiento y pérdida gradual del rendimiento hasta llegar a ser improductivas. En España se ha citado en viñedo esporádicamente (Tobar Jiménez y Pemán Medina 1970, Navacerrada 1975), y se ha conseguido infectar experimentalmente vides y olivos con poblaciones procedentes de cítricos (Valcarce y Laborda 1980). Hay que tener en cuenta que existen diferentes biotipos de este nematodo.

Endoparásitos sedentarios. Pertenecen al género *Meloidogyne*, son los patógenos más importantes para el viñedo por su acción directa sobre la planta, de las seis especies que se han citado asociadas al cultivo, las más importantes son *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla*, que pueden dar lugar a un descenso de la producción, siendo mayores los daños en plantaciones jóvenes, al impedir el desarrollo de las plantas que muestran un crecimiento reducido. Los

síntomas que producen en la parte aérea de la viña son inespecíficos y varían con el cultivar, pero su presencia se detecta fácilmente, incluso en infecciones incipientes, por producir pequeños nódulos en las raicillas secundarias. Se considera que *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica* son las tres especies que aparecen con mayor frecuencia en la región mediterránea, mientras que *M. hapla* es de regiones templadas y por el momento no es un problema grave para el viñedo, aunque se ha encontrado ocasionalmente en regiones más cálidas como Sudáfrica, probablemente introducida con los patrones, y, por último, *M. natalei* solo se ha citado en California.

Los nematodos ectoparásitos vectores de virus pertenecientes al género *Xiphinema* son los patógenos principales de los viñedos españoles, destacando sobre todo *X. index* por ser vector del GFLV, que se encuentra distribuido por todo el país con una incidencia en torno al 12% (± 0.025), y que se puede transmitir, además, a través del material vegetal infectado como estaquillas e injertos (Arias *et al.* 1997b, Fresno *et al.* 2001). *X. italiae* también ha sido comprobado experimentalmente como vector del GFLV (Cohn *et al.* 1970) aunque en campo no es efectivo (Martelli 1978). Debemos señalar que también se ha citado en España *X. americanum* por Werland Ardaiz y Pérez Camacho (1993) y Talavera *et al.* (1999), sin embargo las citas anteriores de esta especie han sido consideradas pertenecientes a *X. pachtaicum* por Arias *et al.* (1985). *X. americanum* es un nematodo de cuarentena por ser vector de los nepovirus que afectan al viñedo en EE UU como el “*Tobacco Ring Spot Virus (TRSV)*” o mancha anular del tabaco, “*Tomato Ring Spot Virus (ToRSV)*” o mancha anular del tomate y “*Peach Rosette Mosaic Virus (PRMV)*” o virus del mosaico en roseta del melocotonero. La clasificación y nomenclatura de los virus la encontramos en Murphy *et al.* (1995).

Por otro lado, Stobbs y Van Schagen (1996) señalan que *X. rivesi* es vector del PRMV en Canadá. Arinç *et al.* (1987) demuestran experimentalmente que *X. pachtaicum* no transmite el GFLV, coincidiendo con las observaciones de Arias *et al.* (1997b) de que ejemplares de esta especie recogidos de la zona peri-radicular de vides infectadas dieron siempre resultados negativos en las pruebas de detección del virus, hasta el punto de que las poblaciones de dicho nematodo se han venido utilizando como controles negativos en las pruebas de ELISA amplificado que se aplicaron para la detección del virus en ejemplares de *X. index* y *X. italiae*, así como en las pruebas de transmisión. Lamberti y Melillo (1991)

demuestran que poblaciones de *X. index* superiores a 50 individuos por kg de suelo afectan al rendimiento de la vid. Sultan y Ferris (1991) encuentran en Israel que las poblaciones de *X. index* en ausencia de planta huésped sobreviven más de 60 días el 10%, dependiendo de las condiciones de humedad, siendo la supervivencia muy baja tanto en suelos saturados como en los secos. Malan y Meyer (1992, 1993) señalan que las vides inoculadas con individuos de *X. index* portadores de GFLV muestran síntomas del virus al cabo de cuatro meses y a los seis meses aparecen síntomas en la hoja. Esmenjaud *et al.* (1993) y Fresno y Arias (1993) detectan el virus mediante la técnica ELISA en 10 individuos de *X. index*, mientras que Arias *et al.* (1997b) lo detectan en un solo individuo por la técnica de IC-PCR.

La comprobación de la transmisión del GFLV de la vid por *X. index* (Hewitt 1950, 1956, Hewitt *et al.* 1958) fue la primera prueba experimental de la importancia de los nematodos como vectores de virus vegetales. A partir de este descubrimiento se intensificaron las investigaciones en este campo y hoy se conocen especies transmisoras pertenecientes a cinco géneros: *Longidorus*, *Paralongidorus* y *Xiphinema*, que se incluyen en el orden Dorylaimida, así como *Paratrichodorus* y *Trichodorus* en Triplonchida. Estos nematodos transmiten dos grupos de virus distintos, los Longidóridos son vectores de Nepovirus, que son los de mayor interés para el viñedo, y los Tricodóridos de Tobravirus, que son importantes en cultivos de patata, tabaco y otras hortícolas.

De las 38 especies del género *Xiphinema* que se han encontrado asociadas al viñedo, *X. americanum sensu lato* es un complejo de especies morfológicamente muy próximas (Lima 1965, 1968) que podrían ser solo poblaciones diferentes procedentes de distintas áreas geográficas (Tarjan 1969). Por otro lado, Lamberti y Bleve Zacheo (1979) distinguen 25 especies dentro del complejo y consideran que *X. americanum sensu stricto* tiene una distribución geográfica limitada al este de EE UU, aunque Griesbach y Maggenti (1990) indican que la especie se encuentra también en California, se considera que no existe en Europa y las citas en este continente se refieren a *X. pachtaicum*, *X. rivesi* o *X. brevicolle*. Pertenecen también a este grupo *X. bricolensis* vector del Yom RSV y *X. californicum* del CRLV, TRSV y Tom RSV que están distribuidos en EE UU (Brown y Hallbrendt 1992).

X. diversicaudatum está distribuido en zonas de clima templado y húmedo de todo el mundo, es vector del virus del mosaico del Arabis (ArMV) (Jha y Posnette 1959), y del virus de los anillos latentes de la fresa (SLRV) (Lister 1964). Es una especie muy frecuente en la parte septentrional de Francia, a lo largo de las cuencas fluviales y en la costa atlántica encontrándose muy dispersa en el Reino Unido y Centro Europa (Alpey y Taylor 1986). Se ha encontrado asociado a vegetación natural en suelos con unos 60-70% de arena, preferentemente ácidos, condicionado por la humedad y el clima continental (subhúmedo a húmedo), su límite sur en Europa parece estar en la Región Central de España (Arias *et al.* 1985). Otras asociaciones que han sido citadas entre nematodos y virus se consideran dudosas por no cumplir sus pruebas de transmisión los requisitos establecidos por Trudgill *et al.* (1983).

X. index es el vector más importante del GFLV, y presenta una distribución que es similar a la del viñedo. Tiene una gama restringida de hospedadores (vid, higuera, rosal y morera), aunque Coiro *et al.* (1987) han comprobado experimentalmente que parasita a otros cultivos y malas hierbas que pueden servir de reservorio de las poblaciones. Independientemente de su función de vector de virus produce una serie de alteraciones en las raíces de las plantas como consecuencia de su actividad trófica, que consisten en engrosamientos y necrosis de los extremos apicales de las raicillas secundarias, con alteraciones celulares (Lehmann y Wyss 1978).

X. italiae es una especie que está ampliamente distribuida en Europa, especialmente en el área del litoral mediterráneo (Cohn 1977, Alpey y Taylor 1986), donde aparece en viñedos asociada a *X. index* y *X. pachtaicum*. Se ha citado en Sudáfrica y Nigeria asociada a GFLV (Heyns 1974, Khan 1988). Su rango de hospedadores es amplio, generalmente en plantas cultivadas, aunque también es frecuente en bosques (Heyns 1974, Lamberti *et al.* 1985), pero solamente se ha comprobado su desarrollo en vid y cítricos (Cohn y Mordechani 1969, Coiro y Agostelli 1991). Navas y Arias (1986) lo encuentran asociado a suelos areno-limosos y limo-arenosos con pH ácido (5-5,5) y contenidos de materia orgánica entre 2,5-5,5%. *X. italiae* también ha sido comprobado experimentalmente como transmisor de GFLV (Cohn *et al.* 1970), aunque en condiciones de campo no es muy efectivo (Martelli 1978).

X. rivesi se encuentra ampliamente distribuido en EE UU y Canadá (Ebsary *et al.* 1984, Georgi 1988, Griesbach y Maggenti 1990), así como en los viñedos Bourdelais (Francia) (Scotto la Massese *et al.* 1988). En España se encuentra en áreas naturales, asociado a diferentes cultivos, especialmente vid y rosál al que parasita (Arias *et al.* 1991, Escuer *et al.* 2007). Es el principal vector del TRSV (Forer *et al.* 1981, Forer y Stouffer 1982), virus que no se ha encontrado en España (Escuer *et al.* 2007).

X. pachtaicum pertenece al grupo *X. americanum* s. l., se le conocía como *X. mediterraneum* hasta que Lamberti y Siddiqi (1977) sinonimizaron ambas especies, se encuentra distribuido ampliamente en la cuenca mediterránea, frecuentemente asociado a viñedo (Alphey y Taylor 1986, Arias *et al.* 1986), ha sido citado como posible vector del GFLV (Alfaro 1971).

Daño directo. Los nematodos ectoparásitos de los géneros *Longidorus* y *Xiphinema* inducen modificaciones en las raíces de las plantas, al alimentarse sobre las células subapicales de las raíces. Estos nematodos introducen su estilete a través de una serie de 5 a 7 células corticales, las células próximas al odontostilo se hipertrofian y muestran síntomas de gran actividad metabólica, de manera similar a la que se observa en los sincitios producidos por *Heterodera* y *Meloidogyne*, produciendo un incremento de inclusiones citoplasmáticas y aumento del tamaño de núcleos y nucleolos. Los nematodos causan engrosamiento y detención del ciclo de crecimiento del sistema radicular, de modo que las plantas quedan incapacitadas para la absorción de nutrientes y comienzan a mostrar **síntomas de deficiencia de elementos como nitrógeno, sodio, potasio, fósforo y magnesio** (Maung 1959, Winfield y Cooke 1975).

Características de *Xiphinema index* vector del GFLV. Este nematodo se caracteriza morfológicamente por presentar el cuerpo alargado cilíndrico, de unos 3 mm de longitud, formando una espiral abierta con mayor curvatura en la mitad posterior, la cutícula es gruesa con estrías finas superficiales, mostrando una serie de poros a lo largo del cuerpo. La región labial es hemisférica, casi continua con el contorno del cuerpo con una ligera depresión bajo las aperturas anfidaes. Los anfidios tienen forma de estribo con aperturas como cortes casi del tamaño de la anchura de la región labial. El estilete es típico del género, consta de un odontostilo hueco de 126 (119-129) µm de longitud, bifurcado en

el punto de unión con el odontóforo, de unas 70 (63-78) μm de longitud, y con tres extensiones basales y el anillo guía del estilete a 108 (100-114) μm del extremo anterior. El anillo nervioso se encuentra por debajo de la base del odontóforo. La parte posterior del esófago es cilíndrica, musculosa, 2,5 veces más larga que su anchura en la base. La vulva es un corte transversal en la parte media del cuerpo, al 38-40% de la longitud del cuerpo. Las gónadas son didélficas, retroflexas y no presentan órgano "Z" ni pseudórgano "Z", a diferencia de *X. diversicaudatum*. Los ovarios son alargados, simétricos con varios oocitos en fila, excepto en la región de multiplicación. La región posterior es mamiforme, con longitud de 1 a 1,3 veces su anchura al nivel del ano, convexo-cónica con mayor curvatura en su parte dorsal y un mucrón en la parte ventral de 9 a 13 μm de longitud, aunque pueden aparecer hembras amucronadas (Fig. 1).

Su ciclo biológico consta de tres o cuatro estadios juveniles, dependiendo de la especie, que se distinguen de los adultos por poseer dos odontostilos, uno funcional que pierden con la muda y el de repuesto que pasa a funcional después de dicha muda. El juvenil de primer estadio (J1) emerge del huevo y algunos individuos muestran una forma característica de la región posterior que tiene valor taxonómico, la parte anterior del odontostilo de repuesto se sitúa en la parte del odontóforo del estilete funcional, mientras que los restantes estados juveniles (J2, J3 y J4) tienen el odontostilo de repuesto en posición posterior incluido en la pared de la parte anterior del esófago. Por lo demás su morfología es básicamente similar a la de los adultos.

En estudios de campo es difícil determinar la duración del ciclo, puesto que en la mayoría de las especies de *Xiphinema* pueden encontrarse a lo largo del año tanto adultos como todos los estados juveniles (Flegg 1966, 1968, Reudel 1971, Harris 1979). Las diferencias fisiológicas existentes entre poblaciones de *X. index* de distintas áreas, unidas a las diferencias morfológicas e histoquímicas entre poblaciones virulíferas y libres de virus, que han sido observadas por Roggen (1966) y Halbrendt *et al.* (1995), pueden explicar las diferencias en la capacidad de transmisión de distintos aislados de GFLV que encuentran Catalano *et al.* (1989), de manera similar a lo observado por Brown y Taylor (1981) en la transmisión de distintos aislados de SLRV por poblaciones de *X. diversicaudatum* de procedencias diferentes.

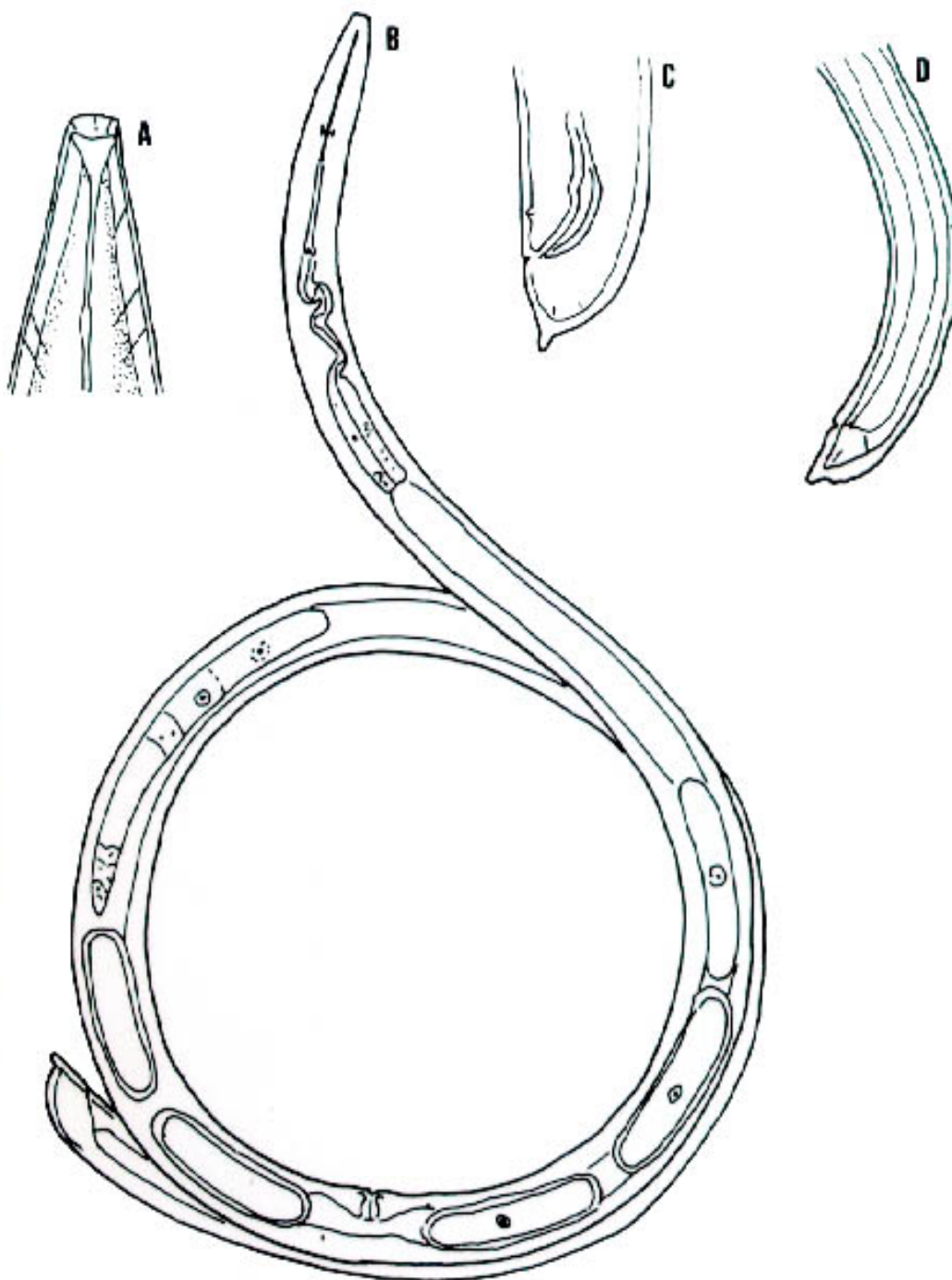


Figura 1. Características morfológicas de *X. index*. A. región anterior de la hembra; B. hembra adulta; C. región posterior del macho; D. región posterior de la hembra.

Los focos de GFLV-*X. index* generalmente se presentan en rodales muy localizados que se extienden muy lentamente bajo las condiciones tradicionales de cultivo en España, ya que los nematodos suelen encontrarse en poblaciones muy pequeñas y muestran una movilidad muy baja, por lo que el interés fitopatológico de este nematodo se debe principalmente a que mantienen por períodos largos la infección del virus en campo.

Se ha observado que la introducción de riego favorece el incremento de las poblaciones de nematodos y sobre todo su dispersión, que repercute a su vez en la mayor distribución del virus y hace ineficaz la reposición de las cepas muertas, con lo que la única solución sería el mantener el viñedo mientras los límites de producción sean aceptables económicamente, para después **proceder a su arranque manteniendo el terreno en barbecho o en rotación con un cultivo alternativo y por un período de al menos cinco años en California** (Raski *et al.* 1965, Fresno *et al.* 2001), **mientras que en Francia, con ambientes más húmedos, se consideran necesarios de seis a siete años de rotación con plantas no hospedadoras, o tres años si se aplican nematicidas** (Dalmasso 1970), en cualquier caso se debe replantar cuando se haya comprobado la ausencia de individuos infectivos de *X. index* (Arias *et al.* 1997b). Se recomienda para la eliminación de restos de material de vid infectada en el suelo (Magnien 1998), la utilización de herbicidas sistémicos previos al arranque de la cepa infectada, seguida de la fumigación del suelo por nematicidas para la eliminación de los nematodos vectores. Hewitt (1956) señaló el origen edáfico de la degeneración infecciosa de la vid o “*fanleaf* (GFLV)” y Hewitt *et al.* (1958) demuestran experimentalmente que el GFLV es transmitido por *X. index*. Se ha demostrado que el virus no se transmite a través de los huevos del nematodo y que los juveniles pierden la capacidad de transmisión con la muda, teniendo que alimentarse de nuevo de una planta infectada para adquirir el virus, el nematodo mantiene la capacidad de transmisión de cuatro a ocho semanas cuando se alimenta de plantas no infectadas (Taylor y Raski 1964, Brown *et al.* 1988, 1995) pudiendo sobrevivir hasta nueve meses en suelo estéril en ausencia de planta huésped y se ha comprobado que el virus persiste al menos 30 días en el nematodo, cuando éste se mantiene sin alimento (Raski y Hewitt 1960). Por otro lado, el problema puede resolverse si se remueve el suelo cuidadosamente para eliminar las raíces y se mantiene en barbecho, puesto que el nematodo puede sobrevivir mientras existan en el suelo raíces vivas de vid o malas hierbas. En los viñedos con riego puede ser una buena medida el desecar el suelo, aunque se ha

observado que en las condiciones ambientales de Alemania es más eficaz la inundación (Weischer 1975).

X. index es un nematodo ectoparásito migratorio que produce al alimentarse necrosis y pequeños nódulos en la zona apical de las raíces de la vid, llegando a reducir hasta el 38% de su peso (Fisher y Raski 1967). Se ha observado, en plantas de vid inoculadas con 500 individuos de *X. index* y mantenidas a 26,6 °C, un 23% de incremento de caída de hojas viejas en el primer año y en el segundo año un 65% de caída, un 38% de reducción de peso tanto de la parte aérea como de la raíz, un 60% de reducción de inflorescencias y un 89% de reducción de la producción (Kirpatrick *et al.* 1965, Boubals *et al.* 1971). Todo ello permite señalar la importancia que pueden tener las prácticas agrícolas en la epidemiología de la enfermedad, tema que ha sido revisado por Siddiqi (1986), Walter y Demangeat (1995) y Arias *et al.* (1997b).

X. index está ampliamente distribuido en todos los viñedos del mundo, puesto que se encuentra principalmente asociado a la vid, también se ha encontrado frecuentemente asociado a higuera, rosál, morera y otros frutales, siendo poco frecuente en plantas herbáceas y en ambientes naturales, aunque se ha citado en bosques de Irán (Choleva 1975, Weischer 1975, Siddiqi 1986). En España se ha encontrado fundamentalmente en viña e higuera y ocasionalmente en áreas naturales en las regiones del Sur, Este y Centro de la Península (Arias 1975). Los rangos de hospedadores y su patogenicidad han sido estudiados por Radewald y Raski (1962).

En condiciones de campo el GFLV solamente se ha encontrado en vid (Martelli 1978) pero experimentalmente tiene una gama de hospedadores amplia, que comprende unas 30 familias botánicas diferentes. Se ha demostrado que es suficiente que el nematodo se alimente una sola vez en una planta infectada por un período de cinco minutos para adquirir el virus (Alfaro y Goheen 1974), aunque la alimentación por períodos más largos favorece la eficacia de la transmisión. *X. index* retiene el virus durante más de ocho meses en ausencia de planta huésped, hasta tres meses si se alimenta en plantas hospedadoras inmunes al virus y varios años en presencia de restos de raíces de vid. Todas las fases de desarrollo del nematodo tienen capacidad infectiva (Raski y Hewitt 1963, Cohn *et al.* 1970), aunque durante el período de desarrollo pierde su capacidad infectiva entre una fase y otra, al cambiar la capa cuticular del esófago durante las

mudas. Por otro lado, las diferencias en la eficacia de transmisión de un virus por distintas poblaciones de un nematodo hace pensar en la existencia de razas biológicas (Brown 1986).

Diversos trabajos de campo y laboratorio demuestran la influencia que tienen los factores ambientales en el desarrollo de *X. index*, pudiendo variar la duración de su ciclo de vida entre dos y 14 meses, dependiendo principalmente de la temperatura y el desarrollo estacional de la planta huésped. Se ha comprobado en campo que *X. index* se desarrolla con menor rapidez que *X. americanum* s.l. y *X. diversicaudatum*. En zonas templadas *X. index* parece tener una generación al año, con un ciclo que se completa de dos a tres meses y adultos que sobreviven en el suelo cinco años en presencia de raíces vivas. Das y Raski (1968) comprueban que la presencia del virus aumenta la supervivencia del nematodo en ausencia de alimento, mientras que Raski *et al.* (1965) indican que en suelo estéril no perdura más de 9-10 meses, pero en suelos de viñedo con restos de raíces puede sobrevivir varios años.

El suelo no es un factor limitante para la distribución del nematodo, aunque las variaciones poblacionales son más patentes en los suelos ligeros que en los arcillosos, siendo más abundantes en suelos con pH entre 6,5-7,5, disminuyendo las poblaciones a pH inferior a 6,5 (Conh y Mordechani 1970, Prota 1970, Weischer 1974). Se encuentra en todo tipo de suelos por Navas y Arias (1986), desde arenosos a arcillosos, pero con mayor frecuencia en las clases texturales franco-arenosas y franco-arcillo-arenosa, con márgenes de pH comprendidos entre 7,4-8,2 y contenidos de materia orgánica comprendidos entre 2,5-5,5%. También soporta contenidos altos de carbonato, hasta más del 54%, sus poblaciones aumentan con el contenido de arena, encontrándose las poblaciones máximas en suelos con porcentajes de arena entre 59-70%, disminuyendo según aumenta el contenido en carbonato. Por otro lado, en relación con el suelo en La Mancha se ha encontrado en suelos de Cambisol gleico y cálcico, apareciendo una vez en un Luvisol, pero nunca en Solochaks ni Vertisoles (Arias *et al.* 1997b). En suelos de buena permeabilidad *X. index* se encuentra principalmente a profundidades entre 30-50 cm, que corresponden a la zona de máxima densidad de raíces (Weischer 1975, Scotto la Massese *et al.* 1988, Arias *et al.* 1997b), pero puede sobrevivir a profundidades de hasta 3,5 m en ausencia de raíces y a 2 m es frecuente encontrar nematodos portadores del virus (Raski *et al.* 1965).

Weischer (1975) considera que existen muy pocas publicaciones que traten específicamente de la ecología de los géneros *Xiphinema* y *Longidorus*, aunque todos los trabajos sobre ellos incorporan siempre alguna información sobre su comportamiento ecológico, señala que los elementos principales que afectan a estos nematodos son las características del clima, suelo y planta, existiendo interacciones complejas entre los diferentes factores físicos, químicos y biológicos, siendo los más importantes la temperatura, humedad, suelo, clima y estacionalidad, planta y otros factores bióticos; en relación con la temperatura señala que *X. index* muestra muy baja actividad por debajo de los 16 °C, acortándose la duración de su ciclo de vida cuando se aumenta la temperatura entre 16-28 °C, Radewald y Raski (1962) señalan que en California *X. index* puede completar el ciclo en 22-24 días a 24 °C, aunque en condiciones de campo, donde los valores de la temperatura tienen mayor fluctuación, la duración del ciclo puede ser más larga, siendo de 12 a 14 meses en Cerdeña (Prota 1970, Prota y Garau 1973). En Israel completa su ciclo sobre vid en siete a nueve meses a temperaturas de 20-23 °C y de tres a cinco meses a 28 °C (Cohn y Mordechani 1969), sin embargo Coiro y Brown (1984) encuentran que en condiciones experimentales sobre higuera a 18 °C completa el ciclo en 12 semanas. Coiro *et al.* (1990a,b) señalan que las poblaciones de *X. index* tardan 62 días en completar su ciclo de vida a 29 °C sobre higuera y Coiro y Agostinelli (1991) demuestran que *X. index* necesita diez semanas para completar su ciclo sobre *V. vinifera*. Arias *et al.* (1997b) comprueban que en las condiciones de clima mediterráneo continental muestra una sola generación al año, entre marzo y mayo, lo que coincide con las observaciones de Allen *et al.* (1988) y Scotto La Massese *et al.* (1988) en zonas templadas, donde tiene una sola generación al año que completa en 2-3 meses.

La reproducción de *X. index* es partenogenética por lo que un solo juvenil es capaz de desarrollar una población (Dalmasso 1970). Se ha encontrado que su tasa de reproducción es mayor a 29,4 °C (Radewald y Raski 1962). En los viñedos italianos las mayores poblaciones se encuentran durante el verano, las menores entre noviembre y febrero y las hembras grávidas únicamente aparecen en el mes de julio (Amici 1967). El ciclo biológico del nematodo en Chipre se estudia por Phillis (1996) y determina que la puesta de huevos se realiza entre mayo y julio, cuando la temperatura del suelo es de 16,5-19 °C.

Virus causante del entrenudo corto infeccioso de la vid (GFLV). Conocido como “*Grapevine Fanleaf Virus*” (GFLV), es el virus que primero se encontró en el viñedo, causa la degeneración infecciosa de la vid y constituye el mayor problema en todas las zonas vitivinícolas del mundo. Se considera que la enfermedad existe en la cuenca mediterránea desde la implantación de la viticultura (Hewitt 1956) y fue aislado por Cadman *et al.* (1960).

Hewitt (1956) sospechó la naturaleza de enfermedad edáfica de esta virosis y Hewitt *et al.* (1958) descubrieron su transmisión por *X. index*, constituyendo ésta la primera cita de un nematodo como vector de virus; Alfaro y Goheen (1974) establecieron que el umbral para la adquisición del virus por el nematodo es de 5 minutos. *Vitis* spp. es su principal hospedador y posiblemente el único en condiciones naturales (Martelli 1978).

El efecto de la enfermedad varía con la tolerancia del cultivo y las características ambientales, en condiciones extremas de suelos poco profundos, climas cálidos y soleados puede llegar a producir la muerte de las vides. Sin embargo, en otras condiciones las plantas afectadas pueden sobrevivir mucho tiempo con mayor o menor productividad y su reducción depende en cierto grado del clima, suelo, variedades, patrones, etc. Las pérdidas medias estimadas en países europeos para variedades susceptibles de *Vitis vinífera* llegan al 50% de reducción de peso, con depreciación comercial de la uva de mesa. Además los plantones e injertos de plantas enfermas tienen crecimiento débil, escasa capacidad de enraizamiento y dificultad para prender el injerto (Vuittenez 1970).

Sintomatología (Fig. 2). Los síntomas que se le atribuyen son tan variados que dan lugar a cierta confusión, actualmente se considera que síntomas similares son el resultado de la fisiología de la planta y de condiciones genéticas y ambientales (Walter *et al.* 1983). Según Martelli y Savino (1988) la enfermedad se caracteriza por tres tipos de síntomas provocados por distintas reacciones del agente causal:

1. Malformaciones infecciosas. Hojas distorsionadas, asimétricas, con dentaciones agudas, manchas cloróticas, deformaciones foliares y brotes mal formados con ramificaciones anormales; nudos dobles, entrenudos cortos, racimos pequeños, pobres y en menor número de lo normal, maduración irregular con uvas pequeñas. Los síntomas foliares se desarrollan al principio de

la primavera y persisten a lo largo de todo el período vegetativo, aunque pueden enmascararse en verano.

2. Mosaico amarillo, con desarrollo de decoloraciones, amarillo brillante al principio de la primavera, que pueden afectar a todas las partes vegetativas de la cepa (hojas, ramas, pámpanos e inflorescencias).

3. Alteraciones cromáticas de las hojas que varían de pocas manchas salteadas, anillos, líneas, extenso moteado de las venas y/o áreas intervenales, a un amarillo total, en primavera las partes afectadas se distinguen fácilmente a distancia. El follaje y las ramas muestran pocas o ninguna malformación, pero los racimos son pequeños con uvas que no maduran y de coloración débil en las variedades tintas. En climas cálidos, la vegetación en verano retoma su color verde normal y el amarillo se torna blanquecino tendiendo a desaparecer.

4. Bandedo de venas. Se caracteriza por el amarilleo de las venas principales de hojas maduras que se extiende a las áreas intervenales y desaparece a mediados o final de verano, generalmente en un número limitado de hojas. Las hojas cloróticas muestran una ligera malformación. Racimos pobres y producción virtualmente nula (Goheen y Hewitt 1962).

Características generales del GFLV. El virus de la degeneración infecciosa de la vid es un Nepovirus formado por partículas isométricas de unos 30 nm de diámetro con contorno angular y poca resolución de superficie de estructura. Al purificar el virus y someterlo a centrifugación diferencial en gradiente de sacarosa, se separan tres bandas correspondientes a tres tipos de partículas denominadas, en función de su coeficiente de sedimentación: T (*Top*, banda superior), M (*Middle*, banda media) y B (*Bottom*, banda inferior), de 53, 93 y 126 S respectivamente. El diagnóstico serológico puede hacerse por tests convencionales como ELISA, inmuno-electromicroscopía o por técnicas de ácidos nucleicos. El efecto del GFLV sobre el crecimiento y producción del viñedo se encuentra reflejado en numerosos trabajos, entre ellos debemos señalar los de Prota (1961) quien encuentra que las cepas afectadas por este virus son más sensibles a las condiciones ambientales adversas que las sanas; Boubals (1970) comprueba que el número de racimos por cepa enferma se llega a reducir un 42% respecto a la sana, que el número de flores por racimo disminuye a su vez el 41%

y una parte importante de las flores que sobreviven son defectuosas, traduciéndose en corrimiento de uva importante.



Figura 2. Síntomas producidos por el GFLV en vid.

Así mismo, Bovey (1973) y Bovey *et al.* (1980) determinan que la disminución de producción en cepas enfermas por GFLV puede alcanzar hasta un 98%; García de Luján y García Gil de Bernabé (1976) afirman que el desarrollo del GFLV produce una serie de alteraciones en las vides enfermas, tales como corrimiento de racimos que producen la disminución del peso y número de granos, con maduración irregular, achaparramiento de la planta con evidente disminución del vigor y la producción, pudiendo llegar a una total ausencia de racimos, presentando un raquitismo característico y envejecimiento prematuro de la vid que se traduce en pérdidas económicas, además, el vino obtenido de cepas enfermas suele clasificarse como de "calidad inferior". Rüdel (1986) valora entre 44-94% las pérdidas producidas en la variedad Traminer en Alemania. Katsirdakis *et al.* (1989) han demostrado que el porcentaje de granos de polen estériles en vides con GFLV de la variedad Sultanine era de un 23%, mientras que en plantas no infectadas era del 5%. Walter y Martelli (1996) señalan que la disminución de cosecha en cepas infectadas por GFLV es de un 75% en la variedad Chardonnay. En plantas con GFLV la fotosíntesis está ralentizada con respecto a plantas no infectadas, el diámetro del tronco y de las bayas es menor, la producción de raíces más débil, el contenido de azúcar de los frutos es ligeramente superior y ni el pH ni la acidez de los mostos han mostrado diferencias (Auger *et al.* 1992). Con respecto a la producción de plantas de vivero la disminución de madera recolectada en porta injertos inoculados con GFLV puede ser de un 46%, variando la cifra según las variedades (Babini *et al.* 1981). Igualmente se ha comprobado que el GFLV tiene un efecto negativo sobre el crecimiento y la producción de raíces de las plantas multiplicadas "*in vitro*" (Barba *et al.* 1993).

En España "el entrenudo corto infeccioso de la vid" (GFLV) se cita por primera vez como enfermedad vírica por Marcilla Arrázola (1942) y Fernández de Bobadilla (1948, 1950) quienes describen la sintomatología en viñedos de Jerez, pero las primeras publicaciones sobre la presencia del virus en España se deben a Alfaro (1971) y Fijo y Arias (1976) quienes detectan la enfermedad asociada al nematodo vector *X. index*. La enfermedad ha sido encontrada en la mayoría de las zonas vitícolas españolas basándose en diagnósticos visuales, en La Rioja (Díaz Yubero y Esteban 1973 y Provedo y Fernández Sevilla 1973), en Jerez (Fijo y Arias 1976, García de Luján y Gil de Bernabé 1976), en Montilla-Moriles (Pérez Camacho 1981), y en Murcia (Padilla 1989), además Ayuso y Peña Iglesias (1973), Arias *et al.* (1993), y Arias y Fresno (1994) lo citan en otras regiones; pero son Arias *et al.* (1994) y García

Benavides *et al.* (1994) quienes realizan estudios utilizando métodos serológicos (ELISA) y biotecnológicos (PCR, ICPCR) para la detección de los virus, demostrando que el virus se encuentra disperso en todas las zonas estudiadas en Canarias, Castilla y León, Galicia, La Mancha y Murcia.

La importancia del GFLV en España ha sido valorada por Peña Iglesias (1972), afirmando que el 20% del viñedo español manifestaba problemas graves debidos al virus; en 1989 señaló que el GFLV infectaba al 90% de las cepas de las variedades Cayetana Blanca y Garnacha, al 87% Macabeo, 85% Airén, 75% Tempranillo, 60% Xareló, 49% Palomino, 45% Pedro Ximénez y 5% Monastrell, afectando al 67% de ellos, dando lugar a pérdidas de al menos 364 millones de dólares.

Mecanismos de transmisión del GFLV. En condiciones de campo el GFLV solamente se ha encontrado en vid (Martelli 1978), pero experimentalmente tiene una gama amplia de hospedadores, que comprende unas 30 familias botánicas. Se transmite fácilmente a plantas herbáceas por inoculación de savia, de vid a vid a través de material vegetal infectado y, de acuerdo con su naturaleza de Nepovirus, por los nematodos vectores *X. index* y *X. italiae* (Hewitt *et al.* 1958, Cohn *et al.* 1970). Es suficiente que el nematodo se alimente una sola vez en una planta infectada por un período de cinco minutos para adquirir el virus (Alfaro y Goheen 1974), aunque períodos superiores favorecen la eficacia de la transmisión.

X. index retiene el virus durante más de ocho meses en ausencia de planta huésped, hasta tres meses si se alimenta en plantas hospedadoras inmunes al virus y varios años en presencia de restos de raíces de vid. El virus se retiene en la capa cuticular del lumen del esófago del vector, donde puede observarse, por microscopía electrónica, en una sola capa a lo largo del mismo (Taylor y Robertson 1970, Raski *et al.* 1973), tanto los adultos como los estados juveniles pueden transmitir el virus.

La dispersión del GFLV por nematodos es lenta, debido al movimiento limitado del vector (1,3-1,5 m/año), que hace que no sean agentes de dispersión eficaces, aunque no hay que olvidar el crecimiento de las raíces, por ello su importancia está en mantener la infección durante períodos largos, mientras que la propagación a distancia se realiza a través de material vegetal, mediante el arrastre de tierra y raíces con los aperos de cultivo.

A pesar de la existencia del virus en Europa, desde los comienzos de la viticultura, su diseminación comenzó a finales del siglo XIX con la introducción de la vid americana para el control de la filoxera, al no transmitirse por semillas de vid su principal reservorio en la naturaleza es la vid misma, debido a que las raíces permanecen en el suelo muchos años después de eliminar la cepa madre infectada, pueden constituir la fuente de inóculo para los vectores en el intervalo que va desde que se levanta un viñedo y se implanta el siguiente, por lo que los procesos tradicionales de arranque e implante, si no se realizan correctamente, no son efectivos.

El virus se ha encontrado en el endospermo de semillas de vid infectada, pero no en el embrión ni en el polen de vid y en plantas herbáceas cuyas semillas son capaces de transmitirlo (Cory y Hewitt 1968). *Chenopodium amaranticolor*, *Ch. quinoa*, *Cucumis sativus*, *Gompherena globosa* y *Phaseolus vulgaris* pueden ser reservorios del virus en la naturaleza y se vienen utilizando conjuntamente con especies susceptibles de *Vitis* (*V. rupestris* var. St. George) como plantas indicadoras para la detección del virus y como fuentes para la purificación del mismo.

La mayoría de los estudios sobre relación virus-vector se han llevado a cabo para *X. index*-GFLV, que es una de las transmisiones mejor estudiadas. Todas las fases de desarrollo del nematodo tienen capacidad infectiva (Raski y Hewitt 1963, Cohn *et al.* 1970), aunque durante el período de desarrollo los estados juveniles pierden su infectividad entre una y otra fase, al cambiar la capa cuticular del esófago durante las mudas. De cualquier modo, la eficacia de transmisión se incrementa considerablemente con el tiempo de adquisición y con el número de individuos utilizados en el test.

La transmisión de Nepovirus por vectores es específica, cada especie de nematodo transmite un virus, así *X. diversicaudatum* transmite el ArMV pero no GFLV a la inversa que *X. index*, aunque virus serológicamente diferentes pueden tener un mismo vector, ArMV y SLRV se transmiten por *X. diversicaudatum*, y aislados diferentes de un mismo virus pueden transmitirse por especies diferentes de un mismo género, serotipos escoceses de RRV y TBRV se transmiten por *L. elongatus*, mientras que los ingleses tienen sus vectores en poblaciones de *L. microsoma* y *L. attenuatus* respectivamente (Harrison 1964). Incluso existe el caso de que un virus pueda tener dos

vectores pertenecientes a géneros distintos, como PRMV que puede transmitirse por *X. americanum* y *L. diadecturus* (Allen *et al.* 1982).

Esta asociación específica entre el virus y el vector parece relacionar la proteína de la cápsida del virus que interactúa, con la cutícula del aparato digestivo del nematodo vector en el punto de fijación del virus, odontóforo y esófago (Roberts y Brown 1980, Brown y Trudgill 1983, Brown *et al.* 1995), que parece ser debida a la capa de hidratos de carbono, que tapiza de manera discontinua odontóforo y esófago, que puede reconocer las moléculas de lecitina de la proteína de la cápsida del virus (Robertson y Henry 1986). Las diferencias en la eficacia de transmisión de un virus por distintas poblaciones de un nematodo hacen pensar en la existencia de razas biológicas, sobre todo en especies de distribución geográfica amplia, que no muestran diferencias morfológicas significativas para considerarlas especies distintas y además hibridan entre si (Brown y Topham 1985, Brown y Taylor 1987); la capacidad para transmitir virus parece ser hereditaria siendo controlada por un único gen. Las diferencias en la eficacia de transmisión entre las distintas poblaciones indican la posible existencia de diferencias biológicas que no son suficientes para considerarlas especies distintas (Brown 1986).

La mayor parte de las citas sobre transmisión de virus se han basado en pruebas experimentales en las que se ponía un cierto número de individuos del nematodo presunto vector en contacto con plantas infectadas de virus durante un período mas o menos largo, para transferirlas posteriormente a plantas herbáceas susceptibles al virus. Las transmisiones obtenidas de este modo estaban influenciadas por una serie de factores que pueden enmascarar la transmisión, por lo que se consideró la conveniencia de establecer un criterio único en las pruebas experimentales para comprobar la transmisión, entre las metodologías propuestas se viene aplicando la propuesta de Trudgill *et al.* (1983), por ser la más sensible que permite detectar pequeñas diferencias en la eficacia de transmisión en cada etapa del proceso (adquisición, retención y transmisión), se establecen como pasos fundamentales que el virus y el nematodo deben estar correctamente identificados, debe comprobarse que las plantas cebo se han infectado como consecuencia del test y que el nematodo es la única fuente posible de infección.

El diagnóstico correcto del GFLV es de gran importancia para el establecimiento de nuevas asociaciones virus-vector, se ha venido realizando tradicionalmente en base a observaciones visuales o mediante la inoculación en plantas hospedadoras sensibles, que dan una respuesta rápida con sintomatología clara y bien conocida. La inoculación puede realizarse mediante nematodos vectores, por injerto o por inoculación mecánica de la savia. Sin embargo, las infecciones cruzadas pueden inducir a error y en programas de "indexaje" y mejora se precisan métodos mas sensibles, seguros y rápidos, por lo que se han desarrollado técnicas serológicas de inmuno ensayo, que han adquirido un papel clave en el diagnóstico de virus en tejidos vegetales, por ser sensibles, específicas y fácilmente aplicables a un número grande de muestras.

La técnica ELISA (*Enzyme-Linked-immunosorbent Assay*) se utilizó por primera vez en virus vegetales para la detección del virus de la Sharka "*Plum Pox Virus*" (PPV), y desde entonces se viene aplicando en la detección de GFLV en vid (Gonsalves 1979, Ramsdell *et al.* 1979, Bovey 1980, Englebrecht 1980, Jiménez y Goheen 1980, Tanne 1980, Clark 1981, Shanmuganathan y Fletcher 1982). Esta técnica muestra las ventajas sobre las técnicas convencionales de ser cómoda, rápida y de gran sensibilidad, siendo útil para la detección de virus en mezclas de muestras sanas y enfermas en porcentajes de infección pequeños, su potencialidad permite su aplicación en estudios epidemiológicos y en el certificado de material de propagación, como complemento de la selección visual (Clark y Adams 1977, Barba *et al.* 1978, Lister 1978, Bovey 1980, Nolasco 1982, Rüdell *et al.* 1983, Walter *et al.* 1983), y en la detección del virus en el nematodo vector (Bouquet 1983, Fresno y Arias 1993).

Al ser una técnica serológica con gran especificidad en reacciones antígeno-anticuerpo a veces dificulta los ensayos de diagnóstico, ya que para diferentes estirpes de un virus a veces se requieren sueros distintos. Para facilitar la técnica Van Regenmortel y Burckard (1980) y Clark (1981) recomiendan el ELISA indirecto que no requiere la obtención de sueros conjugados para distintos virus y Rowhani *et al.* (1992) aplican una modificación del F(ab')₂ ELISA que es, a su vez, una modificación del ELISA indirecto, con mayor sensibilidad para la detección de GFLV, y debido a la naturaleza ácida de los tejidos de la vid, ensaya diferentes tampones de extracción, concluyendo que la absorbancia de GFLV aumenta si se mantiene

un pH 7,0-7.5 a lo largo del ensayo. También Mendoza *et al.* (1980) utilizan tampones con nicotina para visualizar partículas virales directamente por microscopio electrónico. Los procedimientos más utilizados son ELISA-DAS “*double antibody sandwich*” (Clark y Adams 1977); ELISA indirecto y ELISA indirecto sandwich o TAS (“*triple antibody sandwich*”) (Koenig y Raul 1982, Chu *et al.* 1989).

Se han desarrollado otras técnicas que utilizan sondas de DNA (Fuchs *et al.* 1991), la hibridación del ácido nucleico del virus, con sondas complementarias del mismo marcadas radioactivamente o con sondas colorimétricas (biotina), que inicialmente se realizaban en solución pero actualmente se llevan a cabo sobre membranas de nitrocelulosa o nylon, por su capacidad de fijar ácidos nucleicos (Hull 1984). Ambas permiten procesar gran número de muestras de manera rápida, sensible y específica, con la ventaja de las hibridaciones de tener una sensibilidad unas 100 veces mayor para virus purificados (Chu *et al.* 1989), y detectar el genoma o parte del mismo, según la longitud y la naturaleza de la sonda que se utilice, mientras que el ELISA solo detecta la proteína de la cápsida, y con la desventaja de requerir mayor complejidad de instalaciones, uso de material radiactivo y mayor especialización, inconvenientes que se soslayan, en parte, con el uso de sondas no radiactivas menos sensibles (Donovan *et al.* 1987).

En la actualidad se están empleando otras técnicas de gran sensibilidad en el diagnóstico de virus, la reacción de la polimerasa en cadena, “*Polimerase Chain Reaction*” o PCR (Saiki *et al.* 1988), es 10^7 veces más sensible que el Dot-Blot (Borja y Ponz 1992). Por esta técnica se amplifica el número de copias de un fragmento de DNA o cDNA del virus elevándola hasta niveles detectables, mediante la enzima DNA polimerasa, estable a temperaturas altas (Chu *et al.* 1989), con la ventaja de no ser necesario partir de virus purificado, pudiéndose realizar con extractos de savia bruta (Borja y Ponz 1992), de gran sensibilidad y especificidad, de ser fácilmente automatizable y permitir su aplicación a la detección de virus en un solo nematodo vector o en casos en que la titulación del virus es muy baja o se presenta de forma irregular en una planta. El método de inmunocaptura-reacción de la polimerasa en cadena (ICPCR) (Nolasco *et al.* 1992) que combina el PCR con la técnica ELISA, con la ventaja de ser más operativo que el primero y más sensible que el segundo, se ha experimentado con resultados satisfactorios

para la detección del virus en planta a grandes diluciones y en un solo nematodo.

Se ha venido considerando que la facilidad de detección del virus dependía de la época del año, siendo más alta en junio y menor en diciembre y marzo (Bovey *et al.* 1980, Nolasco 1982, Rüdel *et al.* 1983); sin embargo, el virus se puede detectar en diferentes partes de la planta a lo largo de todo el año, así como en los nematodos vectores (Fresno y Arias 1993). Por otro lado, Rowhani *et al.* (1992) encuentran diferencias en los valores de la absorbancia con $F(ab')_2$ entre los distintos tejidos de la planta a lo largo del año; los brotes apicales pasan de máximos en mayo a mínimos en septiembre, las hojas maduras solo dan valores altos en mayo que decrecen rápidamente manteniéndose bajos el resto de la estación, en madera triturada las lecturas son moderadas a lo largo de la estación, aunque se han encontrado diferencias en la gravedad de la sintomatología entre las cepas afectadas por GFLV de una misma viña, con predominio de uno u otro síntoma, así como en una misma cepa en distintos años con diferencias en la titulación del virus; observándose en la mayoría de los viñedos los tres tipos de síntomas, se considera por tanto, que es preciso establecer niveles de confianza para trabajos de rutina.

II.3. Epidemiología de los nematodos vectores de virus de la vid en España

Se han encontrado 11 especies de nematodos posibles vectores de virus en España, pero solo se consideran de interés desde el punto de vista de la replantación del viñedo *X. index*, vector del GFLV citado en 106 ocasiones con una distribución amplia, y *X. diversicaudatum* vector del ArMV que está localizado en el Noroeste de la Península, Galicia, León y La Rioja y que puede tener una distribución más amplia en la mitad norte peninsular (Arias *et al.* 1985, 1986, 1997b). Por otro lado, hay que considerar las citas de *X. rivesi* en Madrid, Ciudad Real, El Hierro y La Gomera, aunque recientemente se ha encontrado que está ampliamente distribuida en la zona sur de la Península (Fig. 3); *X. vuittenezi* por haber sido citado en viñedos europeos asociado al GFLV y *X. coxi* por haberse encontrado asociado a este virus y al “*Strawberry Latent Ringspot*” (SLRV) en Europa Central. Sin embargo el único nepovirus encontrado en España en vid es el GFLV, por ello nuestro estudio se centra

principalmente en la caracterización epidemiológica de *X. index* y su correlación con el virus.

X. americanum ha sido citado en tres ocasiones asociado a olivar en Granada y en hospedador desconocido en la provincia de Salamanca. La revisión del material original de la provincia de Salamanca ha permitido comprobar que dichos ejemplares pertenecen a *X. pachtaicum*, el material original de olivar en el camino del Fargue (Granada) no pudo ser revisado, pero debido al año en que se realizó la cita (1956) debe considerarse como *X. americanum s.l.*, en tanto no se compruebe su identidad correcta, aunque sin duda debe tratarse de *X. pachtaicum*, que es la especie más frecuente en olivar y está ampliamente distribuida en ambientes mediterráneos.

X. diversicaudatum se encuentra en la mitad norte peninsular, de acuerdo con su distribución en Europa, se ha encontrado en 51 ocasiones, principalmente asociado a frutales y en ambientes naturales. Su presencia en nuestro país se considera importante puesto que es vector del ArMV, que está relacionado serológicamente y con una sintomatología similar a la causada por el GFLV, con el que puede encontrarse en infecciones mixtas en los viñedos de Europa, y aunque no se ha citado en España podría hallarse en los viñedos de Castilla y León, Cataluña y Galicia. Se destaca pues la asociación de *X. diversicaudatum* a frutales (18 citas) y ambientes naturales (31), con diez citas en ambientes naturales de Cataluña, de las que ocho corresponden a Barcelona y una a Gerona, 18 citas corresponden a frutales de Zamora (siete), Ávila (seis), La Rioja (dos), y Burgos, Cáceres y Salamanca (una). El resto aparecieron en ambientes naturales de Madrid, Salamanca, Segovia, Teruel y Toledo. Así mismo, hay que destacar su presencia en viñedos de Toledo y en los de Arbó, Cambados, Ribadumia, Salvaterra do Miño, Tomiño y Tuy en Galicia.

Por otro lado, **la vid junto a la higuera son los principales hospedadores de *X. index***, que son dos especies vegetales que aparecen frecuentemente asociadas. El nematodo se desarrolla muy **bien en higuera**, donde alcanza poblaciones numerosas y se mantiene durante mucho tiempo, además los ejemplares portadores de GFLV pierden su capacidad infectiva al alimentarse de la higuera, sin que lleguen a transmitirle el virus. En consecuencia, en aquellos viñedos donde existen higueras, estas constituyen un buen

reservorio para el nematodo, donde se mantienen sus poblaciones en las etapas entre plantaciones consecutivas. Se ha encontrado en España asociado a otras especies vegetales (44 citas) fundamentalmente en frutales y esporádicamente en cultivos hortícolas y cereales. En la revisión del material original correspondiente a las referencias de distintas especies de roble, se ha comprobado que dichos ejemplares se corresponden con juveniles de *X. diversicaudatum*, por lo que dichas referencias deben considerarse erróneas. Así mismo, en estudios realizados en Jumilla (Murcia), en 20 muestras de olivar y almendro, que son especies vegetales frecuentemente asociadas al viñedo en la agricultura mediterránea, no se ha encontrado *X. index*, lo que parece confirmar que sus principales hospedadores son vid e higuera. Presenta una distribución amplia en la Península (Fig. 3). Se suprime también la cita de la referencia de *X. index* en *Citrus sinensis* en Madrid (capital) por tratarse de un cultivo experimental y, además, en el análisis de 422 muestras de suelo de cítricos de Castellón de la Plana, no apareció esta especie (Bello *et al.* 1985).

X. rivesi apareció en 70 ocasiones con una distribución amplia en mitad suroriental de la península, asociado principalmente a frutales y ambientes naturales (Fig. 3). Al igual que ocurre con *Longidorus attenuatus*, *L. elongatus* y *L. macrosoma*, estas especies deben tenerse en cuenta para el caso de la posible introducción de los virus que transmiten en vides americanas.

X. index es el principal vector de GFLV, ambos patógenos tienen una distribución mundial asociada al viñedo, con una distribución amplia en la España Peninsular y en el archipiélago Canario, en todos los climas desde el eurosiberiano en Galicia al mediterráneo más árido en Murcia (Fig. 3). Goitia (2004) aporta nuevas citas de este nematodo en Alicante (una cita), Ávila (dos), Badajoz (siete), Burgos, Cádiz, Cuenca y Gran Canaria (una), Murcia (dos), Pontevedra (tres), Tenerife (ocho), Valladolid (una), Zaragoza (dos) y Zamora (seis).

X. italiae, que se ha comprobado experimentalmente que es vector del virus pero en campo tiene una efectividad menor, es un nematodo ampliamente distribuido en la cuenca mediterránea que aparece frecuentemente asociado a nuestros viñedos. Se dan nuevas citas en Murcia (siete) y Pontevedra (seis).

X. diversicaudatum es el vector del Virus del Mosaico del Arabis (ArMV) que se encuentra en vides europeas, su presencia en Galicia, León y La Rioja (Fig. 3) hace suponer que puede tener una distribución más amplia en la mitad norte peninsular, donde se dan los climas templados más adecuados para su desarrollo.

La cita de *X. mediterraneum* en Jerez (Cádiz) por Tobar Jiménez y Pemán Medina (1970), pertenece a *X. pachtaicum* que es una especie que se encuentra ampliamente distribuida en áreas de clima mediterráneo, incluidas las zonas áridas debido a que soporta bien la sequía. Aunque se ha encontrado asociada a vides con síntomas de GFLV, no se ha comprobado que sea vector del virus e incluso se ha utilizado como control negativo en tests de diagnóstico. Se considera que pertenecen a esta especie las citas de *X. mediterraneum*, ya que ambas especies fueron sinonimizadas por Lamberti y Siddiqi (1977).

X. ingens se ha encontrado principalmente en la Región Central, con una cita en Jaén y otra en Valencia, asociado tanto a vid como a ambientes naturales, y *X. vuittenezi* con una cita en Valencia y otra en Murcia, nunca se han encontrado asociados a la presencia de virus. Por último, *X. vuittenezi* que se ha encontrado asociado al GFLV en viñedos europeos pero no está comprobado como vector; *X. coxi* se ha encontrado asociado a este virus y al "Strawberry Latent Ringspot" (SLRV) en Europa Central, pero su transmisión tampoco se ha comprobado experimentalmente.

Por todo ello, se han encontrado en los viñedos españoles 21 especies de nematodos de la familia Longidoridae, que incluye los posibles vectores de nepovirus para estos cultivos, la especie más frecuente es *X. pachtaicum* con 314 citas, seguida de *X. index* (106), *X. italiae* (73), *X. rivesi* (70), *X. diversicaudatum* (10), *Longidorus belloi* (8), *X. ingens* (4), *X. pseudocoxi*, y *X. turcicum* (3), *L. macrosoma* y *X. sahelense* (2), *L. attenuatus*, *L. elongatus*, *X. coxi europaeum*, *X. neovuittenezi*, *X. pyrenaicum* y *X. vuittenezi* (una). De las especies de longidóridos encontradas en viñedo solo *L. attenuatus*, *L. elongatus*, *L. macrosoma*, *X. diversicaudatum* y *X. rivesi* se pueden considerar como transmisores de virus al viñedo, solo *X. diversicaudatum* y *X. rivesi* aparecen en más de cinco localidades, encontrándose *X. diversicaudatum* únicamente en viñedos de Toledo, La Rioja y Galicia (Fig. 3).

Respecto a otros nematodos vectores de otros virus, deben tenerse en cuenta, en primer lugar, *X. diversicaudatum* por ser vector del Virus del Mosaico del Arabis (ArMV) en las vides europeas, *Longidorus macrosoma* y *L. elongatus* vectores del “*Raspberry Ringspot Virus*” (RRV), *L. attenuatus* y *L. elongatus* que transmiten el “*Tomato Black Ring*” (TBRV), pero se encuentran muy localizados y se considera que por el momento no representan un problema para las zonas vitivinícolas españolas. Entre los vectores de virus en vides americanas se han encontrado *X. rivesi* vector del “*Tomato Ringspot*” (ToRSV) y *L. elongatus* que transmite el “*Peach Rosette Mosaic*” (PRMV). Sin embargo, las citas de *X. americanum*, vector del TRSV y el ToRSV en vides americanas en el Condado de Huelva y en El Penedés de Werland–Ardaiz y Pérez Camacho (1993) y Ripoll (1980) respectivamente, deben considerarse erróneas, ya que los nuevos muestreos realizados en la zona ponen de manifiesto que se trata de *X. pachtaicum*, que pertenece a *X. americanum* s.l., que constituye un grupo formado por más de 15 especies, entre las que se incluye *X. pachtaicum* (Lamberti y Bleve Zacheo 1979). Esta comprobación tiene interés por el hecho de que *X. americanum sensu stricto* es un nematodo de cuarentena en Europa.

X. index y el GFLV tienen una distribución mundial que coincide con la del cultivo de la vid, que es el principal hospedador de ambos, ya que el GFLV en campo solamente se ha encontrado en este cultivo (Martelli 1978). La distribución de *X. index* en España indica que este nematodo parece ser específico de la vid, donde existen más de 100 citas, siendo sus hospedadores alternativos la higuera (11 citas) y, en menor grado frutales, manzano (tres citas), albaricoquero, ciruelo, melocotonero y peral. Llama la atención el que no aparezca en almendro ni olivo, que son cultivos frecuentemente asociados con la vid en la agricultura mediterránea. Estas observaciones están de acuerdo con los resultados de Moral del (1996) en el estudio de la distribución de este nematodo en las series de vegetación de la cuenca del Guadiana, donde de 22 especies vegetales muestreadas, incluyendo vid, higuera y frutales, así como especies de ambientes naturales, *X. index* aparece en el 16% de las muestras de higuera, en el 12,5% de las de vid y una sola vez (0,9%) en peral. Tampoco se ha encontrado en el estudio de 422 muestras de suelos de cítricos analizadas en Castellón de la Plana por Bello *et al.* (1985).

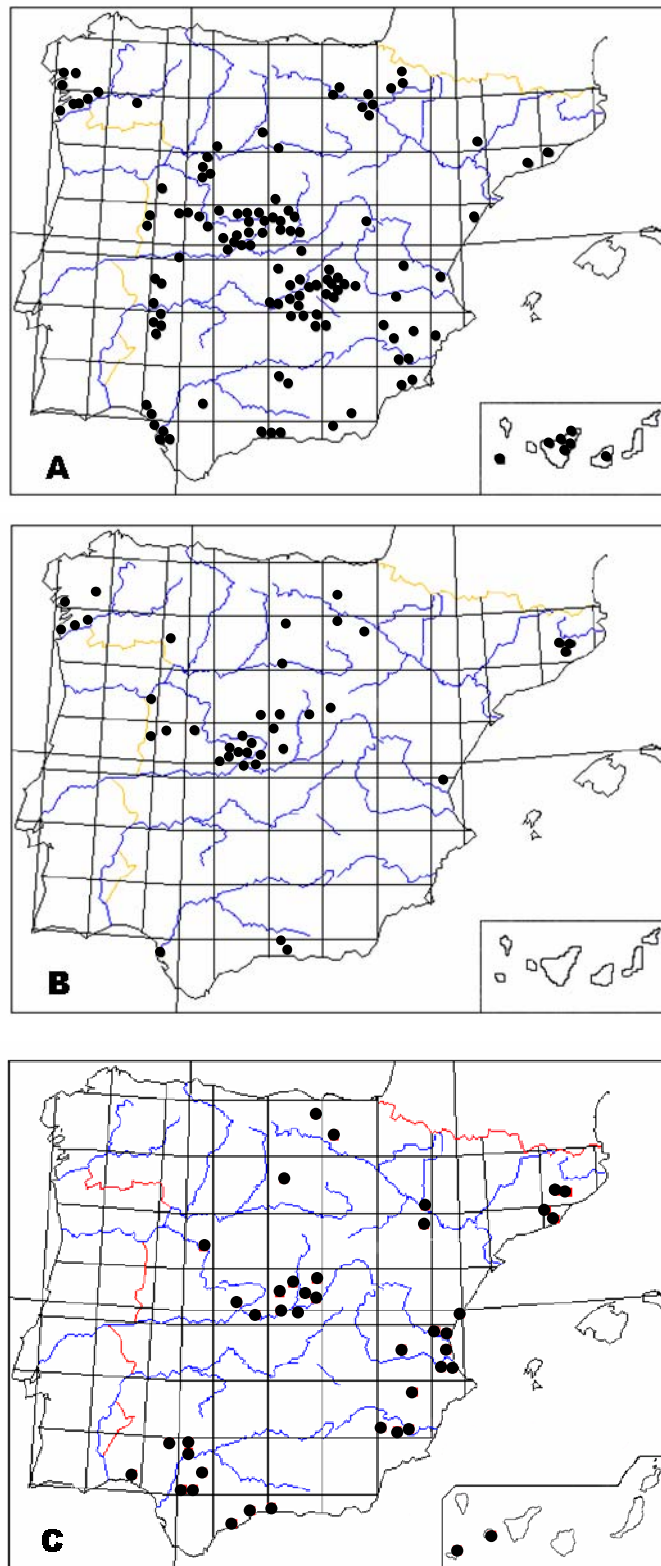


Figura 3. Distribución: A. *X. index*, B. *X. diversicaudatum*, C. *X. rivesi*.

Del resto de los nematodos vectores de virus de la vid destaca en primer lugar *X. diversicaudatum*, con una distribución principalmente en el Centro y Norte de la Península, que nos muestra que este nematodo es un claro componente biogeográfico de la región Eurosiberiana (Rivas Martínez 1987), así como *X. rivesi* que se encuentra ampliamente distribuido por todo el país, las restantes especies se han encontrado en raras ocasiones en vid: *L. attenuatus* y *L. elongatus* (una cita) y *L. macrosoma* (dos citas). Sin embargo se han encontrado en otros cultivos: *L. attenuatus* (seis citas), *L. elongatus* (cuatro), *L. macrosoma* (cinco), *X. diversicaudatum* (51) y *X. rivesi* (70). Se considera que no tienen interés como transmisores de virus las siguientes especies que han aparecido asociadas a los viñedos españoles: *L. belloi*, *X. ingens*, *X. pachtaicum*, *X. pseudocoxi*, *X. pyrenaicum*, *X. sahelense*, *X. turcicum* y *X. vuittenezi*. Por último, entre los nematodos transmisores de virus de la vid no se han encontrado las especies siguientes: *L. apulus*, *L. diadecturus*, *L. fasciatus*, *X. americanum* y *X. californicum* (Goitia 2004).

Nematodos vectores de virus en la vid por Autonomías en España. En La Comunidad de Andalucía, los primeros trabajos corresponden a Jiménez Millán *et al.* (1965), encontrándose en estudios posteriores GFLV y *X. index* asociado a los síntomas del virus en Jerez y Manzanilla-Sanlúcar de Barrameda (Alfaro 1971, Fijo y Arias 1976, García de Luján y Gil de Bernabé 1976). En la de Montilla-Moriles se ha estudiado la importancia y distribución de enfermedades de etiología supuestamente viral, en base a diagnósticos visuales, pero no se ha comprobado serológicamente la presencia del virus ni se ha encontrado *X. index*. En el Condado de Huelva no se ha encontrado ninguno de los dos patógenos (Pérez Camacho 1981), pero en los parrales de Almería se encuentran ambos (Arias *et al.* 1985, Guerrero *et al.* 1989). Por otro lado, han aparecido *L. attenuatus*, *X. index* y *X. rivesi* asociados a frutales y hortícolas, *L. macrosoma* y *X. diversicaudatum* en ambientes naturales, lo que indica la posible presencia y riesgo de introducción de los virus que transmiten.

En Aragón existen datos de la presencia de *X. index* en dos localidades de la DO de Cariñena, y de GFLV en una localidad de Zaragoza y otra de Huesca, también se ha encontrado *X. index* asociado a frutales de Huesca y Teruel. Por otro lado *X. diversicaudatum* está citado en ambientes naturales, y *X. rivesi* en Aula Dei (Zaragoza). Se indica la posibilidad de dispersión del GFLV

y el riesgo de introducción del ArMV (Pinochet y Bergua 1983, Arias *et al.* 1985).

En **Canarias** el GFLV está ampliamente extendido en todas las islas, incluso en plantaciones jóvenes, así como *X. index* que se encuentra en mayor abundancia en higueras, y en los suelos con alto contenido de humedad, si bien no apareció el nematodo en los viñedos cultivados sobre sustratos volcánicos en ambientes xéricos (Bello 1969, Arias *et al.* 1993, Arias 1998). Por otro lado, Espino *et al.* (1995, 1996) confirman las observaciones de R. Rodríguez, quien en el año 1990 señala el bajo rendimiento de las cepas afectadas por el nematodo, y encuentran GFLV en el 1,47%, pero solo en dos zonas del norte de la isla de Gran Canaria. Fresno *et al.* (1993) indican que la tradicional forma de cultivo de la vid en Canarias, sobre cenizas volcánicas, impide la extensión de la enfermedad en Lanzarote, La Palma, El Hierro y sur de Tenerife. No ocurre lo mismo en los viñedos de Gran Canaria, ubicados en zonas de "laurisilva" con alto contenido de humedad en el suelo y en el ambiente. Arias *et al.* (1997a) indican que *X. index* está ampliamente extendido en todo el Archipiélago fundamentalmente en higueras, en suelos con alto contenido de humedad, por otro lado se ha encontrado *X. rivesi* en las islas de El Hierro y La Gomera.

Castilla-La Mancha es la Comunidad mejor estudiada y con mayor superficie dedicada al viñedo (Fernández Martínez 1993). A esta región corresponden el 36% de las citas de *X. index*, sin embargo la baja frecuencia y abundancia relativa de nematodos en la zona, corrobora la hipótesis de que sus características agroambientales condicionan la aparición de problemas fitopatológicos graves, limitando el desarrollo de plagas y enfermedades y, por lo tanto, permitiendo el diseño de sistemas agrarios de gran calidad ambiental, entre los que destacan los viñedos (Navas 1984, Bello *et al.* 1985, 1990, 1996), que también está de acuerdo con las observaciones de Arias *et al.* (1994, 1997a,b) quienes encuentran *X. index* con una incidencia de solo el 14%, pero con un 29,6% de incidencia virus-vector, lo que indica su importancia en la epidemiología del virus, aunque el GFLV aparece con una incidencia máxima del 12% ($\pm 0,025$), porcentaje muy inferior al que se venía estimando en base a diagnósticos visuales (Peña Iglesias 1972).

Debido a las características agroambientales de Castilla-La Mancha los focos de GFLV-*X. index* se mantienen en rodales muy localizados, que se extienden muy lentamente bajo las técnicas agrícolas tradicionales, donde los nematodos se encuentran en poblaciones muy pequeñas y muestran muy baja movilidad, por lo que la importancia de los nematodos está principalmente en mantener la infección en el campo por períodos largos. La modificación de las técnicas agrarias, principalmente aquellas que influyen sobre la humedad de los suelos y la temperatura, pueden implicar riesgos derivados de la distribución potencial de los organismos patógenos, puesto que estos factores ambientales influyen en el desarrollo de *X. index* de manera que su ciclo de vida varía de dos a 14 meses, dependiendo principalmente de la temperatura y el desarrollo estacional de la planta huésped (Allen *et al.* 1988, Scotto La Massese *et al.* 1988, Arias *et al.* 1997a,b), siendo el contenido de humedad del suelo otro de los factores más limitantes para el desarrollo de sus poblaciones, que aumentan considerablemente con la introducción de regadío (Arias *et al.* 1993, 1997a,b).

En los viñedos donde se ha introducido regadío, se observa la aparición generalizada de síntomas, como mosaico amarillo, bandeado de venas, deformación de madera, corrimiento de uva, etc., junto a un considerable incremento de las poblaciones de *X. index* y en consecuencia de la dispersión de GFLV. También influye la instalación de riego en la presencia de nematodos en los horizontes superficiales del suelo incluso en los períodos de mayor calor, en contraste con lo que ocurre con el manejo tradicional del viñedo, donde las poblaciones de nematodos son muy bajas y en los períodos de mayor temperatura solo se encontraba algún individuo en los horizontes argílicos más profundos, donde se mantiene la escasa humedad del suelo, muriendo cuando llegan a la costra de carbonato cálcico que es característica de los suelos de La Mancha. Por lo tanto, la actual modificación de las técnicas de manejo de viñedo en esta Comunidad puede contribuir al incremento de estos patógenos (Arias *et al.* 1997b). La presencia de *X. diversicaudatum* en la Sierra de San Vicente (Toledo) se considera puntual dada su baja frecuencia y máxime cuando es un nematodo de climas templados, estando su límite meridional de distribución en esta zona (Navas 1979, Navas *et al.* 1988), a pesar del gran número de plantas examinadas no se ha encontrado el ArMV, también se ha encontrado *X. rivesi* en Albacete, Ciudad Real y Toledo.

Castilla y León, tienen una superficie dedicada al viñedo superior a las 60.000 ha. En las DO del Bierzo, Cigales, Ribera de Duero, Rueda y Toro, así como en la denominación específica Cebreiros se ha encontrado GFLV con un 12,8% de incidencia, siendo El Bierzo la menos afectada por la virosis y Toro la de mayor incidencia, con un 48%, las restantes DO se sitúan entre el 9% y 19%, en Cigales, Toro y Cebreiros no se encontró ningún municipio libre de virus. La presencia del nematodo vector aparece correlacionada con la virosis en el 31% de las muestras, pero en el 50% de las estudiadas en Toro. Ni en El Bierzo ni en Rueda hay presencia del nematodo (García Benavides *et al.* 1994). Sin embargo, la presencia de *X. index* en otros once hospedadores y teniendo en cuenta la distribución espacial de estos organismos a lo largo de las distintas estaciones del año es muy probable que la incidencia del nematodo vector sea superior al encontrado, tal y como indican Arias y Fresno (1994).

La presencia en hospedadores alternativos de *X. diversicaudatum* en 15 ocasiones, nematodo frecuente en Europa y ampliamente distribuido en la mitad norte de la Península por ser un nematodo de ambientes templados transmisor del ArMV, presupone un posible riesgo de introducción y dispersión de este virus (Arias *et al.* 1985, 1986, Díez Rojo *et al.* 2006). Así mismo, la presencia de *L. attenuatus*, *L. elongatus*, *L. macrosoma* y *X. rivesi* en hospedadores alternativos indica también el riesgo que estos nematodos conllevan para la introducción de virus de vides americanas.

En las DO de **Cataluña** se ha encontrado *X. index* en tan solo dos localidades de El Penedés y, aunque se ha encontrado el GFLV, no existen datos de su posible correlación. Conviene indicar que la cita de *X. mediterraneum* (Pinochet y Cisneros 1986) debe modificarse por pertenecer a *X. pachtaicum* (Lamberti y Siddiqi 1977), a pesar de que este nematodo no es vector de virus. También debe considerarse errónea la cita de *X. americanum* en viñedos en Cerdanyola del Vallés (Ripoll 1980, Ripoll y Mínguez 1984), puesto que en los muestreos realizados para su comprobación se ha confirmado que en realidad se trata de *X. pachtaicum*. Por último, la presencia de *X. diversicaudatum* en ambientes naturales (Escuer y Palomo 1991, Escuer 1995) y de *X. rivesi* asociado en hospedadores alternativos indica el riesgo de introducción del ArMV y TRSV respectivamente.

En **Tierra de Barros** (Badajoz) se ha encontrado *X. index* correlacionado con GFLV con una incidencia superior al 10%, estando el virus en un 29% de las muestras afectando a la producción y a la longevidad de las cepas portadoras de virus, que mueren prematuramente, aunque esta última observación es poco importante desde el punto de vista económico puesto que no superan las dos cepas hectárea y año.

En las zonas vitivinícolas de la **Ribera del Guadiana**, se ha encontrado una incidencia GFLV–*X. index* en torno al 4% de las muestras analizadas, pero con una correlación de ambos patógenos del 99% (Moral del 1996, Arias *et al.* 1997c). Al igual que en la región de La Mancha, la modificación del manejo del viñedo en esta zona, puede derivar a un aumento de la incidencia de GFLV. Como hospedadores alternativos de estos nematodos se ha encontrado *X. diversicaudatum* en ciruelo y *X. index* en cerezo en La Vera (Cáceres), así como en higuera y peral de la cuenca del Guadiana (Moral del 1996).

La Comunidad Autónoma de **Galicia** cuenta con más de 30.000 ha de viñedo, en ella se han encontrado ambos patógenos, el GFLV con una incidencia del 19%, que generalmente no se corresponde con la sintomatología observada, siendo las zonas más afectadas las Rías Baixas y Valedoras y las menos Ribeiro y Amandi, no habiéndose detectado el virus en Verín, en cualquier caso el GFLV no se encuentra tan extendido como se venía estimando en base a diagnósticos visuales (Fresno *et al.* 1993, Abelleira *et al.* 1999). Además destaca la presencia de *X. diversicaudatum* vector del ArMV en Coruña, Orense y Pontevedra, por lo que se debería comprobar la posible presencia de este virus y en cualquier caso considerar el riesgo de su introducción.

En **Madrid** se encuentra *X. index* asociado tanto a vid como a higuera y otros hospedadores alternativos (Arias *et al.* 1985), así como *X. rivesi*. También se ha detectado serológicamente la presencia de GFLV en diversas localidades del entorno de Villa del Prado. En hospedadores alternativos se encuentran, además, *L. attenuatus*, *L. elongatus*, *L. macrosoma*, *X. diversicaudatum* y *X. rivesi*.

En **Murcia**, Bello *et al.* (2004) realizan en primer lugar la caracterización de los problemas fitonematológicos de los viñedos de Murcia, encontrando que las primeras citas se deben a Jiménez Millán (1962) quien encuentra en un parral

de Abarán: *Crinonemoides xenoplax*, *X. index*, y *Xiphinema* spp., considerando erróneamente a *C. xenoplax* como transmisor de virus. Se ha encontrado *X. index* en las DO de Bullas, Jumilla y Yecla asociado a vid en Abarán, Molina de Segura y Jumilla, en esta última localidad con una correlación con el GFLV alta. Además se ha encontrado el nematodo asociado a cítricos en El Algar, higuera de Alcantarilla, El Palmar y Pueblo Nuevo así como en ambientes naturales de Tobarra, que sin duda pueden actuar de reservorios del patógeno, *X. rivesi* en almendro, cítricos, melocotonero y morera en Alcantarilla, ciruelo, cítricos, higuera, membrillero y peral en Pueblo Nuevo, albaricoquero y melocotonero en Caravaca (Arias 1974, Arias y Bello 1977, Arias *et al.* 1985, Escuer *et al.* 2004). Este nematodo constituye un riesgo para la introducción de ToRSV y TRSV en el viñedo. Sin embargo no se ha encontrado *X. index* en almendros ni olivos que se encontraban próximos a una viña fuertemente infectada en Jumilla, lo que una vez más corrobora la especificidad del nematodo por la vid e higuera (Díez Rojo 2006).

En **Navarra** se ha encontrado *X. index* en viñedos e higuera, la distribución del nematodo posiblemente es mucho más amplia, habiéndose encontrado también GFLV (Arias *et al.* 1985, Grupo de Trabajo de los Problemas Fitosanitarios de la Vid 2001), sin embargo se requiere un estudio más profundo para conocer la magnitud del problema en esta zona. Aunque no apareció *X. diversicaudatum* en vid, hay que tener en cuenta que ha sido citado en hayedos de los Montes Echarri y Gorogain (Arias *et al.* 1985), lo que no descarta que pueda estar más extendido con el consiguiente riesgo para la introducción del ArMV.

En **La Rioja**, incluyendo Rioja Alta, Baja y Alavesa, con casi 39.000 ha, solamente existían hasta el momento dos citas de *X. index* (Lara y Bello 1983, Arias *et al.* 1985, Pinochet y Cisneros 1986) y la presencia de GFLV se determinó en base a diagnósticos visuales (Díaz Yubero y Esteban 1973, Provedo y Fernández Sevilla 1973), sin embargo recientemente se han encontrado altas concentraciones de GFLV en viñedos de La Rioja y Navarra asociados a *X. index* y en Álbalos la infección se encontraba generalizada por toda la viña, mostrando los síntomas característicos del entrenudo corto, madera aplanada, ramificaciones y hojas dentadas (Arias *et al.* 2002). Por otro lado, Navas (1984) considera que *X. index* prefiere suelos alcalinos, deficientes en materia orgánica y con bajo contenido en arena. Finalmente se destaca el

hecho de que en esta zona se dan las condiciones ambientales necesarias para el desarrollo de *X. diversicaudatum* y *L. elongatus*, que son vectores de virus que afectan a variedades de vides europeas y americanas, respectivamente.

En las DO de Alicante, Utiel Requena, y Valencia se ha encontrado *X. index* en seis ocasiones, en Alicante, Castellón y Valencia (Arias *et al.* 1985) y GFLV en estudios puntuales, sobre todo en variedades de uva de mesa (Miralles 1989, Toledo Paños *et al.* 2003). Se destaca además la presencia de *L. attenuatus*, *X. diversicaudatum* y *X. rivesi* en hospedadores alternativos especialmente frutales y cítricos.

Finalmente en el **País Vasco** se ha encontrado *X. diversicaudatum* en ambientes naturales de Álava y *X. index* en frutales de Bizkaia. Se destaca la importancia de *X. index* en la epidemiología del GFLV, por su larga persistencia en el suelo, máxime si tiene hospedadores alternativos que le sirvan de reservorio, como en el caso muy especial de las higueras, aunque esta planta elimina el virus, la importancia del manejo del cultivo en el incremento de las poblaciones del nematodo y en la dispersión de la enfermedad, así como la importancia de las medidas fitosanitarias en las nuevas plantaciones y la utilización de métodos adecuados y sensibles para la detección del virus. Así mismo, se pone de manifiesto el interés que tiene, para los servicios de diagnóstico y cuarentena, en preplantación o introducción de material vegetal, la posibilidad de detectar el GFLV en cualquier época del año, tejido de la planta y en un solo nematodo por el método de IC-RT-PCR o en cinco nematodos por ELISA (Arias *et al.* 1997b). Se resalta la conveniencia de estudiar otros nepovirus de control obligatorio en la Unión Europea, cuyos nematodos vectores se han encontrado en España, y se destaca que *X. americanum sensu stricto* y *Longidorus diadecturus*, que son vectores de virus en los viñedos de EE UU, no se han encontrado en Europa.

II.4. Manejo agronómico de nematodos en viñedo

Como alternativas de manejo están en primer lugar las medidas fitosanitarias, sobre todo el empleo de material certificado libre de virus y la limpieza de aperos, que son eficaces especialmente en el caso de los nematodos vectores

de virus, como el **GFLV, así como las prácticas culturales, el barbecho o las enmiendas orgánicas** que permiten regular las poblaciones de nematodos. También se vienen utilizando plantas resistentes, agentes de control biológico y métodos físicos como la solarización o la aplicación de vapor de agua, especialmente para la desinfección de sustratos, y la termoterapia para el manejo de GFLV (Rüdel 1988, Bello *et al.* 2004). Pero la utilización de productos químicos es el método más utilizado y, hasta ahora, la única alternativa cuando otros métodos de control no se pueden aplicar o cuando las técnicas agronómicas no reducen o suprimen el problema de modo eficaz. Los productos químicos que se han venido utilizando con más frecuencia son los fumigantes, como 1,3-dicloropropeno (1,3-D) con cloropicrina (Pic), dazomet, metam sodio o bromuro de metilo (BM), y compuestos no volátiles como los organofosforados: etoprofos y fenamifos; y los carbamatos: aldicarb y oxamilo (Boubals y Dalmaso 1968, Lear *et al.* 1981, Raski y Goheen 1988). El coste del tratamiento químico de una hectárea de viñedo consiste en la aplicación localizada de 1,3-D al 95% (inyectable) con una dosis de 500 litros ha⁻¹ y un coste unitario de 4,11 €/kg de producto y 0,24 euros/kg de aplicación, ascendiendo a **2.175 €/ha** el coste total de una hectárea de viñedo desinfectada químicamente (Goitia 2004).

El BM se viene utilizando en la desinfección de los viñedos desde hace más de 20 años, principalmente en EE UU, Sudáfrica, Francia e Italia (Van Gundy *et al.* 1972, Raski *et al.* 1983, Raski y Goheen 1988). Aunque no se tiene conocimiento de que se haya empleado en España para este cultivo. Debido a la introducción del riego en los viñedos, en los últimos años, se han generalizado y están aumentando los problemas de virus y nematodos, siendo necesaria la búsqueda de alternativas de control que sean económicamente rentables y ecológicamente compatibles (Arias *et al.* 1997a,b, Arias 1998), por otro lado Basile *et al.* (1986) y Raski y Goheen (1988) aplicaban BM para el control de *X. index* en Italia y EE UU respectivamente. El BM produce la muerte total de *X. index* a las 48 horas de exposición a 600 ppm, aunque los juveniles y adultos se mantienen vivos hasta las 43 y 27 horas respectivamente (Van Gundy *et al.* 1972).

Entre las alternativas no químicas destaca la solarización, que utiliza la energía solar y recientemente la biodesinfección que se basa en la utilización de las sustancias resultantes de la descomposición de la materia orgánica, que se viene

utilizando con gran eficacia como alternativa al uso de BM, un producto tóxico y sobre todo un potente destructor del ozono estratosférico, por lo que su retirada es inminente (Bello *et al.* 1997a). Por otro lado, D'Addabbo *et al.* (1999) estudian el efecto del orujo de aceituna en el control de *X. index*, observando su mayor eficacia después de seis meses de su aplicación. Aballay e Insunza (2002) señalan que *Brassica napus* reduce significativamente los problemas ocasionados por *X. index*.

La Solarización es un método que utiliza la energía solar en el control de los patógenos y se fundamenta en el tratamiento del suelo con calor solar mediante la cobertura con láminas delgadas de plástico transparente durante períodos prolongados de cuatro a ocho semanas. Bello *et al.* (2004) consideran que por sí sola esta alternativa no es eficaz, especialmente cuando se trata de controlar organismos móviles como son los nematodos, y que en los suelos de la región mediterránea se desplazan a los horizontes más profundos por la acción de la temperatura, pudiendo ser incorporados de nuevo a la capa superficial del suelo con las labores. En los casos donde la solarización ha sido eficaz, se trata por lo general de suelos con alto contenido en materia orgánica (solarización más biodesinfección, biosolarización), o en suelos poco profundos. La solarización puede ser eficaz cuando se combina con biodesinfección, durante al menos un mes, a una temperatura ambiente superior a 40 °C, aunque se recomienda de 30 a 45 días durante los meses de julio y agosto (Lacasa *et al.* 1999, Bello *et al.* 2003).

La Biodesinfección constituye una alternativa no química para el manejo de organismos patógenos de los vegetales de origen edáfico, que se fundamenta en el efecto biocida de las sustancias resultantes de la descomposición de la materia orgánica. Su efectividad se incrementa cuando se incorpora en un sistema de producción integrada, prolongando su eficacia en el tiempo por medio de prácticas culturales como la rotación de cultivos, períodos de barbecho, injerto, solarización y otras como la época y modo de siembra, labores, manejo del agua, cubiertas, control sanitario, empleo de agentes biológicos de control e incluso bajas dosis de pesticidas (MBTOC 1998, Bello *et al.* 2000a,b). Existen buenos ejemplos de la eficacia de la biodesinfección para el manejo de hongos, nematodos y malas hierbas, aunque solo se han aplicado en cultivos de hortalizas y fundamentalmente en el manejo de nematodos formadores de nódulos del género *Meloidogyne*, por lo que no existe

experiencia del uso de esta alternativa para el control de nematodos en suelos de viñedo (Bello *et al.* 2000a,b, 2001, 2003, Gómez Soriano *et al.* 2006).

La biodesinfección podría tener grandes posibilidades en las zonas vitivinícolas españolas, debido a que es importante la carga ganadera, que da lugar a la producción de un gran número de toneladas de estiércol, 80.723.600 t/año (MAPA 2004a,b). Además existe una gran tradición de cultivos forrajeros que pueden utilizarse como abono verde y actuar como biodesinfectante, especialmente en el caso de las crucíferas que como se ha demostrado tienen una gran eficacia para el manejo de nematodos en la remolacha (López Robles 1991). Por otro lado, existe una gran producción de champiñón, especialmente en Castilla-La Mancha y La Rioja, cuyos residuos pueden utilizarse como biodesinfectantes, a la vez que también pueden emplearse subproductos de industrias vitivinícolas y oleícolas (Bello *et al.* 1997a, 2003, 2004, López Pérez 2004). Por todo ello, hemos centrado nuestras investigaciones en el estudio de la eficacia de la biodesinfección en el manejo de los nematodos del viñedo, mediante la utilización de diversas materias de origen orgánico, tanto mediante determinaciones *in vitro* o en suelo bajo condiciones de laboratorio como en campo, tratando de determinar su eficacia en el control de *X. index*, por ser vector del GFLV, el principal problema nematológico en viñedos.

Desde el punto de vista del manejo del cultivo se destaca la importancia que tiene el conocer la epidemiología de *X. index* y su relación con la transmisión del GFLV, por su larga persistencia en el suelo, máxime si tiene hospedadores alternativos que le sirvan de reservorio. Se pone de manifiesto la importancia del manejo del cultivo, especialmente la introducción de riego, en el incremento de las poblaciones del nematodo y, en consecuencia, en la dispersión de la enfermedad. Se resalta la importancia de las medidas fitosanitarias, como utilización de plantas certificadas libres de virus en las nuevas plantaciones, utilización de métodos adecuados y sensibles para la detección del virus, control del material utilizado para injertos, control y limpieza de aperos, etc. Así mismo, se pone de manifiesto que el hecho de que el GFLV pueda detectarse en cualquier época del año y en cualquier tejido de la planta es de gran interés en programas de selección sanitaria y de control, y la posibilidad de detectar el virus en un solo nematodo por el método de IC-RT-PCR o en cinco nematodos por ELISA es muy importante, para los servicios de diagnóstico y cuarentena, en preplantación o introducción de material vegetal. Se indica, así mismo, la

conveniencia de estudiar otros nepovirus de control obligatorio en la Unión Europea y cuyos nematodos vectores se han encontrado en España. Por último, se indica que en el Reglamento Europeo se recoge que los viveros de plantones de vid deben estar libres de *Longidorus* spp. y *Xiphinema* spp., cuando estos géneros están ampliamente distribuidos en los suelos de toda Europa y muchas de sus especies no son patógenas. Por otro lado conviene recordar que *X. americanum sensu stricto* y *Longidorus diadecturus*, que son vectores de virus en los viñedos de EE UU, no se han encontrado en Europa.

Se ha encontrado resistencia a *X. index* en *Vitis arizonica*, *V. candicans*, *Muscandinia rotundifolia* (*V. rotundifolia*), *V. rotundifolia*, *V. rufotomentosa*, *V. smalliana* y *V. soloni* (Kunde *et al.* 1968). Señalan Coiro *et al.* (1990a,b) que *V. candicans* es una fuente de resistencia para *X. index* y que este nematodo no se desarrolla sobre morera. Por otro lado, Hafner (1988) señala la existencia de un portainjerto Börner, resultado del cruce de Riparia 183Gm X *Vitis cinerea*, que fue registrado en Alemania en 1989, que es resistente a filoxera y nematodos transmisores de virus. Bouquet *et al.* (2000) señalan que los híbridos de *V. vinifera* X *M. rotundifolia* pueden ser eficaces como portainjertos por ser resistentes a *X. index* y GFLV. Mauro *et al.* (2000) señalan la posible obtención de portainjertos resistentes de origen transgénico en Francia. Cordeau (1998) revisa portainjertos y virosis de la viña. Sassanelli *et al.* (1999) y Ridolfi *et al.* (2001) señalan que *X. index* no se desarrolla con eficacia en olivo, dependiendo la densidad de sus poblaciones del contenido en fenoles de la planta.

II.5. Biodesinfección en viñedos

Bello *et al.* (2004) en estudios de biodesinfección en viñedo realizados en bandas, demuestran que el empleo de plástico en las calles del viñedo antiguo una vez biodesinfectadas con estiércol de oveja más gallinaza (7:3) con dosis de 10 kg/m² y dejando las filas de viñedo antiguo en barbecho como testigo, fueron eficaces en el manejo de *X. index*, siendo las calles donde se lleva a cabo la biodesinfección en las filas del nuevo viñedo replantado. Con el fin de optimizar el método de aplicación para eliminar los individuos de *X. index* en el suelo, y sobre todo porque las raíces de la vid pueden alcanzar varios metros, tanto en horizontal como en profundidad, por ello era necesario comprobar qué ocurre en las calles biodesinfectadas que se dejaron en barbecho como testigo, puesto que hay que tener en cuenta que **para evitar riesgos de reinfestación**

del viñedo, se debe descartar la presencia de un solo nematodo portador del virus causante del “entrenudo corto de la vid” (Arias *et al.* 1997c), tratando a la vez de encontrar otras alternativas como es el uso de subproductos agroindustriales, para ello se realizaron una serie de muestreos, con el fin de valorar la influencia del barbecho sobre el *X. index*, la eficacia de la biodesinfección en bandas y el efecto a lo largo del perfil del suelo.

En cuanto a la influencia del barbecho en *X. index*, de las muestras recogidas tanto en las calles como en las filas de la parcela, los resultados de los análisis según la presencia o no de *X. index* permiten confirmar que está presente en las calles no biodesinfectadas con una frecuencia y abundancia mayor en las zonas donde se acumula más humedad mientras que en las zonas con menor humedad y más insolación no aparece el nematodo. El estudio confirma que la biodesinfección en bandas es eficaz en los primeros 60 cm. Aunque también puede existir contaminación de las calles que están en barbecho, por lo que se recomienda una biodesinfección de modo uniforme y en toda la parcela para evitar focos de nematodo. A lo largo del perfil del suelo, a más de 60 cm de profundidad, se comprobó la existencia de nematodos que pudieran parasitar a los restos de raíces vivas que permanecieron en el suelo después del arranque de la viña. Se confirmó que en este horizonte, tanto la biodesinfección como en el barbecho, la presencia de *X. index* es muy baja siendo efectivo su control.

Para resolver el problema de contaminación lateral de las bandas biodesinfectadas por las que no lo estaban, se desinfectó toda la superficie con estiércol de cabra. Posteriormente, los resultados confirman la reinfestación por la presencia de raíces vivas, dificultando la eliminación total de *X. index* en el suelo, por lo que se recomienda que la duración del barbecho sea de al menos tres años, sin olvidar que la presencia de virus puede deberse también a un mal control sanitario del material vegetal. Para confirmar la eficacia de la biodesinfección cuando se aplica en toda la superficie, tomaron muestras en una finca contigua, donde el 91% resultaron positivas en las filas y en las calles un 67%, después de arrancar el viñedo se dejó pasar el verano para determinar el efecto del barbecho y el número de individuos había disminuido notablemente, por lo que se pone de manifiesto la importancia que tiene el barbecho en el manejo de *X. index*, así como aplicar la biodesinfección en el momento posterior al arranque para evitar que los nematodos se desplacen en profundidad.

Se considera que la biodesinfección en toda la superficie de la parcela resulta eficaz, cuando se combina con al menos dos años de barbecho, aunque hay que señalar que la aplicación del material biodesinfectante debe hacerse en el momento más próximo al arranque del viñedo para evitar desplazamiento de los nematodos y debe ser distribuido uniformemente para reducir focos aislados, no siendo necesaria la utilización de plástico (Díez Rojo 2006).

II.6. Nematodos formadores de nódulos del género *Meloidogyne* y manejo agronómico

El género *Meloidogyne* Göldi, 1892 (Nematoda:Heteroderidae) comprende a los denominados “nematodos formadores de nódulos”, un grupo de nematodos del suelo de gran importancia económica por su efecto negativo sobre la producción agrícola. Estos nematodos son endoparásitos sedentarios de las raíces de numerosas plantas, con un rango de hospederos que comprende más de 3.000 especies vegetales diferentes (Abad *et al.* 2003), por lo tanto se pueden considerar en general como polívoros. El daño que ocasionan a los vegetales se debe principalmente a la alteración de los tejidos vasculares de la raíz, que reduce sustancialmente la toma de nutrientes y agua, con el consiguiente debilitamiento de la planta y disminución del rendimiento (Orton Williams 1973, Siddiqi 2000, Abad *et al.* 2003). Además, los efectos negativos de *Meloidogyne* se agravan en algunas ocasiones por interacciones con otros patógenos. Para España se ha calculado que las pérdidas anuales ascienden a unos 905 millones de euros, de los cuales un 40% corresponde a las pérdidas en cultivos hortícolas. En segundo lugar están las pérdidas en cereales (21% de pérdidas), seguido por frutales (14%), cítricos (10%) y patatas (6%), con el porcentaje restante (9%) correspondiendo a remolacha azucarera, vid, olivo y leguminosas (Bello *et al.* 1997b).

II.6.1. Posición sistemática y morfología. El género *Meloidogyne* se encuentra dentro del Orden Tylenchida, teniendo en cuenta a Siddiqi (2000) y Karssen (2002) en el sistema de clasificación, tal como se detalla a continuación:

Orden **Tylenchida** Örley, 1880

Superfamilia Hoplolaimoidea Filipjev, 1934 (Paramonov, 1967)

Familia Meloidogynidae Skarbilovich, 1959 (Wouts, 1973)

Subfamilia Meloidogyninae Skarbilovich, 1959

Género *Meloidogyne* Goeldi, 1892

M. arenaria (Neal, 1889) Chitwood, 1949

M. hapla Chitwood, 1949

M. incognita (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949

M. javanica (Treud, 1885) Chitwood, 1949

Lo más característico de los nematodos de este género son los síntomas que inducen en las raíces de las plantas que parasitan, que son los nódulos producidos por las hembras, de donde proviene su nombre común de “nematodo formador de nódulos”.

La hembra adulta es de forma redondeada a piriforme, blanca, sedentaria, con un cuello corto que se proyecta. No tiene fase de quiste. En el extremo posterior la vulva y el ano están próximos, rodeados de un patrón cuticular característico (patrón perineal), que presenta diferencias en las distintas especies. Los fasmidios se abren con forma de poro, a cada lado del ano, levemente elevados. La cutícula es gruesa y estriada. El estilete es delgado, de unos 12-15 μm , con nódulos basales pequeños. El poro excretor está por delante del bulbo medio, con frecuencia cercano a la base del estilete. Los ovarios son dos, prodélficos y convolutos. Las glándulas rectales son seis, de tamaño grande, y segregan una sustancia gelatinosa en la cual se depositan los huevos, que no son retenidos dentro del cuerpo de la hembra.

El macho es vermiforme, de hasta 2 mm de longitud, con el extremo de la región posterior curvado. La cutícula es fuertemente estriada, con campos laterales con cuatro estrías. La región anterior es redondeada, poco prominente, con un disco labial marcado y pocas (una a tres) estrías. Los sectores laterales son más anchos que los submedianos, asemejándose a “mejillas”. El estilete es robusto (18-25 μm) con nódulos basales grandes. Las glándulas esofágicas están situadas principalmente en posición ventral. Las espículas son delgadas, generalmente de entre 25-33 μm de longitud, con el *gubernaculum* de 7-11 μm de longitud. Tiene un testículo, o dos si hubo un desarrollo sexual revertido. La región posterior es redondeada, con fasmidios como poros cerca de la abertura cloacal, que es subterminal. No presentan bursa.

Los juveniles presentan diferente aspecto según el estadio. El J1 tiene el término de la región posterior roma, realizando la muda dentro del huevo. El J2 es vermiforme, posee capacidad migratoria, siendo el estado infectivo. El cuerpo es recto a arqueado en reposo, midiendo por lo general menos de 0,6 mm de longitud. La región anterior es generalmente redondeada con una a cuatro estrías gruesas, un disco labial diferenciado y una estructura levemente esclerotizada. Los sectores laterales son más anchos que los submedianos. El estilete es delgado, de menos de 20 μm de longitud. El poro excretor está por detrás del hemizónido. La región posterior tiene una porción hialina claramente visible, con la punta angosta e irregular en el contorno. El J3 es sedentario, hinchado, con forma de “salchicha” y una región caudal corta y roma. El J4 también es sedentario e hinchado, con el ano terminal (Fig. 4).

II.6.2. Biología. El ciclo biológico de los nematodos del género *Meloidogyne* (Fig. 4) comienza en el huevo, donde aparece la primera de las cuatro fases juveniles (J1). Dentro del huevo tiene lugar la primera muda, emergiendo como segundo estadio juvenil (J2), el cual posee capacidad migratoria y puede penetrar en los tejidos de la planta (fase infectiva). El estado J2 tiene energía suficiente para permanecer cerca de un mes en la búsqueda y penetración de la raíz, estableciendo un sitio de alimentación. Al penetrar en la raíz se mueve intercelularmente, ingresando a la altura de la base del cilindro vascular y migrando hacia arriba. En la zona de diferenciación de la misma se vuelve sedentario y establece un punto de alimentación permanente. Este punto de alimentación se forma en respuesta a las secreciones que el nematodo inyecta a las células del hospedero, las cuales inducen varias divisiones nucleares sin citoquinesis, dando lugar a células grandes, multinucleadas, llamadas “células gigantes”. Las células de la planta alrededor del lugar de alimentación se dividen e hinchan, lo cual se manifiesta externamente como nódulos (“agallas”). El nematodo ingiere el citoplasma de las células gigantes originadas en la planta a través de sus estiletos, ya que estas células gigantes funcionan como fosas metabólicas que canalizan los recursos de la planta hacia el nematodo parásito. Posteriormente pasa por las dos fases juveniles restantes (J3 y J4) hasta convertirse en adulto. Tanto el estadio J2 como el adulto poseen estilete, mientras que los estadios J3 y J4 carecen de él (Orton Williams 1973, Williamson y Gleason 2003).

En el período de alimentación las hembras se van engrosando hasta tomar forma de pera, y después de 15-30 días comienza la puesta de huevos, que son expulsados a través de la vulva dentro de una matriz gelatinosa. Esta matriz es secretada por las glándulas rectales y tiene actividad pectolítica, celulolítica y proteolítica sobre las células vegetales, lo que posibilita que se forme un canal desde el extremo posterior de la hembra hasta la superficie de los nódulos radiculares. Al principio esta matriz es de color blanquecino y al acercarse el momento de la eclosión se torna de color castaño. Cada masa de huevos puede contener unos 500 huevos, que permanecen protegidos dentro de la matriz gelatinosa, eclosionando ante condiciones favorables de humedad y el estímulo de los exudados radiculares de las plantas hospederas. La producción de huevos por parte de las hembras puede darse tanto con fecundación del macho (anfimixis) como de forma partenogenética. En cuanto a los machos, mantienen su forma vermiforme durante toda la vida y viven de modo libre en el suelo, posiblemente sin alimentarse (Orton Williams 1973, Siddiqi 2000). Por lo general los machos no son funcionales puesto que las hembras se reproducen por partenogénesis en la gran mayoría de las especies. La duración del ciclo varía según los requerimientos térmicos de cada especie. Cuanto más cerca está la temperatura del óptimo de cada especie, la duración del ciclo es menor (Trudgill 1995).

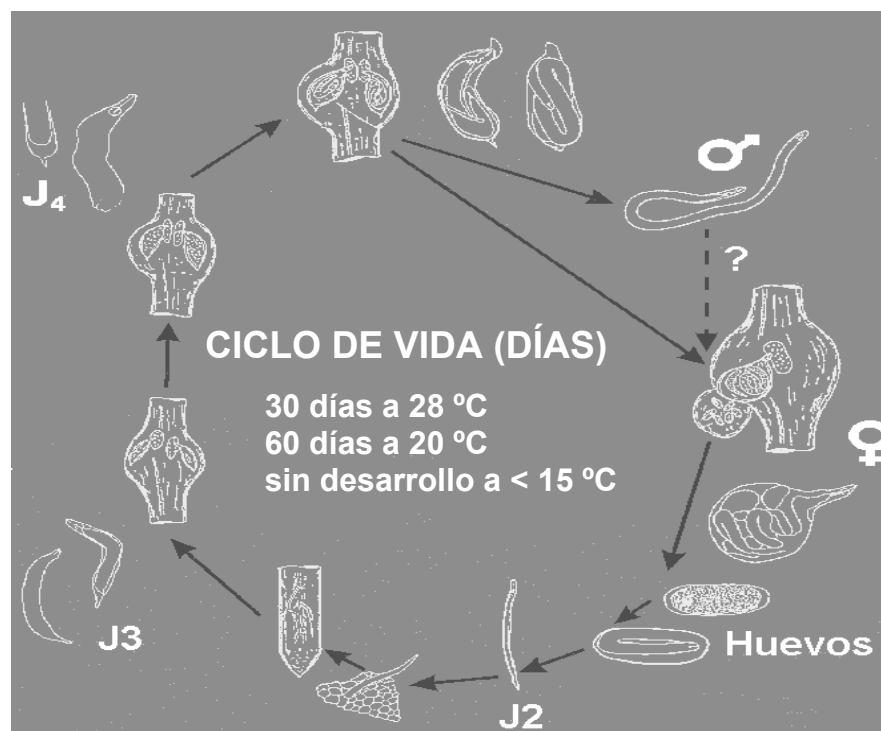


Figura 4. Ciclo biológico de *M. incognita*.

II.6.3. Especies del género *Meloidogyne*. Dentro del género *Meloidogyne* se reconocen actualmente 86 especies válidas, además de 4 especies *inquirendae* (Palmisano y Ambrogioni 2000, Sahoo *et al.* 2000, Siddiqi 2000, Charchar y Eisenback 2002, Castillo *et al.* 2003, Eisenback *et al.* 2003, Handoo *et al.* 2004). La identificación de las especies se basa tradicionalmente en la morfología de los juveniles y del patrón perineal de la hembra. Sin embargo, actualmente hay nuevos métodos disponibles para diferenciar especies que se han introducido progresivamente como complemento de los métodos tradicionales. Estos nuevos métodos se basan en características bioquímicas, como la electroforesis de proteínas (polimorfismo de enzimas, análisis de isoenzimas, proteínas solubles totales) y moleculares, como el análisis de PCR-RFLP (reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción), AFLP (polimorfismos amplificados de los fragmentos de restricción) y SCARs (regiones amplificadas de secuencias caracterizadas) (Siddiqi 2000).

Especies de interés en cultivos hortícolas protegidos. Las especies en cultivos hortícolas protegidos son: *Meloidogyne arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* y *M. javanica*. En primer lugar se realiza una revisión de los trabajos más recientes sobre las relaciones entre estas cuatro especies y posteriormente se procede a su descripción. Las descripciones se inician con una referencia a la primera cita de la especie y su importancia para los cultivos, continuando con su morfología y morfometría, su biología, distribución y hospederos, así como con las medidas de control y manejo que se han utilizado o se utilizan en la actualidad.

En los últimos años, con el desarrollo de las **técnicas bioquímicas y moleculares**, se han llevado a cabo numerosos trabajos con el objetivo de determinar las diferencias y relaciones filogenéticas existentes entre *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* y *M. javanica*. En general, el **análisis de isoenzimas** ha demostrado ser una técnica útil para la identificación de las cuatro especies de mayor importancia, obteniéndose el mejor resultado a través del estudio del polimorfismo de las esterasas y de la malodeshidrogenasa. Es un método bastante fiable y relativamente sencillo puesto que existen geles comerciales preparados a tal efecto (Espárrago *et al.* 1994). Por otra parte, el uso de la **citogenética**, que se basa en el estudio de las diferencias de disposición y número de cromosomas, permite distinguir fácilmente *M. incognita* de *M. hapla*, e incluso entre las diferentes razas de cada especie. Sin embargo, presenta como

desventajas que es difícil distinguir entre *M. arenaria* y *M. javanica*, por presentar una disposición cromosómica similar, y que este tipo de estudio implica realizarlo en una fase concreta del ciclo de las hembras, lo que representa un inconveniente (Cenis *et al.* 1992). Por otra parte, el desarrollo de la biotecnología ha permitido la puesta a punto de algunas técnicas precisas y discriminantes para la identificación de las cuatro especies de interés (Cenis *et al.* 1992), destacándose entre ellas el uso de PCR-RFLP. La técnica de **PCR** (*Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa), se basa en la amplificación enzimática *in vitro* de un fragmento de ADN delimitado por dos oligonucleótidos cebadores que se añaden a la reacción. Se caracteriza por su relativa sencillez, manteniendo el poder discriminatorio para la separación de las especies. En cuanto a la técnica de **RFLP** (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción), se basa en las diferencias que se detectan en las secuencias de ADN de diversos organismos al fragmentarlas con enzimas de restricción en puntos específicos de la cadena. Presenta como inconveniente su complejidad técnica.

II.6.4. Descripción de las especies de interés. Se describen a continuación en detalle las características morfológicas y biológicas de las cuatro especies más frecuentes en nuestro país: *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* y *M. javanica*, así como su distribución, sus hospederos más importantes, las relaciones con otros patógenos y las alternativas de manejo. La identificación de dichas especies se ha realizado tradicionalmente a través de la morfología del patrón perineal, observando tanto la forma general del patrón como la altura del arco dorsal y la presencia de estrías y puntuaciones (Figs 5, 6).

M. arenaria (Neal, 1889) Chitwood, 1949

El ejemplar tipo fue descrito por Chitwood (1949) sobre *Arachis hypogaea* en Florida, EE UU (Orton Williams 1975). Es un nematodo de importancia en cacahuete, tomate y plantas ornamentales, cultivos donde causa pérdidas graves.

Características morfológicas. Las hembras de *M. arenaria* poseen un cuerpo piriforme, con una estría en la parte anterior, detrás de la región labial. Los nódulos del estilete son redondeados con los márgenes anteriores dirigidos

hacia atrás. El patrón perineal es de redondo a oval, con el eje mayor paralelo a la vulva, y un arco dorsal bajo, generalmente comprimido en sentido dorso-lateral (Fig. 6A). Las estrías se encuentran bastante separadas y la mayoría son poco patentes. Los campos laterales están marcados generalmente por algunas estrías quebradas y bifurcadas, y a veces por numerosas estrías cortas en desorden, aunque a veces no se distinguen. Algunas estrías se dirigen directamente a los ángulos de la vulva. Los fasmidios están espaciados ampliamente. No hay puntuaciones entre el ano y el *terminus*, como en *M. hapla*. En el material tipo recolectado por Chitwood (1949) se encontraron patrones perineales aberrantes sin vulva (Orton Williams 1975).

Los machos tienen la parte anterior aplanada, con forma de cono truncado redondeado. La cobertura de la región labial y la primera estría prácticamente no se diferencian, formando una sección anterior algo cuadrada separada por una constricción profunda de las estrías basales (una o más, generalmente dos). El cuerpo se angosta levemente después de la parte anterior. El estilete es fuerte, con los nódulos basales redondeados. Los campos laterales tienen cuatro estrías longitudinales, con las bandas exteriores areoladas y la banda interna con estrías cruzadas a intervalos irregulares en la mitad del cuerpo y más regulares en la parte posterior. Pueden tener uno o dos testículos. Las espículas tienen la pared delgada, con la región basal dilatada en forma poco patente, solo marcada por una leve constricción. Se estrechan gradualmente hasta un *terminus* bífido subagudo, con presencia de un reborde ventro-lateral. El *gubernaculum* es simple, creciente. La región caudal tiene estrías hasta cerca del *terminus*. Los fasmidios están al nivel de la cloaca o en la parte anterior (Orton Williams 1975).

Los juveniles tienen la parte anterior no prominente, vista lateralmente como un cono truncado con estrías débilmente separadas detrás de la cobertura de la parte anterior, ancha y aplanada. Los nódulos del estilete son bastante prominentes, redondeados. El recto se ve hinchado, al menos en algunos juveniles. La cola es angosta, adelgazándose hasta un *terminus* subagudo (Orton Williams 1975).

Los caracteres morfológicos más útiles para identificar a *M. arenaria* son el estilete y la forma de la región labial de los machos y la morfología del estilete en las hembras. Los patrones perineales de las hembras son muy variables y

constituyen un carácter de diferenciación menos útil (Eisenback y Triantaphyllou 1991).

Biología. El ciclo es el mismo que se ha descrito para el género. La duración del ciclo a 20 °C es de 63-66 días. Se han logrado obtener hasta 9 generaciones anuales, con ciclos que varían entre los 18 días en verano y los 54 en invierno. Su temperatura máxima de reproducción está por debajo de los 32,6 °C; sin embargo, los juveniles de *M. arenaria* tienen mayor resistencia a las temperaturas altas que los juveniles de otras especies de *Meloidogyne* (Orton Williams 1975). La reproducción es por partenogénesis mitótica (Eisenback y Triantaphyllou 1991).

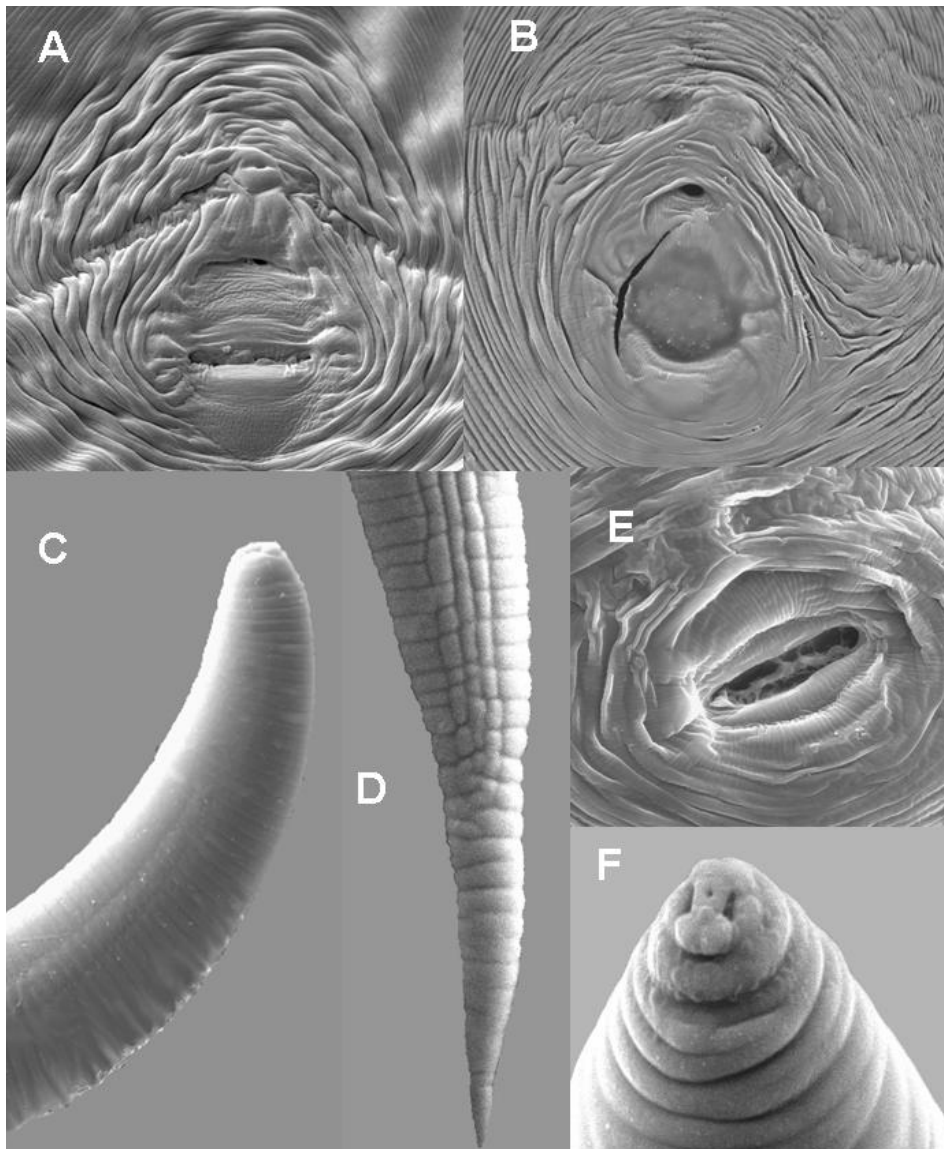


Figura 5. Morfológicas de *Meloidogyne* al microscopio electrónico de barrido (SEM): *M. incognita*: Hembra: A. región perineal, F. región labial. Juvenil: C. región anterior, D. región posterior, *M. hapla*: Hembra: B, E. región perineal.

Distribución y hospederos. Es un nematodo de distribución cosmopolita, encontrándose en las regiones más cálidas del mundo: en los países europeos que rodean al mar Mediterráneo, América del Sur, Central y Norte, Centro y Sur de África, Medio Oriente, India, Malasia, Japón y Australia. En climas templados se encuentra frecuentemente en invernaderos. No es tan frecuente como *M. incognita* y *M. javanica*, aunque su distribución es muy similar, entre los 40° de latitud N y 33° de latitud S. La temperatura óptima promedio del mes más cálido es de 24 °C (Orton Williams 1975, Eisenback y Triantaphyllou 1991, Bello *et al.* 1994). Según Eisenback (1997) la causa de su amplia distribución es su adaptación a diferentes temperaturas, con un límite inferior de -1,1 °C como promedio en el mes más frío. En España se ha encontrado en el centro y sur de la Península Ibérica (Fig.7)

Los hospederos mencionados en la bibliografía incluyen numerosos cultivos como berenjena, col de Bruselas, repollo, zanahoria, apio, endivia, lechuga, cebolla, guisante, pimiento, patata, espinaca, batata, tomate, cucurbitáceas, cebada, avena, maíz, trigo, cacahuete, remolacha azucarera, tabaco y algunas variedades de algodón. *M. arenaria* también ha sido citada en pastos y leguminosas como tréboles, *Dactylis glomerata* y *Lolium multiflorum*, frutales como plátano, higuera, vid, nectarina y melocotonero, así como en ornamentales que incluyen diferentes especies de *Aphelandra*, *Begonia*, *Dahlia*, *Digitalis*, *Maranta*, *Pelargonium*, *Philodendron*, *Sansevieria* y *Viola* (Orton Williams 1975), llegando a señalarse más de 330 hospederos (Goodey *et al.* 1965).

Varios trabajos han demostrado la existencia de diferentes biotipos de *M. arenaria*, con distinto rango de hospederos y/o patogenicidad (Orton Williams 1975). Hay dos razas identificadas por el test de Hartman y Sasser (1985), que se reproducen sobre tomate, sandía y tabaco resistente a *M. incognita*, variando en su capacidad de parasitar a cacahuete y pimiento. La raza 1 (o raza cacahuete) se reproduce en cacahuete, mientras que la raza 2 no puede reproducirse sobre este hospedero. Con frecuencia la raza 2 no se reproduce en pimiento, y ninguna de las dos razas lo hace en algodón o fresa (Eisenback y Triantaphyllou 1991).

Daños e interacción con otros patógenos. *M. arenaria* puede causar graves pérdidas, especialmente en cacahuete, donde afecta raíces, frutos y estolones. Provoca disminuciones importantes en el rendimiento, llegando a causar muerte de plantas. También se ha citado causando daños graves en árboles forestales japoneses introducidos en Brasil como semillas y plantados en suelos infestados con *M. arenaria* (Lordello y Kanazawa 1967), en cultivos de tomate en Sudán (Yassin 1974) y en plantas ornamentales en invernaderos de Holanda y Bélgica (Orton Williams 1975). Se han encontrado ocasionando daños importantes son los cultivos comerciales de *Sansevieria* en Islas Canarias, Marruecos y Florida (Fontana, 1970) y en florales de la Riviera italiana y la Costa Azul de Francia (Ritter 1972).

En las zonas del norte del Mediterráneo causa menos pérdidas que *M. incognita*, a pesar de estar más ampliamente distribuida (30-40% de pérdidas vs 75%) (Ritter 1972). Se ha encontrado interacción entre *M. arenaria* y *Fusarium oxysporum* en sandía (Sumner y Johnson 1972) y en tomate (Treskova 1972). En tabaco Porter y Powell (1967) encontraron que se producían infecciones con *F. oxysporum* solo cuando se encontraba presente un nematodo formador de nódulos (*M. arenaria*, *M. incognita* o *M. javanica*). Según Meléndez y Powell (1967) la acción del nematodo induce cambios en los tejidos del hospedero que lo predisponen a la infección por el hongo. Por otra parte, Brodie y Cooper (1964) observaron que el porcentaje de plantas de algodón muertas por “damping-off”, causado por *Rhizoctonia solani*, era mucho mayor en presencia de *M. arenaria*. También se ha estudiado la posible interacción de *M. arenaria* con *Aspergillus flavus* en cacahuete, aunque no se han encontrado datos que permitieran afirmar que esta interacción existe realmente (Minton y Jackson 1967, Bell *et al.* 1971). En Florida (EE UU) *M. arenaria* se ha encontrado asociada a varios hongos como *Pythium myriotylum*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma* spp. y *Fusarium* spp., causando graves nodulaciones y pudrición en raíces de cacahuete (Dickson y Mitchell 1974).

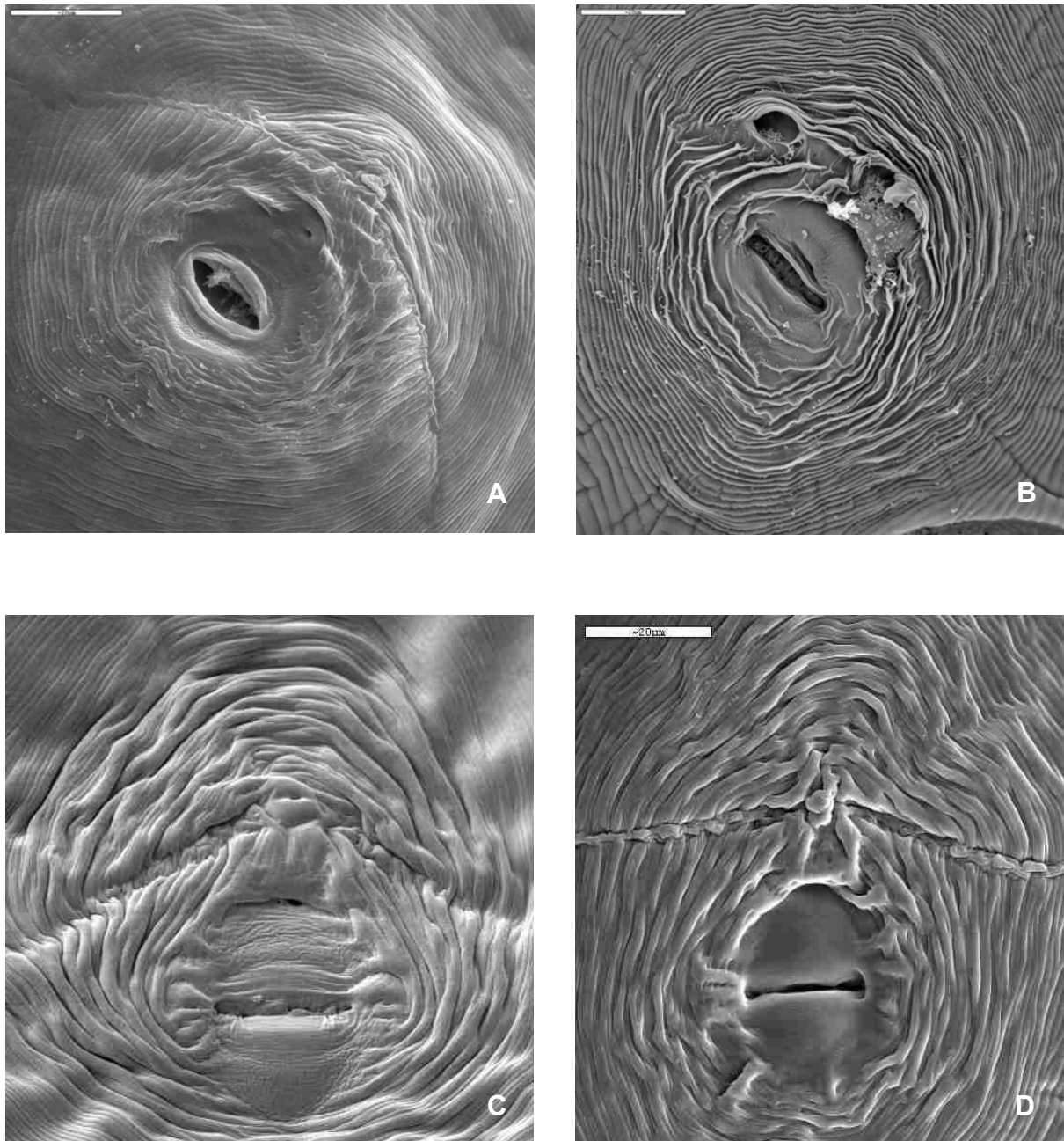


Figura 6. Patrones perineales de *Meloidogyne* al microscopio electrónico de barrido (SEM): A) *M. arenaria*, B) *M. hapla*, C) *M. incognita*, D) *M. javanica*. La regla en las fotografías indica 20 μm .

Manejo. Tradicionalmente el control se ha basado en la aplicación de productos químicos al suelo, aunque también se han probado algunos productos químicos sobre la planta, como la pasta de fenamifos en tallos y troncos de gardenia e higuera (Inserra *et al.* 1974, Orton Williams 1975), la aplicación de pesticidas sistémicos como aldicarb sobre ornamentales (Coolen *et al.* 1971, Cuany *et al.* 1973) o la inmersión de las raíces en nematicidas o agua caliente (Cayrol 1969, Schneider 1969, Jacob *et al.* 1973). Algunas plantas han mostrado resistencia a este nematodo, entre ellas *Crotalaria mucronata*, *C. spectabilis*, algunas especies de *Nicotiana* (Graham 1952), *Rhododendron* sp., fresa (Sasser 1954), *Tagetes erecta*, *T. patula* (Winoto Suatmadji 1968) y varias gramíneas (Orton Williams 1975). Sin embargo, otras que habían sido señaladas como plantas resistentes, posteriormente se comportaron como hospederos, posiblemente por existir diferentes biotipos dentro de la especie (Orton Williams 1975). Las rotaciones con otros cultivos han demostrado ser efectivas para el caso de cacahuete alternado con *Sorghum vulgare* con y sin fumigación (Thames y Langley 1967), y para el caso de tomate alternado con dos años de *Cynodon nlemfuensis* cv *nlemfuensis* (Adeniji y Chheda 1971).

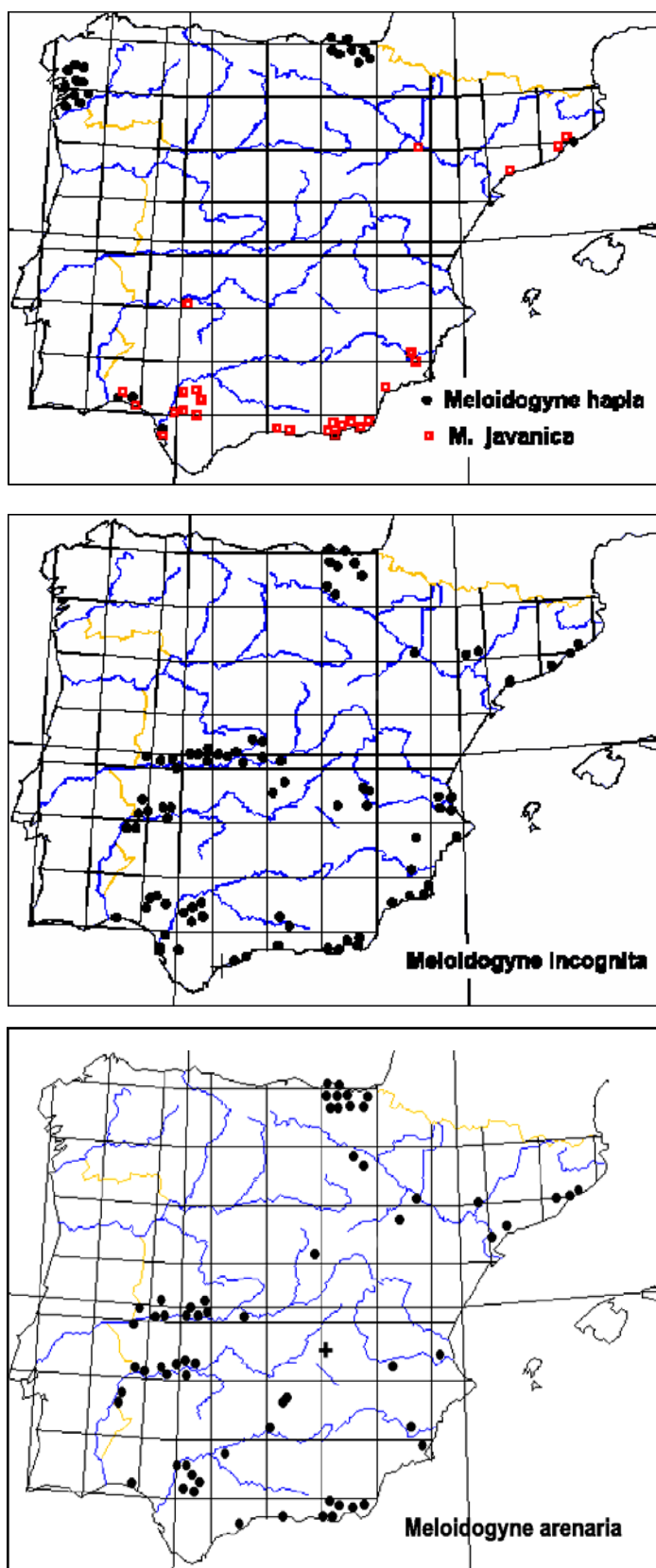


Figura 7. Distribución de *M. hapla*, *M. javanica*, *M. incognita* y *M. arenaria*.

M. incognita (Kofoid et White, 1919) Chitwood, 1949

M. incognita se encuentra en todos los países templados y tropicales, y es posiblemente el patógeno de cultivos que causa más daño en el mundo (Trudgill y Blok 2001). El hospedero tipo es *Daucus carota* de El Paso, Texas (EE UU). Anteriormente Kofoid y White (1919) la habían descrito con el nombre de *Oxyuris incognita* a partir de huevos encontrados en las heces de soldados de todo EE UU. Sandground (1923) sugirió que eran huevos de *Heterodera radiculicola* (como se le llamaba a *Meloidogyne* spp.), que se habían ingerido con material vegetal infectado. Chitwood (1949) consideró que el nematodo encontrado en zanahoria era la misma especie que *Oxyuris incognita* y lo denominó *Meloidogyne incognita* n. comb. (Orton Williams 1973).

Características morfológicas. Según la descripción de Orton Williams (1973), las hembras son endoparásitas, con el cuerpo esférico y un cuello que se proyecta del mismo. La parte anterior tiene 2 o 3 anillos detrás de los labios. La cutícula se engrosa abruptamente en la base del estilete en reposo. Los nódulos basales del estilete son redondeados o curvados hacia fuera. El poro excretor está al mismo nivel o en forma posterior a los nódulos basales del estilete, entre 10-20 estrías detrás de la parte anterior. El patrón perineal es el más variable de todas las especies conocidas. El típico patrón “tipo incognita” (5A, 6C) posee estrías poco separadas, muy onduladas y hasta en zigzag, especialmente lateral y dorsalmente. El arco dorsal es alto, redondeado. Los campos laterales no son claros, a veces marcados por roturas en las estrías, con los extremos rotos y con frecuencia bifurcados, con el patrón fusionándose con las estrías del cuerpo. El “tipo acrita” tiene las estrías menos marcadas, algo más espaciadas (o con estrías gruesas muy separadas, con estrías delgadas muy cercanas entre las gruesas). El arco dorsal es variable, puede estar achatado en la parte superior o tener forma trapezoidal. Las estrías con frecuencia se bifurcan a lo largo de una “línea lateral”. Los límites del patrón están más o menos bien definidos. Puede haber patrones aberrantes, denominados “tipo E”.

Los machos tienen la parte anterior poco prominente, con forma de cono alto truncado, claramente estriado. La cobertura de la parte anterior sobresale en vista lateral, con número de estrías variable detrás de la misma, generalmente 1-3 en los sectores sublaterales y entre 1-5 en los sectores laterales. El cono del estilete es más largo que la aguja, con nódulos basales prominentes,

generalmente más largos que anchos, con los bordes anteriores chatos, cóncavos o “dentados”. El poro excretor se encuentra a la altura del extremo posterior del istmo y el hemizónido está generalmente entre 0-5 estrías por delante de él. Los campos laterales tienen cuatro líneas longitudinales, con las bandas externas areoladas y las bandas internas raramente cruzadas por estrías, excepto en el extremo posterior. Pueden tener uno o dos testículos. La región posterior es redondeada y el *terminus* no posee estrías. Los fasmidios están situados a la altura de la cloaca o inmediatamente por delante. Las espículas están levemente curvadas. El *gubernaculum* es creciente.

Por su parte, los juveniles tienen la parte anterior poco prominente, que se ve como un cono truncado en vista lateral y sub-hemisférico en vista dorso-ventral. La región labial es ancha, con dos estrías que se ven claramente en los sectores sublaterales de la parte anterior y 3 en los sectores laterales (vista ventral o dorsal). Los nódulos basales del estilete son prominentes y redondeados. El hemizónido está situado tres estrías por delante del poro excretor. Los campos laterales tienen cuatro líneas longitudinales, y las bandas externas están cruzadas por estrías. El recto se ve dilatado. La región posterior se adelgaza hasta un terminus subagudo, con estrías que se engrosan hacia el extremo posterior.

Biología. El ciclo es el mismo descrito para el género. Es una especie polífaga frecuente en ambientes mediterráneos que se encuentra perfectamente en el levante y el sur peninsular, aunque en ambientes templados puede afectar a cultivos bajo invernadero. Su ciclo biológico presenta cuatro fases juveniles, dentro del huevo se forma la fase J1 que sin salir de él pasa a J2, siendo esta fase la que sale del huevo, tiene capacidad migratoria y es la que penetra en la raíz de la planta. Al entrar en la raíz, el nematodo se hace sedentario y pasa por los sucesivos estadios de desarrollo, engrosando progresivamente, hasta que aparece la hembra adulta en forma de pera, tal como hace referencia el nombre genérico. Simultáneamente produce una hipertrofia o engrosamiento de las raíces, de ahí el nombre de “nematodo formador de nódulos” que en Castilla-La Mancha se conoce como “escobillado de la raíz” y en la comarca de Villena (Alicante) como “porrina”.

La temperatura óptima de desarrollo de *M. incognita* es de 28 °C, en la cual el ciclo se completa en 30 días. Al disminuir la temperatura el ciclo se alarga, de

modo que a 20 °C dura entre 57-60 días (Orton Williams 1973). Determinaron Ploeg y Maris (1999) que la temperatura base (T_b) para su desarrollo era de 10,1 °C, con 400 °C día para completar su ciclo (S). Al alejarse del óptimo, las temperaturas influyen también sobre la movilidad de la fase migratoria (J2), de modo que a 18 °C se ve afectada la capacidad de penetración en la raíz (Prot y Van Gundy 1981, Roberts *et al.* 1981, Roberts 1987, Jeffers y Roberts 1993). Por otra parte, a altas temperaturas (35,4 °C) la reproducción se ve inhibida (Ploeg y Maris 1999). Algunos autores proponen la existencia de “termotipos” dentro de la especie, adaptados a diferentes zonas, y con distintos requerimientos de temperatura (Dao 1970). En la zona de Villena (Alicante, España) se ha encontrado que no existen termotipos, y que se pueden dar hasta seis ciclos anuales, cuatro en verano, uno en otoño y otro al final del invierno (López Pérez *et al.* 2003). La reproducción se realiza por partenogénesis mitótica y los individuos suelen ser triploides, aunque en ocasiones se han encontrado individuos diploides (Eisenback y Triantaphyllou 1991).

Daños e interacción con otros patógenos. *M. incognita* produce nódulos que pueden presentarse solos o agrupados, e incluso pueden encontrarse masas de nódulos, como ocurre en cucurbitáceas. En plantas no hospederas no se forman adultos o lo hacen en pequeña cantidad, puede disminuir el crecimiento de la planta y darse síntomas atípicos en las raíces. En las plantas hospederas la gravedad de los síntomas es variable, pudiendo ocasionar la muerte de las mismas, sobre todo cuando son plantas jóvenes (Orton Williams 1973). Se han encontrado numerosas asociaciones entre *M. incognita* y otros patógenos, especialmente hongos, pero también algunas bacterias.

Distribución y hospederos. Este nematodo es de gran importancia en todas las regiones cálidas y tropicales del mundo, encontrándose en África, Australia, América Central y América del Sur, EE UU, India, Japón, Malasia e invernaderos del norte de Europa, Canadá y ex-URSS (Orton Williams 1973, Bello *et al.* 1994). Según Eisenback (1997) la causa de su amplia distribución es su adaptación a diferentes temperaturas, con un límite inferior de -1,1 °C como promedio en el mes más frío. Es la especie de mayor distribución, encontrándose en un rango geográfico entre los 40° de latitud N y 33° de latitud S, con un rango de hospederos extremadamente amplio. Las temperaturas en estas zonas suelen estar entre 18-30 °C, aunque la mayoría de las poblaciones

se encuentran en regiones con temperaturas entre los 24 -30 °C. La temperatura óptima del mes más cálido es de 27 °C. Con frecuencia se suele encontrar a *M. incognita* junto con *M. javanica* (Eisenback y Triantaphyllou 1991). Realizaron Goodey *et al.* (1965) una lista de más de 700 especies vegetales y variedades que son parasitadas por *M. incognita*, incluyendo hortalizas: judías, *Brassica* spp., zanahoria, *Cucurbita* spp., lechuga, okra, guisantes, *Phaseolus* spp., tomate; pastos y leguminosas: pasto Bermuda, trébol, alfalfa; árboles y arbustos: té, *Prunus* spp., *Vitis* spp.; cereales, ornamentales, malas hierbas y cultivos como caña de azúcar, patata, algodón y tabaco (Orton Williams 1973). Se encuentra distribuido por toda la Península Ibérica (Fig. 7).

II.6.5. Relación *Meloidogyne*-hospedero. Los nematodos del género *Meloidogyne* están muy adaptados al parasitismo radicular, dependiendo del establecimiento de los lugares de alimentación especializados dentro de la raíz para su crecimiento y reproducción. Una vez establecidos, los nematodos cuentan con un suministro constante de agua y alimento desde el hospedero, así como con la protección dentro de la agalla para la hembra y su progenie (Siddiqi 2000). Su alta adaptación se traduce en su capacidad de infectar más de 3.000 especies de plantas, incluyendo hortícolas, frutales, cereales y ornamentales (Abad *et al.* 2003).

El daño sobre las plantas se debe principalmente a la alteración de los tejidos vasculares que reduce sustancialmente la toma de nutrientes y agua, con el consiguiente debilitamiento y disminución del rendimiento (Orton Williams 1973, Siddiqi 2000, Abad *et al.* 2003). A esto se agrega que los efectos negativos de *Meloidogyne* se pueden ver agravados por interacciones con otros patógenos. Estos pueden ser hongos (*Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Curvularia* spp.), bacterias (*Pseudomonas*, *Agrobacterium*) u otros nematodos fitoparásitos. Como se ha señalado anteriormente, la identificación de las especies del género *Meloidogyne* se realiza habitualmente a través de los patrones perineales de las hembras maduras y de la morfología y morfometría de los juveniles. Por otra parte, existen los llamados “bioensayos” o “ensayos con hospederos diferenciales”, que estudian la capacidad de desarrollo del nematodo sobre ciertas plantas hospederas. La prueba con hospederos diferenciales más utilizada es el “test de hospederos diferenciales de Carolina del Norte” diseñado por Hartman y Sasser (1985) en la que se

incluyen plantas de algodón cv Deltapine 61, tabaco cv North Carolina 95, pimiento cv Early California Wonder; sandía cv Charleston Grey, cacahuete cv Florunner y tomate cv Rutgers (Tabla 2).

El bioensayo de Hartman y Sasser (1985) distingue diferentes razas en las especies del género *Meloidogyne* más importantes económicamente (Tabla 2). En *M. incognita* se distinguen cuatro razas que se reproducen sobre pimiento, tomate y sandía, mientras que en relación con las plantas huésped de tabaco y algodón, la raza 1 no se reproduce sobre ninguno de estos dos hospederos, la raza 2 se reproduce en tabaco pero no en algodón, la raza 3 se reproduce en algodón pero no sobre tabaco, y la raza 4 se reproduce en ambos. La raza 1 es la más frecuente, seguida de las razas 2 y 3, siendo raro encontrar poblaciones de la raza 4 (Eisenback y Triantaphyllou 1991). En *M. javanica* se ha descrito una sola raza, aunque últimamente se plantea la existencia de la raza 2 que parasita pimiento y la 3 que parasita cacahuete pero no a pimiento (Rahmmah y Hirschmann 1990), por último la 4 que parasita pimiento y cacahuete (Carneiro *et al.* 2003). En *M. arenaria* se ha descrito la raza 1 que ataca pimiento y cacahuete y la raza 2 que no parasita estas plantas huésped. En *M. hapla* se han descrito las razas A y B que se diferencian en el número de cromosomas.

Tabla 2. Identificación de especies y razas de *Meloidogyne* a través de hospedadores diferenciales (Hartman y Sasser 1985).

Razas	Pimiento	Tomate	Algodón	Tabaco	Cacahuete	Sandia
<i>M. incognita</i>						
1	+	+	-	-	-	+
2	+	+	-	+	-	+
3	+	+	+	-	-	+
4	+	+	+	+	-	+
<i>M. javanica</i>						
1	-	+	+	+	-	+
<i>M. arenaria</i>						
1	+	+	-	+	+	+
2	-	+	-	+	-	+
<i>M. hapla</i>						
	+	+	-	+	+	-

Pimiento cv Sonar; tomate cv Marmande; Algodón DP61; Tabaco NC95; Cacahuete cv Florunner; Sandía cv Charleston Grey.

II.6.6. Efecto de la temperatura sobre *M. incognita*. Castilla-La Mancha, por sus características climáticas, no parece ser el área adecuada para el desarrollo de las poblaciones de *M. incognita*, y mucho menos que afectara de forma grave a los cultivos durante el invierno, ya que presenta temperaturas medias por debajo de 15 °C desde el mes de octubre hasta mayo. Debe recordarse que *M. incognita* solo suele producir éste tipo de problemas en áreas con temperaturas altas y casi nunca en zonas donde éstas son demasiado bajas (4,8°C).

López Pérez *et al.* (2003) se plantearon la posibilidad de que existieran en Castilla-La Mancha termotipos adaptados a climas fríos. Partiendo de esta hipótesis de trabajo, diseñaron un experimento consistente en el estudio de la reproducción de las poblaciones a distintas temperaturas, con el fin de observar si existía una mejor adaptación a las bajas temperaturas, y si su capacidad reproductiva e infectiva era similar a la de las poblaciones de *M. incognita*, que se reproducen a temperaturas por encima de los 20 °C. Durante el experimento, la población original se mantuvo en cámara a 24 °C, para conseguir un nivel de inóculo suficientemente elevado. Una fracción de la población original se pasó a 30 °C, y otra fracción se mantuvo a 17 °C, todo ello sobre tomate cv Marmande, que es sensible a *M. incognita*, en macetas de 500 g con siete repeticiones. En los resultados no se observaron diferencias en los índices de nodulación por *M. incognita* sobre tomate cv Marmande sometido a las dos temperaturas elegidas y únicamente aparecen diferencias en la duración de los ciclos, que como es lógico, es mayor en las poblaciones que se someten a temperaturas bajas.

Por otro lado, la población que se mantuvo a 30 °C, se pasó posteriormente a 17 °C para observar su respuesta al cambio, con la intención de determinar si su posible aclimatación a temperaturas elevadas, dificultaba su actividad a temperaturas inferiores. Sin embargo, los resultados que se obtuvieron, no han permitido determinar la presencia de termotipos adaptados a bajas temperaturas en la población de *M. incognita* estudiada en Castilla-La Mancha.

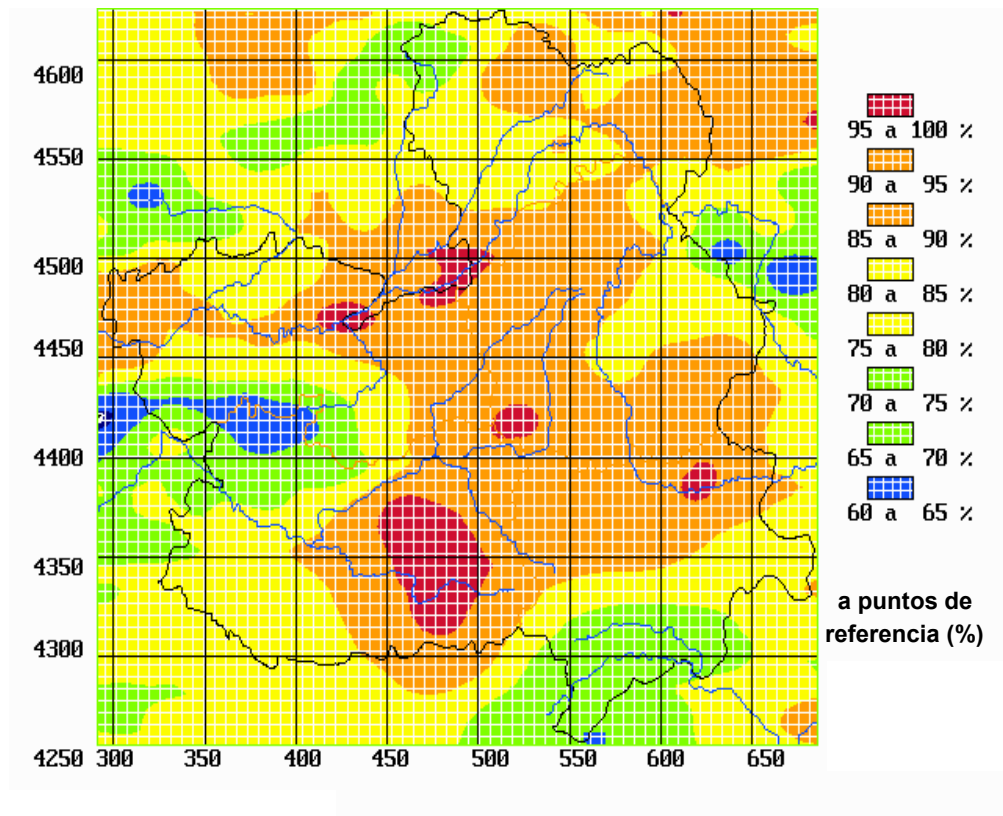


Figura 8. Zonas de riesgo para de *M. incognita* en función de la temperatura en la submeseta sur (Bello *et al.* 1996).

Cuando se estudian los valores de la temperatura del suelo a lo largo del año (Fig. 9) se encuentra que *M. incognita* en Castilla-La Mancha puede desarrollar su ciclo bajo una temperatura óptima, desde el 15 de mayo al 15 de septiembre (durante cuatro meses), dando lugar como máximo a cuatro generaciones de nematodos. Durante el otoño (15 septiembre a 15 noviembre), y la primavera (abril a 15 de mayo) se alarga la duración del ciclo, pudiendo dar lugar a una generación en cada uno de estos períodos. Por último, el nematodo tiene dificultad para reproducirse en invierno (finales de noviembre a finales de marzo), cuando la temperatura es inferior a 15 °C, puesto que los juveniles no pueden moverse.

López Pérez *et al.* (2003) en condiciones de campo han establecido de modo práctico que el inicio de las temperaturas óptimas para el desarrollo de *M. incognita*, coinciden con el “movimiento” de las hojas de las higueras y estudian su relación con la temperatura del suelo, para poder utilizarlo como bioindicador, encontrando que en condiciones de clima mediterráneo continental el 29 de febrero del año 2000, empezaron a moverse el 25% de las yemas terminales, el 13 de marzo aparecieron las primeras hojas y se

aprecian los primeros frutos, y el 24 de marzo estaban en crecimiento las hojas laterales. Ésta fase de la higuera coincide con la temperatura del suelo que permite el inicio de la actividad del nematodo (Fig. 9), por lo que la aparición de las hojas de higuera puede tomarse como un indicador en campo para ser utilizado por los agricultores, como el comienzo de la actividad del nematodo y diseñar alternativas de manejo del cultivo que permitan regular sus poblaciones, con el fin de que no influya en el rendimiento del cultivo.

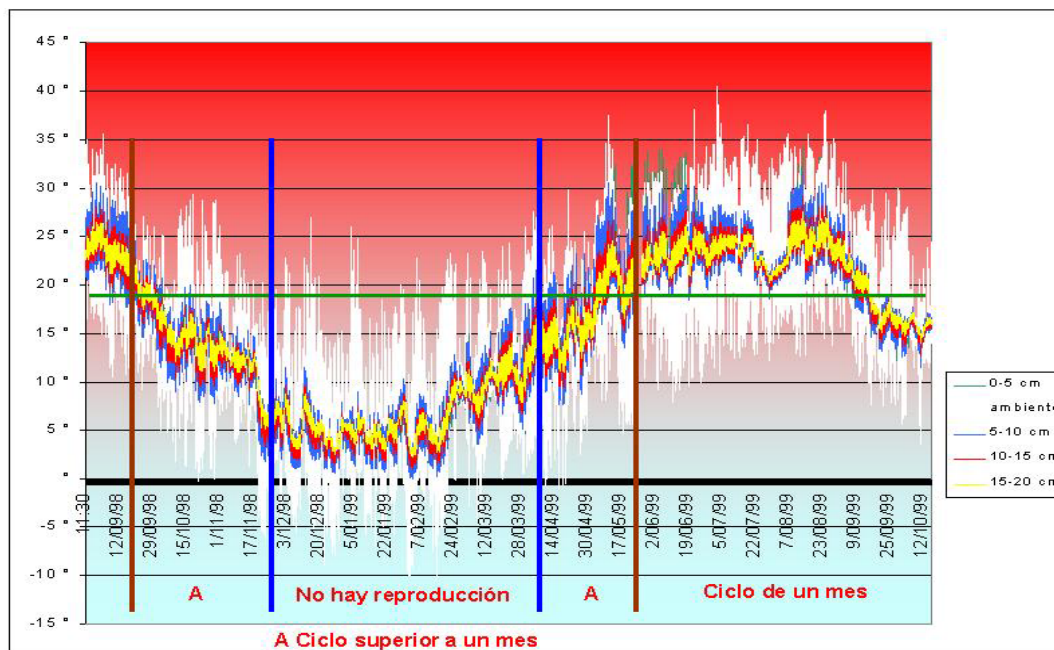


Figura 9. Temperatura del suelo durante un año (7-09-98 al 5-10-99) en Castilla-La Mancha (López Pérez et al. 2003).

Según los resultados del efecto de la temperatura sobre la actividad biológica de *M. incognita*, estos nematodos empiezan su actividad biológica en las últimas semanas de marzo (a partir de S. José), desarrollando una generación hasta mediados de mayo, ello quiere decir que si se aplica un pase de rotavator para controlar las plantas arvenses, éstos pueden actuar como plantas trampa, siempre que esta labor se realice antes de que aparezcan masas de huevos de color castaño oscuro en las raíces y que las nodulaciones producidas por el nematodo no estén bien formadas.

Sabemos que el nematodo puede originar a partir del 15 de mayo una generación cada mes, cuatro generaciones hasta finales de septiembre, por ello sería de gran interés planificar las labores y la época de siembra, haciendo

pases de rotavator siempre que la flora arvense sea abundante. Estos pases de rotavator son equivalentes a un tratamiento con nematicidas químicos y, si se han seguido estas prácticas nos encontraríamos con un control en el número de generaciones de nematodos que no ocasionarían tantos problemas en el cultivo.

III. OBJETIVOS

Se plantean como **objetivos generales** el estudio de la influencia de diferentes concentraciones de vinazas obtenidas como subproductos de la industria vitivinícola en la destilación del alcohol vínico sobre las poblaciones de nematodos del suelo, así como en el manejo de los nematodos fitoparásitos y su interés como mejoradores del suelo, determinando su impacto ambiental y posibles riesgos para la salud.

Objetivos específicos

1. Estudiar la influencia de los subproductos procedentes de la industria vitivinícola sobre las poblaciones de nematodos del suelo, en particular en el manejo de *Xiphinema index*, nematodo transmisor del virus causante del “entrenado corto infeccioso de la vid” (*fanleaf*), una de las principales causas de que la desinfección de suelos para la replantación del viñedo sea obligatoria en los países de la UE, así como determinar también su eficacia en el manejo de los “nematodos formadores de nódulos” del género *Meloidogyne*, uno de los principales problemas causantes de pérdidas en cultivos hortícolas.
2. Determinar el efecto de las diferentes concentraciones de vinazas seleccionadas sobre la fertilidad del suelo, tanto en suelos de viñedo como en cultivos hortícolas, así como conocer los posibles efectos fitotóxicos y ambientales de las concentraciones de vinazas seleccionadas en el manejo de nematodos y como mejoradores del suelo.
3. Determinar las dosis óptimas en relación con la época y métodos de aplicación, así como la maquinaria adecuada. Para ello se tendrá en cuenta los fundamentos científico-técnicos en la utilización de subproductos agroindustriales.

IV. METODOLOGÍA

Se pretende describir en este apartado la metodología que nos permita caracterizar los problemas producidos por los nematodos transmisores de virus en los viñedos españoles, así como valorar la eficacia de la biodesinfección como una alternativa de manejo, no solo para *X. index* en viñedos, sino también para los nematodos “formadores de nódulos” del género *Meloidogyne* que tienen un gran interés en los cultivos hortícolas. Se tendrá en cuenta muy especialmente la realidad agraria de nuestro país, tratando de conocer las interacciones entre los distintos elementos del cultivo: condiciones ambientales, sistemas de manejo y suelo (nematofauna), que pueden afectar al desarrollo de los cultivos, con el fin de elaborar un procedimiento de trabajo que permita optimizar la biodesinfección como alternativa, incrementando su eficacia y disminuyendo los gastos económicos.

Se comienza por describir las características agroecológicas de las zonas donde se han llevado a cabo los experimentos, elegidas como representativas de los ambientes mediterráneos continentales (IV.1); métodos de muestreo y técnicas de extracción de nematodos, analizando los procesos previos a la extracción (IV.2); métodos de estudio cuantitativo y cualitativo de nematodos, indicando los métodos de recuento, aislamiento, muerte, fijación, montaje, y observaciones bajo el microscopio óptico (IV.3); métodos para el estudio de las características edáficas, estudio de perfiles, características físicas y químicas de los suelos estudiados (IV.4); estudio de índices de madurez (IV.5); técnicas para la determinación de la actividad biodesinfectante (IV.6); determinación del efecto de la biodesinfección sobre la planta (IV.7); caracterización de la virulencia de las poblaciones de *Meloidogyne* estudiadas (IV.8) y métodos estadísticos (IV.9).

IV.1. Agroecología de las áreas estudiadas

Los estudios de campo se han realizado fundamentalmente en viñedos de Castilla-La Mancha y en cultivos hortícolas de El Perelló (Sueca, Valencia) sobre suelos clasificados como arenosoles calcáricos:

- Zona de **Socuéllamos, El Pedernoso y Villarrobledo** pertenecientes a las provincias de Ciudad Real, Cuenca y Albacete respectivamente (Fig.10), dentro de la comunidad de Castilla-La Mancha, con Denominaciones de Origen Protegidas (DOP) e Indicaciones Geográficas Protegidas (IGP) donde están inscritas 528.986 ha con una producción comercializada de 3.137.831 t (MARM 2008). La comarca está situada en la zona central de la comunidad de Castilla-La Mancha, una gran llanura con elevaciones montañosas de escasa altitud que junto con la influencia marina casi nula provocan que el clima sea muy extremado e irregular, con la consiguiente repercusión en el aprovechamiento agrícola-ganadero. Se ha clasificado el clima de la zona como templado mediterráneo de matiz continental, con una pluviometría media de 550,8 mm, dándose las máximas precipitaciones en invierno seguido de primavera y otoño, durante los meses de junio, julio y agosto es absoluta la ausencia de precipitaciones y en caso de producirse caen en forma de tormentas que causan más daños que beneficios en agricultura, por lo que se puede afirmar que el balance global es siempre negativo para el suelo. Las temperaturas máximas se dan en verano llegando a 40 °C y las mínimas en invierno alcanzando los -7,5 °C, con una temperatura media de 13.8 °C. Por sus características geográficas y climáticas el área constituye un buen marco de referencia para el estudio epidemiológico de las enfermedades de origen edáfico de las plantas y su manejo ambiental, puesto que los organismos patógenos solo tienen un mes mayo-junio con condiciones óptimas para su desarrollo (Bello *et al.* 1990, 1996).

- Zona de **El Perelló (Sueca, Valencia)**, localidad perteneciente a la Comarca Valenciana de la Ribera Baja, en el Parque Natural de la Albufera. La zona se caracteriza por un clima mediterráneo levantino-balear con pluviometría anual de 400-500 mm, alcanzando unas temperaturas medias de 17-18 °C con inviernos suaves de 8 °C y veranos rondando los 28 °C. Destaca una humedad del 65%, al igual que la insolación alcanza las 2.660 horas de luz anuales (Capel Molina 1981, MAPA 2002)

Para describir los perfiles se ha utilizado la clasificación de suelos propuesta por FAO (1988), que utiliza una serie de datos analíticos referidos a cada horizonte descrito en campo, pudiéndose resumir dichos análisis, fundamentalmente, en tres clases; **Análisis físico:** Granulometría y clasificación textural; determinación del color del suelo mediante cartas de color

para suelos, Munsell; determinación del grado de estructura, consistencia, porosidad, etc.; **Análisis químico:** pH en agua, % carbonatos, % materia orgánica y **Análisis físico-químico:** Determinaciones de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ e H^+ en meq/100 g ó, lo que es igual, en moles de carga/kg, capacidad total de intercambio catiónico y grado de saturación en bases (método del acetato amónico).

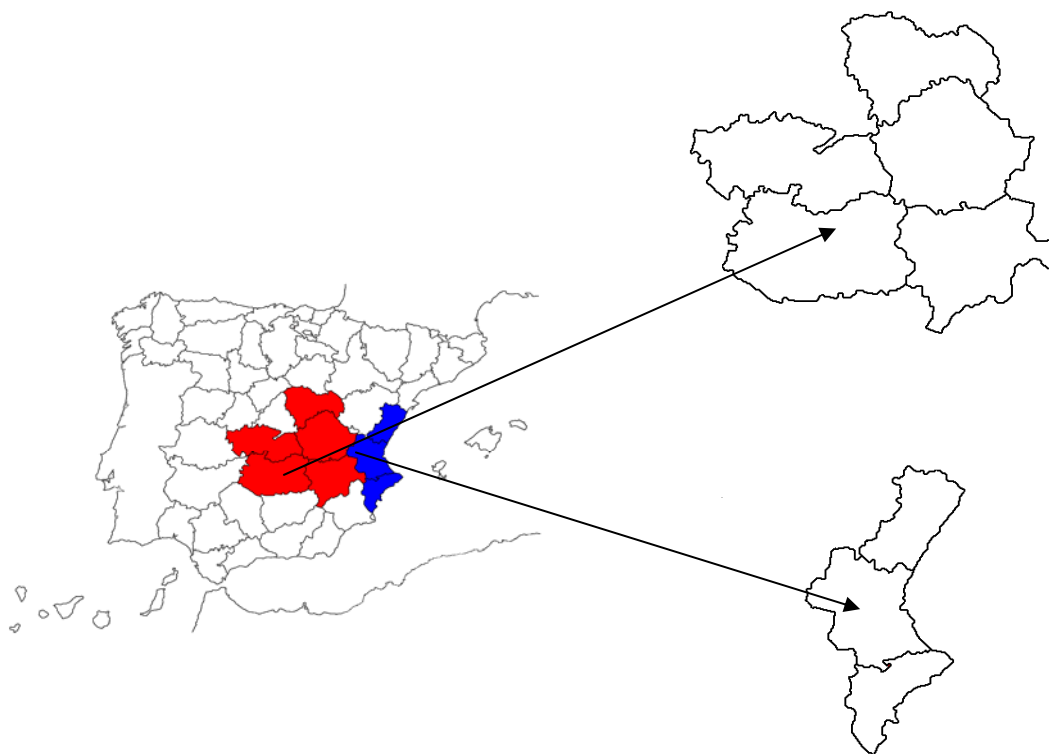


Figura 10. Zonas donde se han realizado los experimentos de campo.

DESCRIPCIÓN DE LOS PERFILES:

- Socuéllamos

Perfil 1. Arenosol calcárico (Arc)

Situación: km 11 de la Ctra. de Pedro Muñoz a Tomelloso.

Altitud: 636 m.

Posición fisiográfica: Planicie o llanura

Forma del terreno circundante: Llano.

Pendiente en el lugar del perfil: Llana o casi llana (0-2%).

Material originario: Sedimentos arenosos con gravas.

Pedregosidad superficial: Abundante (del 10 al 25%).

Drenaje: Bueno.

Erosión: Riesgo y grado ligeros.

Uso: Agrícola, cultivo viñedo.

Tabla 3. Descripción del perfil CR-III Socuéllamos (Ciudad Real).

Horizonte	Profundidad (cm)	Descripción
Ap	0 - 30	Pardo en seco (7,5 YR 5/4) y rojo oscuro en húmedo (2,5 YR 3/6). Textura arenosa. Estructura débil mediana a fina, en bloques angulares. No adherente y ligeramente plástico en mojado, muy friable en húmedo y blando en seco. Pedregosidad en el espesor del horizonte (15%). Escasas raíces finas. Límite con el horizonte inferior, neto y plano.
C1	30 - 50	Amarillo rojo en seco (7,5 YR 6/6) y pardo claro en (7,5 YR 6/4). Textura arenosa. Estructura débil, mediana, en bloques subangulares. No adherente y no plástico en mojado, muy friable en húmedo y muy blando en seco. Escasas raíces finas. Límite con el horizonte inferior, brusco y ondulado.
C2	> 50	Rosa en seco (7,5 YR 7/4) y pardo muy claro en húmedo (10 YR 7/4). Textura "arena". No se aprecia estructura. No adherente y no plástico en mojado, suelto en húmedo y suelto en seco. Pedregosidad de la masa de este horizonte próxima al 50%. No hay raíces.

**Figura 11. Arenosol calcárico (Socuéllamos, Ciudad Real).**

Tabla 4. Datos analíticos del perfil CR-III Socuéllamos (Ciudad Real).

Determinaciones	Ap (0-30 cm)	C1 (30-50 cm)	C2 (+50 cm)
Físicas			
Arena (%) (2 -0,05)	84	86	98
Limo (%) (0,05 - 0,002)	6	4	1
Arcilla (%) (< 0,002)	10	10	1
Textura	Arenosa franca	Arenosa	Arenosa franca
Químicas			
pH en agua	7,80	7,80	8,05
pH en KCl	7,25	7,30	7,80
Carbonatos (%)	7,9	27,2	18,2
Materia orgánica (%)	0,85	0,51	0,10
Físico-químicas			
Intercambio iónico (me /100 g = c moles de carga/kg)			
Ca ²⁺	4,46	7,02	4,24
Mg ²⁺	2,36	1,70	0,72
Na ⁺	0,09	0,20	0,02
K ⁺	0,34	0,08	0,02
H ⁺	---	---	---
Capacidad total	7,25	9,00	5,00
Saturación (%)	100	100	100

- El Perelló (Sueca, Valencia)

Perfil. Arenosol calcárico (Arc)

Situación: En la zona conocida por “El Recatí”, situada en Valencia, entre las localidades de El Perelló y El Perellonet (carretera litoral de Valencia a Cullera).

Altitud: 12 m.s.n.m.

Posición fisiográfica: Depósitos aluviales litorales.

Forma del terreno circundante: Llano

Pendiente en el lugar del perfil: Llana

Material originario: Arenas y limos de zonas costeras.

Pedregosidad superficial: No hay

Drenaje: interno y externo buenos.

Erosión: No hay.

Uso: Agricultura intensiva (invernadero bajo plástico).

Tabla 5. Descripción del perfil - El Perelló (Sueca, Valencia).

Horizonte	Profundidad (cm)	Descripción
Ap	0 - 30	Color pardo en semiseco (10 YR 4/3) y pardo oscuro en húmedo (10 YR 3/2). Textura arenosa franca. Estructura mediana subangular de débil desarrollo. Consistencia en mojado, ligeramente adherente y no plástico; en húmedo muy friable y en seco suelto. Poros grandes y gran actividad biológica. Raíces escasas y gruesas. El límite con el horizonte subyacente es gradual y horizontal.
A1	30 - 45	Color gris claro en seco (10 YR 5/1), con ligeros moteados amarillo pálido (5 Y 7/4); gris oscuro (5 Y 6/4) en húmedo y moteados pardo oliva (5 Y 6/4). Textura arena. Estructura mediana a gruesa, subangular muy débilmente desarrollada. No adherente y no plástico en mojado, muy friable en húmedo y blando en seco. Límite con el horizonte subyacente neto y gradual.
C	>45	Color gris oscuro en seco (10 YR 4/1) y (5 Y 4/1) en húmedo. Textura arena. Estructura no se aprecia bien; puede ser masiva. Ligeramente adherente y ligeramente plástico en mojado, muy friable en húmedo y blando en seco.



Figura 12. Arenosol calcárico (El Perelló Sueca, Valencia).

Tabla 6. Datos analíticos del perfil El Perelló (Sueca, Valencia).

Determinaciones	A _p (0 30 cm)	A ₁ (30 45 cm)	C (+ 45 cm)
<u>Físicas</u>			
Arena (%) (2 -0,05)	87	89	96
Limo (%) (0,05 - 0,002)	6	6	1
Arcilla (%) (< 0,002)	7	5	3
Índice de Inestabilidad estructural	0,23	0,25	0,38
pF O	31,24	27,99	26,75
Textura	Arenoso franco	Arena	Arena
<u>Químicas</u>			
pH en agua	7,74	7,95	8,06
pH en ClK	7,18	7,34	7,97
Carbonatos (%)	20,0	19,64	17,09
Materia orgánica (%)	2,40	0,83	0,09
<u>Físico-químicas</u>			
Intercambio iónico me/100 g = cmoles de carga/kg			
Ca ⁺⁺	12,5	8,1	10,6
Mg ⁺⁺	2,2	0,8	0,4
Na ⁺	1,3	0,7	1,6
K ⁺	0,3	0,1	0,1
H ⁺	-	-	-
Capacidad total	33,3	18,6	32,7
Saturación (%)	50,0	52,15	38,8

IV.2. Muestreos y técnicas de extracción

En este apartado se describe la metodología empleada en la determinación de la zona de muestreo, con el fin de obtener datos de densidad de las poblaciones de nematodos, que sean representativos de su distribución en el suelo, al mismo tiempo que conocer el efecto de la biodesinfección sobre el manejo de los mismos y la fertilidad del suelo. Se describen las técnicas empleadas para la recogida de muestras, almacenamiento y posterior preparación para la extracción. La manera de determinar las relaciones existentes entre nematodo-hospedador es cuantificar la densidad de población del nematodo. Esta estimación, requiere un conocimiento previo de la distribución del nematodo a través del perfil del suelo con vistas a optimizar los procesos de muestreo. En los viñedos, las muestras de suelo pueden estar

relacionadas con el área de mayor densidad de raíces, que refleja el vigor de la planta y, a su vez, puede ser usada como una medida de la severidad de la infestación por el nematodo. El conocimiento de la abundancia de nematodos en la muestra puede proporcionar una información orientativa de la distribución del nematodo en la parcela.

IV.2.1.Muestreos. Según lo establecido anteriormente, se ha realizado el estudio de los perfiles del suelo representativo de las áreas estudiadas, y para conocer la distribución de nematodos en profundidad se han tomado muestras en los primeros 20 cm y a profundidades superiores. Como base del muestreo se eligen al azar tanto plantas con síntomas externos de baja producción como sanas. Las muestras han sido recogidas de cada una de las plantas seleccionadas, por lo general a una profundidad entre 0-20 cm utilizando como instrumento una azadilla. Con ella se cava hasta que aparecen las raíces secundarias recogiendo unos 20 g de raíces y parte del suelo que las rodea (500 g). Cuando se quiere estudiar la distribución vertical de los nematodos se utiliza una sonda, siempre que se trate de suelos que no sean pedregosos. Las muestras de raíz y suelo se introducen en bolsas de plástico que se cierran para evitar la pérdida de humedad y se etiquetan debidamente con un número que corresponde al cuaderno de campo, para su transporte al laboratorio.

Paralelamente a estas operaciones se registran en un cuaderno de campo las características de la muestra: datos para su localización, características del cultivo, tipo de suelo, fecha de recogida y otros factores de interés. El transporte al laboratorio debe hacerse en cajas de paredes aislantes, no demorando la operación más de 1-2 días. Las muestras se almacenan en cámaras frigoríficas a una temperatura de 5 a 10 °C, bajo la cual los nematodos están en estado de latencia. La temperatura de almacenaje es importante, puesto que si las muestras se someten a temperaturas inferiores a las indicadas pueden morir muchos de los nematodos, y a temperaturas superiores los huevos pueden eclosionar y reproducirse, con lo cual la población existente en la muestra no sería representativa de la del momento de su recogida.

A continuación se describen las distintas técnicas empleadas para la extracción de muestras, teniendo en cuenta las características de movilidad de los nematodos, estas técnicas vienen definidas por el estadio que nos interese

determinar, siendo recomendable la extracción a partir de suelo cuando el objeto del trabajo sea cuantificar la densidad de individuos en fase preinfestiva.

IV.2.2. Procesos previos a la extracción. Para la extracción de nematodos de la muestra se homogeneiza, se pasa por un tamiz con malla de 2 mm siempre que la muestra esté seca, e incluso si el suelo está seco pero no es demasiado pedregoso, y se toma una fracción de 200 cc. Se coloca la fracción obtenida en un recipiente con agua, donde se mantiene un tiempo mínimo de un cuarto de hora. Mientras, en una hoja de laboratorio se anotan todas las características de la muestra. Se opera de un modo semejante con la muestra de raíz de la que se toman 5 g de la muestra. El resto de suelo y raíz no utilizados en el análisis se guardan en cámaras frigoríficas para estudios posteriores, después de separar una fracción para determinar el pH, materia orgánica, humedad y realizar el análisis mecánico del suelo, cuando se crea necesario.

IV.2.3. Extracción a partir de suelo. Los métodos de extracción en Nematología, tratan por diferentes vías de separar los nematodos de las restantes fracciones del suelo: grava, arena, limo, arcilla, fibras vegetales y agua. Aunque los métodos de extracción son numerosos, teniendo en cuenta su fundamento existen solo dos grupos principales, unos que se basan en la densidad de los nematodos y otros en su movilidad. Un método de extracción se considera satisfactorio cuando la mayor parte de los nematodos se recogen en una pequeña suspensión de agua, conteniendo muy poca cantidad de las demás fracciones. Hemos elegido la centrifugación por ser el método más adecuado para el estudio del efecto de los biodesinfectantes sobre los nematodos del suelo, puesto que éstos pueden estar muertos y es más conveniente aplicar métodos de centrifugación basados en la densidad de los nematodos y no en su movilidad, aunque para el estudio de *X. index* se ha utilizado el método de Baermann (1917), según la modificación de Flegg (1967).

Método de centrifugación (Fig. 13). La muestra una vez tamizada se prepara para la centrifugación, para ello se elimina la arena agitando el recipiente que contiene la muestra hasta que la mayor parte del limo, arcilla y fibras vegetales, así como los nematodos, queden en suspensión, vertiéndose la suspensión en un recipiente transparente de un volumen de cuatro litros; el proceso se repite varias

veces hasta que el agua esté más o menos transparente, lo que indica que en la cápsula queda solo arena, pasando los nematodos, el limo, la arcilla y las fibras vegetales al recipiente transparente de cristal o plástico, que debe completarse con agua hasta su borde y dejarse reposar hasta que las fibras vegetales suban a la superficie mientras que el limo y arcilla, así como los nematodos se sedimenten.

Las fibras vegetales que flotan en la superficie del recipiente se eliminan con agua a presión, pero generalmente se pone una tira de papel de filtro que retiene las fibras vegetales y permite detectar la posible presencia de nematodos formadores de quistes de los géneros *Heterodera* y *Globodera*, que son frecuentes en cultivos hortícolas, pero no en viñedos. Mediante un sifón de decantación se va eliminando parte del agua y la arcilla que está en suspensión hasta que solo quedan los sedimentos. Estos sedimentos se pasan a un vaso de precipitado de un litro de capacidad, que se enrasa con agua para eliminar los restos de partículas vegetales, que flotan en la superficie, mediante agua a presión. Se deja sedimentar de nuevo y se reduce su contenido mediante filtración de toda la suspensión acuosa a través de un tamiz de malla de 10 μm . Se lava el tamiz sobre un vaso de precipitado hasta alcanzar un volumen aproximado de 200 ml, se agita para que quede bien homogeneizado, vertiéndose de modo uniforme en los cuatro tubos de la centrífuga de capacidad total aproximada de 300 ml, y se realizan a continuación dos centrifugaciones, siguiendo el método de Nombela y Bello (1983).

La 1ª centrifugación se realiza a $\text{FRC} = 1.800 \times \text{g}$, durante tres minutos. Se decanta suavemente el agua, haciendo girar el tubo lentamente sobre su eje longitudinal para impedir que puedan caer pequeñas fracciones del sedimento, eliminando, mediante este paso, el agua utilizada y quedando únicamente el limo, parte de la arcilla y los nematodos.

La 2ª centrifugación se lleva a cabo añadiendo, al residuo que queda en los tubos de centrífuga, una solución de azúcar de densidad de 1,18 (700 ml de agua + 300 ml de azúcar) mezclándolo bien con un agitador. Se centrifuga a continuación durante medio minuto, dependiendo de la naturaleza de la muestra, a 1500 r.p.m. Los sobrenadantes de las dos centrifugaciones se unen en una sola suspensión que se vierte sobre un tamiz de luz de malla de

10 μm que se lava con agua a presión, pasando el residuo que queda en él a una placa de Petri para iniciar el recuento.

Esta última fase debe realizarse con gran rapidez especialmente cuando los nematodos están destinados a estudios taxonómicos o morfológicos, puesto que al estar sometidos a la solución de azúcar puede producirse plasmolisis que los deformen, e incluso pueden morir.

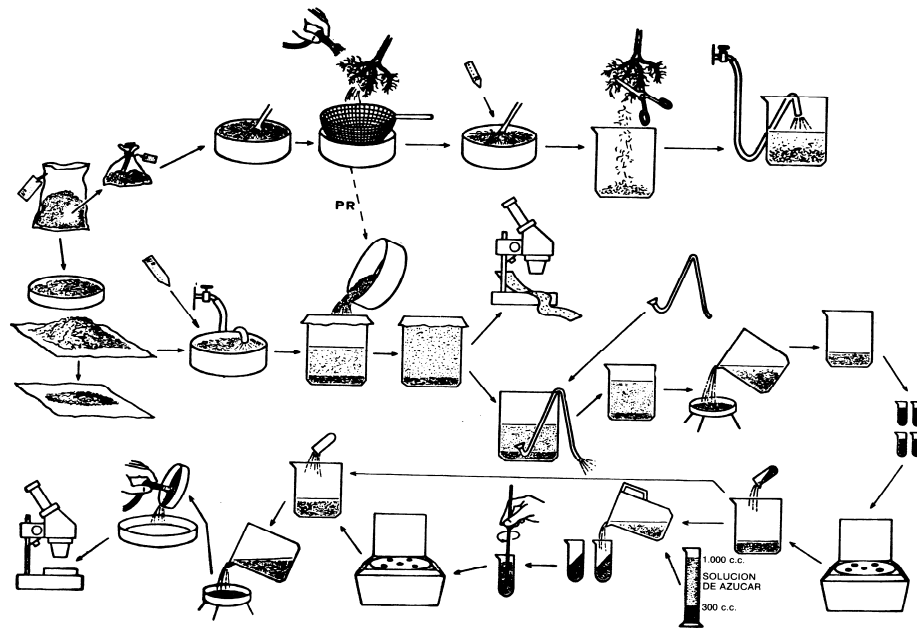


Figura 13. Extracción de nematodos por centrifugación (Nombela y Bello 1983).

Con la 2ª centrifugación logramos separar los nematodos de la arcilla y el limo. Este se sedimenta en el fondo de los tubos, mientras que los nematodos y la arcilla quedan en flotación, por tener menor densidad. El tamiz de 10 μm de luz de malla permite el paso de la arcilla y quedan solo retenidos en él los nematodos y, en algún caso, resto de fibras vegetales que pueden eliminarse con unas pinzas, y en caso de ser muy abundantes, se vierte el contenido del tamiz sobre otro de 50 μm de malla, que se deja reposar en una placa de Petri con una pequeña cantidad de agua, permitiendo así el paso de los nematodos a la placa, mientras que las fibras quedan retenidas por el tamiz.

Método de Flegg (Fig. 14). La extracción de los nematodos se ha realizado también mediante una modificación de la técnica de decantación y filtración

de Flegg (1967), basado en la movilidad de los nematodos y en su velocidad de sedimentación de acuerdo con su tamaño.

El método de Flegg (1967) sigue el procedimiento siguiente: del suelo tamizado se toman 200 cc, que se depositan en un vaso de precipitado graduado de un litro de capacidad, se cubre de agua y se deja como mínimo un cuarto de hora antes de proceder a la extracción propiamente dicha, con el fin de que se deshagan los agregados existentes. Del suelo restante se separan unos 150 g que, después de secarlos, se emplean en el estudio de las características edáficas (determinación de pH, conductividad eléctrica, materia orgánica, etc.). El resto de la muestra se conserva en la cámara frigorífica a ± 5 °C para estudios posteriores o por si fuera necesario repetir los análisis. Una vez pasado el tiempo de remojo necesario de la muestra se deposita en un recipiente de unos 30 cm de diámetro, añadiendo agua a presión y removiendo profundamente la muestra con la mano para suspender las partículas. Después de 25 segundos de sedimentación, el fluido sobrenadante se decanta a través de una batería de dos tamices de 150 μm de apertura de malla el mayor y de 100 μm el menor. El residuo de los tamices se lava suavemente y se recoge en un recipiente. Se repite el procedimiento y tras 15 segundos de sedimentación se decanta de nuevo en la misma batería de tamices y se recoge igualmente el residuo.

El residuo de los tamices se lava cuidadosamente y se vierte sobre uno de nylon de 90 μm de luz y 12 cm de diámetro, que se coloca en un recipiente plástico con diámetro diferenciado, 8,5 en la base y 13,5 en la superior y una altura aproximada de 9 cm, con agua suficiente para que el filtro y los residuos queden embebidos. Pasadas 48 horas, el contenido del recipiente se pasa por un tamiz de 10 μm de luz de malla y se recoge en una placa de Petri.

IV.3. Estudio cuantitativo y cualitativo de nematodos

En este apartado se incluyen las distintas metodologías empleadas en el recuento y aislamiento de nematodos, los procesos seguidos para la fijación y montaje de aquellos individuos que se consideren de interés para posteriores estudios microscópicos, y los métodos de conservación del extracto de la muestra. A continuación se describe el método de tinción de nematodos en tejidos vegetales más frecuentemente utilizado para identificar de manera sencilla las fases

parásitas, ya que es difícil reconocer al animal sin emplear técnicas que permitan destacarlo y contrastarlo de las raíces.

Recuento y aislamiento. El recuento se realiza en una placa de Petri de fondo plano, en la que se recogen los nematodos tras su extracción, observando bajo un microscopio estereoscópico la cantidad global de nematodos. Si el número es pequeño, se inicia el recuento directamente, con la ayuda de un contador de mano múltiple, pero si se observa gran cantidad de ejemplares, se divide la placa con un lápiz graso en dos o cuatro cuadrantes. Los resultados se registran en una hoja de recuentos, en la que figuran los géneros más comunes, anotándose el número de ejemplares de cada grupo. De este modo, se obtiene la cantidad de nematodos que hay en 100 cc de suelo. Si son muchos, se recogen en una copa graduada y se dejan sedimentar durante cuatro horas, a continuación se reduce el volumen a 10 cc y se extrae 1 cc de la fracción que se recuenta y se multiplican por 10 para referirlo a 100 cc.

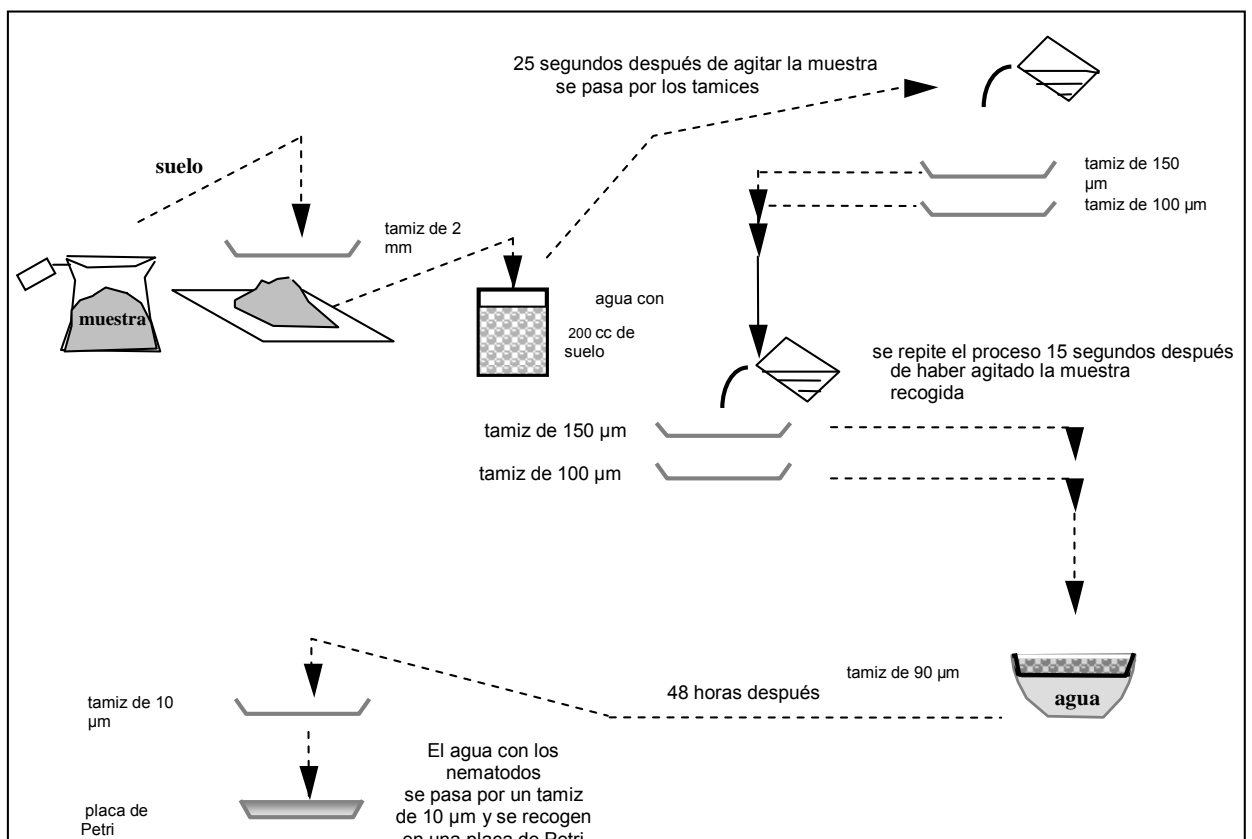


Figura 14. Método de extracción de Flegg (1967).

El **aislamiento** de los nematodos se realiza después de la extracción o como máximo antes de dos días, para que no se desarrollen micelios de hongos. Se

prepara un pocillo con agua destilada para aislar los nematodos que se van a montar en glicerina. El pocillo se etiqueta con el número de la muestra y el aislamiento se realiza con un pincel al que se han dejado únicamente dos fibras. Al mismo tiempo, si se quiere realizar un análisis rápido de alguno de los nematodos aislados, se prepara un portaobjetos de cristal, en el que se vierte una gota de agua destilada, donde se colocan los nematodos aislados, se mantiene sobre la llama de un mechero y se tiñe con una gota de azul lactofenol. Es conveniente que el número de nematodos por preparación no exceda de 10, de modo que los restantes cuyo estudio se considera de interés se pasan al pocillo.

Muerte, fijación y montaje. Los ejemplares, que han sido aislados en el pocillo, se matan y fijan en el día para evitar el crecimiento de micelios de hongos. Para ello, una vez que los nematodos se encuentran en el fondo del pocillo, se retira la mayor cantidad de agua posible con una pipeta Pasteur y a continuación se añade fijador I, previamente calentado al baño de María entre 70-80 °C. El pocillo se tapa para que no se evapore el formol del fijador y se mantiene así durante varios días, al cabo de los cuales después de quitar la tapa, se introduce en un recipiente hermético con atmósfera de alcohol, que se mantiene durante 12 horas en una estufa a 39 °C. Transcurrido este tiempo, se saca el pocillo de la atmósfera de alcohol y se deja evaporar lentamente en la estufa. Una vez evaporado el fijador I, se añade fijador II y se deja evaporar de nuevo, después se añade fijador III y se deja en la estufa, en la que puede permanecer hasta una semana. Una vez terminado el proceso se lleva el pocillo a un desecador que contiene cloruro de calcio o gel de sílice. En este desecador se mantendrán los nematodos en glicerina hasta el momento de ser montados. La composición de los fijadores siguiendo el método de De Grisse (1969), se recogen en la Tabla 7.

El **montaje** se realiza en un portaobjetos, en cuyo centro se ha colocado un pequeño círculo de parafina solidificada. Los nematodos ya fijados y procesados se pasan desde el pocillo a una pequeña gota de glicerina colocada en el interior del círculo de parafina. Antes de colocar el cubreobjetos, se procura poner los individuos en el centro de la preparación, realizando este proceso bajo el microscopio estereoscópico para evitar que queden superpuestos. Tras poner el cubreobjetos, se acerca la preparación a una placa térmica a 60 °C para que al fundirse la parafina quede sellada.

Tabla 7. Composición de los fijadores (De Grisse 1969).

Fijador I (cm ³)	Fijador II (cm ³)	Fijador III (cm ³)
Agua destilada 89	Etanol 96% 95	Etanol 96%50
Formol 40% 10	Glicerina 5	Glicerina50
Glicerina 1		

Conservación del extracto de la muestra. Una vez aislados los nematodos para su fijación y montaje, el contenido de la placa de Petri con los restantes nematodos se pasa a una copa graduada donde se dejan sedimentar; posteriormente se reduce el agua con la ayuda de un frasco lavador. La copa se lava con fijador I, calentando entre 70-80 °C al baño de María, vertiéndose en frasco de conservación, de modo que los nematodos queden fijados. Seguidamente, se registra y almacena el frasco. Cuando el número de muestras es elevado se pasa directamente a la fijación después de la extracción. En una etapa posterior se podrán escoger los ejemplares que se desee y se seguirá el proceso anteriormente indicado.

Estudios morfométricos. Las observaciones se realizan entre 400-1200 aumentos bajo un microscopio LEITZ Dialux 22 con contraste de interferencia diferencial, Nomarski, y cámara clara incorporados. Mediante inmersión y contraste de interferencia diferencial se han estudiado las características morfológicas de los nematodos, permitiendo su determinación a nivel de especie. Para el estudio morfométrico se han realizado dibujos, con cámara clara, de cada uno de los ejemplares estudiados, sobre ellos se toman las medidas de los nematodos, en algunas ocasiones mediante la utilización de una tableta digitalizadora, pero en general con la ayuda de un curvómetro. Para su determinación se han utilizado los índices somatométricos de De Man (1880), así como otras medidas establecidas posteriormente para la determinación de estos géneros:

Índices De Man (1880)

- L = Longitud total en mm
- a = Longitud total / Anchura máxima
- b = Longitud total / Longitud de la región faríngea
- c = Longitud total / Longitud de la región posterior
- c' = Longitud de la cola/ Anchura del diámetro anal
- V = Distancia desde el extremo anterior a la vulva/ Longitud total X 100

- G_1 = Longitud rama genital anterior / Longitud total X 100
- G_2 = Longitud rama genital posterior / Longitud total X 100
- T = Longitud de la gónada masculina / Longitud total X 100

Otras medidas (μm):

- Longitud del esófago, distancia desde el final del odontostilo hasta el cardias.
- Longitud del odontostilo.
- Longitud de la espícula del macho, medida tomada por el interior de la misma.
- Anchura labial, medida en la parte más ancha.
- Longitud de la región posterior, desde el ano hasta el extremo posterior.
- Número de suplementos precloacales en el macho

IV.4. Estudio de las características edáficas

El estudio de los parámetros físicos y químicos de los suelos empleados, se ha realizado conforme a los Métodos Oficiales de Análisis (MAPA 1994). Por tal razón no se exponen en el texto, ya que además en la fuente originaria se encuentra una descripción detallada de estos métodos. La determinación de la humedad se realizó mediante el método gravimétrico, evaluando la diferencia de peso entre la muestra recogida en condiciones de campo y una vez desecada en estufa a 105 °C. Los resultados se expresan en porcentaje de contenido de agua respecto a la muestra en condiciones de campo.

IV.5. Estudio de índices de madurez

La evaluación de la madurez de la vinaza resulta fundamental en el uso potencial de este producto en la agricultura. Al iniciar el desarrollo de los experimentos de biodesinfección es práctica obligada comprobar si los productos utilizados en el proceso provocan efecto fitotóxico sobre las áreas biodesinfectadas. Por esta razón hemos utilizado como índice ensayos de germinación con semillas de berro (*Lepidium sativum* L.).

Bioensayo de germinación El ensayo de germinación tiene en cuenta el número de semillas germinadas con los distintos sustratos y la longitud alcanzada por el sistema radical. Se colocan 10 semillas de berro (*Lepidium*

sativum L.), con cuatro repeticiones, sobre un papel de filtro impregnadas con 5 ml de la dilución de vinaza elegida bien distribuida en una placa de Petri de aproximadamente 9 cm. de diámetro, debiendo permanecer 24 h en una cámara oscura a Tª de 26 °C, durante 3 días. Como testigo se utilizó un tratamiento al que solo se añadió agua destilada. Se calcula posteriormente el porcentaje de germinación, la longitud media de las raíces plántulas y el índice de germinación que viene dado por la expresión:

$$Ig = \% G \cdot \frac{Lm}{Lc}$$

Donde, *Ig* es el índice de germinación, %G el porcentaje de semillas germinadas, *Lm* la longitud media de las raíces correspondientes a los tratamientos y *Lc* la longitud media de las raíces de control. El índice de germinación es un buen indicativo de la madurez de la vinaza (libre de sustancias fitotóxicas) cuando alcanza un valor superior al 70%.

Determinación de la actividad biológica del suelo. El objetivo de esta técnica consiste en la evaluación de la actividad biológica potencial de las muestras de suelo. Ésta puede ser estimada en función de los mg C que se desprenden en forma de CO₂ cuando se incuban, en el laboratorio, en condiciones óptimas de humedad y temperatura. Debido a que los suelos presentan diferentes porcentajes de C, se calculan también coeficientes de mineralización, que corresponden a los mg C/100 g C de suelo y reflejan la mayor o menor biodegradabilidad de la materia orgánica, permitiendo diferenciar tipos de humus estables (bajos valores de coeficiente de mineralización) de otros en los que la materia orgánica es supuestamente más joven o está menos incorporada a la fracción mineral, siendo por lo tanto, más fácilmente biodegradable.

Se incubaron 20 g de muestra e suelo homogeneizada a 2 mm y humedecida a 2/3 de su capacidad de retención hídrica a presión atmosférica. El experimento se llevó a cabo en matraces erlenmeyer de 500 ml, provistos de tapones de goma atravesados por un tubo de entrada y otro de salida manteniéndose en una cámara de cultivo a 27 °C. El desprendimiento de CO₂ de las muestras de suelo, se midió conectando el tubo de salida a un analizador de gas Carmhograph-12 (Wösthoff), mientras que el tubo de entrada se conectó a una columna de cal sodada para permitir la renovación de la atmósfera del matraz

con aire libre de CO₂. La incubación tuvo lugar en condiciones aerobias, al renovarse periódicamente la atmósfera del matraz durante el proceso de medida. Las mediciones se realizaron diariamente durante los 10 primeros días. La actividad respiratoria de los suelos se expresa como mg C/100 g de suelo (Almendros *et al.* 1990 en función de la Tasa de Mineralización de Chone *et al.* 1973).

IV.6. Determinación de la actividad biodesinfectante

Se comienza por la determinación *in vitro* con un extracto del biodesinfectante utilizado, para pasar a diseñar los experimentos en laboratorio y campo.

IV.6.1. Determinación *in vitro* de la actividad biodesinfectante. Se hace una dilución del biodesinfectante, añadiéndose en un primer paso un 100, 50 y 25% sobre un pocillo que contiene 5 individuos de *X. index* que se cubre y se va observando cada hora el número de individuos vivos y muertos, hasta que estén todos muertos. En el caso que la eficacia al 25% fuera completa (100% de muertos), se pasa a una segunda fase de diluciones: 10, 5 y 2% y se repiten las observaciones cada hora, pudiendo establecer las intermedias hasta que se localiza la dosis óptima. En cada caso, se determina si la acción es nematicida y se debe directamente a la acción de las diluciones, o si es nematostática que se debe a la acción de los gases contenidos en el extracto, destapando los pocillos y en el caso de que se tratase de una nematostasis, los juveniles se recuperarían a los pocos segundos. Con ello, se planifican los siguientes experimentos en suelo, hasta establecer las dosis apropiadas para ser tratadas en los experimentos de campo.

IV.6.2. Estudio en laboratorio de la actividad biodesinfectante en suelo. Para comprobar la actividad biodesinfectante de un producto antes de diseñar el experimento de campo, se ha puesto a punto una prueba de laboratorio que permite valorar su efectividad y establecer la técnica más adecuada a tal fin (Fig. 15). Para realizar esta prueba, se muestrea el área donde se pretende realizar el experimento y se determina la cantidad de nematodos fitoparásitos presentes, especialmente los del género *Xiphinema*. Una vez comprobada la presencia del nematodo, se coloca en una bolsa de plástico de polietileno transparente con 0,50 kg de suelo infestado. Realizando cuatro repeticiones por tratamiento, además de cuatro muestras testigo.

Seguidamente, se añade a cada bolsa con suelo infestado la proporción indicada del biodesinfectante, se mezcla uniformemente, se añade un activador para acelerar el proceso de descomposición y, por tanto, el desprendimiento de gases que afectarán a las poblaciones de fitoparásitos. A toda esta mezcla se le añade agua hasta capacidad de campo o determinado porcentaje de saturación de agua dando un riego al mismo. Una vez culminado este proceso, se colocan las bolsas en una cámara a temperatura de 30 °C y humedad controlada, donde permanecerán aproximadamente 20 días, al cabo de los cuales se realiza la extracción de los nematodos mediante el método anteriormente descrito para suelo (Nombela y Bello 1983). Es fundamental conocer el contenido de materia orgánica del suelo utilizado, puesto que si éste es alto se puede deber a ella el efecto biodesinfectante, con el resto se determina el efecto de los biodesinfectantes sobre la fertilidad del suelo.

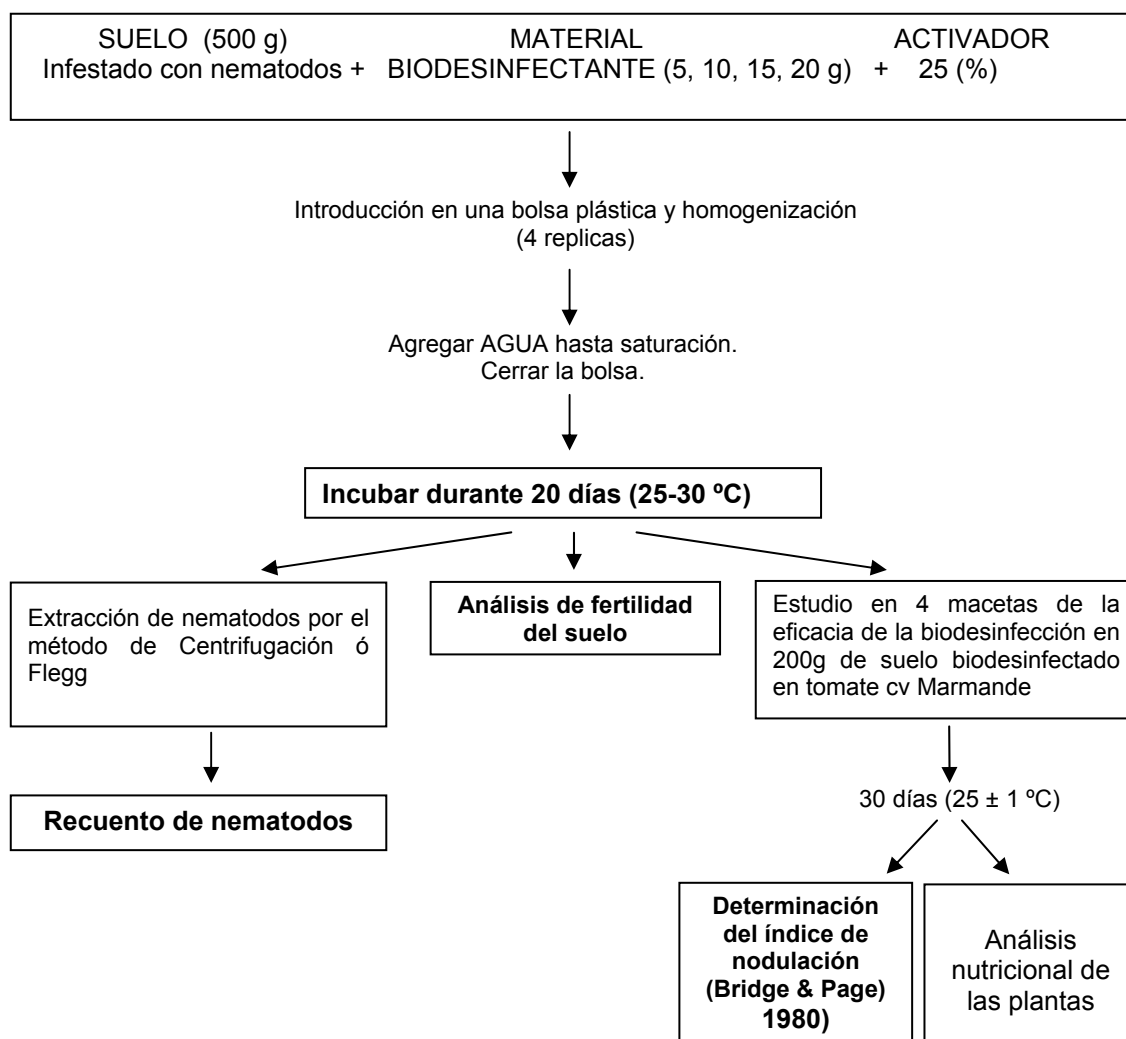


Figura 15. Protocolo de biodesinfección en condiciones de laboratorio.

IV.6.3. Determinación de la actividad biodesinfestante en campo.

Después de establecer las dosis óptimas en laboratorio, se elige en campo una parcela de 100 m² que ha sido muestreada previamente con cinco tomas, en un muestreo en forma de W, a profundidad de 0-20 cm, extrayéndose en laboratorio los nematodos para determinar las poblaciones de los diferentes grupos: *X. index*, rabdítidos, doriláimidos, monónquidos y enquitreidos.

Se aplica a continuación el biodesinfestante, uniformemente distribuido, se satura con agua de riego, se puede poner plástico, o simplemente, en el caso de los cultivos a cielo abierto se utiliza la costra impermeable que se forma tras el riego para retener los gases, especialmente en los suelos con un alto contenido en arcilla. Después de 20 días se retira el plástico, si se ha puesto, y se vuelve a hacer un muestreo con tomas en forma de W, recogiendo suficiente muestra para la extracción de cuatro muestras de nematodos (400 g), para comprobar la eficacia de la biodesinfestación en laboratorio cultivando plantas de tomate cv Marmande (250 g) y para análisis de suelo (10 g). Por último, si se hace un pase de rotavator antes de 30 días, las malas hierbas pueden actuar como planta trampa, eliminando las pequeñas áreas donde la biodesinfestación no fue eficaz, puesto que actúa como un biodesinfestante eficaz (Fig. 16).

IV.7. Efecto de la biodesinfestación sobre la planta

Se estudió fundamentalmente el efecto de la biodesinfestación sobre la biomasa y nutrición de la planta. Para ello, en macetas de 300 g de suelo, se trasplantaron plantulas de tomate cv Marmande, susceptible al nematodo (*Meloidogyne*), con 4 repeticiones por tratamiento, comprobándose en las mismas, además de los índices de nodulación por el nematodo, algunos indicadores de crecimiento vegetal después de un mes. Los indicadores de crecimiento estudiados fueron: altura de la planta, peso de la parte aérea, peso de la raíz y número de hojas. Para realizar dichas mediciones se debe secar previamente la planta hasta peso constante. Se utilizó una regla graduada y una balanza de precisión, respectivamente. Los datos para ser procesados se reflejan en las hojas de muestras, donde además se recoge la fecha de siembra y de levantamiento de las macetas es decir del experimento, así como también, el número de muestra y el tratamiento aplicado.

Estudio de la nutrición de la planta. Dadas las características de nuestro experimento, basada en la utilización de residuos, se decidió estudiar el efecto que sobre las plantas tratadas podían ocasionar los mismos desde el punto de vista nutricional, para lo cual se analizó en planta el contenido de N_{total} , P, K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe, Mn^{2+} , Zn, y Cu, basado en la técnica de “Ataque de plantas para análisis foliar”. Esta técnica consiste en limpiar la muestra con un detergente suave, lavar con agua corriente y finalmente con agua destilada; se coloca en una bandeja en una estufa a 70 °C hasta su desecación total y posteriormente se tritura la muestra hasta pulverizarla. Se pesa 1 gramo y se agrega a un matraz de ataque de 100 cc; se añaden 10 cc de ácido nítrico concentrado y se deja un mínimo de 5 horas, para realizar el ataque en frío. Se continúa el ataque en baño caliente de arena a una temperatura de 100 °C y una vez que se han desprendido los vapores nitrosos (color marrón) cuando toda la materia orgánica ha quedado destruida y el líquido transparente, se retira del baño y se dejan enfriar los matraces.



Figura 16. Preparación del suelo en el experimento de biodesinfección en campo (El Perelló, Valencia).

Una vez frío, se añaden 2 cc de ácido perclórico y se colocan nuevamente los matraces en el baño a una temperatura aproximada de 200 °C; cuando cese el desprendimiento de los vapores blancos densos de perclórico, el líquido se tornará transparente e incoloro, pero con una sedimentación en el fondo del matraz. En este momento se retira del baño, se agrega a los matraces agua destilada muy caliente para facilitar la disolución del precipitado y se calienta en mechero agitando continuamente para su disolución total. A continuación se pasa a un matraz de 50 cc y sobre él un embudo con papel de filtro, se pasa agua caliente para humectar el papel y lavar los matraces, agua que inmediatamente se desecha, se filtra sobre dichos matraces, procurando lavarlos de ataque con el agua caliente al menos cuatro veces. Se enrasa el matraz de 50 cc y la muestra pasa a análisis. En este extracto se determinan P, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Fe, Mn²⁺, Zn.

Para la determinación del N_{total} se utiliza el método de Kjeldahl, que consiste en pesar 0,1 g de materia seca que se agregan en un matraz de ataque de 50 cc y los siguientes productos: 0,5 g de mezcla catalítica compuesta por 95% de sulfato potásico y 5% de selenio negro seco, además 5 cc de ácido sulfúrico concentrado; se colocan los matraces en el tren de ataque a una temperatura superior a 100 °C, donde se mantienen hasta que el líquido esté transparente, se enrasan con agua destilada, se agita bien y se pasa la muestra para el análisis. Cuando se ha cultivado sobre suelos con residuos que pudieran contener metales pesados, se determinan, además, los contenidos totales de Mg²⁺, Fe, Mn²⁺, Zn, Cu, Pb, Cd, Cr y Ni en mg kg⁻¹ de suelo, que son comparados con los valores mínimos establecidos por el MAPA.

IV.8. Caracterización de la virulencia en las poblaciones de *Meloidogyne*

Para la caracterización de los biotipos de *Meloidogyne* en función de su virulencia se siguió un procedimiento consistente en primer lugar en la identificación de las especies presentes en las muestras mediante morfología y morfometría, confirmado a través del análisis del ADN de las hembras por PCR. Posteriormente se aplicó el bioensayo diseñado para la caracterización de los biotipos de *Meloidogyne*, con el objetivo de identificar la variación en virulencia dentro de cada especie e incluso dentro de cada raza. Una vez identificadas las especies se comenzaron los bioensayos para la caracterización de la virulencia de las poblaciones, en forma simultánea con la

determinación de las razas dentro de cada especie. Para ello se extrajeron masas de huevos maduras (de color castaño) de cada población de *Meloidogyne*, de modo que cada una de las repeticiones proviniera de la masa de huevos producida por una sola hembra. Cada masa de huevos se colocó en un pocillo con agua. Luego se prepararon macetas de 300 cc con tierra estéril, a razón de 5 a 8 repeticiones (macetas) por población, y en cada maceta se colocó una planta de tomate cv Marmande (sensible a *Meloidogyne*) de 15-20 días de edad, con dos hojas verdaderas. Cada maceta fue inoculada con una masa de huevos para obtener “poblaciones puras” (aislados provenientes de una hembra), realizando un pequeño hueco próximo al tallo de la planta y vaciando el pocillo con la masa de huevos con ayuda de un frasco lavador. En algunos casos se utilizó directamente el suelo de las muestras (“población original” o “población de campo”) en lugar de obtener poblaciones puras a partir de masas de huevos. Las macetas se mantuvieron en cámara de crecimiento con temperatura de 25 (\pm 1) °C y fotoperíodo de 16 hs de luz durante 40-45 días. Cuando las poblaciones se desarrollaron hasta alcanzar un índice 5 en el esquema de índice de nodulación de Bridge y Page (1980) se inició el proceso de caracterización de las razas y de la virulencia (Fig. 17).

Para la determinación de las razas ó biotipos se utiliza el ensayo de hospederos diferenciales de Carolina del Norte de Hartman y Sasser (1985), que incluye como hospedadores: tomate cv Rutgers, pimiento cv Early California Wonder, tabaco cv North Carolina 95, algodón cv Deltapine 91, sandía cv Charleston Gray y cacahuete cv Florunner (Tabla 2). Este método no permite caracterizar la virulencia, puesto que no incluye plantas con genes de resistencia. Por otra parte, como se ha visto anteriormente, los métodos moleculares disponibles tampoco permiten caracterizar la virulencia (Castagnone Sereno 2002). En vista de las limitaciones encontradas en los bioensayos así como en los métodos moleculares disponibles, el grupo de investigación del Departamento de Agroecología del CCMA (López Pérez *et al.* 2004) diseñó un ensayo de hospedadores diferenciales con el objetivo específico de caracterizar la virulencia de las poblaciones de nematodos, a la vez que las razas ó biotipos a las que pertenecen.

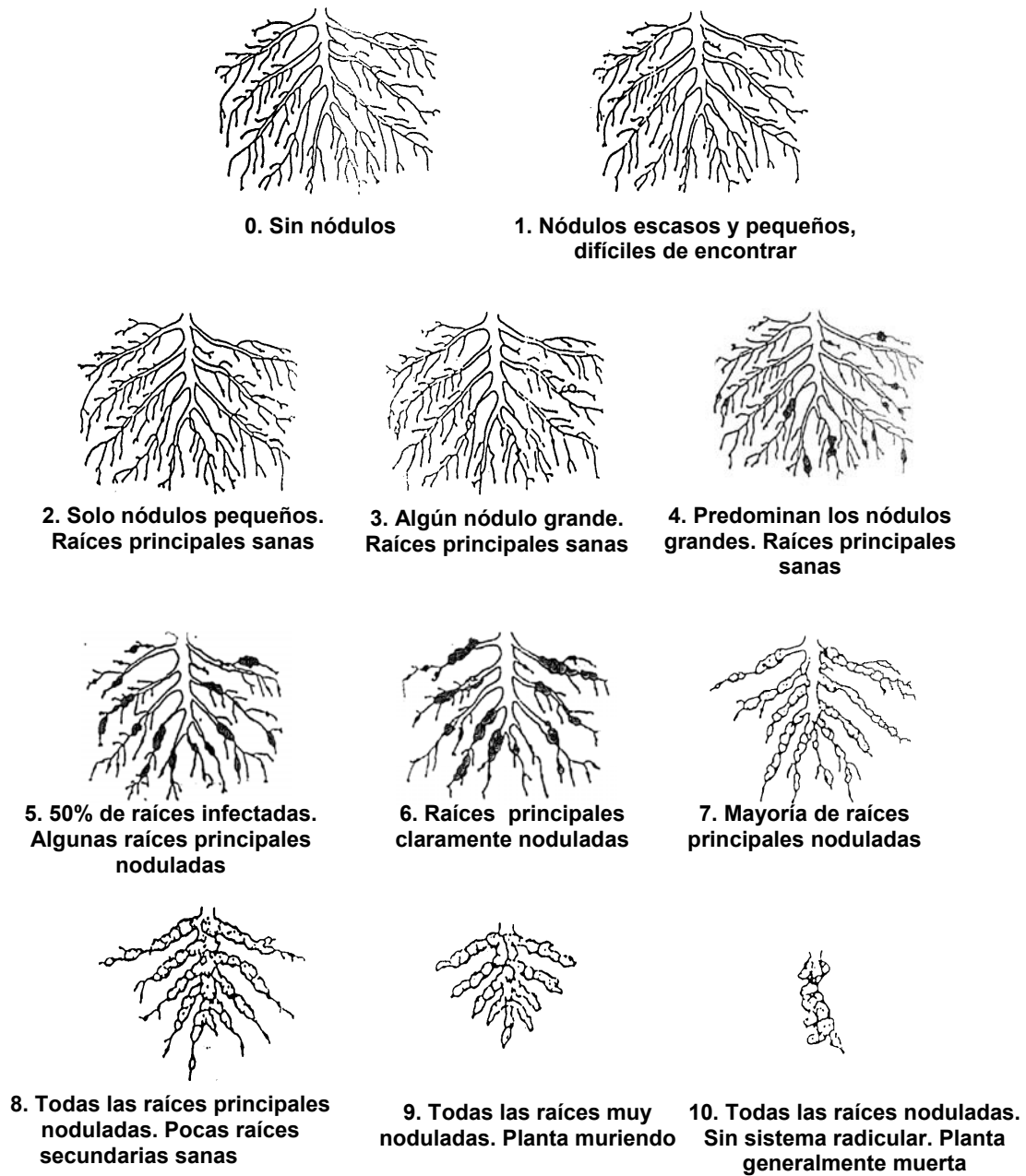


Figura 17. Índice de nodulación de Bridge y Page (1980) modificado.

Para la determinación de las razas ó biotipos se utiliza el ensayo de hospederos diferenciales de Carolina del Norte de Hartman y Sasser (1985), que incluye como hospedadores: tomate cv Rutgers, pimiento cv Early California Wonder, tabaco cv North Carolina 95, algodón cv Deltapine 91, sandía cv Charleston Gray y cacahuete cv Florunner (Tabla 2). Este método no permite caracterizar la virulencia, puesto que no incluye plantas con genes de resistencia. Por otra parte, como se ha visto anteriormente, los métodos moleculares disponibles tampoco permiten caracterizar la virulencia (Castagnone Sereno 2002). En vista de las limitaciones encontradas en los bioensayos así como en los métodos moleculares disponibles, el grupo de investigación del Departamento de Agroecología del CCMA (López Pérez *et al.* 2004) diseñó un ensayo de hospedadores diferenciales con el objetivo específico de caracterizar la virulencia de las poblaciones de nematodos, a la vez que las razas ó biotipos a las que pertenecen.

Este test incluye como hospederos diferenciales: tabaco cv North Carolina 95, algodón cv Deltapine 91, pimiento cvs Capino y Sónar (sensibles, en sustitución del cv Early California Wonder) y cvs Charleston Belle y Carolina Wonder (resistentes), tomate cv Marmande (sensible, en sustitución del cv Rutgers) y cv Nikita (resistente), fresa cv Camarosa y *Tagetes patula*. La innovación más importante con respecto al método de Hartman y Sasser (1985) es el uso de hospederos portadores de genes de resistencia, que es lo que permite distinguir entre las poblaciones de nematodos virulentas y avirulentas. La inclusión de *T. patula* se realizó para diferenciar las razas A y B de *M. hapla*, eliminándose la sandía y el cacahuete del test de Hartman y Sasser (1985), ya que las diferencias que detectan estas plantas se pueden observar también con otros hospederos.

IV.9. Métodos estadísticos

El análisis matemático de los datos obtenidos se ha realizado a partir de diversos procedimientos estadísticos, tanto uni- y bivariantes como multivariantes, según el caso. Se han utilizado, dependiendo del tipo de análisis, los programas SPSS y STATISTICA para el entorno WINDOWS.

Análisis de la varianza. El Análisis de la Varianza (ANOVA) es un test clásico y básico en cualquier trabajo experimental, frecuentemente utilizado en Ecología (Margalef 1974). Este tratamiento estadístico se aplica a factores cuantitativos y pretende averiguar si las diferencias apreciadas entre varios tratamientos o grupos de muestras "pueden ser razonablemente atribuidas a simples fluctuaciones debidas al azar o si, por el contrario, son demasiado grandes para que esto sea cierto y traducen necesariamente divergencias reales y significativas" (Lamotte 1976). En consecuencia, el Análisis de la Varianza permite conocer el grado de homogeneidad o heterogeneidad entre las variables comparadas y predecir si pertenecen o no a un mismo universo muestral, posibilitando analizar las fuentes de variación entre los distintos tratamientos estudiados. La realización del ANOVA requiere que los datos se ajusten a una distribución normal y que presenten homogeneidad en sus varianzas. Existen diferentes procedimientos para la comparación de medias (Duncan, Tukey, Bonferroni, Bartlett, etc.) aunque una de las pruebas más poderosas (menos conservativa) es el test MSD (de las siglas en inglés de *Medium Significant Difference*), muy recomendado cuando inicialmente hay pocas comparaciones de interés. Este es el procedimiento que hemos utilizado para comparar los factores estudiados en las distintas biodesinfecciones.

V. RESULTADOS

La biodesinfección constituye una alternativa no química para el manejo de organismos patógenos de los vegetales de origen edáfico, que se fundamenta en el efecto biocida de los productos resultantes de la descomposición de la materia orgánica. Se ha comprobado, que por lo general, cualquier resto orgánico puede actuar como biodesinfectante, aunque su eficacia depende de la dosis y del método de aplicación.

Existen buenos ejemplos de la eficiencia de la biodesinfección para el manejo de hongos, nematodos y malas hierbas, aunque mayoritariamente se han aplicado en cultivos de hortalizas y fundamentalmente para el manejo de nematodos formadores de nódulos del género *Meloidogyne* (Bello *et al.* 2000a,b, 2001, 2003, 2004). Últimamente y debido a la obligatoriedad, por parte de la UE, de desinfección del suelo para la replantación del viñedo se han realizado varias experiencias de biodesinfección con materia orgánica sólida, estiércoles, en la localidad de Jumilla (Murcia) en viñedos ecológicos, los cuales tiene prohibido el uso de fumigantes químicos, que son los que recomienda utilizar el Reglamento (CE) 1227/2000 (Gómez Soriano *et al.* 2006, Díez Rojo 2006). En todos los casos siempre se ha trabajado utilizando fundamentalmente subproductos agroindustriales sólidos, por lo que no existe experiencia del uso de esta alternativa mediante la utilización de subproductos líquidos, que en teoría son más fáciles de aplicar. La biodesinfección con subproductos líquidos de la industria vitivinícola, podría tener grandes posibilidades en las zonas productoras, que en la mayoría de los casos coinciden con las zonas de cultivo de vid en España, pudiéndose utilizar en biodesinfección con bajos costes. También puede emplearse como material biodesinfectante líquido el alpechín, subproducto de la industria oleícola, cuya acumulación puede producir, paradójicamente, problemas graves de contaminación ambiental (Bello *et al.* 2003).

En este apartado se estudia el efecto biodesinfectante de la vinazas de alcoholera tanto en estudios *in vitro* (V.1), como en suelos en condiciones controladas de laboratorio (V.2) y en campo (V.3); se determina su efecto sobre los nematodos fitoparásitos pertenecientes a *Xiphinema index*, un transmisor de “*fanleaf*” en la vid y sobre los nematodos formadores de nódulos

de la especie *Meloidogyne incognita*, un parásito de la vid y de los cultivos hortícolas, determinando su efecto en la fertilidad y sobre la biodiversidad edáfica con relación a los nematodos libres y saprófagos del suelo; determinación del índice de madurez (V.4); caracterización de razas en las poblaciones de los nematodos “formadores de nódulos” (V.5); relación de *M. incognita* con la flora arvense (V.6); por último se estudia su efecto sobre la nutrición de la planta y la calidad del mosto (V.7). Para ello se comienza realizando un estudio *in vitro* con varias diluciones del producto. Una vez evaluada la eficacia *in vitro*, se estudia su eficacia sobre suelo en condiciones controladas de laboratorio, para pasar por último a estudios en condiciones de campo.

V.1. Determinación *in vitro* de la actividad biodesinfectante

Para evaluar la eficacia de las vinazas de la industria vitivinícola, se aplicó un extracto de 5 ml diluidos al 5, 3, y 1% respectivamente sobre una placa de Petri cerrada, que contenía 5 individuos de *X. index*. Se realizan cuatro repeticiones por dilucción o tratamiento y se observan cada 20 minutos bajo un microscopio binocular el número de individuos que permanecen vivos, y los que han muerto. Una vez evaluada la eficacia de las concentraciones elegidas se pasa a establecer diluciones intermedias hasta que se selecciona la dilucción óptima. En cada caso, se confirma si la acción es nematocida y se debe a la acción directa de los extractos, ó si es nematostática y se debe por lo tanto a la acción de los gases contenidos en la dilucción. Para ello se destapan los pocillos y en el caso de que se tratase de un efecto nematostático, los individuos de *X. index* se recuperarían al paso del tiempo y adquirirían movilidad de nuevo.

Se observa que la **concentración de vinazas al 5% controla los nematodos a los 45 minutos y la concentración del 2% a los 60 minutos después de haber iniciado el experimento** (Fig.18A). En un segundo experimento se confirma el efecto nematocida incluso con dosis más bajas (Fig.18B). **En este 2º experimento, a las concentraciones del 2% los individuos mueren a los 55 minutos** y no se recuperan después de tres horas de exposición, este fenómeno también ocurre con las concentraciones de vinaza del 1%, mientras que en las concentraciones del 0,2%, las vinazas solo tienen efecto letal a

partir de las tres horas de exposición. Los testigos presentan en todos los casos los individuos vivos.

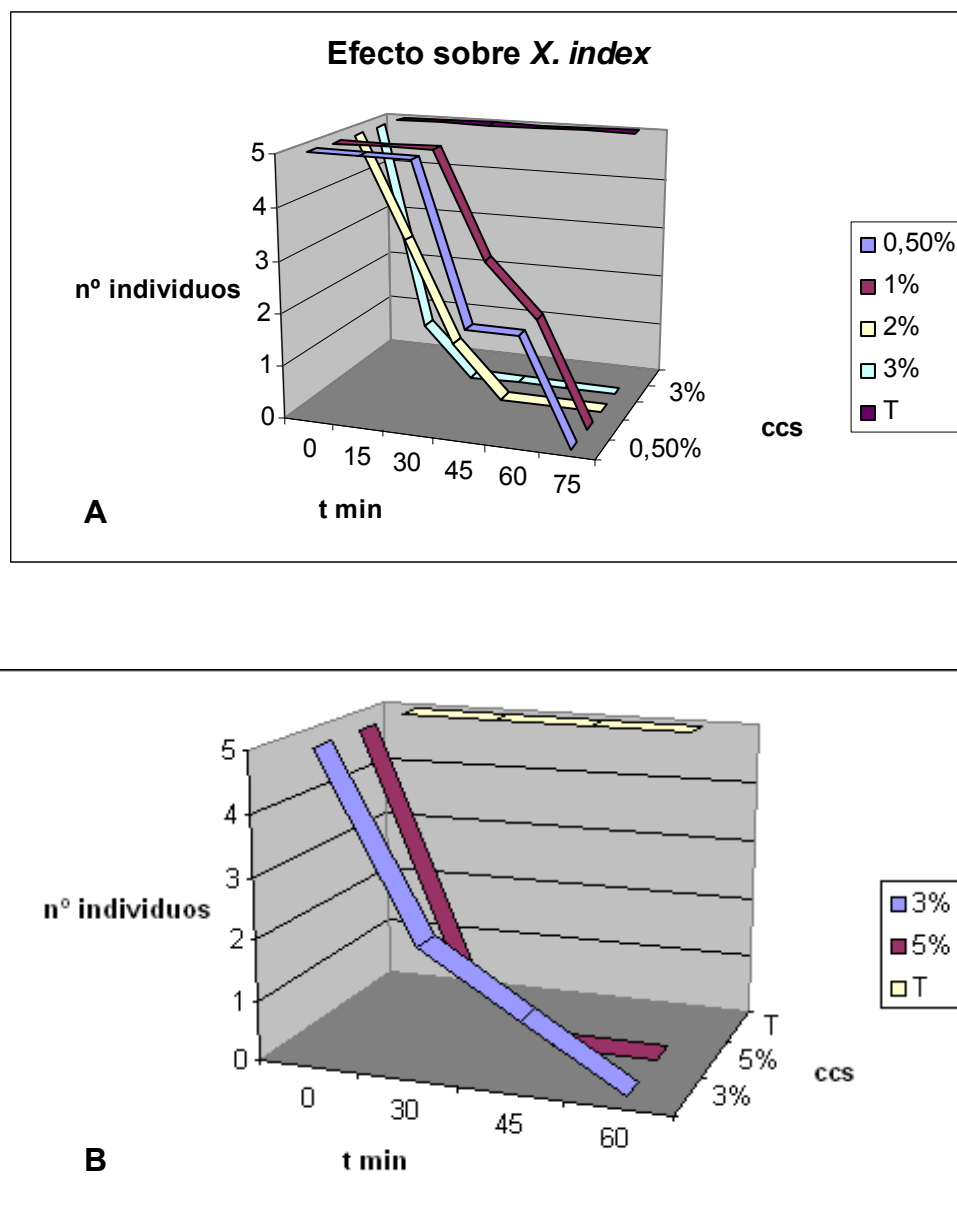


Figura 18A,B. Efecto en *X. index* de diferentes concentraciones de vinaza.

Cuando se trabaja con los nematodos del género *Meloidogyne*, se sigue el mismo procedimiento, utilizando las formas móviles que son los juveniles (J_2). Para ello se realizan diferentes diluciones de la vinaza 5, 2, 1 y 0,2%, que se aplican en un pocillo con 5 juveniles, llevándose a cabo periódicamente observaciones de su comportamiento, teniendo en cuenta el posible efecto nematostático, para lo cual una vez que pierden la movilidad se destapa la placa de Petri durante un período de tiempo de al menos 24 horas.

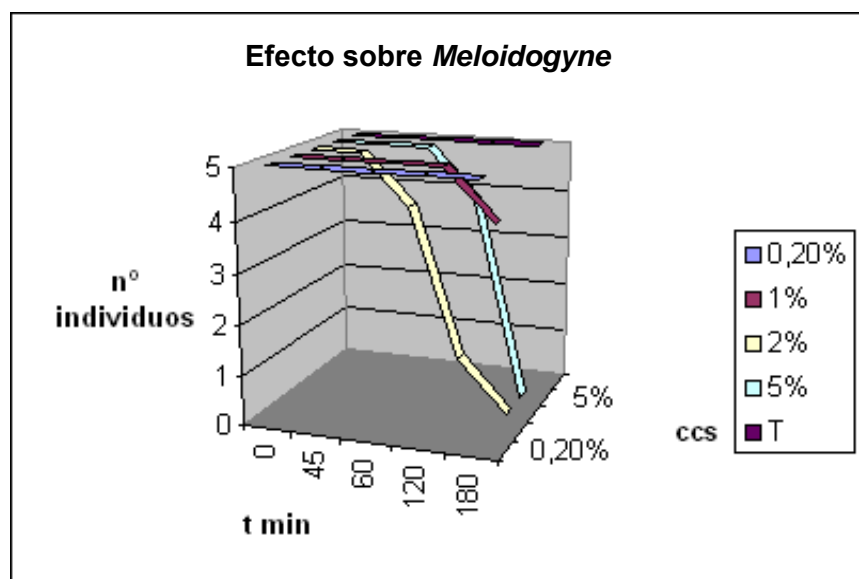


Figura 19. Efecto sobre juveniles de nematodos del género *Meloidogyne* de diferentes concentraciones de vinaza.

En los experimentos *in vitro* llevados a cabo con nematodos del género *Meloidogyne* podemos decir que con concentraciones de vinazas diluidas al 5%, el control de nematodos se alcanza pasadas las tres horas de exposición. En los casos de concentraciones más bajas (1 y 0,2%) el tiempo para el control se prolonga notablemente (Fig. 19), e incluso no es efectivo.

V.2. Determinación de la actividad biodesinfectante en suelos en condiciones de laboratorio

Para la evaluación de la actividad biodesinfectante en suelo, en condiciones de laboratorio, de las vinazas de la industria vitivinícola, se ha utilizado el protocolo de biodesinfección del Apartado IV.6.2, que nos permite al mismo tiempo determinar su efecto sobre los nematodos, la fertilidad del suelo y sobre la planta (Fig.15). Los experimentos se han realizado utilizando suelos infestados con nematodos, que son representativos de zonas hortícolas de España. En algunos casos se han utilizado suelos en los que posteriormente se han realizado los experimentos de campo. Los suelos seccionados han sido los siguientes: (A) suelo franco-arenoso y ligeramente ácido de Villa del Prado (Madrid), (B) suelo arcilloso y básico del Campo de Cartagena (Murcia) y (C) un suelo arenoso y básico de El Perelló (Sueca, Valencia).

A. Experimentos en suelo franco arenoso y ácido de Villa del Prado (Madrid)

Se ha utilizado un suelo franco arenoso procedente de un invernadero de producción hortícola, que había estado cultivado con tomates. En un análisis previo a la realización del experimento se confirmó que el suelo estaba infestado de nematodos del género *Meloidogyne*. Con fecha 4-4-2006 se recogieron dos muestras registradas con los n^{os} 28000 y 28001, que después de mezclar y homogeneizar se pasaron por un tamiz de 2 mm, siguiendo a continuación el protocolo anteriormente descrito de biodesinfección (Fig. 15), realizando los tres tratamientos siguientes: 5, 3, y 1 ml de vinaza de vino, que corresponden a unas dosis de campo de 25.000, 15.000 y 5.000 l·ha⁻¹. El experimento se diseñó con cuatro repeticiones por tratamiento y el testigo.

Influencia de la biodesinfección sobre los nematodos del suelo. Con fecha 3-05-2006 se da por concluido el experimento, observándose una elevada anaerobiosis en los tratamientos con 5 ml y 3 ml y principio de anaerobiosis en el de 1ml. Los resultados nematológicos se recogen en la Tabla 8.

Tabla 8. Influencia de la biodesinfección sobre los nematodos del suelo mantenido a 30 °C, Villa del Prado (Madrid) (Indiv. 100 cc⁻¹) (*).

Tratamiento	<i>Meloidogyne</i> (J2)		Rabdítidos	Doriláimidos	Enquitreidos
	V	M	V	V	V
Testigo	17 b	8 a	31 b	0 a	4 a
5 ml	0 a	15 b	16 a	1 a	2 a
3 ml	0 a	28 c	14 a	0 a	4 a
1 ml	0 a	30 c	22 ab	0 a	1 a
Valor F	34,680	26,427	3,548	1,000	0,632

(*) V=vivos, M=muestrados; DMS: diferencia mínima significativa. La misma letra o letras en la misma columna no manifiestan diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$). Las cifras corresponden a la media y a la desviación de la media.

En la Tabla 8 se muestran los resultados de las poblaciones de nematodos del suelo inmediatamente después de finalizada la biodesinfección. El efecto de la vinaza de vino sobre las poblaciones de nematodos del suelo, disminuye notablemente las poblaciones de J2 del nematodo fitoparásito *Meloidogyne*, observándose diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo. En las poblaciones de rabdítidos, se observa como las vinazas de vino, sobre todo a dosis elevadas, disminuyen estadísticamente las poblaciones.

Para el resto de poblaciones, no se observan diferencias estadísticamente significativas, tanto en los dorilaimidos como en los enquitreidos, debido a que en el suelo original las poblaciones existentes de estos nematodos son bajas, por tratarse de suelos que con anterioridad han sido fumigados químicamente.

Influencia de la biodesinfección en la fertilidad del suelo. De las muestras recogidas el 4-4-2006 se determinaron diferentes parámetros que nos permiten conocer la influencia de la biodesinfección en la fertilidad del suelo. Los resultados se recogen en la Tabla 9.

Tabla 9. Efecto de la biodesinfección en la fertilidad del suelo, Villa del Prado (Madrid).

	1 ml	3 ml	5 ml	Testigo	Valor F	
MO (%)	4,40 ± 0,13 ab	4,36 ± 0,04 ab	4,24 ± 0,20 a	4,58 ± 0,08 b	2,439	
pH	6,31 ± 0,03 b	6,49 ± 0,03 c	6,54 ± 0,04 c	6,22 ± 0,03 a	51,625	
CE (mS/cm)	0,72 ± 0,06 ab	0,67 ± 0,02 a	0,67 ± 0,02 a	0,75 ± 0,01 b	3,292	
g/kg	C _{total}	25,50 ± 0,70 ab	25,30 ± 0,20 ab	24,55 ± 1,15 ab	26,50 ± 0,45 b	2,454
	N _{total}	2,31 ± 0,23 a	2,15 ± 0,15 a	2,28 ± 0,23 a	2,74 ± 0,10 b	3,757
	P ₂ O ₅	0,95 ± 0,03 a	0,87 ± 0,02 a	0,85 ± 0,03 a	0,74 ± 0,37 a	0,498
	K ⁺	0,74 ± 0,03 a	0,74 ± 0,05 a	0,80 ± 0,03 a	0,78 ± 0,02 a	1,689
	Ca ²⁺	1,46 ± 0,04 a	1,39 ± 0,11 a	1,49 ± 0,05 a	1,53 ± 0,06 a	1,475
	Mg ²⁺	0,25 ± 0,01 a	0,24 ± 0,02 a	0,26 ± 0,01 a	0,26 ± 0,01 a	1,600
	Na ⁺	0,16 ± 0,01 a	0,15 ± 0,00 a	0,16 ± 0,01 a	0,16 ± 0,01 a	0,692
mg/kg	Fe	384,75 ± 10,88 b	481,75 ± 30,25 c	554,75 ± 27,38 d	320,50 ± 31,25 a	35,231
	Mn ²⁺	112,75 ± 4,88 a	111,25 ± 5,25 a	123,75 ± 5,25 b	121,75 ± 3,25 ab	3,731
	Cu	15,78 ± 0,83 bc	15,55 ± 0,53 b	16,83 ± 0,62 c	14,28 ± 0,18 a	7,505
	Zn	12,53 ± 0,48 a	12,55 ± 0,33 a	13,65 ± 0,45 ab	14,28 ± 0,18 b	12,654

(*) DMS: diferencia mínima significativa. La misma letra o letras en la misma fila no manifiestan diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$). Las cifras corresponden a la media y a la desviación de la media.

En la Tabla 9 se recogen los resultados del análisis químico de los suelos después de haber realizado la biodesinfección. **Se puede observar que los tratamientos con vinaza de vino, aunque no presentan diferencias estadísticamente significativas, disminuye los niveles de materia orgánica**, lo que nos puede indicar que este tipo de biodesinfectantes ayudan a la mineralización de la materia orgánica, esto puede tener gran interés en suelos con elevados contenidos en materia orgánica. Por ello convendría

estudiar si la incorporación de vinaza ayuda a la descomposición de aquellas materias orgánicas que tienen altos contenidos en fibras y sobre todo en lignina. **Además se puede observar con claridad como aumenta el pH y disminuye la conductividad eléctrica según se aumenta la dosis.** Con respecto a los principales elementos nutritivos principales (NPK) no se observan diferencias estadísticamente significativas, debido principalmente a que no se introducen en el suelo grandes cantidades de ellos, puesto que el valor como fertilizante de las vinazas de vino es escaso en estos nutrientes. Con respecto a los demás macronutrientes, tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas. Por el contrario **si existen diferencias en los micronutrientes, sobre todo en Fe y Cu. Estas diferencias aumentan según se incrementa la dosis de tratamiento. No se observa que estos valores puedan ser perjudiciales, pero este hecho debe de tenerse en cuenta si se van a aplicar estos subproductos de forma continuada.**

Influencia de la biodesinfección en la planta. Para estudiar el efecto de la biodesinfección en la planta, se cultivaron en los suelos biodesinfectados tomates cv Marmande, sensibles a los nematodos del género *Meloidogyne* utilizando las mismas muestras recogidas el 4-4-2006. Se levantaron las macetas con las plantas después de un mes y tres días, los resultados se recogen en la Tabla 10.

Tabla 10. Efecto de la biodesinfección en la planta de tomate cv Marmande, en cámara desde el 2-05-06 hasta el 5-06-06 (un mes y tres días).

Tratamiento	Índice		Altura		Peso (g)		Nº Hojas					
	Nodulación		(cm)		Total	Tallo		Raíz				
Testigo	0	a	19,38	a	1,15	a	0,93	a	0,22	a	4,25	a
5 ml	0	a	16,00	a	2,55	a	1,01	a	1,54	a	6,50	a
3 ml	0,25	a	18,75	a	2,61	a	0,80	a	1,82	a	4,50	b
1 ml	0	a	20,50	a	2,00	a	0,93	a	1,07	a	4,67	a
Valor F	1,00		0,331		0,326		0,084		0,565		4,041	

(*) DMS: diferencia mínima significativa. La misma letra o letras en la misma columna no manifiestan diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$). Las cifras corresponden a la media.

No se observan diferencias estadísticamente significativas, por lo que se considera que no hay ningún efecto negativo de las dosis de vinaza aplicadas al suelo sobre las plantas. Se debe indicar que todas las plantas del testigo murieron a los seis días, considerándose que puede ser debido a la presencia

de los nematodos del género *Meloidogyne* existentes. Se consideró que el experimento era de interés o para estudiar el efecto fertilizante de las vinazas de vino sobre las plantas (Tabla 10).

B. Experimento en suelo arcilloso y básico del Campo de Cartagena (Murcia)

El suelo pertenecía a un invernadero con problemas de *M. incognita* del término municipal de San Javier (Murcia), que había sido cultivado con pimiento. Se recogió la muestra el 4-4-2006, registrada con el nº 28002, realizándose el experimento en laboratorio una vez tamizada y homogeneizada la muestra. Se aplicaron las mismas dosis que en el experimento anterior, (5, 3 y 1 ml de vinaza de vino), con cuatro repeticiones de cada tratamiento y del testigo.

Influencia de la biodesinfección en los nematodos del suelo. Con fecha 4-5-2006, acabado el experimento, se observa que en ninguna de las repeticiones de los tres tratamientos hay fenómenos de anaerobiosis. Los resultados nematológicos se recogen en la Tabla 11.

Tabla 11. Influencia de la biodesinfección en los nematodos del suelo mantenido a 30 °C, Campo de Cartagena (Murcia). (Indiv. vivos 100 cc⁻¹ suelo)(*).

Tratamiento	<i>Meloidogyne</i> (J2)	Rabdítidos	Doriláimidos	Enquitreidos
Testigo	1 a	7 a	0 a	1 a
5 ml	7 b	16 b	0 a	2 a
3 ml	3 a	12 ab	1 a	1 a
1 ml	1 a	7 a	2 a	3 a
Valor F	5,526	3,543	1,714	1,000

(*) DMS: diferencia mínima significativa. La misma letra o letras en la misma columna no manifiestan diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$). Las cifras corresponden a la media.

En la Tabla 11 se muestran los resultados de las poblaciones de nematodos del suelo inmediatamente después de finalizada la biodesinfección. Se observan poblaciones de J2 del nematodo fitoparásito *Meloidogyne* en las dosis más altas (5 ml) **aumentando las poblaciones de rabdítidos en las dosis más altas (5 y 3 ml)** y los tratamientos no presentan diferencias en relación con los doriláimidos y enquitreidos.

Influencia en la fertilidad del suelo. Se ha estudiado la fertilidad del suelo en la muestra recogida el 4-4-2006 para valorar los parámetros que nos dan a conocer la influencia de la biodesinfección en la fertilidad del suelo. Los resultados se recogen en la Tabla 12.

Tabla 12. Influencia de la biodesinfección en la fertilidad del suelo (*).

	1 ml		3 ml		5 ml		Testigo	Valor F	
MO (%)	3,02 ± 0,04	a	3,11 ± 0,08	a	3,06 ± 0,12	a	3,12 ± 0,06	0,770	
pH	7,61 ± 0,03	a	7,65 ± 0,04	a	7,72 ± 0,02	b	7,64 ± 0,02	5,710	
CE (mS/cm)	2,32 ± 0,18	a	3,05 ± 0,18	b	2,52 ± 0,12	a	3,00 ± 0,05	9,980	
g/kg	C_{total}	17,50 ± 0,25	a	18,00 ± 0,50	a	17,70 ± 0,70	a	18,05 ± 0,35	0,729
	N_{total}	1,49 ± 0,16	a	1,44 ± 0,12	a	1,40 ± 0,07	a	2,15 ± 0,05	29,494
	P₂O₅	0,46 ± 0,01	c	0,48 ± 0,00	c	0,44 ± 0,02	b	0,40 ± 0,00	21
	K⁺	1,29 ± 0,02	a	1,31 ± 0,04	a	1,29 ± 0,05	a	1,28 ± 0,04	0,252
	Ca²⁺	3,75 ± 0,05	a	3,71 ± 0,05	a	3,64 ± 0,08	a	3,63 ± 0,07	1,844
	Mg²⁺	0,92 ± 0,02	a	0,93 ± 0,03	a	0,91 ± 0,05	a	0,91 ± 0,05	0,173
	Na⁺	0,72 ± 0,02	a	0,75 ± 0,03	a	0,74 ± 0,03	a	0,76 ± 0,05	0,6
mg/kg	Fe	18,75 ± 0,88	a	21,25 ± 2,25	a	20,50 ± 1,00	a	19,75 ± 1,25	1,47
	Mn²⁺	55,75 ± 1,88	a	57,00 ± 1,50	ab	60,75 ± 2,13	b	58,50 ± 2,50	2,508
	Cu	4,15 ± 0,80	b	3,23 ± 0,29	a	3,30 ± 0,15	a	3,48 ± 0,09	2,535
	Zn	6,25 ± 0,13	a	6,28 ± 0,24	a	6,78 ± 0,16	b	6,70 ± 0,20	4,436

(*) DMS: diferencia mínima significativa. La misma letra o letras en la misma fila no manifiestan diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$). Las cifras corresponden a la media y a la desviación de la media.

En la Tabla 12 se recogen los resultados del análisis químico de los suelos después de haber realizado la biodesinfección. No se observan diferencias estadísticamente significativas con respecto a la materia orgánica. Quizás en este caso no se observe debido a que los contenidos en ella sean menores que en Villa del Prado. **Con respecto a los niveles de elementos principales en este caso se observan diferencias estadísticamente significativas en el**

N_{total} y en P₂O₅, que disminuyen. Los valores de N_{total} disminuyen según se aumenta la dosis, lo cual nos hace suponer de nuevo que las vinazas de vino ayudan a mineralizar los compuestos orgánicos. El valor del P₂O₅ parece lógico que disminuya, puesto que en los procesos de biodesinfección lo que se pretende es que los gases resultantes de la descomposición de la materia orgánica sean los que actúen, para ello es necesario que se reproduzcan los microorganismos del suelo que necesitan y consumen fósforo. En los demás macroelementos, no se observan diferencias estadísticamente significativas. Al igual que ocurría en Villa del Prado (Madrid) se observan algunas diferencias estadísticamente significativas, que son bajas. **Estas diferencias se deben a que este tipo de enmiendas aportan aunque sea en pequeñas cantidades, microelementos que pueden llegar a ser interesantes** cuando sean escasos sus niveles en suelo. Lo mismo ocurría en el caso de Villa del Prado (Madrid) el incremento de metales pesados en suelo no presenta valores perjudiciales. Además hay que destacar que en este caso **disminuyen los niveles de Zn**, que se pueden deber al aumento del pH o que se formen complejos al reaccionar el Zn con las vinazas.

Influencia en la planta. La influencia de la biodesinfección sobre la planta se determina cultivando tomates cv Marmande en los suelos biodesinfectados. Los resultados se detallan en la Tabla 13.

Tabla 13. Influencia de la biodesinfección en la planta tomate cv Marmande en cámara desde el 5-5-2006 hasta el 5-6-2006 (1 mes) (*).

Tratamiento	Índice	Altura (cm)	Peso (g)			
			Total	Tallo	Raíz	Nº Hojas
Testigo	0 a	11,0 a	1,11 a	1,0 a	0,12 a	8,5 a
5 ml	0 a	12,63 a	0,66 a	0,54 a	0,13 a	6 a
3 ml	0 a	12,25 a	1,07 a	0,97 a	0,10 a	7 a
1 ml	0 a	16,13 a	1,05 a	0,94 a	0,12 a	6,25 a
Valor F	1,000	0,927	0,394	0,506	0,061	1,855

(*) DMS: diferencia mínima significativa. Misma letra o letras en la misma columna no manifiestan diferencias significativas ($\alpha = 0,05$). Las cifras corresponden a la media.

No se observan diferencias estadísticamente significativas, por lo que se considera que no hay ningún efecto negativo de las dosis de vinaza aplicadas al suelo sobre las plantas.

C. Experimento en suelo arenoso y básico del El Perelló (Sueca, Valencia). Se estudian suelos de dos invernaderos de cultivos hortícolas, pertenecientes a la Cooperativa Unió Protectora de'l Perelló, en los cuales se

confirmó la presencia del nematodo formador de nódulos del género *Meloidogyne*. Se pretende de determinar cuál es la influencia sobre el suelo de diferentes subproductos de la industria alcoholera como son: vinazas de lías, de piquetas y de vino, así como los residuos sólidos que se originan como consecuencia de las diferentes decantaciones a que se someten los sustratos líquidos a partir de los cuales se va a obtener alcohol vínico en la industria alcoholera. En un primer experimento se comparan los subproductos líquidos a una misma dosis (5 ml) y en un segundo se comparan líquidos con sólidos a distintas dosis.

C.1. Experimento en el efecto de los subproductos líquidos en suelo. El experimento se inicia el 2-2-2006 y termina con fecha de 1-3-2006 (27 días). Se analiza a continuación la influencia de los subproductos líquidos sobre los nematodos (Tabla 14), la planta (Tabla 15) y la fertilidad del suelo (Tabla 16).

Influencia de la biodesinfección en los nematodos del suelo. No se observó en ninguna de las repeticiones de los tres tratamientos que hay fenómenos de anaerobiosis. Los resultados nematológicos se recogen en la Tabla 14.

En los tratamientos con 5 ml de los tres subproductos: lías, piquetas y vinaza de vino en 500 g de suelo se produce un control total sobre los juveniles de *Meloidogyne* con relación al testigo, disminuyendo los doriláimidos, rabdítidos y enquitreidos.

Tabla 14. Influencia de la biodesinfección en los nematodos del suelo mantenido a 30 °C, El Perelló (Sueca, Valencia). (Indiv. vivos 100 cc⁻¹ suelo) (*).

Tratamiento	<i>Meloidogyne</i> (J2)				Rabdítidos	Doriláimidos	Enquitreidos			
	V		M							
Testigo	30,5	b	6	a	18	b	78,5	b	45	b
5 ml vin. lías	0	a	38,5	c	3	a	4,5	a	1	a
5 ml vin. piqueta	0	a	22	b	0	a	1	a	1	a
5 ml vin. vino	0	a	22	b	0	a	1,5	a	1	a
Valor F	21,023		12,090		19,047		42,429			

(*) V= vivos; M = muertos DMS: diferencia mínima significativa. La misma letra o letras en la misma columna no manifiestan diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$). Las cifras corresponden a la media y a la desviación de la media.

Influencia en la planta. La influencia de la biodesinfección sobre la planta se determina cultivando tomates cv Marmande en los suelos biodesinfectados. Los resultados se detallan en la Tabla 15.

Tabla 15. Influencia de la biodesinfección en la planta tomate cv Marmande en cámara desde el 3-3-2006 hasta el 6-4-2006 (1 mes) (*).

Tratamiento	Índice	Altura (cm)		Peso (g)			Nº Hojas				
				Total	Tallo	Raíz					
Testigo	5 b	9,88	a	0,44	a	0,37	a	0,07	a	6,75	b
5 ml vin. lías	4 a	9,38	a	0,47	a	0,42	a	0,05	a	6,75	b
5 ml vin. piqueta	3 a	9,88	a	0,65	a	0,52	a	0,13	a	7	b
5 ml vin. vino	3,25 a	11,25	a	0,7	a	0,6	a	0,1	a	4,25	a
Valor F	2,627	0,688		1,225		1,624		1,297		7,33	

(*) DMS: diferencia mínima significativa. La misma letra o letras en la misma columna no manifiestan diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$). Las cifras corresponden a la media y a la desviación de la media.

No se observan diferencias de los diferentes tratamientos en la planta, salvo en el caso de la vinaza de piquetas, dónde algunos de los parámetros estudiados son ligeramente superiores, aunque se observa en el índice de nodulación en raíz diferencias significativas que es mayor en el testigo.

Influencia en la fertilidad del suelo. Se estudia la influencia de los diferentes tratamientos sobre la fertilidad del suelo en la muestra utilizada en el experimento de biodesinfección en comparación con el testigo. Los resultados se recogen en la Tabla 16.

Los resultados de fertilidad química para el experimento realizado en suelo de El Perelló (Sueca, Valencia), en el que se aplica la misma dosis (5 ml) pero diferentes subproductos de la industria alcoholera, se encuentra que **las vinazas de lías son las únicas que presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo en la mayoría de parámetros estudiados y en especial de N_{total} , K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Mn^{2+} .** Como se ha comentado en los experimentos anteriores, se puede observar que la vinaza de vino disminuye la materia orgánica, aunque no se observan diferencias estadísticamente significativas, sin embargo las vinazas de lías aumentan los contenidos de materia orgánica de suelo, resultado que es bastante coherente debido a su composición, que es mucho mayor en materia orgánica con

respecto a los demás subproductos, en el caso del pH todos los subproductos utilizados lo incrementan.

Tabla 16. Influencia de la biodesinfección en la fertilidad del suelo (*).

	Piquetas 5 ml	Vino 5 ml	Lías 5 ml	Testigo	Valor F
MO (%)	1,35 ± 0,04 a	1,32 ± 0,03 a	1,44 ± 0,01 b	1,36 ± 0,05 a	4,364
pH	8,09 ± 0,05 b	8,11 ± 0,03 b	8,14 ± 0,02 b	8,01 ± 0,02 a	6,063
CE mS/cm	0,34 ± 0,02 ab	0,32 ± 0,01 a	0,36 ± 0,01 b	0,34 ± 0,02 ab	3,197
C_{total}	7,83 ± 0,23 a	7,65 ± 0,18 a	8,35 ± 0,08 b	7,88 ± 0,29 a	3,927
N_{total}	0,71 ± 0,03 a	0,77 ± 0,05 a	0,94 ± 0,09 b	0,82 ± 0,03 a	6,661
P₂O₅	0,65 ± 0,01 a	0,67 ± 0,01 a	0,66 ± 0,01 a	0,74 ± 0,01 b	39,430
g/kg K⁺	0,089 ± 0,00 b	0,073 ± 0,00 a	0,11 ± 0,00 c	0,07 ± 0,00 a	56,290
Ca²⁺	2,77 ± 0,05 ab	2,72 ± 0,04 a	2,80 ± 0,04 b	2,83 ± 0,03 b	3,104
Mg²⁺	0,19 ± 0,01 a	0,18 ± 0,01 a	0,19 ± 0,01 a	0,20 ± 0,01 a	0,917
Na⁺	0,06 ± 0,0 a	0,06 ± 0,0 a	0,07 ± 0,0 b	0,06 ± 0,0 a	1,319
mg/kg Fe	182,50 ± 9,50 b	169,0 ± 8,50 b	227,0 ± 2,0 c	115,00 ± 4,0 a	97,959
Mn²⁺	53,25 ± 0,88 ab	52,25 ± 1,25 a	57,25 ± 0,38 c	54,75 ± 0,75 b	15,133
Cu	8,09 ± 3,56 a	9,58 ± 0,09 a	10,00 ± 0,20 a	9,43 ± 0,18 a	0,478
Zn	19,05 ± 0,45 a	18,70 ± 0,35 a	20,13 ± 0,19 b	20,05 ± 0,25 b	9,868
CO₃²⁻ g/kg	235,5 ± 31,50 a	292,8 ± 20,88 bc	251,8 ± 24,63 ab	310,0 ± 6,0 c	4,941
% CaCO₃	3,06 ± 0,09 a	3,41 ± 0,09 b	3,31 ± 0,19 b	3,69 ± 0,06 c	11,698

(*) DMS: diferencia mínima significativa. La misma letra o letras en la misma fila no manifiestan diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$). Las cifras corresponden a la media y a la desviación de la media.

La conductividad eléctrica es muy similar en todos los tratamientos, observándose la misma tendencia de disminución que ocurre en los demás experimentos cuando se utilizan vinazas de vino. Con respecto a los elementos nutritivos principales cabe destacar, que al igual que ocurre en otros experimentos **disminuye el contenido en P₂O₅ con todos los subproductos utilizados, debido principalmente al aumento de la actividad biológica.** De los demás macronutrientes se observa que las vinazas de vino y en cierta medida las de piquetas disminuyen los contenidos en Ca²⁺ y a su vez en CO₃²⁻ y CaCO₃ con respecto al testigo. **En referencia a los**

micronutrientes, se observan principalmente diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo en los niveles de Fe, lo cual nos indica que este tipo de enmiendas son aptas para la restitución en los suelos que tienen altos contenidos en calcio, como puede ser el suelo en el que se ha realizado este experimento. Al igual que ocurre en otros experimentos aumenta el contenido en Zn, por lo que se deben tomar precauciones cuando este tipo de enmiendas vayan a realizarse frecuentemente.

C.2. Experimento comparativo sobre el efecto de los subproductos líquidos con los sólidos en suelo. Se hace un estudio comparativo de la influencia de la biodesinfección, de los diferentes subproductos líquidos y sólidos la biodesinfección con dosis de 1% y 0,5% de vinaza de vino líquida y de 5 g y 2,5 g de vinaza sólida sobre los nematodos (Tabla 17) planta se observa cultivando planta de tomate cv Marmande sobre suelo biodesinfectado de las muestras con nº de registro 28439-28455. Los resultados se detallan en la Tabla 17.

Se observan diferencias significativas en el número de juveniles de *Meloidogyne* muertos en todos los tratamientos con relación al testigo, incrementándose significativamente en los tratamientos con vinaza sólida en las dos dosis (5 y 2,5 g), el número de rabdítidos, doriláimidos, monónquidos y enquitreidos.

Tabla 17. Estudio de la influencia de la biodesinfección con diferentes subproductos líquidos y sólidos en los nematodos del suelo sometido a 30 °C, El Perelló (Sueca, Valencia). (Indiv. 100 cc⁻¹ suelo) (*).

Tratamiento	<i>Meloidogyne</i>		Doriláimidos V	Rabdítidos V	Monónquidos V	Enquitreidos V
	V	M				
Líquida 1%	7 a	81 b	11 a	57 a	5 a	33 a
Líquida 0,5%	3,5 a	69 c	6 a	28 ab	1,75 a	17,5 a
Sólida 5 g	4 a	55,2 b	29,6 b	256 c	4,4 a	206,4 b
Sólida 2,5 g	11,2 a	90,4 c	46,4 c	100,8 b	14,4 b	164,8 b
Testigo	45 b	10 a	5 a	12 a	2 a	10 a
Valor F	19,236	14,863	10,538	42,276	15,614	25,107

(*) V=vivos; M = muertos. DMS: diferencia mínima significativa. La misma letra o letras en la misma columna no manifiestan diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$). Las cifras corresponden a la media y a la desviación de la media.

Influencia en la planta. La influencia de la biodesinfección en la planta se determina cultivando tomates cv Marmande en los suelos biodesinfectados. Los resultados se detallan en la Tabla 18.

Tabla 18. Influencia de la biodesinfección con vinaza de vino líquida al 1% y 0,5% y vinaza sólida 2,5 g y 5 g en la planta desde el 15-9-2006 hasta el 10-10-2006 (*).

Tratamiento	Índice	Altura (cm)	Peso (g)			Nº Hojas
			Total	Tallo	Raíz	
Líquida 1%	5 b	10,5 a	1,43 a	1,04 a	0,4 b	7,5 a
Líquida 0,5%	3,75 a	10,63 a	1,26 a	0,96 a	0,29 ab	7,75 a
Sólida 5 g	4,25 a	11,75 a	1,23 a	1,02 a	0,21 a	7,75 a
Sólida 2,5 g	3,75 a	11,5 a	1,18 a	0,92 a	0,28 ab	7,75 a
Testigo	6,75 c	10,5 a	1,30 a	1,02 a	0,27 ab	7,75 a
Valor F	13,5	0,948	0,402	0,176	1,415	0,075

(*) DMS: diferencia mínima significativa. La misma letra o letras en la misma columna no manifiestan diferencias estadísticamente significativas ($\alpha=0,05$). Las cifras corresponden a la media y a la desviación de la media.

Se observa una reducción del índice de nodulación de *Meloidogyne* en todos los tratamientos con relación al testigo, especialmente en las vinazas sólidas, aunque no aparece impacto significativo sobre la planta.

V.3. Determinación de la actividad biodesinfectante en campo

Las biodesinfecciones se centran en dos experimentos de cultivos hortícolas bajo invernadero en El Perelló (Sueca, Valencia) para el control de *M. incognita* (V.3.1) y en viñedos con el fin de determinar el efecto sobre el *X. index* en la localidad de Socuéllamos (Ciudad Real) donde se vienen aplicando vinazas desde hace varios años vinazas (V.3.2).

V.3.1. Cultivos hortícolas (El Perelló, Valencia). Se estudia en unos invernaderos pertenecientes a una cooperativa de la zona, dedicado a los cultivos hortícolas, la posible influencia sobre los nematodos formadores de nódulos del género *Meloidogyne* durante dos épocas diferentes: A. Invernadero I, se aplica durante el verano y B. Invernadero II, al final del verano, cuando empiezan a descender las temperaturas.

A. Invernadero I: aplicación de vinaza durante el verano. Se elige un suelo cultivado anteriormente con pepinos, donde se confirmó la presencia de *M. incognita* mediante muestreos realizados el 2-8-2006 a dos profundidades 0-15 cm y >15 cm (Anexo: Tabla 1). La parcela se divide en tres subparcelas donde se incorpora la vinaza de vino a las dosis de 4 l/m² (V4), 2 l/m² (V2) y una tercera parcela que se somete a un tratamiento de solarización, con el fin de comparar los tratamientos. Al mismo tiempo que se realiza la extracción de nematodos, se cultiva en 200 g de suelo planta de tomate cv Marmande desde el 18-8-2006 hasta el 18-9-2006 en cámara a 24 °C, sobre el mismo suelo de las muestras de campo que fueron registradas con los n^{os} 28407-28739, con el fin de confirmar la presencia de *Meloidogyne* a través del índice de nodulación en raíces. Una vez realizada la biodesinfección y colocado un plástico de 150 galgas en toda la superficie para someter el suelo no solo al tratamiento de biodesinfección sino complementarlo con la solarización aprovechando las temperaturas elevadas del mes de agosto (Anexo: Fig. 1).

Influencia de la biodesinfección y solarización en los nematodos del suelo. Se muestrea el 30-8-2006 para poder evaluar la influencia de los tratamientos en el suelo. Se recogen las muestras que serán registradas con n^o 28508-28539 y se realiza la extracción de nematodos. Los resultados se detallan en la Tabla 19 (Anexo: Tabla 2).

Tabla 19. Influencia de la biodesinfección y solarización en los nematodos del suelo. El Perelló (Sueca, Valencia). (30-8-2006). (Indiv. 100 cc⁻¹ suelo) (*).

Tratamiento	<i>Meloidogyne</i> (J2)		Doriláimidos		Rabdítidos		Monónquidos		Enquitreidos V
	V	M	V	M	V	M	V	M	
Muestreo 0-20 cm									
4 l/m ²	0,5 a	2 a	4 a	3 a	5 a	6 a	4 a	0 --	1 a
2 l/m ²	0 a	4 a	6 a	3 a	7 a	5 a	1 a	0 --	1 a
Solarización	0 a	12 b	5 a	12 a	16 b	7 a	1 a	0 --	0 a
Valor F	1,0	4,65	0,14	4,05	1,62	0,35	0,50	---	0,75
Muestreo 20-40 cm									
4 l/m ²	0,5 a	9 a	4 a	1 a	6 a	28 b	0,5 a	0,5 a	0 a
2 l/m ²	0 a	4 a	4 a	2 a	9 ab	8 ab	2 a	1 a	0 a
Solarización	8 b	6 a	4 a	0,5 a	31 b	6 a	0,5 a	0 a	1 a
Valor F	0,94	0,86	0,05	10,94	3,41	0,364	0,53	0,72	1,0

(*) V= vivos; M = muertos DMS: diferencia mínima significativa. La misma letra o letras en la misma columna no manifiestan diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$). Las cifras corresponden a la media y a la desviación de la media.

En la Tabla 19 no se observan diferencias significativas entre los tratamientos con vinaza y la solarización en el control de los nematodos del género *Meloidogyne*.

Influencia de la biodesinfección y solarización en la planta. La influencia de la biodesinfección sobre la planta se estudia cultivando planta de tomate cv Marmande sobre suelo de las muestras recogidas el 30-8-2006 con nº de registro 28508-28539, en cámara durante un mes y tres días. Los resultados se recogen en la Tabla 20, no observándose diferencias significativas entre los tratamientos con vinaza y la solarización sobre los parámetros estudiados en planta.

Después de los tratamientos se sembró repollo chino (*Brassica juncea*), puesto que la cooperativa de El Perelló ha introducido las verduras chinas como alternativa en la rotación durante el invierno. Tras dos meses de cultivo (septiembre-octubre) se determinaron los índices de nodulación (Fig. 20, Anexo: Fig. 2), observando que estos son similares entre todos los tratamientos. Sin embargo, los mayores índices se encontraron en la zona testigo, donde se había realizado solarización.

Tabla 20. Influencia de la biodesinfección y solarización en planta de tomate cv Marmande, en cámara durante un mes y tres días desde el 31-8-2006 hasta el 3-10-2006 (*).

Tratamiento	Índice	Altura (cm)	Peso(g)			Nº Hojas
			Total	Tallo	Raíz	
Muestreo 0-15 cm						
4 l/m ²	0,25 a	13,38 a	2,1 a	1,84 a	0,28 a	9,75 a
2 l/m ²	0,50 a	15,13 a	1,80 a	1,61 a	0,22 a	9 a
Solarización	0 a	15,66 a	1,40 a	1,24	0,16 a	9 a
Valor F	0,111	1,146	1,297	0,787	0,002	0,529
Muestreo >15 cm						
4 l/m ²	1 a	14,75 b	1,19 b	1,09 b	0,10 a	8 b
2 l/m ²	0,5 a	12 a	0,71 a	0,63 a	0,05 a	6,5 a
Solarización	0 a	11,37 a	0,81 a	0,73 a	0,09 a	6,75 ab
Valor F	1,8	12,986	8,832	10,745	2,579	4,043

(*) DMS: diferencia mínima significativa. La misma letra o letras en la misma columna no manifiestan diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$). Las cifras corresponden a la media y a la desviación de la media.

x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	Testigo
x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
0	0	2	1	1	1	3	0	0	1	
1	0	1	2	0	2	1	0	0	0	
0	0	0	2	1	0	1	0	0	0	
1	0	0	7	0	0	0	0	0	0	
1	0	0	8	0	1	1	0	0	1	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	Vino 2 l/m ²
x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	3	1	0	0	0	0	0	0	0	
x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	Vino 4 l/m ²
x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	
4	4	5	0	0	0	0	1	8	1	
0	4	0	0	0	0	0	1	2	1	
x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	

Figura 20. Índices de nodulación al final del experimento tras un ciclo de cultivo de repollo chino (*Brassica juncea*).

Influencia de la biodesinfección y solarización en la fertilidad del suelo.

De las muestras recogidas el 30-8-2006 se determinaron diferentes parámetros que nos permiten conocer la influencia de la biodesinfección en la fertilidad del suelo. Los resultados de fertilidad después de la biodesinfección en campo, se recogen en la Tabla 21. Se analizaron dos profundidades, para determinar si el producto penetraba en profundidad o se quedaba en superficie. Se compararon los tratamientos con un testigo al cual se realizó solarización, pero no se le aportó ningún tipo de fertilizante. De mismo modo que ocurre en los experimentos de **realizados en laboratorio en condiciones controladas, disminuyen la materia orgánica y la conductividad con respecto al testigo solarizado**, aunque en este caso no se observó ninguna diferencia en el pH. En los datos de N_{total} se observa una ligera tendencia a disminuir, según se aumenta la dosis, lo cual nos viene a confirmar que las vinazas ayudan a mineralizar los compuestos orgánicos.

Tabla 21. Influencia de la biodesinfección y solarización en la fertilidad del suelo. El Perelló (Sueca, Valencia).

	Vinaza 4 l/m ²	Vinaza 2 l/m ²	Testigo solarizado	Valor F	
Muestreo 0-15 cm					
MO (%)	2,04 ± 0,18 a	2,29 ± 0,18 ab	2,49 ± 0,17 b	3,799	
pH	7,8 ± 0,01 a	7,82 ± 0,07 a	7,80 ± 0,07 a	0,053	
CE (mS/cm)	0,67 ± 0,07 a	0,76 ± 0,06 ab	0,78 ± 0,03 b	3,719	
g/kg	C_{total}	11,82 ± 1,03 a	13,26 ± 1,03 ab	14,44 ± 1,00 b	3,799
	N_{total}	1,05 ± 0,45 a	1,53 ± 0,11 ab	1,63 ± 0,08 b	4,144
	P₂O₅	1,06 ± 0,02 a	1,20 ± 0,14 a	1,07 ± 0,10 a	1,408
	K⁺	0,055 ± 0,004	0,053 ± 0,01 a	0,06 ± 0,01 a	0,885
	Ca²⁺	2,81 ± 0,12 a	2,89 ± 0,05 a	2,71 ± 0,06 a	2,403
	Mg²⁺	0,29 ± 0,01 a	0,31 ± 0,02 a	0,29 ± 0,01 a	0,873
	Na⁺	0,13 ± 0,01 a	0,15 ± 0,02 ab	0,16 ± 0,01 b	3,685
	mg/kg	Fe	104,20 ± 7,70 a	106,11 ± 2,49 a	105,13 ± 2,58 a
Mn²⁺		39,09 ± 1,78 a	39,14 ± 0,74 a	36,80 ± 0,69 a	2,994
Cu		5,71 ± 0,16 a	6,38 ± 0,35 b	5,77 ± 0,18 a	4,768
Zn		26,42 ± 1,02 a	27,0 ± 1,37 a	25,85 ± 0,69 a	0,617
Muestreo > 15 cm					
MO (%)	0,97 ± 0,08 b	0,74 ± 0,10 a	0,82 ± 0,09 ab	3,507	
pH	8,06 ± 0,09 a	7,99 ± 0,05 a	7,94 ± 0,05 a	2,179	
CE (mS/cm)	0,51 ± 0,00 a	0,50 ± 0,01 a	0,56 ± 0,04 ab	3,833	
g/kg	C_{total}	5,60 ± 0,46 b	4,28 ± 0,57 a	4,75 ± 0,52 ab	3,507
	N_{total}	0,50 ± 0,25 ab	0,70 ± 0,06 a	0,70 ± 0,06	2,957
	P₂O₅	0,98 ± 0,07 a	0,83 ± 0,13 a	0,87 ± 0,04 a	1,975
	K⁺	0,036 ± 0,003 ab	0,033 ± 0,003 a	0,04 ± 0,002 b	4,968
	Ca²⁺	2,53 ± 0,07 a	2,65 ± 0,03 ab	2,74 ± 0,09 b	6,127
	Mg²⁺	0,16 ± 0,01 a	0,16 ± 0,00 a	0,18 ± 0,01 b	3,710
	Na⁺	0,10 ± 0,00 a	0,10 ± 0,00 a	0,11 ± 0,01 ab	4,301
mg/kg	Fe	95,79 ± 4,10 a	106,06 ± 2,67 a	110,40 ± 11,00 a	2,568
	Mn²⁺	31,54 ± 1,04 a	30,22 ± 1,00 a	31,92 ± 1,07 a	1,432
	Cu	7,54 ± 1,54 a	6,99 ± 0,88 a	9,75 ± 3,27 a	1,260
	Zn	22,41 ± 3,40 a	16,52 ± 1,67 a	27,16 ± 9,19 a	2,121

(*) DMS: diferencia mínima significativa. La misma letra o letras en la misma fila no manifiestan diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$). Las cifras corresponden a la media y a la desviación de la media.

B. Invernadero II: aplicación de vinaza al final del verano. Después de la recolección de pepino (Anexo: Fig. 3), el 18-9-2006 se recogen muestras de suelo a dos profundidades entre el horizonte A(0-20 cm) y B(20-40 cm), realizándose en el laboratorio una extracción de nematodos, así como una observación de los índices de nodulación de las raíces en el propio invernadero con el fin de confirmar la existencia de un problema nematológico causado por *M. incognita*. Entre 0-20 cm la media de juveniles de *M. incognita* está entre 57-91 por 100 cc de suelo y de 20-40 cm entre 13-64 juveniles por 100 cc de suelo (Anexo: Tabla 3A, B).

Las muestras de suelo infestado de *M. incognita*, con los n^{os} de registro 28600-28619 que corresponden a la profundidad entre 0-20 cm y por otro lado las muestras con n^{os} de registro 28620-28639 de profundidad entre 20-40 cm, se cultivan en macetas con tabaco, algodón, pimiento sensible cv .Sonar, pimiento resistente C-25, tomate resistente cv Eufrates, tomate sensible cv Marmande y Cacahuete cv Florunner para determinar el biotipo (Apartado V.5, Tabla 32).

Influencia de la biodesinfección en los nematodos del suelo. El 18-9-2006 se divide la parcela en cuatro subparcelas y se lleva a cabo la biodesinfección con unas dosis de 1 l/m² (V1), 2 l/m² (V2) y dos testigos T1 y T2. Después de realizada la biodesinfección, el 11-10-2006 las muestras recogidas a dos profundidades de 0-20 cm y 20-40 cm se registran con los n^{os} 28706 hasta el n^{os} 28749. Se realiza por una parte la extracción de nematodos en el laboratorio, por otra los análisis de fertilidad y con 200 g del suelo restante se cultiva tomate cv Marmande para observar la influencia del tratamiento sobre la planta. Los resultados de todos los experimentos se detallan en la Tabla 22 (Anexo: Tabla 4 A, B). No se observan diferencias significativas, salvo en el incremento del número de rhabditidos y enquitreidos de los suelos recogidos entre 0-20 cm tratados con vinaza, los cuales presentan un mayor número de individuos juveniles de *M. incognita* en el testigo 1, esto también es similar en las muestras pertenecientes a la profundidad entre 20-40 cm.

Tabla 22. Influencia de la biodesinfección en nematodos del suelo. El Perelló (Sueca, Valencia) (Indiv. 100 cc⁻¹ suelo).

Tratamiento	<i>Meloidogyne</i>		Doriláimidos		Rabditidos		Monónquidos		Enquitreidos V
	V	M	V	M	V	M	V	M	
Muestreo 0-20 cm									
2 l/m ²	21 a	5 ab	26,5 b	0 a	71 ab	8 b	4 ab	0 a	24 b
1 l/m ²	30 a	3,6 ab	14 a	0 a	44,6 a	5 ab	1,3 ab	0 a	4 a
Testigo 1	116 b	6 b	25 b	2 b	54,5 ab	1 a	3,5 b	0 a	10 ab
Testigo 2	18,3 a	1 a	11,5 a	0 a	61 b	3 a	2,5 a	0 a	5 ab
Valor F	49,25	2,006	5,077	3,63	1,223	1,871	2,226	1,000	2,293
Muestreo > 20 cm									
2 l/m ²	5 a	14 b	10 a	2 ab	35 ab	8 b	3 a	1 a	24 b
1 l/m ²	12 a	2 a	13 a	3 b	27 a	5 ab	3 a	3 a	4 a
Testigo 1	97 b	9 ab	11 a	0 a	41 ab	1 a	3 a	0 a	10 ab
Testigo 2	7 a	3 a	10 a	0 a	48 b	3 a	1 a	0 a	5 ab
Valor F	6,245	5,840	0,848	5,787	2,436	3,683	0,923	1,096	2,293

(*) DMS: diferencia mínima significativa. La misma letra o letras en la misma fila no manifiestan diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$). Las cifras corresponden a la media y a la desviación de la media.

Influencia en la planta. La influencia de la biodesinfección sobre la planta se observa cultivando tomate sensible cv Marmande en macetas sobre suelo muestreado el 11-10-2006, después de haberse realizado la biodesinfección. Los resultados se recogen en la Tabla 23.

Según los resultados de la Tabla 23, no se observan diferencias significativas salvo que el índice de nodulación por nematodos formadores de nódulos del género *Meloidogyne* es mayor en el testigo 1 en las muestras recogidas entre 0-20 cm.

Después de la biodesinfección se cultivó apio, examinando las raíces de 32 plantas por tratamiento dos meses después de haber sembrado el apio, encontrándose que el tratamiento con 2 l/m² de vinaza presenta un índice de nodulación medio de 4,9 frente a un índice de 5,2 en el tratamiento con 1 l/m² de vinaza y un índice de 6,5 en el testigo 1, presentando el testigo 2 un índice de 4,3 puesto que las poblaciones originales eran más bajas que el resto de las subparcelas. (Fig. 21, Anexo: Fig. 4).

Tabla 23. Influencia de la biodesinfección en planta de tomate cv Marmande en cámara desde el 16-10-2006 hasta el 6-11-2006.

Tratamiento	Índice Nodulación	Altura (cm)	Peso (g)			Nº Hojas
			Total	Tallo	Raíz	
Muestreo 0-20 cm						
2 l/m ²	3 a	16,5 a	2,16 a	1,7 a	0,4 a	8,3 a
1 l/m ²	2,5 a	18,6 a	2,11 a	1,6 a	0,5 a	8,2 a
Testigo 1	4,3 a	16,7 a	2,1 a	1,7 a	0,3 a	10 b
Testigo 2	1,7 a	16,6 a	1,9 a	1,7 a	0,3 a	9,3 ab
Valor F	1,286	0,823	0,087	0,149	1,75	3,31
Muestreo 20-40 cm						
2 l/m ²	1,7 a	15,6 a	1,60 a	1,29 a	1,29 a	7,25 a
1 l/m ²	2 a	16,3 a	1,93 a	1,56 a	1,56 a	8,66 b
Testigo 1	3 a	16,7 a	2,18 a	1,63 a	1,63 a	9,25 b
Testigo 2	1,7 a	17,7 a	2,04 a	1,60 a	1,60 a	9,25 b
Valor F	1,141	1,12	1,116	0,983	1,833	6,581

(*) DMS: diferencia mínima significativa. La misma letra o letras en la misma columna no manifiestan diferencias estadísticamente significativas ($\alpha = 0,05$). Las cifras corresponden a la media y a la desviación de la media.

T1 15 7 16 8 33 6 34 6 13 7 14 8 31 8 32 8 11 4 12 7 29 6 30 7 9 6 10 9 27 7 28 9 7 8 8 8 25 6 26 7 5 5 6 7 23 7 24 6 3 3 4 5 21 6 22 8 1 1 2 7 19 6 20 7 17 4 18 7										V1 l/m² 23 9 24 8 32 6 21 9 22 8 31 7 19 9 20 8 30 8 17 9 18 8 29 7 15 7 16 8 28 3 13 7 14 6 27 3 11 7 12 7 26 6 9 6 10 5 25 6									
V2 l/m² 15 7 16 8 31 4 32 5 13 8 14 7 29 5 30 4 11 6 12 8 27 3 28 7 9 6 10 5 25 1 26 7 7 5 8 5 23 2 24 4 5 5 6 5 21 3 22 5 3 4 4 4 19 2 20 6 1 5 2 3 17 3 18 4										T2 15 6 16 7 31 6 13 2 14 5 29 4 11 6 12 5 27 5 9 6 10 7 25 6 7 7 8 6 23 5 5 6 6 6 21 4 3 6 4 5 19 7 1 4 2 5 17 6									

Figura 21. Índices de nodulación al final del experimento después de apio.

V.3.2. Viñedo (Socuéllamos, Ciudad Real). Se realiza un estudio sobre un viñedo convencional, donde se vienen aplicando vinazas de vino durante los últimos cinco años, en la localidad de Socuéllamos (Ciudad Real), que presentaba síntomas de *fanleaf* (GFLV) y donde la producción estaba destinada a la elaboración de alcohol. El tratamiento con vinaza de vino era pura y se aplicó durante cada mes por goteo entre calles. Se muestreo este viñedo el 30 de mayo de 2006, en distintos puntos del viñedo tanto cerca de la cepa como en las calles a una profundidad de 0-20 cm. Se tomó como testigo una finca próxima en la que no se había realizado ningún tipo de tratamiento (Fig.22). Las muestras recogidas del viñedo convencional, se registraron con el nº 28175, otras dos muestras de la zona donde se había aplicado vinaza, una alrededor de la cepa nº 28176 y otra en la calle nº 28177. El 12-9-2006, se realiza un nuevo muestreo que corresponde a las muestras nº^{os} 28557-28569, a una profundidad de 0-20 cm. Se observó que el suelo era arenoso, de compactación baja, húmedo y de color rojizo. Se estudió la influencia sobre los nematodos y la fertilidad del suelo.

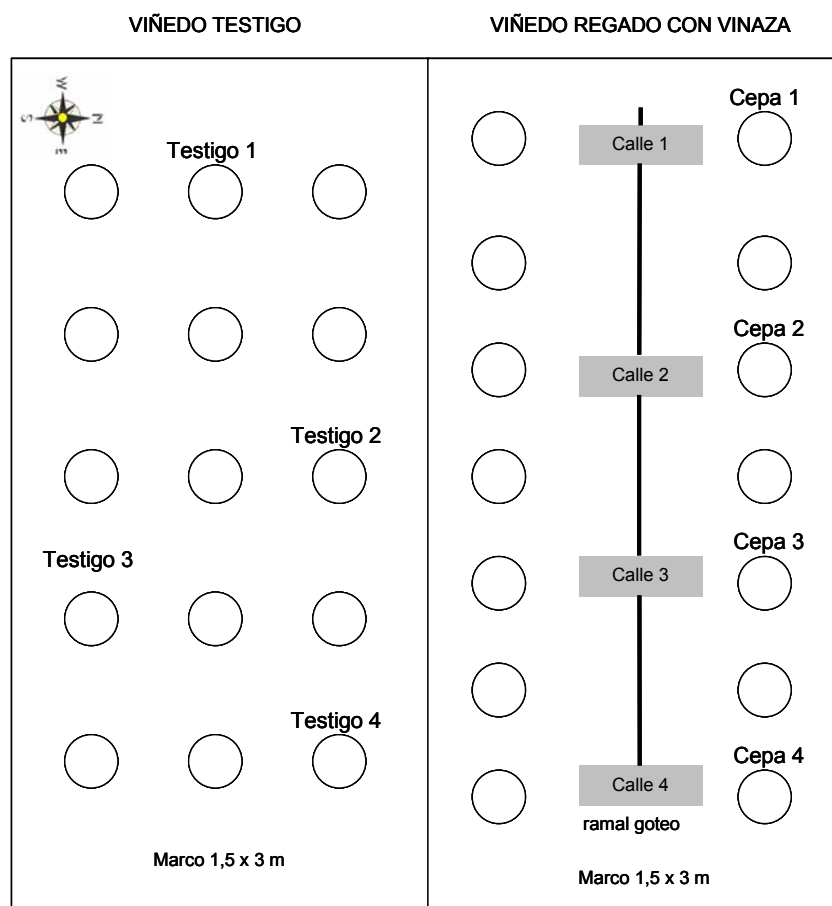


Figura 22. Puntos de muestreo en el viñedo de Socuéllamos (Ciudad Real) tratado con vinazas de vino pura durante cinco años y en un viñedo testigo.

Influencia de la biodesinfección en los nematodos del suelo. En las muestras recogidas el 6-6-2006, se realizó una primera extracción por Baermann a partir de una muestra media (Tabla 24) y una segunda por centrifugación de las cuatro repeticiones de cada tratamiento (Tabla 25). En las muestras del segundo muestreo, el 12-9-2006 solo se extrajeron por centrifugación (Tabla 26).

Tabla 24. Nematodos en suelo de Socuéllamos (Ciudad Real) (6-6-2006). Extracción por Baermann (Indiv. 200 cc).

Muestra	<i>X. index</i>	Doriláimidos	Rabdítidos	Enquitreidos
28175	6	14	12	2
28176	0	18	12	2
28177	0	12	114	4

Tabla 25. Nematodos en suelo de Socuéllamos (Ciudad Real) (6-6-2006) Extracción por centrifugación (Indiv. 100 cc⁻¹ suelo).

Muestra	<i>X. index</i>	Doriláimidos	Rabdítidos	Enquitreidos
28175 Testigo				
1	0	2	4	0
2	0	4	8	0
3	0	0	4	0
4	0	0	4	0
Media	0	2	5	0
28176 Cepas parcela regada con vinaza				
1	0	4	22	0
2	0	2	18	0
3	0	4	46	0
4	0	0	48	0
Media	0	3	34	0
28177 Calles parcela regada con vinaza				
1	0	20	216	14
2	0	28	484	16
3	0	10	516	24
4	0	10	558	12
Media	0	17	444	17

Se observa, poblaciones altas de *X. index* en el viñedo convencional, que solo aparece en las extracciones por Baermann (Tabla 24). En las muestras

extraídas por centrifugación se observa un incremento de doriláimidos, rabdítidos y enquitreidos en las áreas tratadas con vinaza, especialmente en las calles (Tablas 25 y 26). En el muestro realizado el 12-9-2006, en las extracciones por centrifugación solo aparece *X. index* en una muestra de la cepa más alejada del inicio del ramal del riego, en el área donde se aplicó vinaza de vino, apareciendo también en esta zona *M. arenaria* en todas las muestras, observándose por otro lado un incremento de doriláimidos, rabdítidos y enquitreidos en la zona donde se aplicó la vinaza. Solo aparecieron *Criconemoides* en una muestra del viñedo testigo.

Tabla 26. Nematodos en suelo de las muestras n^{os} 28557-28569, Socuéllamos (Ciudad Real)(12-9-2006) Extracción por centrifugación (Indiv. 100 cc⁻¹ suelo).

Tratamiento	<i>X. index</i>	<i>M. arenaria</i>	<i>Criconemoides</i>	Doriláimidos	Rabdítidos	Enquitreidos	
Vinaza	1	0	0	0	4	52	14
	2	0	0	0	2	28	8
	3	0	0	0	2	28	32
	4	0	0	0	20	16	48
	Media	0	0	0	7	31	25,5
Cepa	1	0	4	0	0	20	0
	2	0	2	0	4	22	2
	3	0	8	0	4	6	0
	4	1	56	0	4	12	2
	Media	0,25	17,1	0	3	15	1
Testigo	1	0	0	0	4	6	0
	2	0	0	2	4	8	2
	3	0	0	0	0	18	2
	4	0	0	0	8	10	2
	Media	0	0	0,25	4	10,5	1,2

Influencia en la fertilidad del suelo. Al mismo tiempo que se preparan las muestras para la extracción de nematodos se separa una parte para dejarla secar y determinar los parámetros que nos indiquen el efecto de las vinazas sobre la fertilidad del suelo. Los resultados se detallan en la Tablas 27 y 28.

Se observa en la Tablas 27 y 28, que se produce en los tratamientos con vinazas, cuando se aplican de forma continuada, un incremento de la materia orgánica, conductividad eléctrica, N_{total}, P₂O₅, K⁺, Mg²⁺, Na⁺, Fe, Cu y Zn,

disminuyendo el pH, Ca^{2+} y Mn^{2+} . Se observa además que la acumulación se produce en el inicio del ramal de goteo, siendo menores los valores según se avanza por este.

Tabla 27. Influencia en las características y macronutrientes de los tratamientos con vinaza, muestras recogidas el 12-9-2006 (Socuéllamos, Ciudad Real).

Tratamiento	MO%	pH	CE mS/cm	g/kg							
				C	N _{total}	P ₂ O ₅	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	
Vinaza	1	3,95	6,58	1,33	22,90	3,01	0,95	1,91	2,09	0,23	0,046
	2	3,27	6,04	1,17	19,00	3,13	0,70	1,39	1,79	0,21	0,033
	3	2,65	6,83	0,77	15,40	2,04	0,60	0,77	1,88	0,21	0,022
	4	1,72	7,28	0,78	10,00	1,34	0,90	1,10	3,02	0,15	0,026
Cepa	1	0,43	8,03	0,23	2,50	0,36	0,08	0,40	1,47	0,07	0,008
	2	0,61	7,65	0,25	3,50	0,46	0,17	0,47	1,65	0,08	0,006
	3	0,43	7,60	0,25	2,50	0,28	0,07	0,40	1,56	0,08	0,006
	4	0,43	7,77	0,27	2,50	0,36	0,11	0,40	2,15	0,08	0,008
Testigo	1	0,86	7,90	0,24	5,00	0,46	0,09	0,34	3,52	0,12	0,006
	2	0,74	7,94	0,19	4,30	0,44	0,07	0,30	3,03	0,11	0,009
	3	0,67	7,87	0,21	3,90	0,46	0,10	0,32	2,90	0,12	0,009
	4	0,80	7,84	0,19	4,60	0,46	0,08	0,30	2,53	0,18	0,008

Tabla 28. Influencia en los micronutrientes de los tratamientos con vinaza, muestras recogidas el 12-9-2006 (Socuéllamos, Ciudad Real).

Tratamiento		mg/kg			
		Fe	Mn ²⁺	Cu	Zn
Vinaza	1	279	14	6,9	7,2
	2	229	12	7,3	6,0
	3	145	15	4,5	5,2
	4	51	23	3,0	3,0
Cepa	1	10	39	1,1	0,8
	2	12	19	1,1	1,2
	3	10	58	1,1	1,0
	4	10	32	1,0	0,7
Testigo	1	11	57	1,3	0,5
	2	11	62	1,4	0,5
	3	12	65	1,3	0,5
	4	13	63	1,4	0,6

V.4. Determinación del índice de madurez

La vinaza es el residuo de la industria alcoholera dedicada principalmente a la destilación de vino de baja calidad para la obtención de alcohol vínico como producto principal. Se trata de un producto con elevado porcentaje de agua, y un alto contenido en nutrientes, materia orgánica y sales solubles (Tabla 29). En este apartado se va a determinar la posible fitotoxicidad de las vinazas de vino. Para ello se ha puesto a punto la metodología para la realización de ensayos de germinación y para la determinación de la actividad biológica del suelo sometido a la acción de la vinaza, que se recogen en el Apartado V.5, que se emplearan una vez establecidas las dosis óptimas en campo.

Tabla 29. Composición química de la vinaza de alcoholera utilizada.

Parámetro	Vino	Lías
pH	3,61	4,75
N _{total} g/l	0,12	0,56
P ₂ O ₅ g/l	0,21	0,36
K ⁺ g/l	0,73	1,97
Ca ²⁺ g/l	0,04	0,84
Mg ²⁺ g/l	0,08	0,15
Na ⁺ g/l	0,06	0,21
Cl g/l	0,10	0,14
CE dS/m	2,87	2,87
Sal g/l	1,50	-----
Pb mg/l	0,88	0,57
Zn mg/l	0,35	0,91

Ensayos de germinación. Para comprobar las vinazas utilizadas en este trabajo pueden provocar efecto fitotóxico para las plantas cultivadas se desarrolla un método que nos permite determinar de un modo rápido el posible efecto fitotóxico. Tal método consiste en poner a germinar 10 semillas de berro (*Lepidium sativum* L.) con cuatro repeticiones en cámara a temperatura de 24°C ±1 °C durante tres días, los tratamientos consistieron en aplicar 5ml de las diluciones de vinaza de vino a las concentraciones de 1, 3 y 5% y un testigo dónde se utilizó agua destilada. Las semillas fueron puestas a germinar el 3-2-2006 y se realizaron las observaciones el 7-2-2006, determinándose el

porcentaje de germinación, además de la longitud de la radícula de cada planta germinada, cuyos resultados se muestran en la Tabla 30.

Tabla 30. Índice de germinación de las semillas después de realizar los experimentos con diferentes diluciones de vinaza en condiciones controladas de laboratorio.

Tratamiento	Plantas germinadas	% Germinación	Longitud media	Índice de Germinación%
Testigo	8	80	21	57
1%	6	60	15	43
3%	6	60	15	43
5%	5	50	15	36

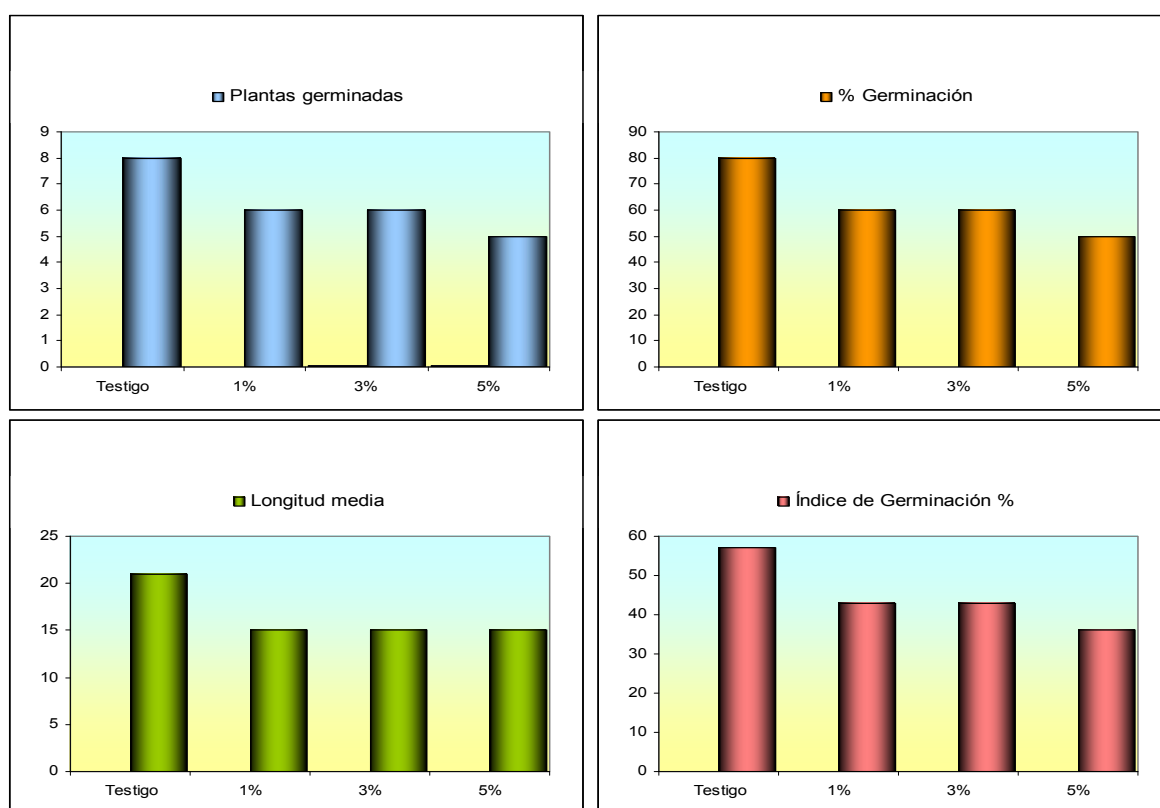


Figura 23. Valores de porcentaje de germinación, longitud media de radícula e índices de germinación de plantas de *Lepidium sativum* L tratadas con progresivas concentraciones de vinaza de vino.

Los resultados del test de fitotoxicidad muestran un ligero efecto depresivo de la aplicación de vinaza en la germinación radícula, que presenta muy escasa dependencia a la dosis de aplicación (Tabla 30, Fig. 23). Los valores de longitud media de radícula (totalmente independientes de la concentración) sugieren que no hay interacción entre las fracciones solubles de la vinaza y el

metabolismo de la planta. El experimento se repitió con concentraciones al 10% v:v, y tampoco se observaron efectos en la germinación y el crecimiento de las plántulas (Anexo: Figs 5-7).

V.5. Caracterización de razas en las poblaciones de nematodos “formadores de nódulos”

Para caracterizar la virulencia de las poblaciones de nematodos del género *Meloidogyne* encontradas, tanto en **A. Castilla-La Mancha**, donde aparece una mezcla de poblaciones de *M. arenaria* y *M. incognita*, como en **B. El Perelló (Valencia)** donde aparece *M. incognita* se ha utilizado el test de Hartman y Sasser (1985), que ha sido modificado por Robertson *et al.* (2005, 2006) que al incluir cultivares de pimientos y tomates resistentes nos permiten diferenciar **biotipos** dentro de una misma raza, que son poblaciones especializadas debido a una repetición continuada de plantas resistentes, aparecen ciertos individuos que son capaces de romper la resistencia. Ello nos permite distinguir dentro de las diferentes razas del género *Meloidogyne* nuevos biotipos que son capaces de parasitar tomate con el gen de resistencia (gen *Mi*), y también poblaciones que pueden parasitar pimiento resistente (poblaciones pimiento). La caracterización de biotipos de *Meloidogyne* es importante para la selección de plantas cultivadas portadoras de resistencia en el diseño de sistemas de rotación tanto en sistemas de producción integrada como ecológica.

A. Castilla-La Mancha (*M. arenaria* y *M. incognita*). Los resultados de la caracterización de las poblaciones encontradas en Castilla-La Mancha se recogen en la Tabla 31, donde podemos observar que están representadas las cuatro razas de *M. incognita*, apareciendo biotipos que son capaces de parasitar tanto a los pimientos resistentes como a tomates portadores del gen *Mi* de resistencia (Robertson *et al.* 2005).

Tabla 31. Caracterización de poblaciones del género *Meloidogyne* en Castilla-La Mancha, Test de Hospedadores de Carolina del Norte modificado (Robertson *et al.* 2005). En color las poblaciones que han sido encontradas en Castilla-La Mancha. (*)

Patotipo	Pimiento*		Tomate*		Algodón DP61	Tabaco NC95	Cacahuete Florunner	Raza
	S	R	S	R				
<i>M. incognita</i>								
1. Tomate 1	+	-	+	-	-	-	-	1
2. Tomate 1-Mi	+	-	+	+	-	-	-	1
3. Pimiento 1	+	+	+	-	-	-	-	1
4. Pimiento 1-Mi	+	+	+	+	-	-	-	1
5. Tomate 2	+	-	+	-	-	+	-	2
6. Tomate 2-Mi	+	-	+	+	-	+	-	2
7. Pimiento 2	+	+	+	-	-	+	-	2
8. Pimiento 2-Mi	+	+	+	+	-	+	-	2
9. Tomate 3	+	-	+	-	+	-	-	3
10. Tomate 3-Mi	+	-	+	+	+	-	-	3
11. Pimiento 3	+	+	+	-	+	-	-	3
12. Pimiento 3-Mi	+	+	+	+	+	-	-	3
13. Tomate 4	+	-	+	-	+	+	-	4
14. Tomate 4-Mi	+	-	+	+	+	+	-	4
15. Pimiento 4	+	+	+	-	+	+	-	4
16. Pimiento 4-Mi	+	+	+	+	+	+	-	4
<i>M. arenaria</i>								
Quero (To)	+	-	+	+	-	+	¿?	3
Socuéllamos (CR)	+	-	+	+	-	+	¿?	3

(*)S:Sensible; R:Resistente pimiento cv Sonar; tomate cv Marmande; Algodón, DP61; tabaco NC95; cacahuete cv Florunner; sandia cv Charleston grey; pimiento resistente:Atlante (Arnedo S.A), tomate resistente cv Nikita.CR: Ciudad Real, To: Toledo.

Se encontró también en viñedos de Quero (Toledo) y Socuéllamos (Ciudad Real) mezcla de poblaciones de *M. arenaria* de la raza 3, capaz de parasitar a pimiento y *M. incognita*, lo que puede dar lugar a que algunas de las poblaciones de campo se comporten como la raza 4 de *M. incognita*, un biotipo altamente virulento que es capaz de parasitar algodón y tabaco, pudiendo además producir infección en raíces de dos variedades de pimientos resistentes, Carolina Wonder y Charleston Belle, e incluso en tomate cv Nikita portadores del gen *Mi* de resistencia a *M. incognita* (Tabla 31). **La gran diversidad de biotipos encontrados en Castilla- La Mancha dificulta la eficacia en la utilización de variedades resistentes.**

B. El Perelló (Sueca, Valencia). Los resultados de la caracterización de las poblaciones encontradas en El Perelló (Valencia), se recogen en la Tabla 32, donde podemos observar que solo se encontró *M. incognita* raza 2, con biotipos que son capaces de parasitar pimientos a tomates portadores del gen *Mi* de resistencia pero no a los pimientos resistentes; que pueden utilizarse en la rotación de cultivos.

Tabla 32. Determinación de la raza de la especie *M. incognita* en las muestras 28600-28639. El Perelló (Sueca, Valencia).

Tratamiento	Pimiento*		Tomate*		Algodón DP61	Tabaco NC95	Cacahuete Florunner	Raza
	S	R	S	R				
0-20 cm								
Testigo 1	+	-	+	+	-	+	-	2 Tom Mi
Testigo 2	+	-	+	+	-	+	-	2 Tom Mi
Tratamiento 1	+	-	+	+	-	+	-	2 Tom Mi
Tratamiento 2	+	-	+	+	-	+	-	2 Tom Mi
>20 cm								
Testigo 1	+	-	+	+	-	+	-	2 Tom Mi
Testigo 2	+	-	+	+	-	+	-	2 Tom Mi
Tratamiento 1	+	-	+	+	-	+	-	2 Tom Mi
Tratamiento 2	+	-	+	+	-	+	-	2 Tom Mi

(*)S:Sensible; R:Resistente pimiento cv Sonar; tomate cv Marmande; algodón DP61; tabaco NC95; cacahuete cv Florunner; sandía cv Charleston grey; pimiento resistente:Atlante (Arnedo S.A); tomate resistente cv Nikita. Tratamiento 1=1 l/m²; Tratamiento 2= 2 l/m² de vinaza de vino;

Según el Test de de Hospedadores de Hartman y Sasser (1985), las poblaciones estudiadas en el El Perelló (Valencia) pertenecen a *M. incognita* raza 2, que son capaces de parasitar a tabaco NC95 pero no algodón DP61, perteneciendo al biotipo tomate *Mi*, puesto que pueden parasitar a los tomates portadores del gen *Mi* de resistencia (Tabla 32).

V.6. Relación de *M. incognita* con la flora arvense

Es de gran interés tanto el conocimiento de las diferentes especies de flora arvense asociadas al cultivo de la vid como el comportamiento con relación a ellas de las poblaciones de *M. incognita*, pudiendo ser utilizadas como plantas trampa en el manejo control de nematodos de este género. En este sentido cuando los tratamientos con herbicidas se aplican en el momento adecuado antes de la floración, las especies arvenses pueden actuar como plantas trampa de *M. incognita* (López Pérez *et al.* 2003). Por el contrario, su presencia en las calles del viñedo puede incrementar las poblaciones de nematodos, especialmente a partir del mes de mayo hasta septiembre, cuando la temperatura es superior a los 20 °C. Por ello se recomienda labores de rotavator cuando la flora arvense sea muy abundante y predominen las especies susceptibles al nematodo (Tabla 33).

Tabla 33. Flora arvense asociado al cultivo de la vid en Castilla-La Mancha. (Antón y Laborda 1991, Goodey 1965).

Familia	Especies encontradas	Susceptibilidad a <i>Meloidogyne</i>	Especies de <i>Meloidogyne</i>
Borragináceas	<i>Echium plantagineum</i>	N	
	<i>Lithospermum arvense</i>	N	
Cariofiláceas	<i>Cerastium sp.</i>	N	
	<i>Spergula pentandra</i>	N	
	<i>Spergularia rubra</i>	N	
Escrofulariáceas	<i>Linaria spartea</i>	N	
Geraniáceas	<i>Erodium cicutarium</i>	S	<i>M. hapla</i>
Compuestas	<i>Senecio vulgaris</i>	S	<i>M. hapla</i>
	<i>Matricharia sp.</i>	S	<i>M. incognita</i>
	<i>Diplocharis muralis</i>	N	
Crucíferas	<i>Mibora verna</i>	N	
Gramíneas	<i>Lolium strictum</i>	N	
	<i>Lamium amplexicaule</i>	S	<i>M. hapla</i> , <i>M. incognita</i>
Leguminosas	<i>Ornithopus compressus</i>	N	
	<i>Trifolium arvense</i>	N	
	<i>Trigonella polycerata</i>	N	
Liliáceas	<i>Allium sp.</i>	N	
Primuláceas	<i>Anagallis marianum</i>	N	
	<i>Sybilum marianum</i>	N	
Portulacaceas	<i>Portulaca oleracea</i>	S	<i>M. arenaria</i> , <i>M. hapla</i> , <i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i> .

*S, susceptible; N, No se conoce efecto.

Si tenemos en cuenta la especies de la flora arvense citadas en Castilla-La Mancha (Tabla 33), y el Catálogo de Nematodos Parásitos de Plantas de Goodey *et al.* (1965), encontramos como plantas sensibles (S) a *Meloidogyne* spp. las especies siguientes: *Erodium cicutarium*, *Lamium amplexicaule*, *Matricharia*, *Portulaca oleracea* y *Senecio vulgaris*, por el contrario, no son parasitadas por *Meloidogyne* (N): *Allium*, *Anagallis marianum*, *Cerastium*, *Diplocharis murakii*, *Echium pantagineum*, *Linaria sparteae*, *Lithospermum arvense*, *Lolium striatum*, *Mibora verna*, *Ornithopus compressus*, *Spergula pentandra*, *Spergularia rubra*, *Sybilum marianum*, *Trifolium arvense* y *Trigonella polycerata*. El uso de un índice de nodulación (Fig.17) como referencia en las plantas adventicias asociadas al viñedo nos permite conocer el grado de infestación por *M. incognita* de un viñedo y de este modo tomar las medidas de manejo oportunas, aunque no hay que olvidar que la presencia de especies arvenses dentro del cultivo puede crear problemas al servir de reservorio para las poblaciones de *M. incognita*, por lo que es de sumo interés evitar su presencia, aunque no hay que olvidar que pueden actuar como plantas trampas y ser indicadoras de infestación por *M. incognita*.

Por último, la presencia de higueras aisladas cercanas a un viñedo nos puede aportar información sobre los cambios de la temperatura y permitir conocer, con la brotación de sus hojas, la fecha de inicio de la actividad de las poblaciones de *M. incognita*, aunque hay que tener presente que las higueras pueden ser un foco de infestación por estar la mayoría de ellas parasitadas por los nematodos formadores de nódulos o por *X. index*, nematodo transmisor del virus causante del entrenudo corto de la vid. En relación con *X. index*, debemos señalar que se ha comprobado que al parasitar la higuera el nematodo pierde el virus en caso de que sea portador.

V.7. Efecto sobre la nutrición de la planta y la calidad del mosto

Se estudia el efecto del tratamiento de 2 l/m² de vinaza sobre un cultivo posterior de apio y la aplicación de vinaza pura sobre el cultivo de remolacha. En el mosto se determinó el contenido de potasio y grado Baumé (° Bé) en un viñedo donde se había aplicado vinaza reiteradamente.

Nutrición de la planta

- **Apio.** En el experimento sobre cultivos hortícolas en El Perelló (Sueca, Valencia), del Invernadero II donde se aplicó vinaza al final del verano, se estudia el efecto de la vinaza de vino (lías) a una dosis de 2 l/m², sobre el cultivo posterior de apio, tanto en la raíz como en la parte aérea (Tabla 34).

Tabla 34. Efecto del tratamiento con 2 l/m² de lías de vino en plantas de apio en el experimento de El Perelló (Sueca, Valencia).

Índice (I)	mg/kg											
	N%	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	P	Fe	Mn ²⁺	Zn	Cu	Pb	Ni	
Raíces												
T (0-3)	2,60	30993	10774	4182	3916	737	18,7	67,3	30,7	0,0	0,0	
T (5-7)	3,20	37364	11412	5292	3403	649	23,0	56,0	35,3	0,0	0,0	
T (8-9)	3,53	34191	11506	5424	3524	674	21,7	53,6	29,7	0,0	0,6	
Media	3,11	34183	11231	4966	3614	687	21,1	59,0	31,9	0,0	0,2	
V2 (0-4)	3,12	37983	11034	5403	3315	770	17,7	65,7	122,3	0,0	2,1	
V2 (5-6)	3,01	35765	11280	5155	3070	768	20,9	61,6	99,3	0,0	0,9	
V2 (7-8)	2,88	33302	8127	4818	2778	610	13,0	49,1	101,3	0,0	1,1	
Media	3,00	35683	10147	5125	3054	716	17,2	58,8	107,6	0,0	1,4	
P. aérea												
T 3,64 g	4,15	46104	17468	3457	3017	87	30,4	39,1	6,3	0,0	0,0	
V2 5,89g	4,01	52767	16993	3254	4418	148	15,1	39,5	7,8	0,0	1,1	

(*) T: Testigo, V2: Vinaza de vino (lías) en dosis de 2 l/m²; I: Índice de nodulación.

Según la Tabla 34 se observa tanto en raíz como en hoja una disminución del % de N_{total}, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ y Zn con los tratamientos de vinaza, incrementándose el K⁺, Cu y Ni, mientras que el P disminuye en la raíz pero se incrementa en la hoja y el contenido en Pb es cero.

- **Remolacha.** En la localidad de Socuéllamos (Ciudad Real) se tomó una muestra de raíz de remolacha, donde se había aplicado vinaza reiteradamente. Se estudia el efecto de la vinaza sobre el cultivo de remolacha. (Tabla 35).

Tabla 35. Efecto de la aplicación de vinazas en raíces de remolacha en Villarrobledo (Ciudad Real).

	mg/kg				
	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	P
Referencia	9.600	13.900	2.300	3.100	1.200
Fertilizada con vinaza	9.860	1.113	3.316	2.237	809

Cuando se compara el contenido de nutrientes de la raíz remolacha tratada con una testigo, se encuentra que en las raíces tratadas disminuye el Ca²⁺, Na⁺ y el P, incrementándose el K⁺ y Mg²⁺.

Calidad del mosto. Para su estudio, se ha calculado el grado Baumé (° Bé) que nos indica la cantidad de azúcares en el mosto, útil para calibrar la calidad del producto. Se determina a partir de 10 uvas de cada bloque, estudiándose cuatro variedades: Cencibel, Cabernet Sauvignon, Merlot y Shyrah. También se indica la cantidad de potasio presente en el mosto de las cuatro variedades.

Tabla 36. Efecto de la vinaza de vino pura en los parámetros K⁺ y ° Bé del mosto de diferentes variedades de vid

Variedad de vid	K ⁺ (mg/l)	° Bé
Viña tratada con vinaza de vino		
Cencibel	2.219	12,8
Cabernet Sauvignon	2.760	13,8
Merlot	2.160	13,4
Shyrah	2.025	12,7
TESTIGO*		
Cencibel	1.298	12,0

(*) Media de los parámetros de K⁺ y ° Bé la localidad de Socuéllamos (Ciudad Real) suministrados por la Cooperativa Virgen de Loreto.

Los resultados de la Tabla 36 pertenecen a viñedos que están en regadío y espaldera, tanto en la que se aplicó la vinaza como el testigo que es un viñedo convencional representativo de la zona de Socuéllamos (Ciudad Real). Los contenidos de K⁺ en la variedad Cencibel del testigo pueden considerarse normales para esta variedad, mientras que los contenidos de K⁺ en los mostos

procedentes de las viñas regadas con vinaza de vino son más elevados. Lo normal es que la variedad Cencibel acumule potasio y azúcares en la época del envero y maduración, siempre que esté en condiciones favorables de humedad y en teoría no se debe considerar que el alto contenido de K^+ en el mosto dependa de los niveles que existen en el suelo sino que depende de la disponibilidad de agua que tiene la vid. Como la cantidad de riego es muy similar en las fincas convencionales como las tratadas con vinaza, por ello se puede considerar que el alto contenido en K^+ dependa de la aplicación de vinaza que facilita que la variedad Cencibel lo acumule de modo normal. No se observan diferencias significativas en el contenido de azúcar teniendo en cuenta los valores de grados Baume pero ello depende del rendimiento de las cepas, información de la que no se dispone (Díez Rojo 2006).

VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Se analiza en la discusión el efecto de los subproductos de la industria vitivinícola en el control de nematodos fitoparásitos (VI.1); su valor como mejoradores de suelo (VI.2); y se señalan una serie de medidas para el manejo agronómico de subproductos agrarios en biodesinfección (VI.3).

VI.1. Valoración de subproductos de la industria vitivinícola en el manejo de nematodos fitoparásitos

Arias *et al.* (1986, 1997a,b) y Brown *et al.* (1993, 1995) revisan los nematodos fitoparásitos que causan problemas en la vid, señalando que la especie que puede causar mayores problemas es *X. index* Thorne *et Allen*, 1950, puesto que transmite el “*fanleaf nepovirus*” (GFLV), seguido por otras especies de los géneros *Meloidogyne*, *Xiphinema*, *Pratylenchus* y *Tylenchulus semipenetrans*; menor incidencia tienen especies de los géneros *Criconemoides s.l.*, *Helicotylenchus*, *Longidorus*, *Paralongidorus*, *Paratrichodorus*, *Paratylenchus* y *Trichodorus*.

Como alternativas de manejo deben destacarse en primer lugar las medidas fitosanitarias, sobre todo el empleo de material certificado libre de virus y la limpieza de aperos, que son eficaces especialmente en el caso de los nematodos vectores de virus, así como las prácticas culturales, el barbecho o las enmiendas orgánicas (Rüdel 1988), que permiten el manejo agronómico de las poblaciones de nematodos al eliminar las raíces vivas del suelo que pueden actuar como reserva de *X. index* y del GFLV. También se vienen utilizando plantas resistentes, agentes de control biológico y métodos físicos como la solarización o la aplicación de vapor de agua, especialmente para la desinfección de sustratos y la termoterapia para el control de GFLV. Pero la utilización de productos fitosanitarios es el método más utilizado y, hasta ahora, la única alternativa cuando otros métodos de control no se pueden aplicar y tampoco son eficaces las técnicas agronómicas (Boubals y Dalmasso 1968, Raski y Krusberg 1984). Los productos fitosanitarios que se han venido utilizando con más frecuencia son fumigantes, como 1,3-dicloropropeno (1,3-D) con cloropicrina (PIC), dazomet, metam sodio o bromuro de metilo (BM), así como nematicidas no volátiles del grupo de los organofosforados, como

etoprofos y fenamifos o carbamatos como aldicarb y oxamilo, se debe señalar que en los últimos años se ha generalizado el uso como fumigante de suelos del 1,3 D + PIC (Cebolla *et al.* 2005). El BM se viene utilizando en la desinfección de los viñedos desde hace más de 30 años en EE UU (Van Gundy *et al.* 1972, Raski y Goheen 1988), existiendo también referencias de su utilización en Francia, Chile, Italia y Sudáfrica. No se tiene conocimiento de que se haya empleado en España para este cultivo, debido a que las poblaciones de nematodos se pueden controlar con las condiciones ambientales especiales y con las técnicas de cultivo; pero **con la introducción de riego en los viñedos, los problemas de virus y nematodos están aumentando, siendo necesario la búsqueda de alternativas de control que sean económicamente rentables y ambientalmente compatibles** (Arias *et al.* 1997a,b, Arias 1998), por otro lado la importación de BM está prohibida desde 01-01-2005, salvo para los usos críticos en flor cortada de Cataluña y Andalucía (Cádiz y Sevilla), y viveros de fresa en Castilla y León (Bello *et al.* 2004, MBTOC 2007).

Gomez Soriano *et al.* (2006) observan que *X. index* no aparece en suelo franco sometido a barbecho de 10 años, y tampoco en los almendros, higuera y nísperos de un viñedo arrancado, por lo que sería de interés realizar un estudio epidemiológico para determinar la influencia de las características edáficas en las poblaciones de *X. index*. En este sentido señalar que Navas y Arias (1986) y Arias *et al.* (1997b) encuentran *X. index* con mayor frecuencia en suelos franco-arenoso y franco-arcillo-arenosos, con las poblaciones más altas en suelos con porcentajes de arena entre 59-70%. Conh y Mordechani (1970), Prota (1970) y Weischer (1974) señalan que la variación de las poblaciones es más patente en suelos arenosos que en los arcillosos, **siendo más abundantes en suelos con pH entre 6,5-7,5, disminuyendo a pH inferior a 6,5**, mientras que Navas y Arias (1986) y Arias *et al.* (1997a,b) lo encuentran en suelo con márgenes de pH comprendidos entre 7,4-8,2, con contenidos en materia orgánica entre de 2,5-5,5%, **soportando contenidos altos de carbonatos (hasta un 54%), aunque disminuyen las poblaciones según aumenta el contenido en carbonatos.**

En relación con el clima mediterráneo continental, hay que tener en cuenta que los inviernos en las zonas vitivinícolas de la Península son extremadamente fríos, llegando a alcanzar temperaturas bajo cero, pasando directamente del

invierno al verano, que es seco con temperaturas que llegan a los 35-40 °C. **Si se tienen en cuenta las observaciones de Weischer (1975) de que *X. index* muestra muy baja actividad por debajo de los 16 °C, estando su temperatura óptima entre los 16–28 °C muy por encima de las mínimas alcanzadas en la Península, por lo que en estas condiciones de continentalidad solo se desarrolla un ciclo (Arias et al. 1997b). Esto nos indica el interés que puede tener el barbecho en la reducción de los problemas debidos a estos patógenos, que de acuerdo con Dalmasso (1970) en Francia ha de ser de seis a siete años, pudiéndose reducir a tres años si se aplican fumigantes, Raski et al. (1965) proponen cinco años en California y Arias et al. (1997b) consideran que debe comprobarse la ausencia de individuos portadores de virus de *X. index*, puesto que el nematodo cuando está en bajas poblaciones no es altamente patógeno para la vid.**

Díez Rojo (2006) señala en relación con las otras especies del género *Xiphinema*, que solo encuentra *X. italiae* y *X. pachtaicum*, aunque en general su presencia es muy baja. *X. italiae* no apareció en los suelos arenosos biodesinfectados. **Sería de gran interés demostrar la transmisión del “fanleaf” por este nematodo, puesto que aunque Conh et al. (1970) han comprobado experimentalmente que es transmisor, Martelli (1978) señala que su transmisión no ocurre en condiciones de campo.** La mayor frecuencia de *X. italiae* aparece en los suelos solarizados entre 20-40 cm, donde llega a alcanzar poblaciones de seis individuos por 200 cm³ de suelo. *X. pachtaicum* es la especie más frecuente, aunque solo aparecieron dos individuos en una muestra en los suelos arenosos biodesinfectados, esta especie es frecuente en los barbechos entre 20-40 cm y presenta su mayor abundancia en los suelos solarizados entre 40-60 cm, donde llegan a encontrarse poblaciones de 16 indiv. por 200 cm³ de suelo. Arinç et al. (1987) y Arias et al. (1997b) demuestran que *X. pachtaicum* no es transmisor del GFLV, aunque puede tener un gran valor como bioindicador para determinar la eficacia de la biodesinfección y el barbecho, puesto que se encuentra en viñedos, almendros, higueras y otros frutales próximos llegando a alcanzar poblaciones máximas de 480 indiv., lo que también ocurre con *X. index* en viñedo con poblaciones que llegan a los 154 indiv., *X. italiae* con 11 indiv. y *X. pachtaicum* con 144 indiv. 200 cm³ de suelo.

Gómez Soriano *et al.* (2006), con relación a otros nematodos fitoparásitos solo destaca la presencia de *Macroposthonia xenoplax* con poblaciones muy bajas, que no llegan a superar los 16 individuos apareciendo en su mayoría muertos en los suelos biodesinfectados, siendo su frecuencia también baja en los viñedos próximos, que solo aparece en una muestra (12 indiv. 100 cm³ suelo) con lo cual se considera que esta especie no llega a plantear problemas en los viñedos estudiados. Aparecen con una frecuencia muy baja los géneros *Paratylenchus* y *Scutylenchus* que pueden pertenecer a la vegetación natural de la zona anterior a la implantación del viñedo, además se encontró *Boleodorus* en el barbecho, debiéndose destacar la presencia de nematodos del género *Pratylenchus* en la parcela, tanto en los suelos biodesinfectados, en los que aparece solo en una muestra entre 40-60 cm (12 indiv.) como en el barbecho en los que aparece en dos muestras entre 20-40 cm (ocho y cuatro indiv. 200 cm³ suelo) (Bello *et al.* 2004, Díez Rojo 2006).

Entre los nematodos libres, destaca la baja presencia en los suelos biodesinfectados de doriláimidos con medias que no superan los 15 individuos que es similar a los 13 indiv. que aparecen en el viñedo próximo, presentando los valores menores los suelos biodesinfectados (media cuatro individuos) y los horizontes superiores de los suelos solarizados (media seis individuos); los doriláimidos son muy abundantes en los suelos francos biodesinfectados, tanto en la profundidad entre 0-20 cm, con una media de 29 indiv., como de 20-40 cm (13 indiv.) y entre 40-60 cm (siete indiv. por 200 cm³ suelo). **En relación con los rabdítidos, las mayores poblaciones están en los suelos biodesinfectados, incrementándose con la profundidad que alcanza una media de 115 indiv. entre 40-60 cm**, mientras que en el barbecho y en el viñedo vecino, no sobrepasan los 35 indiv. y en el solarizado el valor medio máximo es de 10 indiv. Los rabdítidos alcanzan los niveles más altos a la profundidad entre 20-40 cm (media 1.259 indiv.), seguida por la profundidad entre 0-20 cm (media 584 indiv. por 200 cm³ suelo).

Se debe destacar también la presencia de enquitreidos, pequeños oligoquetos que tienen gran interés en la dinámica de la materia orgánica, especialmente en los suelos biodesinfectados y en los barbechos, mientras que en los solarizados solo aparecen una vez entre 20-40 cm (cuatro indiv. 200 cm³ suelo), los enquitreidos aparecen especialmente en la

profundidad entre 20-40 cm. Por último señalar la presencia de nematodos del grupo de los monónquidos en dos muestras entre 20-60 cm.

Díez Rojo (2002) y Díez Rojo *et al.* (2006) estudian la eficacia de la biodesinfección en el manejo de *M. incognita* y *X. index*, que son los nematodos más importantes que afectan al viñedo, mediante la utilización de estiércol de oveja y abonos verdes, se observa que **los biodesinfectantes ensayados son eficaces en el manejo de nematodos de suelos de viñedo, incluso a dosis de 25 t ha⁻¹, aunque la eficacia aumenta cuando dichos biodesinfectantes se combinan en una proporción 3:1 con gallinaza. Por otro lado, se observa que la biodesinfección favorece el desarrollo de nematodos saprófagos y enquitreidos, aumenta la fertilidad de los suelos, especialmente en K⁺ y el contenido de nutrientes en las plantas, por lo cual se deben de reajustar los programas de fertilización (Díez Rojo 2006).**

Los resultados del trabajo de Díez Rojo (2006) nos permiten confirmar que *X. index* está presente en las calles no biodesinfectadas, con una frecuencia y abundancia mayor en las zonas donde se acumula más humedad mientras que en las zonas con menor humedad, por tener más insolación o con mayor pendiente, prácticamente no aparece el nematodo, **poniendo de manifiesto el gran interés que tiene el establecer el período óptimo de duración del barbecho para el manejo del nematodo. Los experimentos confirman que la biodesinfección en bandas resultó eficaz en los primeros 60 cm de profundidad con solo 14 muestras positivas (14,6%). En general las muestras presentan uno o dos individuos por 200 cm³ de suelo y están distribuidos en las áreas donde la aplicación de estiércol no fue correcta, aunque también puede existir contaminación lateral desde las calles en barbecho, por lo que se recomienda que la biodesinfección se debe hacer de modo homogéneo y en toda la parcela para evitar que queden focos del nematodo o que existan contaminaciones laterales.** Se confirma que en la parte inferior de la parcela experimental, tanto en el suelo biodesinfectado como en el barbecho, la presencia de *X. index* es muy baja, habiendo sido efectivo su manejo, tanto con biodesinfección como por el efecto del barbecho.

Los resultados indican que la presencia de *X. index* a lo largo del perfil es baja en los suelos biodesinfectados, apareciendo en general entre 0-50 cm de profundidad y con uno o dos individuos por 200 cm³ de suelo,

presentando poca frecuencia en profundidad. Solo cuatro muestras tienen poblaciones superiores a dos individuos por 200 cm³ de suelo, que corresponden a cuatro perfiles de los 24 estudiados (16,7%), uno en el barbecho y en tres de los suelos biodesinfectados de la parte superior de la parcela, que están en la zona con mayor humedad. Ello se puede deber a una posible contaminación lateral desde las calles que no han sido biodesinfectadas, por ello es recomendable determinar la duración del barbecho. Además en los suelos con alto contenido en carbonato cálcico se observa una disminución de *X. index*, *X. pachtaicum* y doriláimidos.

La biodesinfección con 50 t. ha⁻¹ de estiércol de cabra cuando se aplica uniformemente a toda la superficie de la parcela ha sido eficaz. Por otro lado cuando la replantación se realiza después de un año y medio, en suelo con alto contenido en humedad, existe un riesgo alto de reinfección, por la presencia de raíces vivas y la dificultad que tiene la eliminación total de *X. index* en el suelo, por lo cual se recomienda que la duración del barbecho debe ser de al menos tres años, aunque no conviene olvidar que la presencia del virus puede deberse también a un mal control sanitario del material vegetal.

Estos resultados ponen de manifiesto la importancia que tiene el barbecho en el manejo de *X. index* y *M. xenoplax*, así como la necesidad de aplicar la biodesinfección en el momento inmediatamente posterior al arranque del viñedo para evitar que los nematodos se desplacen en profundidad. Se debe señalar que por lo general aparecen muestras positivas en las zonas donde la materia orgánica es escasa, o puede ocurrir también que los juveniles cuando están mudando puedan presentar resistencia al efecto biodesinfectante de la materia orgánica, pero conviene recordar que éstos pierden con la muda el virus. En las muestras de almendro, lo mismo que ocurre en los olivos no apareció *X. index*, por lo que se considera que no hay riesgos de reinfestación al resto de la parcela cuando se asocian almendros y olivos con la vid.

La biodesinfección, tanto con estiércol de oveja como con abono verde de rábano, resultó eficaz en el manejo de *X. index*, *X. pachtaicum*, *M. sphaerocephalus* y *M. xenoplax*, cuando se compara con los testigos, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas. Se debe indicar que

en el caso de *X. index* los diferentes tratamientos presentan al menos alguna muestra con nematodos vivos, lo que indica la necesidad de realizar una correcta homogenización del biodesinfectante, incrementar la temperatura o prolongar el período de biodesinfección para lograr un control más eficaz; también se **observó que durante la última muda las hembras jóvenes pueden ser resistentes a la biodesinfección. El número de individuos vivos fué mayor cuando las muestras se extrajeron por el método de Baermann**, presentando en algunos tratamientos hasta una media de cinco individuos vivos por 200 cm³ de suelo. Sin embargo el método de extracción por centrifugación en azúcar fue más eficaz para los nematodos de baja movilidad como los del género *Macrophostonia*, así como para los enquitréidos y nematodos de pequeño tamaño como los rabdítidos.

En relación con los nematodos saprófagos del grupo de los rabdítidos, el número de individuos es mayor en los tratamientos con estiércol de oveja, ya que éstos nematodos son ovovivíparos y están adaptados a los cambios que se producen en los procesos de descomposición. Las poblaciones de saprófagos disminuyen por lo general al reducirse la dosis de biodesinfectante de origen animal y también con los abonos verde de rábano, aunque la disminución es menos acusada cuando se utiliza abono verde con gallinaza en el suelo arcillo-arenoso. Los doriláimidos disminuyen en la mayoría de los tratamientos, mientras que la población de enquitréidos aumenta con la biodesinfección, estas diferencias resultaron ser estadísticamente significativas.

Se ha ensayado también el efecto biodesinfectante del estiércol de oveja con gallinaza y el abono verde de brasicas en un suelo arenoso, con una población de *M. incognita* de 56 J2 por 100 cm³ de suelo. En el tratamiento con estiércol de oveja, se observó una mortandad del 100% de *M. incognita*, un incremento cuatro veces mayor de la población de rabdítidos y una disminución de las poblaciones de doriláimidos y enquitréidos. Si se compara este tratamiento con el de un suelo biodesinfectado con abono verde de brasicas, los resultados son similares, con la única diferencia de que la población de enquitréidos se incrementó cinco veces.

De todo lo anterior se desprende que la biodesinfección con estiércol de oveja o abonos verdes resultó eficaz en el manejo de las poblaciones de nematodos

fitoparásitos, incrementando los organismos saprófagos. El índice de nodulación por *M. incognita* fue de cero en las plantas de tomate cv Marmande cultivados en los suelos biodesinfectados con los tratamientos anteriores, mientras que en el testigo el valor medio fue de 1,5. El promedio de los valores para la altura y el peso total de la planta de tomate fue mayor en los suelos biodesinfectados.

En el experimento diseñado para determinar la eficacia de la vinaza de remolacha, se determinaba la presencia de individuos adultos o juveniles en sus diferentes estadios, comprobándose que, la proporción de individuos juveniles vivos/hembras vivas era mayor que en la columna testigo, lo cual **pone de manifiesto que los individuos juveniles son más resistentes al tratamiento, posiblemente porque los supervivientes estaban mudando durante la duración de tratamiento, lo cual dificulta su control, aunque hay que recordar que los individuos juveniles pierden el virus y por lo tanto su poder infectivo con la muda**, puesto que los nematodos retienen el virus en estructuras cuticulares que son reemplazadas por otras nuevas en el proceso de muda. La columna testigo se extrajo 37 días después de haber iniciado el experimento, encontrando entre 0-90 cm poblaciones del nematodo *X. index* que alcanzan los 594 indiv. 200 cm³ suelo, apareciendo también 23 indiv. en la grava y 17 indiv. 200 cm³ en el lixiviado suelo. En ningún caso aparecieron individuos muertos y la presencia de cadáveres en los tamices de extracción fue prácticamente testimonial. **Se puede concluir que la utilización de vinazas de remolacha es eficaz para el control de *X. index* tanto en los tratamientos superficiales como en profundidad en los suelos de viñedo, aunque no alcanzara el 100%**, siendo la eficacia del tratamiento mayor con el transcurso de tiempo (siendo más eficaz al mes de haber aplicado la vinaza), por lo que se confirma que el efecto no es inmediato, sino que se incrementa con el período de exposición de los nematodos al producto, por lo que hay que evitar hacer labores que puedan eliminar el producto después de la aplicación.

Las aplicaciones de vinaza de remolacha al 2% en campo tanto solas como combinadas con estiércol y cuando se aplican con plástico resultan altamente eficaces en el control de *X. index*, aunque pueden existir riesgos por la rotura del plástico. Una eficacia similar se observó en la aplicación de vinazas sin plástico más materia orgánica, no resultando eficaz después de

cuatro meses cuando se aplica sola sin plástico, por lo que se deben de mejorar las técnicas de aplicación (Díez Rojo 2006).

La biodesinfección constituye una alternativa no química para el manejo de organismos patógenos de los vegetales de origen edáfico, que se fundamenta en el efecto biocida de las sustancias resultantes de la descomposición de la materia orgánica. Se ha comprobado, que por lo general, cualquier resto orgánico puede actuar como biodesinfectante, aunque su eficacia depende de la dosis y del método de aplicación. Existen buenos ejemplos de la eficiencia de la biodesinfección en el manejo de hongos, nematodos y plantas adventicias, aunque mayoritariamente se han aplicado en cultivos de hortalizas y fundamentalmente para el manejo de nematodos formadores de nódulos del género *Meloidogyne* (Bello *et al.* 2000a,b, 2001, 2003, 2004). Últimamente y debido a la obligatoriedad, por parte de la UE, de la desinfección del suelo para la replantación del viñedo se han realizado varias experiencias de biodesinfección con materia orgánica sólida, estiércoles, en la localidad de Jumilla (Murcia) en viñedos ecológicos, en los cuales está prohibido el uso de fumigantes químicos, que son los que se recomiendan utilizar por el Reglamento (CE) 1227/2000 (Gómez Soriano *et al.* 2006, Díez Rojo 2006). En todos los trabajos sobre biodesinfección siempre se ha utilizado fundamentalmente subproductos agrarios sólidos, por lo que no existe experiencia del empleo en biodesinfección de subproductos líquidos, que en la práctica son más fáciles de aplicar.

El uso de subproductos líquidos de la industria vitivinícola empleados en la biodesinfección, podría tener grandes posibilidades en las zonas productoras de alcohol, que en la mayoría de los casos coinciden con las áreas de cultivo de vid en España, pudiéndose utilizar en biodesinfección con bajos costes. También se pueden combinar las vinazas de la industria vitivinícola con otros materiales biodesinfectantes líquidos como el alpechín, un subproducto de la industria oleícola, así como con subproductos de la industria remolachera y láctea cuya acumulación puede producir, paradójicamente, problemas graves de contaminación ambiental (Bello *et al.* 2003). Se ha estudiado el efecto biodesinfectante de las vinazas de alcoholera tanto en estudios *in vitro* (V.1), como en suelos en condiciones controladas de laboratorio (V.2) y en campo (V.3), determinando su efecto sobre los nematodos fitoparásitos pertenecientes a *X. index*, un transmisor de “*fanleaf*” en la vid y sobre los nematodos

formadores de nódulos de las especies *M. arenaria* y *M. incognita*, parásitos de la vid y de cultivos hortícolas.

En los experimentos *in vitro* se logra controlar los individuos de *X. index* mediante la aplicación de concentraciones de vinazas al 5% transcurridos 45 minutos después de haber iniciado el experimento e incluso a la concentración del 2% después de 60 minutos. También se ha confirmado el efecto nematicida incluso con dosis más bajas, **a las concentraciones del 2% los individuos mueren a los 55 minutos** y no se recuperan después de tres horas de exposición (Fig.18), este fenómeno también ocurre con las concentraciones de vinaza al 1%, mientras que en las concentraciones del 0,2%, las vinazas solo tienen efecto letal a partir de las tres horas de exposición. Los testigos presentan siempre todos los individuos vivos. En el caso de los nematodos del **género *Meloidogyne* podemos concluir que con concentraciones de vinazas diluidas al 5%, el control de nematodos se alcanza pasadas las tres horas de exposición** aunque cuando se utilizan concentraciones más bajas de 1 y 0,2%, el tiempo para el control se prolonga notablemente, e incluso no es efectivo (Fig.19).

Se concluye que en los tratamientos con 5 ml de las lías, piquetas y vinaza, tres subproductos de la industria vitivinícola, en 500 g de suelo se produce un control total sobre los juveniles de *M. incognita* con relación al testigo, disminuyendo el número de doriláimidos, monónquidos, rabdítidos y enquitreidos, organismos del suelo que se **incrementan significativamente en los tratamientos a las dosis de 5 y 2,5 g con vinaza sólida.** Pero cuando se cultivan posteriormente tomates cv Marmande, sensible a *Meloidogyne* sobre suelos biodesinfectados, aparecen en algunos casos en las raíces índices de nodulación altos, lo que **nos confirma que la acción de las vinazas es nematostática y los nematodos se recuperan después de los tratamientos.**

En los muestreos realizados en los viñedos donde se aplicó vinaza de vino reiteradamente, no aparece *X. index* en las calles tratadas, apareciendo únicamente en una muestra recogida alrededor del sistema radicular de la cepa más alejada del inicio del ramal del riego, apareciendo también en todas las muestras alrededor de las cepas *M. arenaria*, produciéndose por otro lado un incremento de doriláimidos, rabdítidos y enquitreidos en la zona donde se

aplicó la vinaza (Tabla 26). Por el contrario, se encuentran poblaciones altas de *X. index* en un viñedo convencional próximo, especialmente cuando las muestras se extraen por el método de Baermann (Tabla 24). Solo aparecieron *Criconemoides* en una muestra del viñedo testigo.

En experimentos de campo realizados durante el verano en El Perelló (Sueca, Valencia) no se observan diferencias significativas entre los tratamientos con vinaza y la solarización en el control del nematodo *M. incognita* (Tabla 19). Después de los tratamientos se sembró repollo chino (*Brassica juncea*), puesto que la cooperativa de El Perelló ha introducido cultivos de brasicas de ciclo corto como alternativa en la rotación durante el invierno. Tras dos meses de cultivo (septiembre-octubre) se determinaron los índices de nodulación (Fig. 20), observando que estos son similares tanto en los tratamientos con vinaza como en el testigo. Sin embargo, los mayores índices se encontraron en la zona testigo, donde se había realizado solarización. No se observan diferencias significativas, salvo en el incremento del número de rhabditidos y enquitréidos en los suelos recogidos entre 0-20 cm tratados con vinaza, los cuales presentan un mayor número de individuos juveniles de *M. incognita* en el testigo solarizado, esto también es similar en las muestras recogidas entre 20-40 cm de profundidad (Tabla 22).

En un segundo experimento realizado al final del verano solo resultaron eficaces a la dosis de 2 l/m², plantándose a continuación apio, examinándose dos meses después las raíces de 32 plantas por tratamiento, y se encontró que el tratamiento con 2 l/m² de vinaza presenta un índice de nodulación medio de 4,9 frente a un índice de 5,2 en el tratamiento con 1 l/m² de vinaza y un índice de 6,5 en el testigo 1, presentando el testigo 2 un índice de 4,3 puesto que las poblaciones originales eran más bajas que el resto de las subparcelas. (Fig. 21, Anexo: Fig. 4). Esto nos confirma que el efecto de las vinazas es nematostático, pudiéndose recuperar los nematodos después del tratamiento.

VI.2. Evaluación de subproductos de la industria vitivinícola como mejoradores de suelo

Las enmiendas orgánicas tienen en agricultura como función principal generar humus y aportar en mayor o menor proporción elementos nutritivos (Urbano 1992, 2002a,b, 2008, Fuentes Yagüe 1999). Se pretende analizar en este

apartado los aspectos relacionados con la fertilización cuando se utilizan los subproductos de la industria vitivinícola como biodesinfectantes para el manejo de nematodos patógenos de plantas.

Díez Rojo (2002, 2006) encuentra que la biodesinfección con enmiendas orgánicas de origen animal como el estiércol de oveja más gallinaza producen en el suelo un incremento de la materia orgánica y del N_{total} , así como del resto de variables químicas analizadas respecto al testigo, con excepción del pH, Ca^{2+} y en algunos casos Mg^{2+} . Por otro lado, la utilización de abono verde de brásica como biodesinfectante presenta una tendencia similar, aunque en este caso disminuyen el pH y el contenido de materia orgánica. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por **Díaz Viruliche (2000)**, **quien observa que cuando se utilizan biodesinfectantes de origen animal aumentan por lo general todas las variables químicas con la excepción del pH y Ca^{2+} , mientras que cuando se utilizan brásicas como biodesinfectantes pueden disminuir los contenidos de materia orgánica en los suelos.**

Urbano (1992, 2002a) señala que la finalidad principal del enterramiento de abonos verdes o siderales es aportar materia orgánica al suelo, aunque su aplicación solo eleva excepcionalmente el nivel de humus del suelo debido a la gran labilidad de esta materia orgánica, pero por el contrario contribuye a mantener la actividad biológica del suelo mediante la aparición de un humus joven, de evolución rápida, que es generalmente rico en nitrógeno. Cuando se cultivan plantas de tomate cv Marmande en suelos biodesinfectados con los tratamientos anteriores, el contenido de los cationes Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ y K^+ , así como el N_{total} , Cu, Mn, Fe y Zn fue mayor o similar al testigo, en las plantas de tomate cultivadas en suelos biodesinfectados, únicamente el P_2O_5 fue menor. En general se observa un incremento de N_{total} , MO, C, K^+ y Na^+ , así como de P_2O_5 y de Mg^{2+} en los tratamientos con abono verde de rábano. Urbano (1998) señala en relación con el fósforo que los abonos verdes no hacen más que devolver al suelo los elementos que previamente la planta ha extraído. Por otro lado, los niveles de P_2O_5 aumentan ligeramente debido a que los abonos verdes utilizados no se habían cultivado en los suelos biodesinfectados, sino que se incorporaron desde el exterior. Por otro lado, el pH y el Ca^{2+} también disminuyen en los suelos biodesinfectado con estos materiales.

En los tratamientos con vinaza de remolacha realizados sobre suelo en columnas experimentales se observó que la materia orgánica, N_{total} , K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Fe , Mn^{2+} y Zn aumentan con respecto al testigo en todas las profundidades estudiadas, mientras que el pH, P_2O_5 , Ca^{2+} disminuyen. Esto también ocurre en campo, salvo que con el tiempo disminuye la materia orgánica, por tratarse de materia orgánica que por ser de naturaleza muy lábil se descompone rápidamente e incluso ayuda a mineralizar a la existente en el suelo, y como en el caso de los abonos verdes puede contribuir a mantener la actividad biológica del suelo. Además se ha observado que cuando se aplican vinazas de remolacha el contenido en materia orgánica aumenta en los tratamientos que se cubren con plástico. Urbano (2002b) señala que **la vinazas por su naturaleza y composición pueden ser consideradas como enmiendas orgánicas o como fertilizantes nitrogenados y potásicos de origen orgánico debido a que al aplicarlas al suelo la materia orgánica no aumenta significativamente puesto que la materia orgánica que poseen, aproximadamente el 40% de su composición, es el extracto húmico (ácidos húmicos y fúlvicos) con un alto nivel de humificación por lo que se descomponen rápidamente, síntoma claro del aumento de nitrógeno en el suelo. Debido a este último caso puede considerarse como un fertilizante orgánico, porque su origen es orgánico.**

Con respecto al pH, dado que el de la vinaza es de naturaleza ácida, los valores obtenidos son similares siempre a los de los testigos, lo cual demuestra la capacidad de los suelos a neutralizar la acidez, sobre todo teniendo en cuenta los valores altos de $CaCO_3$, que puede actuar como tampón. Urbano (2002b) señala que al tratar suelos con dosis altas de vinaza de remolacha, llegando incluso hasta las 60 t/ha, no se produce acidificación en ninguno de los casos, e incluso el pH se incrementa, posiblemente debido a la carga de sales sódicas, potásicas y magnésicas que poseen. Al analizar los lixiviados que se producen en los tratamientos realizados en las columnas experimentales se observa que no existe contaminación por metales pesados y que los niveles de NO_2^- , NO_3^- y SO_4^{2-} varían según el período de duración del experimento.

Martínez et al. (2005a,b) observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los lixiviados que se producen cuando se tratan suelos arenosos, francos o arcillosos con vinaza de

remolacha, urea y nitrato amónico, siendo este último el que mayores pérdidas produce de NO_3^- , mientras que las vinazas de remolacha son las que menos pérdidas producen, señalando además en relación con las vinazas que las pérdidas de NO_3^- son mayores cuando las dosis utilizadas aumentan.

Todos los biodesinfectantes utilizados en el trabajo incrementan los contenidos de K^+ , siendo mayor siempre que se utilicen vinazas solas o combinadas, puesto que el material de partida es rico en este elemento nutritivo. El mismo comportamiento se espera obtener con respecto al K^+ para el resto de vinazas de la industria alcohólica como pueden ser las de caña, cerveza, tequila y vino, pues tienen altos contenidos en K^+ (Beltrame *et al.* 1999, Canellas *et al.* 2003, Leal *et al.* 2003, Castellanos 2004).

Se ha señalado por diferentes autores que cuando se aplican enmiendas orgánicas a los suelos los niveles de Ca^{2+} disminuyen y se incrementan los de Na^+ , puesto que se produce una sustitución de un catión por el otro. En este sentido conviene indicar que Castellanos (2004) encuentra que el Na^+ aumenta cuando se hace fertirrigación en el cultivo de cebada con vinazas de la industria vitivinícola que tienen altos contenidos en sales, a la vez que disminuye el Ca^{2+} , planteando además que se pueden aplicar las vinazas en fertirrigación, pero se debe tener en cuenta que el uso excesivo de estos subproductos puede causar problemas de salinización del suelo. Díaz Viruliche (2000) señala también que la aplicación de enmiendas orgánicas tanto de origen animal como vegetal aumenta los contenidos en Na^+ y disminuyen los de Ca^{2+} .

Por último, indicar que se debe analizar en profundidad los aspectos relacionados con la salinidad y sodicidad de los suelos, puesto que como indica Castellanos (2004) es necesario controlar los niveles de salinización y contenidos de Na^+ en el complejo de cambio para evitar riesgos de salinización de los suelos por el uso reiterativo de estos subproductos. Por otro lado, se recomienda estudiar también las propiedades físicas del suelo, puesto que Castellanos (2004) observó que **cuando se aplican vinazas de la industria vitivinícola al suelo se producen cambios en su estructura determinados por los porcentajes de agregados estables.** En este sentido, se debe de señalar que García Ocampo (1997) en un estudio sobre el efecto en suelos sódicos en Colombia de la aplicación de vinazas de caña de azúcar con una

CE de 11 dS m^{-1} y elevados contenidos de calcio, potasio, magnesio y sulfatos mostraron mejoras en las propiedades hidráulicas, físicas y en el complejo de cambio, siendo efectivas estas aplicaciones para la recuperación de estos suelos afectados por sodicidad.

Se determina el efecto de los subproductos de la industria vitivinícola sobre la fertilidad del suelo, determinando al mismo tiempo su acción fitotóxica mediante índice de madurez (V.4) **Se puede observar que los tratamientos con vinaza de vino, aunque no presentan diferencias estadísticamente significativas, disminuye los niveles de materia orgánica**, lo que nos puede indicar que este tipo de biodesinfectantes ayudan a su mineralización, esto puede tener gran interés en suelos con elevados contenidos en materia orgánica (Tabla 9). Por ello convendría estudiar en un futuro si la incorporación de vinaza facilita la descomposición de aquellas materias orgánicas que tienen altos contenidos en fibras y sobre todo en lignina. **Además se puede observar con claridad como aumenta el pH y disminuye la conductividad eléctrica según se incrementa la dosis de vinaza.**

Con respecto a los elementos nutritivos principales (NPK) no se observan diferencias estadísticamente significativas, debido principalmente a que no se introducen en el suelo grandes cantidades, puesto que el valor como fertilizante de las vinazas de vino es escaso en estos nutrientes. Con respecto a los demás macronutrientes, tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas. Por el contrario **si existen diferencias en los micronutrientes, sobre todo en Fe y Cu, que aumentan según se incrementa la dosis de tratamiento. No se observa que estos valores puedan ser perjudiciales para la planta (Fig. 23), pero este hecho debe de tenerse en cuenta si se van a aplicar estos subproductos de forma reiterada.**

En un suelo arcilloso básico del Campo de Cartagena (Murcia), después de haber aplicado las vinazas de vino en condiciones controladas de laboratorio, no se observan diferencias estadísticamente significativas con respecto a la materia orgánica (Tabla 12), esto se puede deber a que el contenido de materia orgánica es menor que en el caso de los suelos del experimento en Villa del Prado (Madrid). **En relación con los niveles de elementos principales en este caso se observan diferencias estadísticamente significativas en el N_{total} y en P_{205} , que disminuyen.** Los valores de N_{total} disminuyen según se

aumenta la dosis, lo cual nos hace suponer de nuevo que las vinazas de vino ayudan a mineralizar los compuestos orgánicos. El valor del P_2O_5 parece lógico que disminuya, puesto que en los procesos de biodesinfección lo que se pretende es que los gases resultantes de la descomposición de la materia orgánica sean los que actúen, para ello es necesario que se reproduzcan los microorganismos del suelo que necesitan y consumen fósforo. En los demás macroelementos, del mismo modo que ocurre en Villa del Prado (Madrid), se observan algunas diferencias estadísticamente significativas, que son bajas. **Estas diferencias se deben a que este tipo de enmiendas aportan aunque sea en pequeñas cantidades, microelementos que pueden llegar a ser de interés**, cuando sus niveles en suelo son escasos. Lo mismo se puede observar en el caso de Villa del Prado (Madrid) el incremento de metales pesados en suelo no presenta valores perjudiciales. Además hay que destacar que en este caso **disminuyen los niveles de Zn**, que dependen del aumento del pH o que se formen complejos al reaccionar el Zn con las vinazas.

Los resultados de fertilidad química en el experimento realizados en un suelo arenoso básico de El Perelló (Sueca, Valencia), en el que se utilizan la misma dosis (5 ml) pero diferentes subproductos de la industria alcoholera, se encuentra que **las vinazas de lías son las únicas que presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo en la mayoría de parámetros estudiados y en especial de N_{total} , K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Mn^{2+}** . Como se ha comentado en los experimentos anteriores, se puede observar que la vinaza de vino disminuye la materia orgánica, aunque no se observan diferencias estadísticamente significativas, sin embargo las vinazas de lías aumentan los contenidos de materia orgánica de suelo, resultado que es bastante coherente debido a su composición, que es mucho mayor en materia orgánica con respecto a los demás subproductos.

En referencia al pH, todos los subproductos utilizados lo incrementan. **La conductividad eléctrica es muy similar en todos los tratamientos, observándose la misma tendencia de disminución que ocurre en los demás experimentos cuando se utilizan vinazas de vino.**

Con respecto a los elementos nutritivos principales cabe destacar, que al igual que ocurre en otros experimentos **disminuye el contenido en P_2O_5 con todos los subproductos utilizados, debido principalmente al aumento de la**

actividad biológica. De los demás macronutrientes se observa que las vinazas de vino y en cierta medida las de piquetas disminuyen los contenidos en Ca^{2+} y a su vez en CO_3^{2-} y CaCO_3 con respecto al testigo. **En cuanto a los micronutrientes, se observan principalmente diferencias estadísticamente significativas con respecto al testigo en los niveles de Fe, lo cual nos indica que este tipo de enmiendas son aptas para la restitución en los suelos que tienen altos contenidos en calcio,** como puede ser el suelo en el que se ha realizado este experimento. Al igual que ocurre en otros experimentos aumenta el contenido en Zn, por lo que se deben tomar precauciones cuando este tipo de enmiendas vayan a realizarse frecuentemente.

Los resultados de fertilidad después de la biodesinfección en campo, se recogen en la Tabla 21. Se analizaron a dos profundidades, para determinar si el producto penetraba en profundidad o se quedaba en superficie. Se compararon los tratamientos con un testigo en el cual se realizó solarización, pero no se le aportó ningún tipo de fertilizante. De mismo modo que ocurre en los experimentos de **realizados en laboratorio en condiciones controladas, disminuyen la materia orgánica y la conductividad con respecto al testigo solarizado,** aunque en este caso no se observó ninguna diferencia en el pH. En los datos de N_{total} se observa una ligera tendencia a disminuir, según se aumenta la dosis, lo cual nos viene a confirmar que las vinazas ayudan a mineralizar los compuestos orgánicos.

En los tratamientos con vinazas, cuando se aplican de forma reiterada en un viñedo, se observó que se produce un incremento de la materia orgánica, conductividad eléctrica, N_{total} , P_2O_5 , K^+ , Mg^{2+} , Na^+ , Fe, Cu y Zn, disminuyendo el pH, Ca^{2+} y Mn^{2+} , encontrando que la acumulación de estos parámetros se produce en el inicio del ramal de goteo, siendo menores los valores según nos alejamos de él (Tablas 27, 28).

No se observan diferencias estadísticamente significativas, por lo que se considera que no hay ningún efecto negativo de las dosis de vinaza aplicadas al suelo sobre las plantas. Se debe indicar que todas las plantas del testigo murieron a los seis días, considerándose que puede ser debido a la presencia de los nematodos del género *Meloidogyne* existentes. Se consideró que el experimento era de interés para estudiar el efecto fertilizante de las vinazas de vino sobre las plantas (Tabla 10)

Cuando durante un mes se cultivan tomates cv Marmande, sensible a *Meloidogyne* en suelos de diferentes características que han sido sometidos a tratamientos con diferentes concentraciones de los subproductos industriales de la industria vitivinícola, no se observan diferencias estadísticamente significativas con el testigo, por lo que se considera que no hay ningún efecto negativo de las dosis de vinaza aplicadas al suelo sobre las plantas. Por el contrario se encuentra una reducción del índice de nodulación de *Meloidogyne* en todos los tratamientos con relación al testigo, especialmente en las vinazas sólidas (Tablas 10, 13, 15, 17, 18). Tampoco se observan diferencias significativas entre los tratamientos con vinaza y la solarización sobre los parámetros estudiados en la planta (Tabla 20).

Los resultados del test de fitotoxicidad sobre la germinación de semillas de *Lepidium sativum* L, muestran un ligero efecto depresivo en la aplicación de vinaza en la germinación radicular, que presenta muy escasa dependencia a la dosis de aplicación. Los valores de longitud media de radícula (totalmente independientes de la concentración) sugieren que no hay interacción entre las fracciones solubles de la vinaza y el metabolismo de la planta. El experimento se repitió con concentraciones al 10% v:v, y tampoco se observaron efectos en la germinación y el crecimiento de las plántulas, (Tabla 30, Fig. 23) (Anexo: Fig. 7).

Cuando se compara el contenido de nutrientes en la raíz de remolacha tratada con una testigo, se encuentra que en las tratadas disminuye el Ca^{2+} , Na^+ y el P, incrementándose el K^+ y Mg^{2+} . En apio cultivado en suelos donde se aplicó vinaza de vino se observa tanto en raíz como en hoja una disminución del % de N_{total} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} y Zn en los tratamientos de vinaza, incrementándose el K, Cu y Ni, mientras que el P disminuye en la raíz pero se incrementa en la hoja y el contenido en Pb es cero (Tabla 34).

En viñedos en regadío cultivados en espaldera de la zona de Socuéllamos (Ciudad Real) donde se viene aplicando reiteradamente vinaza de vino, se estudió el efecto de estas aplicaciones sobre la calidad del mosto, al compararlas con un viñedo convencional cultivado con las mismas técnicas agronómicas pero sin vinaza que actuó como testigo encontrándose (Tabla 36) que los contenidos de K^+ en la variedad Cencibel del testigo pueden considerarse normales para esta variedad, mientras que el K^+ en los mostos

procedentes de las viñas regadas con vinaza de vino son más elevados. Pero lo normal, es que la variedad Cencibel acumule K^+ y azúcares en la época del envero y maduración, siempre que esté en condiciones favorables de humedad y en la práctica no se debe considerar que el alto contenido de K^+ en el mosto dependa de la disponibilidad de agua que tiene la vid y no de los contenidos en suelo. Por ser la cantidad de riego muy similar tanto en las fincas convencionales como en las tratadas con vinaza, se puede considerar que el alto contenido en K^+ depende de la aplicación de vinaza, que permite que la variedad Cencibel lo acumule de modo normal. No se observan diferencias significativas en el contenido de azúcar teniendo en cuenta los valores de grados Baume pero ello depende del rendimiento de las cepas, información de la que no se dispuso (Díez Rojo 2006).

Es necesario señalar que la aplicación de enmiendas orgánicas como biodesinfectantes deben formar parte de una acción integrada en el manejo agronómico de los cultivos, con especial atención al diseño de los programas de fertilización, según sea el tipo de suelo, el cultivo y sobre todo la época de aplicación de los biodesinfectantes.

VI.3. Manejo agronómico de subproductos agrarios y biodesinfección

En relación con el objetivo sobre el manejo agronómico de subproductos agrarios y biodesinfección, se realiza un análisis de la Producción Integrada (PI) en el cultivo de la vid en España, que se regula a partir del Real Decreto 1201/2002 (BOE núm. 287, de 30 de noviembre de 2002), donde se hace referencia al hecho de que la modernización de la agricultura implica **la utilización de métodos y técnicas agrícolas más respetuosos con el medio ambiente y donde se obtengan alimentos más saludables. Las CCAA son las responsables de la aplicación de la normativa de PI en su comunidad desarrollando sus propios reglamentos**, que al mismo tiempo se integran con los programas horizontales de ayudas agroambientales a los agricultores y ganaderos, que contienen todas aquellas medidas de obligado cumplimiento para todas las CCAA, donde se introducen los factores que regulan la condicionalidad y modulación (Reglamento 1259/1999), entre los cuales podemos señalar algunos como: las Buenas Prácticas Agrarias (BPA), actualmente Buenas Condiciones Agrarias y Medioambientales (BCAM), y las

medidas agroambientales *sensu stricto* en las que el agricultor se compromete a realizar prácticas agrarias más respetuosas con el ambiente.

Para ello se crean las Agrupaciones de Tratamientos Integrados en Agricultura (ATRIA's) como instrumentos para impulsar el manejo integrado a nivel regional, que actualmente se denominan Agrupaciones de Producción Integrada en Agricultura (APRIAS). En consecuencia, **el presente Real Decreto, establece las bases técnicas para regular la producción integrada a nivel nacional, sin olvidar las peculiaridades de cada CCAA.** En el caso concreto del cultivo de la vid, esta normativa se diferencia por CCAA mediante las **Normas Técnicas Específicas de Producción Integrada en viña** que, hasta el día de hoy, han entrado en vigor en las CCAA de Andalucía (año 2005), Canarias (2005), Castilla y León (2003), Cataluña (2005), Galicia (2005), Murcia (1998), País Vasco (2004) y Valencia (2003), quedando desprovistas de esta normativa Aragón, Asturias, Baleares, Cantabria, Castilla-La Mancha, Extremadura, Madrid, Navarra y La Rioja.

La presente normativa establece en cuanto a las técnicas de manejo de cultivo, y especialmente las relativas **al suelo, preparación del terreno y laboreo, material vegetal, plantación y replantación de viñedo, fertilizantes y enmiendas orgánicas**, lo siguiente:

- 1. En lo referente al **suelo, la preparación del terreno y el laboreo**, es obligatorio mantener y mejorar la fertilidad del suelo mediante el mantenimiento de la biodiversidad del agrosistema, la protección del suelo con una cubierta vegetal cultivada o no, y la mínima perturbación del suelo. Además, se deben eliminar las malas hierbas y restos vegetales de cultivos anteriores en la forma adecuada, pudiendo quedar los restos sobre el suelo cuando no presenten un riesgo de transmisión de plagas o enfermedades vegetales, o en agricultura de conservación. Las labores agrícolas deben realizarse respetando al máximo la estructura del suelo y, a ser posible, sin volteo. Así mismo, se tendrá en cuenta la pendiente del terreno para su adecuada conservación del mediante el mínimo laboreo y la construcción de obras de conservación (terrazas, bancales y lomas). **Queda prohibida la desinfección del suelo mediante tratamientos químicos**, salvo casos técnicamente justificados y autorizados por el organismo oficial correspondiente, y*

emplear herbicidas no selectivos, de larga persistencia, alta volatilidad o lixiviables, que no estén inscritos en el Registro Oficial de Productos Fitosanitarios.

Las diferencias por CCAA hacen referencia a **la utilización de cubiertas vegetales que mejoren la fertilidad del suelo, incrementen la diversidad edáfica y minimicen los procesos de erosión y escorrentía en los meses de invierno.** De manera que Andalucía, Canarias, Galicia, Cataluña, Castilla-León y Valencia sugieren la **incorporación de especies mejorantes**, tales como cereales y leguminosas. En su defecto, Andalucía propone utilizar **restos de poda triturados**, mientras que Galicia propone utilizar **el mulching o el flameado.**

En general, todas las CCAA, excepto Galicia, plantean como problema limitante de la PI el control fitosanitario antes de la plantación, ya que se **prohíbe la desinfección química del suelo para erradicar agentes patógenos de la vid. De entre estos, solo se tiene en cuenta el hongo *Armillaria mellea* y el nematodo *Xiphinema index*, transmisor del virus del entrenudo corto (GFLV).** En este sentido, la mayor parte de las Normas Técnicas Específicas de PI en Viña **obligan a dejar el terreno en descanso durante un intervalo de tiempo** que va desde un año para Andalucía, Murcia y Canarias; tres años para Galicia, Castilla y León y País Vasco, mientras que para Cataluña y Valencia es de cuatro años, llegándose a recomendar 6-10 años en caso de haber observado presencia de hongos o virosis transmitidas por nematodos. De entre las diferentes CCAA que hacen referencia a la incidencia de agentes patógenos, **Canarias es la única CCAA que establece la especie concreta: *X. index* como transmisor del GFLV.** Otras CCAA como Andalucía se refieren a todo el género *Xiphinema* spp. como agente patógeno o transmisor del GFLV, lo cual puede inducir a problemas graves, puesto que no todas las especies del género *Xiphinema* transmiten el GFLV.

Andalucía, Canarias y Cataluña son las únicas CCAA que aplican medidas específicas de desinfección del suelo, **recomendándose por vez primera la biodesinfección en el caso de Andalucía y Canarias como técnica de control para eliminar nematodos transmisores de virus que afectan a la vid.** Estas autonomías recomiendan también la solarización del terreno, aunque Bello *et al.* (2004) observan que no es eficaz pues los nematodos se

desplazan hacia horizontes más profundos en el suelo. El País Vasco permite la desinfección química en presencia de nematodos, siempre y cuando lo autorice el técnico responsable, Andalucía llega a permitir la desinfección química, cuando existan problemas de virosis, siempre y cuando el análisis nematológico determine la presencia de *Xiphinema*. Algunas CCAA, como Andalucía, Canarias, Cataluña, Galicia y País Vasco recomiendan **la eliminación de los tocones y raíces del cultivo anterior, a la máxima profundidad posible**, ya que los antiguos viñedos de la explotación pueden contener el agente trasmisor de virus.

- 2. En cuanto a **la siembra y replantación de vides**, es obligatorio emplear material vegetal procedente de productores oficialmente autorizados y, en su caso, certificados y con el correspondiente pasaporte fitosanitario. Emplear, si existen, variedades resistentes o tolerantes a alguna de las enfermedades importantes y adaptadas a las condiciones locales. Se emplearán patrones adaptados a las condiciones edáficas de cada zona y no sensibles a patologías habituales. Además, se deberá analizar previamente la incidencia de virosis o problemas fúngicos. El material, densidad, momento y dosis de siembra, rotaciones, marco de plantación y posibilidad de asociación con otros cultivos, se adaptarán a las condiciones locales. Queda prohibido el uso de patrones, combinaciones injerto-patrón, o variedades especialmente sensibles a determinadas enfermedades de relevancia en la región. Así como la asociación de diferentes cultivos leñosos, cuando sean incompatibles con los requisitos de la PI.*

Aunque el material vegetal deberá proceder de productores oficialmente autorizados, certificados y con el correspondiente pasaporte fitosanitario, existen algunas salvedades por CCAA. En Andalucía, el material vegetal deberá estar inscrito en el Registro Oficial de Semillas y Plantas de Vivero. En Canarias, la única región donde se permite la plantación sin patrón, se emplearán sarmientos sin enraizar y en período de parada vegetativa, pudiéndose **obtener el material vegetal por el propio agricultor para realizar plantaciones en su finca**, previa declaración por el responsable del mismo e inspección del organismo de control pertinente. En Cataluña, el material vegetal deberá proceder de plantaciones que estén inscritos en el Registro Oficial de la UE, con el correspondiente pasaporte fitosanitario CEE

del Reglamento Técnico de Control y Certificación en viña, permitiéndose la utilización de variedades que no estén inscritas en el registro, siempre sobre portainjertos certificados.

En las Autonomías de Canarias, Galicia, País Vasco, Valencia y Murcia es obligatorio emplear **variedades tolerantes o resistentes a enfermedades importantes y adaptadas a las condiciones locales** recomendadas por las autoridades regionales o por el Reglamento de cada DO. Concretamente, en Andalucía se recomienda la utilización de patrones resistentes a los nematodos del género *Meloidogyne*, sin referenciar la especie de la que se trata. Excepcionalmente, en esta CCAA podrá utilizarse variedades locales no certificadas siempre y cuando sea reconocido por la autoridad competente, hasta que exista el Registro de Variedades Locales. Algunas CCAA, como son Cataluña, Valencia y Murcia, requieren además una **autorización previa para tener plantaciones de viña en PI**.

En cuanto al obligatorio cumplimiento del **diagnóstico sobre la incidencia de virosis o problemas fúngicos en fincas nuevas o en replantación**, tenemos que Andalucía recomiendan verificar el estado fitosanitario de la parcela en PI, Canarias conocer el grado de susceptibilidad a plagas de cada variedad local, así como la incidencia de plagas en la zona, Castilla y León realizar un análisis previo de nematodos. Aunque no se menciona de forma explícita el diagnóstico constante de incidencia de organismos patógenos, en concreto, ataques de hongos o nematodos vectores del GFLV, el País Vasco es la única CCAA que recomienda realizar una inspección visual cada 6 años para observar la incidencia de virus. Sin embargo, **la normativa establece que en muchos viñedos se puede restringir la PI cuando el porcentaje de plantas infectadas sea mayor al 20%** (Valencia), **25%** (Castilla y León) **ó 50%** (País Vasco y Murcia). **Estas son las cuatro CCAA que no presentan ninguna alternativa a la desinfección química del suelo, como puede ser la biodesinfección, y proponen como única alternativa incrementar el período de descanso por más de seis años**, lo cual es impensable desde el punto de vista de rentabilidad económica del viñedo.

Todas las CCAA prohíben **la asociación de especies de diferentes cultivos**, justificando que ello implica diferente manejo agronómico. Sin embargo, se reitera en diversas ocasiones el interés de mantener una cubierta vegetal con

cultivos mejorantes, tales como leguminosas o cereales, previa a la plantación para mejorar la fertilidad, estructura y contenido de materia orgánica del suelo, este es el caso de Andalucía, Canarias, Galicia, Cataluña, Castilla y León y Valencia.

- 3. En la fertilización y utilización de enmiendas orgánicas, se realizará un programa de fertilización para cada unidad de cultivo y rotación (si existe cultivo mixto) potenciando la aportación de fertilizantes naturales y reduciendo al máximo los químicos de síntesis.** Para ello, se requiere de un análisis previo de la finca en el momento de integrarse al programa de PI, que debe de revisarse de modo permanente, al menos, cada cinco años. **Cuando se aporte materia orgánica ésta deberá contener un mínimo de metales pesados, patógenos u otros productos tóxicos que no sobrepasen los límites legales establecidos,** siendo obligatorio mantener un nivel mínimo de materia orgánica en el suelo. También, deberá definirse la máxima cantidad de nitrógeno aplicado, así como el momento de cada aplicación, dosis y fórmula del fertilizante, mientras que los oligoelementos se aplicarán solo cuando el análisis justifique su carencia. **Se realizarán enmiendas orgánicas para optimizar el pH del suelo al cultivo,** así como cuando las características físico-químicas del suelo lo aconsejen. Los purines y demás residuos semilíquidos provenientes de explotaciones ganaderas serán tratados por alguno de los sistemas de depuración conocidos. Se realizará un seguimiento analítico del cultivo para comprobar que el programa de fertilización es eficiente. **Quedando prohibido superar la cantidad máxima tolerable por hectárea y año de nitrógeno total, metales pesados, patógenos y otros productos tóxicos y la aplicación de nitrógeno nítrico en los márgenes de corrientes de agua.**

En general, en todas las CCAA con PI de vid se recomienda **mantener unos niveles mínimos de materia orgánica en el suelo (1-2%) y aplicar un 20% del nitrógeno necesario para el cultivo en forma de compost organo-mineral de estiércol,** aplicado de manera fragmentada a lo largo del año. Las concentraciones de nitrógeno mineral se deben adaptar a las demandas de la variedad, tipo de cultivo y zona. Existen otras medidas en cuanto al manejo de la explotación como son las técnicas de poda, riego, control integrado de

plagas y enfermedades, o utilización de herbicidas, con diferencias para cada CCAA, que no son de interés en este trabajo que se centra en **la utilización de subproductos agrarios como mejorantes en la replantación de viña.**

La biodesinfección es una alternativa válida, tanto en agricultura integrada como en ecológica, puesto que en lo referente al suelo, es obligatorio mantener y mejorar la fertilidad del suelo mediante el mantenimiento de la biodiversidad del agrosistema. De entre las diferentes comunidades autónomas que hacen referencia a la incidencia de agentes patógenos, **Canarias es la única CCAA que señala la especie concreta: *X. index* como transmisor del GFLV.** Se concluye en el trabajo que mediante la aplicación de la biodesinfección como técnica de desinfección de suelos se puede reducir el período de descanso a tres años para evitar el riesgo de nematodos transmisores de virus. Se debe resaltar que en la mayoría de los casos se refieren solo al género *Xiphinema* como agente transmisor del GFLV, lo cual puede inducir a problemas graves, puesto que no está demostrado que todas las especies del género *Xiphinema* transmiten el GFLV.

Por último se han analizado los sistemas de producción en agricultura ecológica (AE), que se regulan mediante el Reglamento CE nº 2092/91 de 24 de junio de 1991, **sobre la producción agrícola ecológica y su indicación en los productos agrarios y alimentarios.** Los antecedentes que han llegado a constituir la presente normativa se fundamentan, en primer lugar, en la **creciente demanda de productos agrarios y alimentarios ecológicos en Europa**, el precio más alto de los productos ecológicos en el mercado y el equilibrio oferta-demanda de los productos agrarios. Ocupando un segundo lugar, **la protección del medio ambiente y el mantenimiento del medio rural**, mediante la puesta en práctica de **un método de producción de alimentos menos intensivo y más respetuoso con el medio ambiente**, que frena las prácticas agrarias de los sistemas productivos intensivos originados tras la llamada *Revolución Verde*. A diferencia de la producción integrada que en España se regula según el Real Decreto 1201/2002 (BOE núm. 287, de 30 de noviembre de 2002), en la producción ecológica no existe una normativa por región o CCAA, sino que **la Normativa de la UE es de ámbito general a todas las regiones de Europa.** Puesto que la AE constituye un método específico de producción con respecto a la explotación agraria, requiere de la aplicación/normalización de algunas prácticas agrarias. En cuanto a la

producción ecológica de vegetales y productos vegetales, la Normativa de la UE establece lo siguiente:

1. **Un período de reconversión de al menos dos años antes de la siembra.** En el caso de praderas, de al menos dos años antes de su explotación como pienso procedente de AE. En el caso de cultivos vivaces distintos de praderas, de **al menos tres años antes de la primera cosecha de productos.** No obstante, la autoridad o el organismo de control podrá reconocer el tiempo anterior a la reconversión en AE de manera retroactiva en el caso de parcelas que hayan desarrollado métodos de producción agraria compatibles con las exigencias del medio ambiente y la conservación del espacio natural, así como terrenos naturales o agropecuarios que no hayan sido tratados con alguno de los productos prohibidos en esta normativa. En todo caso, el organismo de control podrá decidir, con el permiso de la autoridad competente, que se prorrogue el tiempo de reconversión a AE.
2. **La fertilidad y la actividad biológica del suelo,** deberán ser mantenidas o incrementadas, mediante diferentes técnicas de manejo, como son **el cultivo de leguminosas, abono verde o plantas de enraizamiento profundo,** con arreglo a un programa de rotación plurianual adecuado; **la incorporación de estiércol procedente de ganadería ecológica, en cuyo caso la cantidad total de estiércol permitido por explotación no podrá superar los 170 kg de N/ha año; o mediante la incorporación de cualquier otro material orgánico, convertido en abono o no, procedente de las explotaciones cuya producción se atenga a la presente normativa.** Excepcionalmente, podrán emplearse otros fertilizantes orgánicos o minerales para el acondicionamiento del suelo y la adecuada nutrición del cultivo en rotación. Para la activación del compost, se permite la utilización de de preparados a base de vegetales o microorganismos que no estén modificados genéticamente. También se permite la utilización de preparados biodinámicos a base de polvo de roca, estiércol de granja y vegetales. Podrán adicionarse al terreno algunos preparados a base de microorganismos que no estén modificados genéticamente, para mejorar

el estado de los nutrientes en los cultivos, cuando la necesidad de dicho uso este autorizada por el organismo de control.

Entre los fertilizantes autorizados por este reglamento, se incluye además de estiércoles animales y abonos verdes, los residuos domésticos compostados o fermentados, cuyas concentraciones en mg/kg de peso seco no superen las siguientes: cadmio: 0,7, cobre: 70, níquel: 25, plomo: 45, zinc: 200, mercurio: 0,4, cromo total: 70, cromo (IV): 0. **Y se permite la utilización de vinazas y extractos de vinazas, excluidas las amoniacales, como fertilizantes del suelo.**

3. ***La lucha contra los parásitos, enfermedades y malas hierbas deberá realizarse mediante la acción conjunta de las siguientes medidas la selección de las variedades y especies adecuadas, un adecuado programa de rotación de cultivos, medios mecánicos de cultivo, protección de enemigos naturales de los parásitos, o la quema autorizada de malas hierbas. Podrán emplearse productos que no estén autorizados para luchar contra plagas o enfermedades vegetales para el cual no existan alternativas ecológicas, físicas, de cultivo o selección de variedades, cuya utilización no afecte de forma indirecta las partes comestibles por la presencia de productos residuales, no contribuya en la degradación del medio ambiente ni tenga como resultado la contaminación del mismo.***

4. ***Las semillas o el material vegetal utilizado en AE deberá certificar su origen o procedencia, descartándose los OMG. Excepcionalmente, podrán emplearse semillas tratadas con productos que no figuran en la presente normativa, siempre y cuando el usuario de dichas semillas pueda demostrar la imposibilidad de adquirir en el mercado semillas no tratadas de una variedad adecuada de la especie de cultivo.***

En AE se recomiendan al menos tres años antes de la primera cosecha de productos. No obstante, la autoridad o el organismo de control podrá reconocer el tiempo anterior a la reconversión en AE de manera retroactiva en el caso de parcelas que hayan desarrollado métodos de producción agraria compatibles con las exigencias del medio ambiente y la conservación del espacio natural.

Se permite la utilización de vinazas y extractos de vinazas, excluidas las amoniacales, como fertilizantes del suelo.

Olmeda *et al.* (2003) señalan que si se parte de la hipótesis de que la superficie vitivinícola disminuye aproximadamente 5000 ha al año (frente a las 56.000 ha año que disminuía hasta el año 1996) y que los rendimientos, desde hace unos diez años, no aumentan de forma significativa, puede calcularse que en las próximas campañas la producción de vino se situará alrededor de una media de 158 millones de hl. Por otro lado, se calcula que los consumos internos oscilarán en torno a los 148 millones de hl (incluidas las cantidades destinadas a la destilación para alcohol de consumo), **lo que puede representar una reducción de unos 13 millones de hl respecto a campañas anteriores**, debido principalmente a la continua disminución del consumo directo pasando de 34,3 l en 1996-1997 a 30,6 l por persona en 2001-2002. Si se tiene en cuenta las importaciones procedentes de terceros países, puede deducirse que, sin contar la variación de las existencias, el plan de previsiones de abastecimiento para la campaña 2002-2003 debería arrojar unos excedentes medios de 5,3 millones de hl. Por otra parte en los años de malas cosechas, el mercado comunitario del vino podría resultar deficitario por un volumen aproximado de seis millones de hl. Si se da esta última condición caracterizada por escasos excedentes de producción, e incluso por producciones que no puedan satisfacer toda la demanda interna, **el régimen de arranque de viñas está abocado a perder importancia, circunstancia que ya empieza a evidenciarse. Sin embargo, dado que el equilibrio actual del mercado es tan precario, con riesgo de aparición de nuevos desequilibrios, no se debe apostar claramente por la conveniencia de levantar totalmente la prohibición de nuevas plantaciones. Lo que si parece deseable es flexibilizar la circulación de derechos de replantación con el fin de favorecer la producción de vinos que cuenten con mayores salidas en el mercado.**

En los orígenes de la OCM, las intervenciones comunitarias en el sector vitivinícola se centraban especialmente en la reducción del potencial de producción (medidas de arranque y limitación de nuevas plantaciones) y en el saneamiento del mercado a través de la destilación. En la actualidad y pensando en la situación de futuro, los esfuerzos deberían centrarse en **el aumento de la competitividad de la producción comunitaria, no solo en el**

mercado interior sino también, y de manera creciente en los mercados internacionales. Ello supone la adopción de medidas tendentes a acabar con los desequilibrios cualitativos entre oferta y demanda, la aceleración del ritmo de renovación de los viñedos, la mayor racionalización de las estructuras de producción y la modernización de todas las etapas y procesos que intervienen en la elaboración de los caldos, desde el embotellado hasta la comercialización y el marketing, pasando por la adaptación de las bodegas, la organización de los productores y la promoción, especialmente en determinados mercados exteriores en expansión.

Conviene recordar que para aquellas regiones en las que la viticultura desempeña una función esencial en cuanto al desarrollo socioeconómico de las regiones productoras, a menudo carentes de otras alternativas económicas viables, se debiera evitar el abandono de la viticultura que además acompaña a limitar la erosión del suelo y a la conservación del paisaje, sin olvidar que la viticultura como cualquier otra actividad agrícola puede incidir negativamente en el medio ambiente por la utilización intensiva de productos fitosanitarios y abonos. Por ello es recomendable, y a la vez necesario, conseguir una perfecta armonización del sector vitícola dentro de los programas agroambientales que tratan de fomentar la introducción o el mantenimiento de métodos de producción compatibles con el respecto al medio ambiente y el mantenimiento del entorno natural y paisajístico

Para el manejo agronómico de los subproductos agrarios a través de la utilización de la biodesinfección en el manejo de nematodos “formadores de nódulos” del género *Meloidogyne*, se comenzó por la caracterización de razas y biotipos de las poblaciones estudiadas (V.5), mediante el Test de Hospedadores de Hartman y Sasser (1985) que ha sido modificado por Robertson *et al.* (2005, 2006) que al incluir cultivares de pimientos y tomates resistentes nos permiten diferenciar biotipos dentro de una misma raza y estudiando su relación con la flora arvense asociada al cultivo de vid (V.6). Se encontró que las poblaciones de *M. incognita* en Castilla-La Mancha están representadas por las cuatro razas, con biotipos que son capaces de parasitar tanto a los tomates como a los pimientos resistentes (Tabla 31).

Se encontró también en viñedos de Quero (Toledo) y Socuéllamos (Ciudad Real) mezcla de poblaciones de *M. arenaria* de la raza 3, capaz de parasitar a

pimiento y *M. incognita*, lo que puede dar lugar a que algunas de las poblaciones de campo se comporten como la raza 4 de *M. incognita*, un biotipo altamente virulento que es capaz de parasitar algodón y tabaco, pudiendo además producir infestación en raíces de dos variedades de pimientos resistentes, Carolina Wonder y Charleston Belle, e incluso a tomate cv Nikita portadores del gen *Mi* de resistencia a *M. incognita* (Tabla 31). **La gran diversidad de biotipos encontrados en Castilla-La Mancha dificulta la eficacia en la utilización de variedades resistentes.** Las poblaciones estudiadas en El Perelló (Sueca, Valencia) pertenecen a *M. incognita* raza 1, que son capaces de parasitar a tabaco NC95 pero no algodón DP61, perteneciendo al biotipo tomate *Mi*, puesto que pueden parasitar a los tomates portadores del gen *Mi* de resistencia, pero no a los pimientos resistentes (Tabla 32).

En las plantas adventicias asociadas al viñedo, el uso de los índices de nodulación (Fig. 17) nos permite conocer el grado de infección por *Meloidogyne* de un viñedo y de este modo tomar las medidas de control oportunas, aunque no hay que olvidar que la presencia de especies arvenses dentro del cultivo puede crear problemas al servir de reservorio para las poblaciones de nematodos, por lo que es de sumo interés evitar su presencia, sin olvidar que pueden actuar como plantas trampas.

Por último, la presencia de higueras aisladas cerca de los viñedos nos permite conocer con la brotación de sus hojas los cambios de la temperatura del suelo, y con ello la fecha de inicio de la actividad de las poblaciones de *Meloidogyne*, que se pueden tomar de referencia para conocer el momento de aplicación de la vinaza, aunque hay que tener presente que las higueras pueden ser un foco de infección por estar la mayoría de ellas parasitadas por los nematodos “formadores de nódulos” o por *X. index*, nematodo transmisor del virus causante del “entrenado corto de la vid”. En relación con *X. index*, debemos señalar que se ha comprobado que al parasitar la higuera el nematodo pierde el virus en caso de que sea portador.

En el control de *M. incognita* se han encontrado alternativas químicas que pueden llegar a duplicar la producción y apreciar una mejora en la calidad, incluso con menor coste económico por basarse en el uso de recursos locales, aunque se deben procurar utilizar dentro de un sistema de producción

integrado, tratando de eliminar varios patógenos a la vez, o por el contrario utilizar alternativas ecológicas como el empleo de variedades tolerantes a patógenos, abonos verdes, técnicas culturales, biodesinfección, rotación con plantas resistentes, barbecho y la fecha de plantación, basándonos para todo ello en el comportamiento agroecológico del nematodo (Sterling 1991, Bello *et al.* 2002, García Álvarez *et al.* 2004a,b, Kerry e Hidalgo Díaz 2006). También se utilizan residuos de origen agrario en el control de *Verticillium dahliae* así como en el control de otros organismos patógenos en el suelo (Lazarovits 2004, Zhou y Everts 2004, Conn *et al.* 2005, Lazarovits *et al.* 2005, Mazzola y Mullinix 2005). Estos trabajos han sido revisados por Ozores Hampton (2005), Zinati (2005) y Porter *et al.* (2006, 2008), dentro de las investigaciones sobre alternativas al bromuro de metilo, un potente destructor de la capa de ozono estratosférica (TEAP 2006, MBTOC 2007). Recientemente nuestro equipo ha identificado la presencia de sustancias volátiles de interés en el control de los patógenos del suelo en residuos de la industria remolachera y de la industria vitivinícola (Fuente de la *et al.* 2007, Hernández *et al.* 2007), que son de gran interés para explicar el efecto biodesinfectante de la materia orgánica y su acción como mejoradores del suelo, pasando al diseño los experimentos para su aplicación en viñedos de Castilla- La Mancha (Anexo: Fig. 8).

Se deben destacar los resultados de los trabajos recientes de Guerrero *et al.* (2006, 2008), Piedra Buena *et al.* (2006, 2007), Robertson *et al.* (2006, 2008, 2009, 2010), Conn *et al.* (2007), González López (2007), López Cepero *et al.* (2007), MBTOC (2007,2008, 2009, 2010), Santos *et al.* (2007, 2008), Torres *et al.* (2007), Villaseca (2007), Xiao *et al.* (2007), Yao *et al.* (2007) Avilés Guerrero *et al.* (2008), Bello (2008), Bello *et al.* (2008), Díez Rojo *et al.* (2008a,b,c, 2009), Fernández *et al.* (2008.), Fuller *et al.* (2008), García Ruíz (2008), Gimsing *et al.* (2008), Kirkegaard *et al.* (2008), LaMondia y Halbredt (2008), Lazzeri *et al.* (2008), Mahran *et al.* (2008), Mumm *et al.* (2008), Pascual *et al.* (2008), Porras *et al.* 2008, Porter *et al.* (2008), Romero *et al.* (2008), Ros *et al.* (2008), Sahebani y Hadavi (2008), Urbano (2008), Verdejo Lucas *et al.* (2008), Verdejo Lucas y Sorribas (2008), Vicente *et al.* (2008), Vilamar *et al.* (2008), Abbasi *et al.* (2009), García Ruíz y García Bernal (2009), García Ruíz *et al.* (2009), Liñán (2009), López Cepero (2009), Talavera *et al.* (2009), Wachira *et al.* (2009), Zanon (2009), Zanon *et al.* (2009), Castro Lizazo (2010), Díez Rojo (2010), García Bernal *et al.* (2010), López Pérez *et al.* (2011).

CONCLUSIONES

1. La aplicación de vinazas resultantes de la industria vitivinícola cuando el vino se destina para la obtención de alcohol en ensayos desarrollados “*in vitro*”, con diluciones al 5%, resultó eficaz a los 45 minutos de su aplicación en el control de *X. index*, nematodo vector del virus causante de la enfermedad del “entrenudo corto infeccioso de la vid”, que es la principal causa para la desinfección de suelos en la replantación del viñedo. Se confirma también la eficacia de diluciones más bajas de vinaza, al 2, 1 y 0,2%, aunque el control total del nematodo se prolonga hasta un periodo de tres horas.
2. Las diluciones de vinazas procedentes de la industria vitivinícola al 5%, resultaron eficaces en el control de los nematodos formadores de nódulos del género *Meloidogyne*, principalmente de las especies *M. arenaria* y *M. incognita*, que plantean problemas graves en los viñedos de nuestro país, así como en cultivos hortofrutícolas, alcanzando su mayor eficacia después de tres horas de la aplicación de la vinaza. Se observó que diluciones menores del 2, 1 y 0,2% eran eficaces en el control del nematodo aunque era mayor la duración del periodo de exposición.
3. Se observa que algunos individuos pueden recuperarse cuando las placas de Petri, donde se realizan los ensayos “*in vitro*”, se destapan antes de terminar el periodo óptimo de exposición de los nematodos a la acción del subproducto. Por ello, se considera que el efecto de las vinazas es nematostático, lo cual es fundamental tenerlo en cuenta en los diseños de los protocolos de aplicación, al mismo tiempo que nos permite afirmar que el efecto se debe principalmente a los gases liberados por el subproducto, por lo cual puede considerarse su acción biodesinfectante.
4. Para la aplicación de vinazas procedentes de la industria vitivinícola como biodesinfectantes en las condiciones de campo, teniendo en cuenta que las diluciones del 5% resultaron eficaces en los ensayos realizados en condiciones controladas de laboratorio para la

eliminación total de los nematodos, hay que señalar que es necesario establecer las dosis óptimas en función del cultivo y diseñar protocolos de aplicación adaptados a las diferentes condiciones de campo.

5. Para lograr una mayor eficacia de los tratamientos con vinazas en el manejo de los nematodos, se recomienda como medidas culturales la necesidad de eliminar las raíces vivas del suelo, ya que pueden actuar de reservorio de patógenos pudiendo producir reinfecciones en el nuevo cultivo. Esta recomendación se debe tener muy en cuenta en la replantación del viñedo, puesto que las raíces actúan como reservorio del virus causante del “entrenado corto de la vid”. Para ello sería necesario realizar labores profundas y frecuentes que permitan la eliminación de las raíces durante el periodo de barbecho, además es imprescindible tener muy en cuenta la utilización de material certificado libre de virus en la replantación del viñedo.

6. En cuanto al valor de las vinazas como mejoradores del suelo respecto a su fertilidad física y química, en el caso de las vinazas aplicadas a dosis bajas, de 2-4 l/m² se mantiene constante o se reduce el contenido de materia orgánica, como podría corresponder en el segundo caso a un incremento de la actividad microbiana del suelo tras la aplicación de un material de rápida biodegradación. Desde el punto de vista de su contribución a la formación de humus estable, el efecto más significativo de la vinaza reside en su rápida insolubilización en el suelo y su incorporación a las sustancias húmicas preexistentes. En el caso de las aplicaciones repetidas, las nuevas propiedades adquiridas conducen a una estabilización de la estructura de los suelos y a una impermeabilización de los agregados, con efecto positivo respecto a la resistencia frente a la erosión y a la acción mecánica de la maquinaria de cultivo. En estos casos, son muy significativos los incrementos en la conductividad eléctrica, y el contenido en C, MO, N, K, P, Na⁺, Mg²⁺ y Fe, disminuyendo el pH y las concentraciones de Ca²⁺ y Mn²⁺.

7. La aplicación de las vinazas procedentes de la industria vitivinícola como biodesinfectantes en suelo, pueden incrementar su

biodiversidad, especialmente de los nematodos saprófagos del grupo de los rhabditidos y los enquitreidos pertenecientes al grupo de los oligoquetos, que son organismos fundamentales en la dinámica de la materia orgánica especialmente cuando se aplican vinazas sólidas. Por el contrario, se observa una disminución de los nematodos del grupo de los doriláimidos en la mayoría de los tratamientos, que son muy sensibles a los cambios ambientales que tienen lugar en el suelo, aunque su interés se centra fundamentalmente en su valor como bioindicadores.

8. No se han observado efectos negativos de la biodesinfección con vinazas de la industria vitivinícola sobre la planta ni sobre el medioambiente, al no encontrarse tampoco contenidos elevados de metales pesados en los lixiviados y los niveles de N_{total} llegan a ser menores en determinados casos con respecto a los testigos.
9. La utilización de las vinazas como biodesinfectante es una alternativa en la biodesinfección de suelos que puede aplicarse tanto en producción integrada como en agricultura ecológica, donde no está permitido el uso de desinfectantes químicos. En el caso del viñedo se recomienda dejar el terreno en descanso al menos dos años para controlar las enfermedades de origen edáfico como son los nematodos transmisores de virus, este periodo coincide con el exigido para la reconversión a agricultura ecológica y en algunos de los reglamentos de producción integrada. La biodesinfección es una alternativa de desinfección de suelos que ha sido aceptada en los reglamentos de producción integrada de Andalucía y Canarias.
10. Se recomienda que antes de la aplicación de las vinazas como biodesinfectantes es necesario hacer un análisis previo del suelo para comprobar la existencia de organismos patógenos, al mismo tiempo se debe observar la presencia de síntomas producidos por virus o nematodos en la planta, puesto que en el caso de que estos patógenos no fueran detectados en el cultivo, la aplicación de estos subproductos estaría enfocada a la mejora de los suelos y bastaría para ello establecer unas labores preparatorias en el terreno.

11. Se destaca desde el punto de vista económico, que el nematodo *X. index*, por ser vector de las virosis del “entrenudo corto” (GFLV) pueden producir pérdidas superiores al 50% en los viñedos, y los nematodos del género *Meloidogyne* vienen causando una reducción de al menos el 10% de la producción de los cultivos hortícolas de nuestro país, pudiendo llegar en algunos casos a la pérdida total de la cosecha, especialmente en Andalucía, Levante y Canarias. La **relación de costes entre biodesinfección y desinfección química** para una ha en suelos de textura media es de $924 \text{ €} / 2175 \text{ €} = 0,42$, lo que indica que el coste de la desinfección de una hectárea mediante biodesinfección supone un 42% con respecto a la desinfección química (100%). Por tanto el monto total, de aproximadamente **40 millones de € por campaña** para la desinfección del viñedo en España utilizando recursos públicos, **podría reducirse a más de la mitad utilizando biodesinfección**.

12. No se ha observado que la biodesinfección tenga efectos negativos en la salud de los consumidores, ni en el medio ambiente, no tiene limitaciones de uso dentro de los reglamentos de producción integrada o ecológica, permitiendo la utilización de recursos locales en el manejo de patógenos de las plantas, disminuye los costes de producción y convierte a la agricultura en una alternativa para evitar problemas de impacto ambiental, como son los originados por los restos de cosechas y de la agroindustria. La eficacia nematocida de la biodesinfección es similar a la de los productos fitosanitarios convencionales.

Actualmente se continúan realizando nuevos ensayos con el fin de optimizar la biodesinfección, tratando de reducir la dosis del material biodesinfectante a través de su aplicación a bandas en lugar de a toda la superficie. También se está estudiando la combinación de las vinazas con otros subproductos agroindustriales como biodesinfectantes con el fin de reducir costes, especialmente mediante la utilización de subproductos procedentes de la industria oleícola, así como los de la industria azucarera y láctea, procurando siempre utilizar recursos locales para evitar el encarecimiento por el transporte del material utilizado en la biodesinfección, también se está estudiando la selección de maquinaria que permita incrementar su eficacia mediante su inyección a mayor profundidad en el suelo.

RESUMEN

Se estudia el efecto de diferentes concentraciones de vinazas, procedentes de subproductos de la industria vitivinícola obtenidos de la destilación de alcohol vínico, en suelos cultivados, tratando de buscar una mayor viabilidad agronómica, y optimizar las técnicas de aplicación. Para ello se plantean los siguientes objetivos: 1º estudiar su influencia sobre las poblaciones de nematodos del suelo, en particular en el manejo de *Xiphinema index*, nematodo transmisor del virus causante del “entrenado corto infeccioso de la vid” (*fanleaf*), siendo una de las causas principales de que la desinfección de los suelos para la replantación del viñedo sea obligatoria para los países de la UE, y estudiar también su efecto sobre los nematodos formadores de nódulos del género *Meloidogyne*, principalmente las especies *M. arenaria* y *M. incognita*, que además de ser parásitos de la vid son uno de los principales responsables de pérdidas en cultivos hortícolas; 2º determinar su efecto sobre la fertilidad del suelo tanto en suelos de viñedo como en otros destinados a cultivos hortícolas y conocer sus posibles efectos fitotóxicos y ambientales de las concentraciones seleccionadas y 3º determinar las dosis óptimas, época, métodos y la maquinaria adecuada para su aplicación, teniendo en cuenta los fundamentos científico-técnicos en la utilización de subproductos agroindustriales.

Se destaca la gravedad de los problemas causados por el virus del “entrenado corto infeccioso de la vid” (GFLV) y su nematodo vector *X. index* en nuestro país, analizando los métodos de desinfección de suelos que actualmente se vienen aplicando. El valor biodesinfectante de las vinazas procedentes de la industria vitivinícola se plantea como alternativa al uso de fumigantes químicos en la desinfección del suelo, con el fin de reducir tanto los costes económicos como su impacto medioambiental. Los estudios se llevan a cabo en suelos clasificados como arenosoles calcáricos de viñedo en Socuéllamos (Ciudad Real), con clima mediterráneo continental, así como en suelos similares dedicados a cultivos hortícolas en El Perelló (Sueca, Valencia) con clima mediterráneo-litoral.

Se observó que el control *in vitro* es eficaz tanto para el nematodo *X. index* con vinazas de industria vitivinícola a la concentración del 5%, como para el control de las poblaciones de *Meloidogyne*, un nematodo patógeno de los cultivos hortícolas. Por otro lado, los nematodos saprófagos del grupo de los rabdítidos, y los enquitreidos pertenecientes al grupo de los oligoquetos, fundamentales en la dinámica de la materia orgánica, se incrementan al realizar una biodesinfección con vinazas procedentes de la industria vitivinícola, especialmente cuando se aplican los subproductos sólidos. Se concluye que la biodesinfección debe aplicarse a todo el terreno para evitar la aparición de rodales con poblaciones de nematodos fitoparásitos. El empleo de la biodesinfección podría reducir los costes de la desinfección de suelos en la replantación del viñedo, actuando como mejorador de las características de los suelos al incrementar su fertilidad, biodiversidad y mejorar sus propiedades físicas, al mismo tiempo que se contribuye a la búsqueda de soluciones a las grandes cantidades de residuos generados por las industrias vitivinícolas en nuestro país, mediante el empleo de los mismos como mejoradores de suelos.

Palabras clave: Agroecología, agroindustria, agronomía, desinfección, nematodos.

SUMMARY

GONZÁLEZ LÓPEZ MR, DíEZ ROJO MA, IGLESIAS GONZÁLEZ C, LÓPEZ PÉREZ JA, BELLO PÉREZ A. 2011. *Value of the wine by-products in the improvement and biodisinfection of soils*

Different concentrations of vinases, by-products from the wine industry were studied in cultivated soils, with major agronomic viability, optimizing the application technique. The fundamental objectives of this project are: 1° to study the influence of these products on soil nematode populations, in particular in the management of *Xiphinema index*, the nematode vector of the grape fanleaf virus (GFLV). GFLV is one of the principle reasons that disinfection of soils before vineyard replantation is obligatory in the EU member states, the effects on the root-knot nematodes of the genus *Meloidogyne* is also be studied as apart from being parasites of vines they are also one the principle problems causing losses in vegetable crops; 2° to determine the effects of these products on soil fertility using vineyard and vegetable crop soils as a reference, investigating possible phytotoxic and environmental effects, and 3° to use fundamental agronomical criteria for the utilisation of agro-industrial by-products, determining optimal dosage, time, methods and adequate machinery for the application.

The problems of grapevine fanleaf virus and its nematode vector *X. index* in Spanish vineyards are highlighted, analyzing current control and disinfection methods. The use of these by-products as biodisinfectants is analysed as an alternative to the use of chemical disinfection in soils with the aim of reducing economic and environmental costs. Field studies have been carried out in soils destined for replantation in Socuéllamos (Ciudad Real), which has a continental Mediterranean climate and in which the fumigation field experiments were designed using vinases in combination with other alternatives and in soils dedicated to horticultural crops in El Perelló (Sueca, Valencia) which has a Mediterranean littoral climate.

The nematode *X. index* was controlled *in vitro* with vinases from the alcohol industry at a concentration of 5%, populations of *Meloidogyne* a pathogen of horticultural crops were reduced. The saprophytic nematodes of the group rhabditids and enquitreids belong to the oligochaeta group which are fundamental in the decomposition of organic materials increased in biodisinfected soils, especially when solid by-products were used. It is concluded that biodisinfection should be applied to the whole field to avoid the appearance of infected patches of parasitic nematodes. The use of biodisinfection could reduce the costs of disinfection of soils destined for vineyard replantation, acting as an improver of soil characteristics, increasing fertility, biodiversity, and improving physical properties, at the same time contributing to the search for solutions for by-products generated by distilleries in our country by using these products as soil improvers.

Key words: Agroecology, agroindustry, agronomy, disinfection, nematodes.

ABREVIATURAS

AE	Agricultura Ecológica
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AIDA	Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
Arc	Arenosol calcárico
ArMV	Virus del mosaico del Arabis, <i>Arabis Mosaic Nepovirus</i>
Art.	Artículo
ATRIAS	Agrupaciones de Tratamientos Integrados en Agricultura
BCAM	Buenas Condiciones Agrarias y Medioambientales
BM, MB	Bromuro de metilo, <i>methyl bromide</i>
BPA	Buenas Prácticas Agrarias
BOE	Boletín Oficial del Estado
CAB	<i>CAB International, Commonwealth Agricultural Bureau</i>
CCAA	Comunidades Autónomas
CCMA	Centro de Ciencias Medio Ambientales
CE	Comunidad Económica
CICYT	Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología
C I H	<i>Commonwealth Institute of Helminthology</i>
CRLV	Virus de la hoja áspera del cerezo, <i>Cherry rasp leaf virus</i>
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
DBCP	1,2-dibromo-3-cloropropano
DGXI	Agencia de Medio Ambiente Europea
DMS	Diferencia Mínima Significativa
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DO	Denominación de Origen
DP61	DeltaPine 61, cultivar de algodón para el Test diferencial de hospedadores
EE UU	Estados Unidos de América
ELISA	<i>Enzyme-Linked-immunosorbent Assay</i>
ELISA-DAS	<i>ELISA double antibody sandwich</i>
ELISA-TAS	<i>ELISA triple antibody sandwich</i>
EUIT	Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica
FAO	Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FEOGA	Fondo Europeo de Orientación y Garantía Agraria
FR C	Frecuencia de revoluciones en centrifugadora
GFLV	Virus causante del entrenado corto infeccioso de la vid, <i>Grapevine fan leaf virus</i>
ICPCR	Inmunocapture/Reacción en cadena de la polimerasa, <i>Polimerase Chain Reaction</i>
I+D+i	Investigación, Desarrollo e innovación
ICVG	<i>International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of Grapevine</i>

ICM	Manejo Integrado de Cultivos, <i>Integrated Crop Management</i>
INRA	<i>Institut National de la Recherche Agronomique</i>
IPM	Manejo Integrado de Plagas, <i>Integrated Pest Management</i>
J2, J3, J4	Estadios del ciclo de vida de los nematodos
JCCLM	Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha
MAPA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (España)
MARM	Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino
MBTOC	<i>Methyl Bromide Technical Options Committee</i>
MMA	Ministerio de Medio Ambiente
MSD	Diferencia Media Significativa, <i>Medium Significant Difference</i>
NC95	North Carolina 95, cultivar de tabaco para el Test diferencial de hospedadores
OCM	Organización Común de Mercados
OEPP	<i>Organisation Européene et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes</i>
OIV	Organización de la Viña y el Vino
O M	Orden Ministerial
OMG	Organismos Modificados Genéticamente
PI	Producción Integrada
Pic	Cloropicrina
RD	Real Decreto
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, <i>Polimerase Chain Reaction</i>
PPV	Virus de la Sharka, <i>Plum Pox Virus</i>
PRMV	Virus del mosaico en roseta del melocotonero, <i>Peach Rosette Mosaic Virus</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RRV	Virus del anillado necrótico de frambuesa, <i>Raspberry Ringspot Virus</i>
SCARs	Regiones amplificadas de secuencias caracterizadas
SCRI	<i>Scottish Crop Research Institute</i>
SEM	<i>Scanning Electro-microscope</i>
SLRV	Virus de los anillos latentes de la fresa, <i>Strawberry Latent Ringspot Virus</i>
SPSS	Aplicación informática de análisis estadístico
TBRV	Virus de la Mancha Negra del Tomate, <i>Tomato Black Ring Virus</i>
TEAP	<i>Technology and Economic Assessment Panel</i>
TORSV	Virus de la Mancha Anular del Tomate, <i>Tomato Ring Spot Virus</i>
TRSV	Virus de los anillos del tabaco, <i>Tobacco Ring Spot Virus</i>
TRV	Virus del cascabeleo del tabaco, <i>Tobacco Rattle Virus</i>
TSWV	Virus de las manchas bronceadas del tomate, <i>Tomato Spotted Wild Virus</i>
UE	Unión Europea
UPM	Universidad Politécnica de Madrid
1,3-D	1,3-dicloropropeno
° Bé	Grado Baumé

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de este trabajo:

Al Prof. D. Pedro Urbano Terrón, Catedrático de Fitotecnia de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Madrid, por la beca para realizar el presente trabajo para María Rosa González López; Dra María Arias Delgado por acogernos en el Departamento de Agroecología del Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC; Prof. Gonzalo Almendros Martín por su ayuda en la realización de ensayos de germinación y su asesoramiento sobre las propiedades de los suelos y características de la materia orgánica; Dr Lee Robertson por su ayuda en la elaboración del trabajo de laboratorio sobre técnicas moleculares para la caracterización de razas y poblaciones de nematodos; Dra Susana Cobacho Arcos por su asesoramiento en taxonomía de nematodos, doriláimidos y monónquidos; Dr Alfonso Navas por la revisión del trabajo y su colaboración; Dr Miguel Escuer Cazador por su colaboración en el montaje de nematodos; Dra Zulimar Hernández Hernández por su colaboración en la revisión de metodologías para la determinación de la actividad biológica del suelo; Dra Ana Piedra Buena Díaz y Dr Iván Castro Lizaso por su apoyo en la redacción del trabajo; D. Casimiro Martínez Martínez por su ayuda en las técnicas de extracción de nematodos, la preparación del material vegetal para los análisis relacionados con la nutrición de la planta, así como del trabajo en laboratorio; D. José María Carreño Medina por su colaboración en la preparación de las muestras de suelo para determinación de análisis químicos; Dña M^a del Mar López Borrego por su ayuda en la realización de trabajos de laboratorio; Dña Valeriana López Sánchez, por su ayuda en los temas relacionados con la gestión del material y medios que fueron necesarios para la realización del trabajo; Dra Carmen Gutiérrez por su colaboración a lo largo de la realización del trabajo; D. Octavio Cenedilla Martín y a todo su equipo del Servicio de Análisis de CCMA, CSIC, por su ayuda en la realización de los análisis químicos de las muestras de suelo; Dña Concepción Cuadra González-Adalid, Dña Concepción González Godino, Dña M^a Sagrario Fernández Casado, D. Florencio Torres Martín por su apoyo durante la

realización del trabajo; D. José Solé por poner a nuestra disposición sus fincas para la realización de muestreos y la aportación de los subproductos utilizados en los experimentos de campo; la Cooperativa de “El Perelló” (Valencia), en especial al presidente D. Emilio Martínez, D. José Beltrán, D. José Herrero, D. Josep Sarrió y D. Fernando Arnau, así como a los demás agricultores que nos han permitido realizar en sus invernaderos los experimentos de campo.

El trabajo se ha realizado dentro del proyecto: “*Fitorremediación de suelos cultivados mediante la aplicación de productos obtenidos de melazas de remolacha*”, que coordina el Prof. D. Pedro Urbano Terrón, en colaboración con el proyecto de la CYCIT: “*Implicaciones medioambientales de los procesos inducidos por la biofumigación y su relación con la diversidad estructural y funcional de suelos*” (Ref. CTM2006-07309) y el proyecto del Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino: “**Prevención de la contaminación en suelos mediante el uso de biopesticidas y mejoradores orgánicos obtenidos a partir de subproductos agroindustriales y ganaderos**” (Ref. 027/2006/2-1.2) que coordina el Prof. D. Antonio Bello Pérez, perteneciente al Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC.

BIBLIOGRAFÍA

- Abad P, Favery B, Rosso MN, Castagnone Sereno P. 2003. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Mol. Plant Pathol.* 4, 217-224.
- Aballay EE, Insunza BV. 2002. Evaluación de plantas con propiedades nematocidas en el control de *Xiphinema index* en vid de mesa cv Thompson Seedless en la zona central de Chile. *Agricultura Técnica* 62, 357-365.
- Abbasi PA, Lazarovits G, Jabaji Hare S. 2009. Detection of high concentrations of organic acids in fish emulsion and their role in pathogen or disease suppression. *Phytopathology* 99, 274-281.
- Abelleira A, Aguín O, Membrives A, Pérez Otero R, Pesqueira R, Pintos C, Rodríguez Iglesias J, Salinero C. 1999. *Plagas y enfermedades de la vid, investigaciones conjuntas Galicia-Norte de Portugal*. Xunta de Galicia, Iniciativa INTERREG I.
- Adeniji MO, Chheda HR. 1971. Influence of six varieties of *Cynodon* on four *Meloidogyne* species. *J. Nematol.* 3, 251-254.
- Alfaro A. 1971. Presencia en España del virus del "fanleaf" de la vid. *Anales INIA. Servicio de Protección de los Vegetal* 1, 71-80.
- Alfaro A, Goheen AC. 1974. Transmission of strains of grapevine fanleaf virus by *Xiphinema index*. *Plant Dis. Rep.* 58, 549-552.
- Allen WR, Dias HF, Van Schagen JG. 1982. Susceptibility of grape cultivars and rootstocks to an Ontario isolate of to ringspot virus. *Can.J. Plant Pathol.* 4, 275-277.
- Allen WR, Jensen HJ. 1951. *Pratylenchus vulnus*, new species (Nematoda: Pratylenchidae), a parasite of trees and vines in California. *Proc. Helminth. Soc. Wash.* 18, 47-50.
- Allen WR, Stobbs LW, van Schagen JG, Ebsary BA. 1988. Association of *Xiphinema* species with soil type grapevines infected with tomato ringspot virus in Ontario, Canada. *Plant. Dis. Rep.* 72, 861-863.
- Almendros G, González Vila FJ, Martín F. 1990. Fire induced transformation of soil organic matter from oak forest. An experimental approach to the effects of fire on humic substances. *Soil Sci.* 149, 158-168.
- Alphey TJW, Taylor CE. 1986. *European Atlas of the Longidoridae and Trichodoridae*. SCRI, 123 pp.
- Amici A. 1967. Fluttuazioni della popolazione di *Xiphinema index* in una zona viticola italiana. *Riv. Patol. Veg.* 3, 99-104.
- Antón FA, Laborda E. 1991. Estudio de las malas hierbas aparecidas en los cultivos de vid y olivo en Santa Olalla (Toledo) y de su control con laboreo. *Bol. San. Veg. Plagas* 17, 249-263.
- Arias M. 1974. Las especies de *Xiphinema* en cultivos de frutales. (Nematoda: Dorylaimida). *Bol. R. Soc. Española Hist. Nat. (Biol.)* 72, 153-163.
- Arias M. 1975. Nuevas aportaciones al conocimiento del género *Xiphinema* (Nematoda) y su distribución en los suelos españoles. *An. Edafol. Agrobiol.* 34, 183-198.

- Arias M. 1979. Distribution of Longidoridae. In: TJW Alpey (Ed.). *Atlas of Plant Parasitic Nematodes of Spain*. SCRI, Dundee, UK, 46-66.
- Arias M. 1996. Nematodos asociados al cultivo de la vid. Transmisión de virosis por nematodos. In: C Prendes, CD Lorenzo, R Cabrera Pérez (Eds). *Seminario de Fitopatología (conferencias)*. Universidad de La Laguna, Tenerife, 7-39.
- Arias M. 1998. Soilborne pathogens and substrates in the Canary Island vineyards. In: A Bello, JA González, M Arias, R Rodríguez Kabana (Eds). *Alternatives to Methyl Bromide for the Southern European Countries*. CSIC-DGXI, Valencia, Spain, 251-260.
- Arias M, Andrés MF, Bello A. 1991. *Xiphinema rivesi* (Nematoda: Longidoridae) en España. In: SEF (Edit), *Estudios de Fitopatología*. Consejería de Agricultura, Badajoz, 154-159.
- Arias M, Bello A. 1977. Nematodos posibles transmisores de virus asociados a los cultivos de cítricos en España. *I Congreso Mundial de Citricultura, Abril-Mayo, 1973, Murcia-Valencia 2*, 709-714.
- Arias M, Bello A, Fresno J. 1994. Nematodos vectores de virus de la vid en España. *Invest. Agrar. Fuera de Serie nº 2*, 187-199.
- Arias M, Fresno J. 1994. Agroecological characterization of *Xiphinema index* Thorne et Allen in Spain. *Bull OEPP/EPPO 4*, 403-411.
- Arias M, Fresno J, Bello A. 1993. Grapevine fanleaf virus in Canary Island as a model for mediterranean region. *Proc. 11th Meeting of the ICVG*. Montreaux, Swizerland, 108-109.
- Arias M, Fresno J, López Pérez JA. 1997a. Viñedos de La Mancha, un viñedo donde no se utiliza bromuro de metilo. In: A Bello, J Pérez Parra, JA González, J Tello (Eds). *Alternativas al Bromuro de Metilo en Agricultura*. Junta de Andalucía, 141-154.
- Arias M, Fresno J, López Pérez JA, Escuer M, Arcos SC, Bello A. 1997b. *Nematodos, Virosis y Manejo del Viñedo en Castilla-La Mancha*. CSIC-JCCM, Madrid, 117 pp.
- Arias M, Fresno J, López Pérez JA, Guinea C. 2002. Nematodos transmisores de virus encontrados en La Rioja y Navarra. Su repercusión en los viñedos y cultivos hortícolas. *V Congreso de la SEAE, I Congreso Iberoamericano de Agroecología 1*, 1049-1058.
- Arias M, Fresno J, Moral del J. 1997c. Grapevine leafroll (GLRaV), Fleck (CFkV) and Grapevine fanleaf GFLV- *Xiphinema index* in the Spanish vineyards of the Guadiana basin, Spain. *12th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine (ICVG)*. Lisboa, Portugal.
- Arias M, Navacerrada G. 1973. Geographical distribution of *Xiphinema Cobb* in Spanish vineyards. *Nematol. Medit.* 1, 28-35.
- Arias M, Navacerrada G. 1976. Nematodes on the Spanish vine crops. *Agr. Consp. Scien.* 39, 587-591.
- Arias M, Navas A, Bello A. 1985. Nematodos ectoparásitos y transmisores de virus de la familia Longidoridae. Su distribución en España continental. *Bol. San. Veg. Plagas* 11, 275-337.

- Arias M, Navas A, Bello A. 1986. Analysis of the geographical distribution of *Xiphinema diversicaudatum* and *Xiphinema pachtaicum* in relation to environmental factors in Spain. *Nematol. Medit.* 14, 7-13.
- Arinç Y, Çınarlı I, Borazancı N. 1987. A study on the vector relationship of *Xiphinema mediterraneum* (Martelli et Lamberti, 1967) and fan leaf virus disease in grapevines. *Proc. First Turkish National Congress of Entomology*, 13-16 October, Izmir, Turkey, 605-610.
- Artolachipi G. 2003. Criterios y actuaciones de la nueva ley en la prevención y lucha contra las plagas. MAPA. *Dirección General de la Producción Agraria*.
- Auger J, Aballay EE, Pinto CM, Pastenes VC. 1992. Efecto del virus de la hoja en abanico (VHA) en el desarrollo y productividad de plantas de vid cv Thompson Seedless. *Fitopatología* 27, 85-89.
- Avilés Guerrero M, Rodríguez Jurado D, Castillo Jurado S, Castillo Fernández ML, Borrero Vega C, Bejarano Alcázar J. 2008. Mecanismos involucrados en la supresión de *Verticillium dahliae* en el suelo mediante la aplicación de enmiendas de crucíferas. *XIV Congreso de la SEF*, 15-19 septiembre, Lugo, 358 p.
- Ayuso P, Peña Iglesias A. 1973. Further research on the detection of grapevine viruses in Spain. *Rev. Pat. Veg.* 9, 28-34.
- Babini AR, Credi R, Giunchedi L, Canova A. 1981. Effetto di infezioni virali su alcuni portainnesti della vite. *Proc. III Simp. Intern. Select, Clon. Vit. Venezia*, 310-318.
- Baermann G. 1917. Eine einfache Methode zur Auffindung von *Ancylostomum* (Nematoden) Larven Erdproben. *Geneesk. Tijdschr. Ned. Ind.* 57, 131-137.
- Barba DJ, Clark MF, Thresh JM. 1978. Rapid detection and serotyping of prunus necrotic ringspot virus in perennial crops by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Ann. Appl. Biol.* 90, 395-399.
- Barba M, Cupidi A, Casorri L. 1993. Influencia of virus and virus like diseases of grapevine in shoot cultures. *Proc. 11th Meeting ICGV, Montreaux, Swizerland*, 43-45.
- Basile M, Lamberti F, Melillo VA, Basile AC. 1986. Influence of method of application and the quality of the cover on the effectiveness of methyl bromide against nematodes belonging to the Longidoridae and on the concentration of inorganic bromide in the soil. *Rivista della Ortoflorofrut. Italiana* 70, 193-203.
- Bell DK, Minton NA, Doupnik B Jr. 1971. Effects of *Meloidogyne arenaria*, *Aspergillus flavus* and curing time on infection of peanut pods by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 61, 1038-1039.
- Bello A. 1969. Estudio de las nematocenosis de las Islas Canarias e influencia del factor antropógeno sobre las mismas. *Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. Sec. Biol.* 67, 35-52.
- Bello A. 2008. La crisis del cultivo del tomate en Canarias. Alternativa desde la Agroecología. *Agropalca* 3, 16 p.

- Bello A, Arias M, López Pérez JA, García Álvarez A, Fresno J, Escuer M, Arcos SC, Lacasa A, Sanz R, Gómez P, Díez Rojo MA, Piedra Buena A, Goitia C, Horra de la JL, Martínez C. 2004. Biofumigation, fallow, and nematode management in vineyard replant. *Nematropica* 34, 56-64.
- Bello A, Escuer M, Arias M. 1994. Nematological problems, production systems and mediterranean environments. *Bull. OEPP/EPPO* 24, 383-391.
- Bello A, Escuer M, Pastrana MA. 1996. Nematodos fitoparásitos y su control en ambientes mediterráneos. In: G Liácer, MM López, A Trapero, A Bello (Eds). SEF *Patología Vegetal*. Phytoma-España, Valencia 1039-1069.
- Bello A, Escuer M, Sanz R, López JA, Guirado P. 1997a. Biofumigación, nematodos y bromuro de metilo en el cultivo de pimientos. In: MA López, JA Mora (Eds). *Posibilidad de alternativas viables al bromuro de metilo en pimientos de invernadero*. Consejería de Medio Ambiente Agricultura y Agua, Región de Murcia, Serie Jornadas y Congresos 11, 67-108.
- Bello A, López Pérez JA, Díaz Viruliche L. 2000a. Biofumigación y solarización como alternativa al bromuro de metilo. In: JZ Castellanos, F Guerra (Eds). *Memoria del Simposio Internacional de la Fresa, Zamora 2000*, INCAPA, México, 24-50.
- Bello A, López Pérez JA, Díaz Viruliche, L Tello J. 2001. Alternatives to methyl bromide for soil fumigation in Spain. In: R Labrada, L Fornasari (Eds) *Global report on Validated Alternatives to the Use of Methyl Bromide for Soil Fumigation*. Plant Production and Protection Paper 166. FAO & UNEP, Rome, 33-46.
- Bello A, López Pérez JA, Díez Rojo MA, López Cepero J, García Álvarez A. 2008. Principios ecológicos en la gestión de los agrosistemas. *Arbor, Ciencia, Pensamiento y Cultura* 729, 19-29.
- Bello A, López Pérez JA, García Álvarez A (Eds). 2003. *Biofumigación en Agricultura Extensiva de Regadío. Producción Integrada de Hortícolas*. CSIC-Caja Rural de Alicante, Mundi-Prensa, Madrid, 670 pp.
- Bello A, López Pérez JA, Sanz R, Escuer M, Herrero J. 2000b. Biofumigación and organic amendments. In: UNEP (Ed.) *Regional workshop on methyl bromide alternatives for North Africa and Southern European Countries*. UNEP, Francia, 113-141.
- Bello A, Navas A, Belart C, Alvira MP. 1985. *Nematodos de los Cítricos*. Publicaciones del Ayuntamiento de Castellón de la Plana, 222 pp.
- Bello A, Pastrana MA, González JA, Escuer M, Orts C. 1997b. Control de nematodos sin bromuro de metilo y producción integrada en España. In: A Bello, JA González, J Pérez Parra, J Tello (Eds). *Alternativas al Bromuro de Metilo en Agricultura. Seminario internacional. 29 y 30 de abril de 1996, Almería*. Consejería de Agricultura y Pesca, 155-171.
- Bello A, Rey JM, Arias M, González JA. 1996. Valores agroambientales de los viñedos de La Mancha y protección de cultivos. In: A Salinas, FJ Montero, E Rodríguez de la Rubia (Eds) *La Vid y el Vino en Castilla-La Mancha*. Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, 61-81.

- Bello A, Tello J, López Pérez JA, García Álvarez A. 2002. Los sistemas agrarios mediterráneos como modelo agroecológico. *In: J Labrador, JL Porcuna, A Bello (Eds). Manual de Agricultura y Ganadería Ecológica.* Eumedia, Madrid, 37-52
- Bello A, Tello J, Navas A, Laguna R, Meco R. 1990. Caracterización de los problemas fitopatológicos de origen edáfico en Castilla-La Mancha. Su interés en una ordenación fitosanitaria. *Cuadernos de Fitopatología* 26, 248-254.
- Beltrame KG, Aloisi RR, Vitti GC, Boluda R. 1999. Compostaje de un lodo biológico de la industria cervecera con aireación forzada y virutas de eucalipto. *Edafología* 6, 85-93.
- Borja MJ, Ponz F. 1992. An appraisal of different methods for the detection of the walnut strain of cherry leafroll virus. *J. Virol. Methods* 36, 73-83.
- Boubals D. 1970. Importance économique des viroses de la vigne. Circonstances favorisant leur propagativa. Lutte contre ces maladies. *IV Conference internationale sur les Maladies a virus de la vigne.* Montpellier.
- Boubals D, Dalmaso A. 1968. Résultats d'essais de désinfection de sols à vigne du sud de la France par des fumigants. *Progrés Agricole et Viticole* 85, 74-81.
- Boubals D, Pistre R, Dalmaso A, Bongiovanni M. 1971. Aspects des atteintes sur racines de vigne du nématode *Xiphinema index* vecteur du court-noué de la vigne. *Progrés Agricole et Viticole* 171, 4 pp.
- Boulila M, Boscia D, Terlizzi di B, Castellano MA, Minafra A, Savino V, Martelli GP. 1990. Some properties of a phloem-limited non mechanically transmissible grapevine virus. *J. Phytopathol.* 129, 151-158.
- Bouquet A. 1983. Détection immunoenzymatique du virus du court-noué de la vigne dans son vecteur *Xiphinema index* Thorne et Allen. *Compt. Rend. Seàn. l'Acad. Sc.* 296. Sèr III, 271-273.
- Bouquet A, Danglot Y, Bongiovanni M, Castagnone Sereno P, Torregrosa L. 2000. Breeding rootstocks resistant to grape fanleaf virus spread, using *Vitis* × *Muscadinia* hybridation. *Acta Horticulturae* 528, 517-526.
- Bovey R. 1973. Importance économique des viroses de la vigne. *Bull. OIV* 468, 124-128.
- Bovey R. 1980. Control of virus and virus-like diseases of grapevine: Sanitary selection and certification, heat therapy, soil fumigation and performance of virus-tested material. *Proc. 7th Intern. Conf. Viruses and Vectors of Grapevines, Niagara Falls*, 299-309.
- Bovey R, Gartel W, Hewitt WM, Martelli GL, Vuittenez A. 1980. *Maladies à Virus et Affections Similaires de la Vigne.* Payot Lausanne, Suiza, 183 pp.
- Bovey R, Martelli GP. 1992. *Directory of Major Virus and Virus-Like Diseases of Grapevines.* MFCIC-ICVG, 113 pp.
- Branas J. 1948. Etude et discussion sur le Court-noué. *26 Ses. Com. l'O.I.V. Bull. O.I.V.* 203, 4-87.
- Bridge J, Page SLJ. 1980. Estimation of root-knot nematode infestation levels using a rating chart. *Trop. Pest Manage.* 26, 296-298.

- Brodie BB, Cooper WE. 1964. Relation of parasitic nematodes to postemergence damping-off of cotton. *Phytopathology* 54, 1023-1027.
- Brown DJF. 1986. Reproduction and interbreeding within and between populations of *Xiphinema diversicaudatum* (Nematoda: Dorylaimoidea). *Nematol. Medit.* 14, 73-82.
- Brown DJF, Dalmasso A, Trudgill DL. 1993. Nematode pests of fruits and vines. In: K Evans, DL Trudgill, JM Webster (Eds). *Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture*. CABI, Wallingford, UK, 427-462.
- Brown DJF, Halbrendt JM. 1992. The virus vector potential of *Xiphinema americanum* and related species. *J. Nematol.* 24, 584 (Abstr.).
- Brown DJF, Lamberti F, Taylor CE, Trudgill DL. 1988. Nematode-virus plant interactions. *Nematol. Medit.* 16, 153-158.
- Brown DJF, Robertson WM, Trudgill DL. 1995. Transmission of viruses by plant nematodes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33, 223-249.
- Brown DJF, Taylor CE. 1981. Variazioni nella trasmissione di virus trapopolazioni di nematodi vettori Longidoridae. *Atti. Soc. Ital. Nematol., Giornate Nematol.*, Firenze, 28-29 November, 1979, 191-204.
- Brown DJF, Taylor CE. 1987. Comments on the occurrence and geographical distribution of longidorid nematodes in Europe and the Mediterranean region. *Nematol. Medit.* 15, 333-373.
- Brown DJF, Topham P. 1985. Morphometric variability between populations of *Xiphinema diversicaudatum* (Nematoda: Dorylaimoidea). *Rev. Nématol.* 8, 15-26.
- Brown DJF, Trudgill DL. 1983. Differential transmissibility of arabis mosaic and strains of strawberry latent ringspot viruses by three populations of *Xiphinema diversicaudatum* from Scotland, Italy and France. *Rev. nématol.* 6, 229-238.
- Cadman CH, Dias HF, Harrison BD. 1960. Sap-transmissible viruses associated with diseases of grapevines in Europe and North America. *Nature* 187, 577-579.
- Canellas LP, Velloso ACX, Marciano CR, Ramalho JFGP, Rumjanek VM, Rexende CE, Santos GA. 2003. Chemical soil properties of an inceptisol under long-term sugarcane crops with vinasse application and without slash burning. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* 27, 935-944.
- Capel Molina JJ. 1981 *Los Climas de España*. Ed. Oikos Tau, Barcelona, 429 pp.
- Carlevaris JJ, Horra de la JL, Rodríguez J, Serrano F. 1992. *La Fertilidad de los Principales Suelos Agrícolas de la Zona Oriental de la Provincia de Ciudad Real. La Mancha y Campo de Montiel*. CSIC-Consejería de Agricultura, JCCM, Madrid, 294 pp.
- Carneiro RMDG, Carneiro RG, Das Neves DI, Almeida MA. 2003. New race of *Meloidogyne javanica* on *Arachis pintoni* in the state of Panamá. *Nematol. bras.* 27, 219-221.
- Castagnone Sereno P. 2002. Genetic variability in parthenogenetic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., and their ability to overcome plant resistance genes. *Nematology* 4, 605-608.

- Castellanos M. 2004. *Metodología para el Uso del Suelo como Depurador de Vinazas Mediante Riego Controlado y Aprovechamiento Agrícola*. Tesis doctoral, Universitat de Valencia, 349 pp.
- Castillo P, Vovlas N, Subbotin S, Troccoli A. 2003. A new root-knot nematode, *Meloidogyne baetica* n. sp. (Nematoda: Heteroderidae), parasitizing wild olive in Southern Spain. *Phytopathology* 93, 1093-1102.
- Castro Lizazo I. 2010. *Biodesinfección de Suelos en Relación con la Diversidad en Hortalizas y Platanera*. Tesis Doctoral, Universidad de Almería, 282 pp.
- Catalano L, Roca R, Castellano M. 1989. Efficiency of transmission of an isolate of grapevine fanleaf virus (GFLV) by three population of *Xiphinema index*. *Nematol. Medit.* 17, 13-15.
- Cayrol JC. 1969. Résultats d'essais de traitements nématicides contre le nématode *Meloidogyne arenaria* infestant les racines de *Marantha makoyana*. *Pépinierist. Hort. Maraîch.* 94, 5471-5473.
- Cebolla V, Torró F, Lobell D, Valero LM, Bartual R, Maroto JV. 2005. Métodos de aplicación de emulsiones fumigantes a base de 1,3-dicloropropeno y cloropicrina con el riego localizado para la desinfección del suelo. *Phytoma España* 72, 60-65.
- Cenis JL, Opperman CH, Triantaphyllou AC. 1992. Cytogenetic, enzymatic and restriction fragment length polymorphism variation of *Meloidogyne* spp. from Spain. *Phytopathology* 82, 527-531.
- Charchar JM, Eisenback JD. 2002. *Meloidogyne brasilensis* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitising tomato cv Rossol in Brazil. *Nematology* 4, 629-643.
- Chitwood BG. 1949. "Root-knot nematodes"-Part I. A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi 1887. *Proc. of the Helminthological Society of Washington* 16, 90-104.
- Choleva B. 1975. Nematodes of the family Longidoridae in Bulgaria. In: F Lamberti, CE Taylor, JW Seinhorst (Eds). *Nematode Vectors of Plant Viruses*. Plenum Press, 355-356.
- Chone T, Jacquin F, Yaghi M. 1973. Emploi de ¹⁴C et ⁴⁵Ca comme éléments traceurs de l'humification. *Bull. ENSAIA* 15, 69-83.
- Chu PWG, Waterhouse PM, Martin RR, Gerlach WL. 1989. New approaches to the detection of microbial plant pathogens. *Biotechn. Gen. Eng. Rev.* 7, 45-110.
- Clark MF. 1981. Immunosorbent assays in plant pathology. *Ann. Rev. Phytopatol.* 19, 83-106.
- Clark MF, Adams AN. 1977. Characteristics of the microplate method of Enzyme-Linked. Immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34, 475-483.
- Cochran WG. 1977. *Sampling Technique*. 3 th Ed. J Wiley and Sons. New York.
- Cohn E. 1977. *Xiphinema italiae*. CIH Description of plant parasitic nematodes, Set 7 n° 95.

- Cohn E, Mordechani M. 1969. Investigations on the life cycles and host preference of some species of *Xiphinema* and *Longidorus* under controlled conditions. *Nematologica* 15, 295-302.
- Cohn E, Mordechani M. 1970. The influence of some environmental and cultural conditions on rearing populations of *Xiphinema* and *Longidorus*. *Nematologica* 16, 85-93.
- Cohn E, Tanne E, Nitzany F. 1970. *Xiphinema italiae*, a new vector of grapevine fanleaf virus. *Phytopathology* 58, 1316-1320.
- Coiro MI, Agostinelli A. 1991. The development of juvenile stages of *Xiphinema index* (Nematoda: Dorylaimida) on *Vitis vinifera*. *Rev. Nématol.* 14, 181-182.
- Coiro MI, Brown DJF. 1984. The status of some plants as hosts for four populations of *Xiphinema index* (Nematoda: Dorylaimida). *Rev. Nématol.* 7, 283-286.
- Coiro MI, Brown DJF, Lamberti F. 1990a. Reproduction of *Xiphinema index* (Nematoda: Dorylaimida) on five plant species. *Nematologica* 36, 474-478.
- Coiro MI, Taylor CE, Lamberti F. 1987. Population changes in *Xiphinema index* in relation to host plant, soil type and temperature in southern Italy. *Nematol. Medit.* 15, 173-181.
- Coiro MI, Taylor CE, Lamberti F. 1990b. Reproduction of two populations of *Xiphinema index* in relation to host and temperature. *Nematol. Medit.* 18, 117-118.
- Conn KL, Tenuta M, Lazarovits G. 2005. Liquid swine manure can kill *Verticillium dahliae* microsclerotia in soil by volatile fatty acid, nitrous acid, and ammonia toxicity. *Phytopathology* 95, 28-35.
- Conn KL, Topp E, Lazarovits G. 2007. Factors influencing the concentration of volatile fatty acids, ammonia, and other nutrients in stored liquid pig manure. *J. Environ. Qual.* 36, 440-447.
- Coolen WA, Hendrickx G, D'Herde JC. 1971. [Nematological problems in glasshouse cultures and the control with systemic nematicides of *Radopholus similis* and *Meloidogyne arenaria* in *Calathea mayokana* and *Monstera deliciosa*]. Publicatie N° W7, *Rijksstn. voor Nematologie et Entomologie*, Wettere, Belgium, 38 pp.
- Cordeau J. 1998. *Création de la Vigne et Porte-Graffes. Elimination des Maladies à Virus*. Editions Féret, Merignac cedex, France, 182 pp.
- Cory L, Hewitt VB. 1968. Some grapevine viruses in pollen and seed. *Phytopathology* 58, 1316-1320.
- Cuany A, Bergé JB, Scotto la Massèse C. 1973. Observations sur l'emploi des nématicides endotherapiques contre le genre *Meloidogyne* en horticulture florale. *OEPP/EPPO Bulletin* 3, 75-87.
- D'Addabbo T, Sassanelli N, Coiro MI. 1999. Suppression of *Xiphinema index* by olive and grape pomace. *Nematol. Medit.* 27, 257-260.
- Dalmasso A. 1970. Influence directe de quelques facteurs écologiques sur l'activité biologique et la distribution des espèces françaises de la famille des Longidoridae (Nematoda: Dorylaimida). *Ann. Zool. Eco. Anim.* 2, 163-200.

- Dao DF. 1970. Climatic influences on the distribution pattern of plant parasitic and soil inhabiting nematodes. *Meded. LandbHogesch. Wageningen* 70, 1-181.
- Das S, Raski DJ. 1968. Vector-efficiency of *Xiphinema index* in the transmisión of grapevine fanleaf virus. *Nematologica* 14, 55-62.
- Dias HF, Harrison BD. 1963. The relationship between grapevine fanleaf, grapevine yellow mosaic and arabis mosaic viruses. *Ann. Appl. Biol.* 51, 97-105.
- Díaz Viruliche LP. 2000. *Interés Fitotécnico de la Biofumigación en los Suelos Cultivados*. Tesis Doctoral, ETSI Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, España, 600 pp.
- Díaz Yubero F, Esteban P. 1973. Identificación visual de síntomas de virosis en viñedos de Rioja. *IV Jornadas de estudio AIDA y Observación de Síntomas de Virosis en Viñedos de Rioja. Agricultura* 500, 773-779.
- Dickson DW, Mitchell DJ. 1974. Nematode and soil-borne disease control on peanut. *J. Nematol.* 6, 138-139.
- Díez Rojo MA. 2002. *Alternativas no Químicas y Control de Nematodos en Cultivos de Castilla y León*. Trabajo Experimental Fin de Carrera. EUIT Agrícolas, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, 241 pp.
- Díez Rojo MA. 2006. *Fundamentos Fitotécnicos para la Aplicación de Subproductos Agrarios en la Mejora de Suelos Cultivados*. Trabajo Experimental Fin de Carrera. ETSI Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, 251 pp.
- Díez Rojo MA 2010. *Bases Agronómicas para la Utilización de Restos Agrarios en Biodesinfección de Suelos*. Tesis Doctoral, ETSI Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, 409 pp.
- Díez Rojo MA, Bello A, Escuer M, López Pérez JA, García. Álvarez A. 2006. *Nematodos fitoparásitos encontrados en Castilla y León. Alternativas no químicas de control*. MAPA, Madrid, 254 pp.
- Díez Rojo MA, Castro Lizazo I, López Pérez JA, González López MR, Martínez Martínez C, Bello Pérez A. 2009. Biodesinfección de suelos como alternativa a los fumigantes químicos. *Agropalca* 5, 24-25.
- Díez Rojo MA, López Pérez JA, Arcos SC, González López MR, Robertson L, Guerrero MM, Ros C, Lacasa A, Torres JM, Cara de M, Tello JC, Bello A. 2008a. Soil biodisinfection as an alternative to soil fumigants. *Proc. of Fifth International Congress of Nematology*, 13-18 July, Brisbane, Australia, 133 p.
- Díez Rojo MA, López Pérez JA, González López MR, Arcos SC, García Dorado V, Iglesias González C, Bello A. 2008b. The use of by products from the wine industry in the control of plant parasitic nematodes. *3th International Biofumigation Symposium*, 21-25 July, Canberra, Australia, 40 p.

- Díez Rojo MA, Torres JM, López Pérez JA, Robertson L, Arcos SC, González López MR, García Dorado V, de Cara M, Tello JC, Bello A. 2008c. Biofumigation and management of soil-borne organism of crops on sandy soils in Almería (Spain). *3th International Biofumigation Symposium*, 21-25 July, Canberra, Australia, 38 p.
- Donovan RM, Bush CE, Peterson WR, Parker LH, Cohen SH, Jordan GW, Brink KMV, Goldstein E. 1987. Comparison of non-radioactive DNA hybridization probes to detect human immunodeficiency virus nucleic acid. *Mol. Cel. Probes* 1, 359-366.
- Ebsary BA, Potter JW, Allen WA. 1984. Redescription and distribution of *Xiphinema rivesi* Dalmasso, 1969, and *Xiphinema americanum* Cobb, 1913 in Canada with description of *Xiphinema occiduum* n.sp. *Can. J. Zool.* 62, 1696-1702.
- Eisenback JD. 1997. *Root-knot Nematode Taxonomic Database*. CD-ROM. Ed. CAB International, Reino Unido.
- Eisenback JD, Bernard EC, Starr JL, Lee TA, Tomaszewski EKJr.. 2003. *Meloidogyne haplanaria* sp. nov. (Nematoda:Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing peanut in Texas. *J. Nematol.* 35, 395-403.
- Eisenback JD, Triantaphyllou HH. 1991. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. In: WR Nickle (Ed.). *Manual of Agricultural Nematology*. Marcel Dekker, Inc., New York. 191-274.
- Engelbrecht DJ. 1980. Application of the enzyme-linked immunosorbent assay procedure to the detection of grapevine fanleaf virus. *S. Afric. J. for Enol. Viticult.* 1, 103-106.
- Eno CF, Blue WG, Good JMJr. 1955. The effect of anhydrous ammonia on nematodes, fungi, bacteria, and nitrification in some Florida soils. *Proc. of the Soil Science Society of America* 19, 55-58.
- Escuer M. 1995. Nematodos. In: JA Barrientos (Ed.) *El Patrimonio Biológico del Montseni. Catálogos de Flora i Fauna*. Diputació de Barcelona 2, 17-23.
- Escuer M, Cano A, Bello A. 2004. *Nematodos fitoparásitos de la Región de Murcia y alternativas de control*. In: A Lacasa, MM Guerrero Díaz, M Oncina (Eds) *Desinfección de Suelos en Invernaderos de Pimiento. II Jornadas Técnicas sobre Alternativas Viabes al Bromuro de Metilo en Pimiento de Invernadero*. Consejería de Medio Ambiente Agricultura y Agua, Región de Murcia, Serie Jornadas y Congresos 16, 27-57.
- Escuer M, Palomo A. 1991. Nematodos asociados a melocotonero, peral y manzano en el Bajo Cinca (Aragón). *Orsis* 6, 75-81.
- Esmenjaud D, Walter B, Minot JC, Voisin R, Cornuet P. 1993. Boitin-avidin ELISA detection of grapevine fanleaf virus in the vector nematodo *Xiphinema index*. *J. Nematol.* 25, 401-405.
- Espárrago G, Fernández Muñoz R, Encina CL. 1994. Fiabilidad de la selección mediante detección del gen Mi de resistencia a *Meloidogyne* por electroforesis de *Aps-1*¹ en tomate de industria. *Investigación Agraria, Producción y Protección Vegetales* 9, 341-346.

- Espino de Paz AI, Rodríguez P, León de JM. 1995. *XX Reunión del Grupo de Trabajo de la Vid*.
- Espino de Paz AI, Rodríguez P, León de JM. 1996. *XX Reunión del Grupo de Trabajo de la Vid*
- FAO. 1988. *Revised Legend of the Soil Map of the World*. ISRIC, Roma, 119 pp.
- FAO. 1989. *Mapa Mundial de Suelos, Leyenda Revisada*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, 205 pp.
- Fernández de Bobadilla G. 1948. Degeneraciones infecciosas del viñedo. *Siembra* 4, 4-6.
- Fernández de Bobadilla G. 1950. Opiniones e hipótesis sobre las degeneraciones infecciosas del viñedo. *Siembra* 1, 5-7.
- Fernández Martínez S. 1993. *La Vid y el Vino en La Mancha*. Dirección General de Agricultura Ministerio de Agricultura, Madrid, 139 pp.
- Fernández P, Pascual JA, Lacasa A. 2008. Aspectos físicos, químicos y medioambientales de la biosolarización en invernaderos de pimiento. VIII Congreso SEAE. 17-20 septiembre, Bullas, Murcia, 97.
- Fijo MA, Arias M. 1976. La dégénérescence infectieuse dans les vignobles de Jerez. *Agr. Consp. Sc.* 28, 73-79.
- Fisher JM, Raski DJ. 1967. Feeding of *Xiphinema index* and *X. diversicaudatum*. *Proc. Helm. Soc. Wash.* 34, 68-72.
- Flegg JJM. 1966. Once-yearly reproduction in *Xiphinema* and *Longidorus* species in Southeastern England. *Nematologica* 14, 197-210.
- Flegg JJM. 1967. Extraction of *Xiphinema* and *Longidorus* species from soil by a modification of Cobb's decanting sieving technique. *Ann. Appl. Biol.* 60, 429-437.
- Flegg JJM. 1968. The occurrence of depth distribution of *Xiphinema* and *Longidorus* species in the South-eastern England. *Nematologica* 14, 189-196.
- Fontana GM. 1970. Fungicide and nematicide tests. Results of 1969. *APS Symp Ser* 27, 165p.
- Forer LB, Hill NS, Powell CA. 1981. *Xiphinema rivesi* a new tomato ringspot virus vector. *Phytopathology* 78, 874.
- Forer LB, Stouffer RF. 1982. *Xiphinema* spp. associated with tomato ringspot virus infection of Pennsylvania fruit crops. *Plant Dis.* 66, 735-736.
- Fresno J, Arias M. 1993. Detection of grapevine fanleaf virus (GFLV) along the whole year and on its vector nematodo *Xiphinema index*. *11th Meeting ICVG*, Montreaux, Suiza, 148-150.
- Fresno J, Arias M, López Pérez JA. 2001. Influencia de las técnicas de cultivo sobre las poblaciones de nematodos vectores de virus y la dispersión del GFLV en los viñedos de Castilla-La Mancha. *Bol. San. Veg. Plagas* 27, 419-428.
- Fresno J, Cabaleiro C, Segura A, Arias M. 1993. El virus del entrenudo corto y sus nematodos vectores en los viñedos de Galicia. *SEF*, 50 p.
- Fuchs M, Pinck M, Etienne L, Pinck L, Walter B. 1991. Characterization and detection of grapevine fanleaf virus by using cDNA probes. *Phytopathology* 81, 559-565.

- Fuente de la E, Soria AC, Díez Rojo MA, García Álvarez A, Piedra Buena A, Almendros G, Bello A. 2007. Monitoring by Solid Phase Micro Extraction (SPME) the dynamics of volatile compounds released from soils amended with forest and agricultural wastes. *International Symposium on Organic Matter Dynamics in Agroecosystems*. University of Poitiers & INRA, 16-19 July 2007. Poitiers, France.
- Fuentes Yagüe JL. 1999. *El Suelo y los Fertilizantes*. MAPA y Ediciones Mundi-Prensa, 352 pp.
- Fuller VL, Lilley CJ, Urwin PE. 2008. Nematode resistance. *New Phytologist* 180, 27-44.
- García Álvarez A, Bello A, Sanz R, Piedra A, Díez Rojo MA. 2004a. Biofumigación as an alternative to methyl bromide for the production of tomatoes and other vegetables. *In: TA Batchelor, F Alfarroba. Proc. of the Fifth International Conference on Alternatives to Methyl Bromide, 27-30 September, Lisbon, Portugal, 171-175.*
- García Álvarez A, Díez Rojo MA, López Pérez JA, Bello A. 2004b. Materia orgánica, biofumigación y manejo de organismos de suelos patógenos de vegetales. J Labrador (Ed.). *Conocimientos, Técnicas y Productos para la Agricultura y la Ganadería Ecológica*. SEAE, Valencia, 71-76.
- García Benavides P, López Robles J, Fresno J, Arias M. 1994. Correlación entre *Xiphinema index* y el virus del entrenudo corto en los viñedos de Castilla y León (España central). *Nematol. Medit.* 22, 21-24.
- García Bernal JM, Díez MA, Torres JM, Pacheco R, Cara de M, López JA, Tello JC. 2010. Investigación participativa en la reducción de fumigantes de suelo. *Agropalca* 10, 28 p.
- García de Luján y Gíl de Bernabé A. 1976. La degeneración infecciosa y las enfermedades de virus de la viña en la zona de Jerez. *Comunicaciones INIA* 6, 225 pp.
- García Ocampo A. 1997. Sodio soils reclamation using vinases. *In: J Battle Sales (Ed.) Internacional Symposium on SALT-Affected Lagoon Ecosystems*. Universitat Valencia, 137-143.
- García-Ruíz A. 2008. *Etiología, Epidemiología y Control no Químico de las Enfermedades Edáficas del Cultivo del Clavel en Invernaderos de la Costa Noroeste de Cádiz*. Tesis doctoral, Universidad de Almería, 321 pp.
- García-Ruíz A, García Bernal JP. 2009. La biodesinfección de suelos como alternativa en los cultivos de flor cortada de Andalucía. *Agropalca* 6, 22 p.
- García-Ruíz A, Tello Marquina JC, Avilés-Guerrero M, Ordovás Ascaso J. 2009. *Fusariosis del clavel. Fusarium oxysporum f.sp dianthi. Últimos Avances en su Control*. Edit. Agrotécnicas, 275 pp.
- Garijo C. 2003. El viñedo, la sanidad del cultivo ante el nuevo marco legal de la ley de Sanidad Vegetal. *8º Symposium Nacional de Sanidad Vegetal*. MAPA Dirección General de la Producción Agraria.
- Georgi LL. 1988. Morphological variation in *Xiphinema* spp. from New York orchards. *J. Nematol.* 20, 617-619.

- Gimsing AL, Kirkegaard JA, Strobel BW, Hansen HCB. 2008. Fate of glucosinolates and their hidrolisis products in soil. *Proc. of 3th International Biofumigation Symposium*. Canberra, Australia, 21-25 July, 13 p.
- Goheen AC, Hewitt WB. 1962. Veinbanding, a new virus disease of grapevines. *Am. J. Enol. Vitic.* 13, 73-77.
- Goitia C. 2004. *Epidemiología, Control y Repercusión de los Nematodos Transmisores de Virus de la Vid en España*. Tesis Doctoral, ETSI Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, 322 pp.
- Gómez Soriano P, Díez Rojo MA, Sanz de la Morena R, García Álvarez A, López Martínez R. 2006. *Desinfección de Suelos Mediante Biofumigación en Replantación de Viñedo*. Consejería de Medio Ambiente Agricultura y Agua, Región de Murcia, Serie Programa de Innovación Tecnológica 19, 44 pp.
- Gonsalves D. 1979. Detection of tomato ringspot virus in grapevines. A comparison of *Chenopodium quinoa* and Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Plant Dis. Rep.* 63, 962-965.
- González López MR. 2007. *Valorización de Subproductos de la Industria Vitivinícola como Mejoradores de Suelo*. Trabajo Experimental Fin de Carrera, EUIT Agrícolas, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, 212 pp.
- Goodell PB, Ferris H. 1981. Sample optimization for five plant-parasitic nematodes in an alfalfa field. *J. Nematol.* 13, 304-313.
- Goodey JB, Franklin MT, Hooper DJ. 1965. *T. Goodey's The Nematode Parasites of Plants Catalogued Under Their Hosts*. 3rd Ed. Farnham Royal, Commonw. Agric. Bur. 214 pp.
- Graham TW. 1952. Susceptibility of tobacco species to the root-knot nematode species. *Plant Dis. Rep.* 36, 87-88.
- Griesbach JA, Maggenti AR. 1990. The morphometrics of *Xiphinema americanum sensu lato* in California. *Rev. nématol.* 1, 93-103.
- Grise De A. 1969. Redescription o modification de quelques techniques utilisees dans l'etude des nematodes phytoparasitaires. *Rijksfaculteit der Landbouwweten-schappen Gent* 34, 315-369.
- Grupos de Trabajo de la Vid. 1987, 1988, 1991, 2001. *Reuniones anuales de los grupos de trabajo fitosanitarios*. MAPA 2002. Dirección General de la Producción Agraria 11 vols.
- Guerrero A, Rubio C, Ruíz A, Joaquín M. 1989. Prospección de nematodos en parral 1988. *XIV Reunión del Grupo de Trabajo de la Vid*, Madrid Feb. 1989.
- Guerrero MM, Ros C, Lacasa CM, Martínez V, Fernández P, Bello A, Lacasa A. 2008. Control de nematodos en invernaderos de pimiento mediante biosolarización con enmiendas orgánicas. *Actas VIII Congreso SEAE*, 16-20 septiembre, Bullas, Murcia, 87 p.
- Guerrero MM, Ros C, Martínez MA, Martínez MC, Bello A, Lacasa A. 2006. Biofumigation vs biofumigation plus solarization to control *Meloidogyne incognita* in sweet pepper. *Bulletin OILB/Crop* 29, 313-318.

- Hafner P. 1988. Börner-eine neue Rebuterlage. *Obstbau Weinbau* 35, 370.
- Halbrendt JM, Brown DJF, Robbins RT. 1995. Geographic distribution of *Xiphinema americanum* group nematodes with three and four juvenile stages. *Abstracts of International Nematology Symposium*, St. Petersburg (Rusia) 23-30 september, 34.
- Handoo, ZA, Nyczepir AP, Esmenjaud D, Van der Beek JG, Castagnone Sereno P, Carta LK, Skantar AM, Higginis JA. 2004. Morphological, molecular and differential-host characterization of *Meloidogyne floricola* n. sp. (Nematoda:Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing peach in Florida. *J. Nematol.* 36, 20-35.
- Harris AR. 1979. Seasonal populations of *Xiphinema index* in vineyard soils of Northeastern Victoria, Australia. *Nematologica* 25, 336-347.
- Harrison BD. 1964. Specific nematode vectors for serologically distinctive forms of raspberry ringspot and tomato black ring viruses. *Virology* 22, 544-550.
- Hartman KM, Sasser JN. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal-pattern morphology. In: KR Barker, CC Carter, JN Sasser. (Eds). *An Advanced Treatise on Meloidogyne*, Vol. II. *Methodology*. North Carolina State University Graphics, Raleigh, 69-77.
- Hernández Z, López Pérez JA, González López MR, Piedra Buena A, Bello A, Almendros G. 2007. Small-scale soil spatial variation patterns alter long-term organic amendment with wine by-products as reflected by visible and infrared derivative spectroscopies of soil humic acids. *International Symposium on Organic Matter Dynamics in Agroecosystems*. University of Poitiers & INRA, 16-19 July. Poitiers, France.
- Hewitt VB. 1950. Fanleaf-another virus disease found in California. *Calif. Dept. Agr. Bull.* 3, 62-63.
- Hewitt VB. 1956. Fanleaf virus of grapevines is a soil-borne. *Phytopathology* 48, 568-593.
- Hewitt VD, Raski DJ, Goheen AC. 1958. Nematode vector of soil-borne fanleaf virus of grapevines. *Phytopathology* 48, 586-595.
- Heyns J. 1974. The genus *Xiphinema* in South Africa. II. *X. elongatum* group. *Phytophylactica* 6, 249-260.
- Hull R. 1984. Rapid diagnosis of plant virus infections by spot hybridization. *TIBS* 4, 88-91.
- Hunt DJ. 1993. *Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae: Their Systematics and Bionomics*. CAB International, St. Albans, UK: 352 pp.
- Inserra RN, O'Bannon JH, Yuhl WA. 1974. Systemic activity of phenamiphos on control of *Meloidogyne arenaria* on *Gardenia jasminoides*. *Nematropica* 4, 2.
- Jacob M, Mende G, Wiese K, Brunner D. 1973. Control of root-knot nematodes in *Gerbera jamesonii*. Bekämpfung von Wurzgallenälchen bei *Gerbera jamesonii*. *Gartenbau* 20, 180-182.
- Jeffers DP, Roberts PA. 1993. Effect of planting date and host genotype on the root-knot nematode-*Fusarium* wilt disease complex of cotton. *Phytopathology* 83, 645-654.

- Jha A, Posnette AF. 1959. Transmission of a virus to strawberry plants by a nematode (*Xiphinema* sp.). *Nature* 184, 962-963.
- Jiménez F, Goheen AC. 1980. The use of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of grape fanleaf virus. *Proc. 7th Meeting of the Int. Council for the Study of Viruses and Virus like Diseases of the Grapevine*, Niagara Falls, 283-291.
- Jiménez Millán F. 1962. Estudio de las especies transmisoras de virus vegetales. *Criconemoides xenoplax* y *Xiphinema index* (Nematoda) nuevas en los viñedos españoles. *Revista Ibérica de Parasitología* 22, 305-318.
- Jiménez Millán F, Arias M, Bello A, López Pedregal JM. 1965. Catálogo de los nematodos fitopárasitos y periradicales encontrados en España. *Bol. R. Soc. Española Hist. Nat. (Biol.)* 63, 47-104.
- Jovellanos GM. 1787. *Informe en el Expediente de la Ley Agraria*. In: H Thomas. 2006. *Cartas de Asturias*. Ed. Gadir, Madrid, 125 p.
- Karssen G. 2002. *The Plant-Parasitic Nematode Genus Meloidogyne Göldi, 1892 (Tylenchida) in Europe*. Ed. Koninklijke Brill NV, Leiden, The Netherlands, 157 pp.
- Katsirdakis KX, Potter Damoulakis UJ, Katis NI, Roubelakis Angelakis KA. 1989. Comparative studies of pollen grains from Fanleaf-infected and healthy grapes. *Proc. 9th Meeting ICVG*, 79-80.
- Kerry B, Hidalgo Díaz L. 2006. Developing a microbial biological control agent for root-knot nematodes with special reference to *Pochonia chlamydosporia*. *Abstract XXXVIII ONTA Meeting*, San José, Costa Rica. 26-30 June, 59.
- Khan FA. 1988. A preliminary report on plant parasite nematodes associated with grapevine in Northern Nigeria. *International Network Newsletter* 5, 45-47.
- Kirkegaard JA, Akiew S, Pattison T, Young A, Prior L. 2008. Understanding mechanism of plant pest suppression using *Brassica* green manures. *Proc. 3th International Biofumigation Symposium*. Canberra, Australia, 21-25 July, 21 p.
- Kirpatrick JD, Van Gundy SD, Martin JP. 1965. Effects of *Xiphinema index* on growth and abscission in Carignane grape, *Vitis vinifera*. *Nematologica* 11, 41 (Abstr.).
- Koenig R, Raul HL. 1982. Variants of ELISA in plant virus diagnosis. *J. Virol. Methods* 5, 113-125.
- Kofoed CA, White AW. 1919. A new nematode infection of man. *J. Amer. Med. Assoc.* 72, 567-569.
- Kunde RM, Lider LA, Schmitt RV. 1968. A test of *Vitis* resistance to *Xiphinema index*. *Am. J. Enol. Viticult.* 19, 30-36.
- Lacasa A, Guerrero Díaz MM, Oncina Deltell M (Eds). 2004. *Desinfección de Suelos en Invernaderos de Pimiento*. Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente, Región de Murcia, 335 pp.

- Lacasa A, Guirao P, Guerrero MM, Ros C, López Pérez JA, Bello A, Bielza P. 1999. Alternatives to methyl bromide for sweet pepper cultivation in plastic greenhouses in south east. *3rd Int. Workshop Alternatives to Methyl Bromide for the Southern European Countries*. 7-10 December, Creta (Greece), 133-135.
- Lamberti F. 1989. Nematode parasites of grapevine and their control. In: R Cavalloro (Ed.) *Plant-protection Problems and Prospects of Integrated Control in Viticultur. Proc. of the CEC/10BC International Symposium*, Lisboa-Vila Real, Portugal June 1988. L-2920 Luxemburg; Commision of the European Communities EUR Publication EUR 11548, 163-172 ISBN 92-826-0940.
- Lamberti F, Bleve Zacheo T. 1979. Studies on *Xiphinema americanum sensu lato* with descriptions of fifteen new species (Nematoda, Longidoridae). *Nematol. Medit.* 7, 51-106.
- Lamberti F, Melillo VA. 1991. Influenza di *Xiphinema index* sulla produzione di uva Italia in provincial di Bari. *Informatore Fitopatologico* 41, 60-61.
- Lamberti F, Siddiqi MR. 1977. *Xiphinema pachtaicum* (= *X.mediterraneum*). CIH Description of Plant-parasitic Nematodes Set 7, n° 94, 3 pp.
- Lamberti F, Taylor CE, Seinhorst JW (Eds). 1985. *Nematode Vectors of Plant Viruses*. Plenum Press, London, 460 pp.
- LaMondia J, Halbrendt J. 2008. The effects of *Brassica* seed meal admendments on *Meloidogyne hapla* viability in laboratory bioassays. *Proc. 3th International Biofumigation Symposium*. Canberra, Australia, 21-25 July, 19 p.
- Lamotte M. 1976. *Estadística Biológica, Principios Fundamentales*. Ed. Toray-Massou, S.A., Barcelona, 163 pp.
- Lara MP, Bello A. 1983. Estudio de la problemática que plantean los nematodos fitoparásitos en los cultivos de La Rioja. *Berceo (Ciencias)* 1, 3-47.
- Lazarovits G. 2004. Managing soilborne plant diseases through selective soil desinfestation by a knowledge based application of soil amendments. *Phytoparasitica* 32, 427-431.
- Lazarovits G, Conn KL, Abbasi PA, Tenuta M. 2005. Understanding the mode of action of organic soil amendments provides the way for improved management of soil-borne plant pathogens. *Acta Hortic.* 689, 215-224.
- Lazzeri L, Leoni O, D'Avino L, Malaguti L. 2008 Biorefinery - Brassicaceae plants as more than biofumigants! *Proc. 3th International Biofumigation Symposium*. Canberra, Australia, 21-25 July, 22 p.
- Leal I, Chirinos E, Leal M, Moral H, W Barrera. 2003. Caracterización fisicoquímica de la vinaza del *Agave cocui* y su posible uso agroindustrial. *Multic* 3, 83-88.
- Lear B, Goheen AC, Raski DJ. 1981. Effectiveness of soil fumigation for control of fanleaf-nematode complex in grapevines. *Am. J. Enol. Viticult.* 32, 208-211.

- Lehmann H, Wyss U. 1978. The ultrastructure of modified root-tip cells induced by the feeding of an ectoparasitic nematode. In: JM Sturges (Ed.): *Electron Microscopy 1978 Vol.II: Biology (9th Int. Cong. on "electron microscopy" 1-9 Aug., Toronto, Canada)* Toronto, Ontario Canada, Microscopical Society of Canada, 438-439.
- Lima MB. 1965. *Studies on Species of the Genus Xiphinema and other Nematodes*. Ph. D. Thesis, University of London, 165 pp.
- Lima MB. 1968. A numeral approach to the *Xiphinema americanum* complex. *Compt. Rend. VIII Symp. Int. Nematol.* Antibes, 1965, France, EJ Brill, Leiden, Holland, 30 pp.
- Liñán de C. 2009. *Vademecum de Productos Fitosanitarios y Nutricionales (25ª Edición)*. Edit. Agrotécnicas, 784 pp.
- Lister RM. 1964. Strawberry latent ringspot a new nematode-borne virus. *Ann. Appl. Biol.* 7, 167-176.
- Lister RM. 1978. Application of the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detecting viruses in soybean seed and plants. *Phytopathology* 68, 1393-1400.
- López Cepero J. 2009. *Agroecología y Manejo de Nematodos en Cultivos Protegidos de Canarias*. Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna, Tenerife, 314 pp.
- López Cepero J, Piedra Buena A, Díez Rojo MA, Regalado R, Brito E, Hernández Z, Figueredo M, Almendros G, Bello A. 2007. Evaluation of soil biodesinfestation with crop and garden residues in root-knot nematodes populations. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*. Ghent University 72, 703-712.
- López Pérez JA. 2004. Interés biofumigante de los restos de champiñón. *Avances en la tecnología de la producción comercial del champiñón y otros hongos cultivados*. Diputación de Cuenca, Cuenca, 231-242.
- López Pérez JA, Bello A, García Álvarez A, Sanz R, Díez Rojo MA, Ferrándiz JC, Domene R. 2003. Ecología y control de *Meloidogyne incognita* en hortalizas de la comarca de Villena (Alicante). *V Congreso de la SEAE. I Congreso Iberoamericano de Agroecología*. Gijón, 16-21 de septiembre. Tomo II, 1067-1078.
- López Pérez JA, Escuer M, Díez Rojo MA, Robertson L, Piedra Buena A, López Cepero J, Bello A. 2011. Host range and biotypes of *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949 (Nematoda: Meloidogynidae) in Spain. *Nematropica* 41,128-138.
- López Robles DJ. 1991. Los problemas planteados por nematodos y su control en el cultivo de remolacha. *Cuadernos Phytoma* 8, 73-77.
- Lordello LGE, Kanazawa PS. 1967. Nematóide nocivo ao quiiri. *Rev. de Agricultura, SP* 42, 107-108.
- Magnien C. 1998. Lutte contre le Court Noué : la devitalisation des ceps avant l'arrachage : une mesure préventive d'un grant intérêt. *Phytoma* 510, 44-45.

- Mahran A, Tenuta M, Hanson ML, Daayf F. 2008. Mortality of *Pratylenchus penetrans* by volatile fatty acids from liquid hog manure. *J. Nematol.* 40, 119-126.
- Malan AP, Meyer AJ. 1992. Transmisión of grapevine fanleaf virus by a South African population on *Xiphinema index*. *Phytophylactica* 24, 217-219.
- Malan AP, Meyer AJ. 1993. Interaction between a South African population of *Xiphinema index* and different grapevine rootstocks. *S. Afric. J. Enol. Viticult.* 14, 11-15.
- Man de JG. 1880 Die einheimischen frei in der reinen Erde und im süßen Wasser lebenden Nematoden. Vorläufiger Bericht und descriptivsystematischer Theil. *Tijdschr. Nederl. Dierk. Vereen.* 5, 1-104
- MAPA. 1981. *Mapa de Cultivos y Aprovechamientos. Sueca (Valencia). Escala 1:50.000. Memoria.* Publicaciones del Ministerio de Agricultura. Secretaría General Técnica, Servicio de Publicaciones Agrarias, Madrid, 50 pp.
- MAPA. 1994. *Métodos Oficiales de Análisis.* Tomo III. Métodos oficiales de análisis de suelos y aguas para riegos. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, Madrid, 205-234.
- MAPA. 2002. *Anuario de Estadística Agroalimentaria 2001.* Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Secretaría General Técnica, Centro de Publicaciones, Madrid, 701 pp.
- MAPA. 2004a. *Anuario de Estadística Agroalimentaria 2003.* Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Secretaría General Técnica. Madrid, 705 pp.
- MAPA. 2004b. *Libro Blanco de la Agricultura y el Desarrollo Rural.* Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Secretaria General Técnica. Tomo 2 Análisis sectoriales, 685 pp.
- Marcilla Arrázola J. 1942. *Tratado Práctico de Viticultura y Enología Españolas.* 3ª edición. Sociedad Anónima Española de Autores y Traductores 1, 313-316.
- Margalef R. 1974. *Ecología.* Edit. Omega, Barcelona, 951 pp.
- Martelli GP. 1978. Nematode borne-viruses of grapevine. In: PR Scott, A Brainbridge (Eds) *Plant Disease Epidemiology.* Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, 274-282.
- Martelli GP. 1993. Advances in grapevine virology. 1991-1993. *11th Meet. ICVG,* Montreux. Switzerland, 13-18.
- Martelli GP, Gallitelli D, Abracheva P, Savino V, Quacquarelli A. 1977. Some properties of grapevine bulgarian latent virus. *Ann. Appl. Biol.* 85, 51-58.
- Martelli GP, Lehoczy J, Quacquarelli A. 1965. Host range properties of a virus associated with Hungarian grapevines showing macroscopic symptoms of fanleaf and yellow mosaic. *Proc. Inter. Conf. Virus Vector Perenn. Hosts Vitis,* Davis, 389-401.
- Martelli GP, Quacquarelli A. 1972. Hungarian chrome mosaic of grapevine and tomato black ring: two similar but unrelated plant viruses. *Ann. Phytopathol.,* 13, 123-141.

- Martelli GP, Savino V. 1988. Fanleaf degeneration. *In*: RC Pearson, AC Goheen (Eds). *Compendium of grape diseases*. APDS Press, 48-49.
- Martínez F, Guerrero F, Gascó G, Urbano P. 2005a. Contaminación por nitratos en suelos fertilizados con vinaza de remolacha. *II Simposio nacional control de la degradación de suelo*. Madrid 6-8 de julio.
- Martínez F, Guerrero F, Urbano P. 2005b. Contaminación por nitratos de los suelos agrícolas fertilizados con vinaza de remolacha frente a la urea y el nitrato amónico. *II Simposio nacional control de la degradación de suelo*. Madrid 6-8 julio.
- Maung O. 1959. Effects of *Meloidogyne incognita acrita* and *Trichodorus christiei* on the nutrients levels of tomato. *Phytopathology* 49, 524.
- Mauro MC, Coutos Thevenot P, Boulay M, Valat L, Barbier P, Walter B, Pinck L. 2000. Analisis of 41 B (*Vitis vinifera* X *V.berlandier*) grapevine rootstocks for grapevine fanleaf virus resistance. *Proc. 7th Internat. Symp. on Grapevine Genetics and Breeding*. Montpellier, France 6-10 July. *Acta Hortic.* 528, 313-319
- Mazzola M, Mullinix K. 2005. Comparative field efficacy of management strategies containing *Brassica napus* seed meal or green manure for the control of apple replant disease. *Plant Dis.* 89, 1207-1213.
- MBTOC. 1998. *Report of the Methyl Bromide Technical Options Committee*. 1998 Assessment of alternatives to methyl bromide, UNEP, Nairobi, Kenia, 354 pp.
- MBTOC. 2007. *2006 Report of the Methyl Bromide Technical Options Committee. 2006 MBTOC Assessment Report*. UNEP, Nairobi, Kenia, 453 pp.
- MBTOC. 2008. *October 2008 Report of the Technology and Economic Assessment Panel. Evaluations of 2008 Critical Use Nominations for Methyl Bromide and Related Matters. Final Report*. UNEP, UNON, Nairobi, Kenia, 111 pp.
- MBTOC. 2009. *November 2009 Report of the 21st Meeting of the parties to the Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer*. UNEP (UNEP/OzL.Pro. 21/9). Port Ghalib, Egypt, 4-8 November, 66 pp.
- MBTOC. 2010. *Report of the Technology and Economic Assessment Panel. Evaluations of 2009 Critical Use Nominations for Methyl Bromide and Related Matters*. Final Report. UNEP, Nairobi, Kenia, (advance).
- Meléndez PL, Powell NT. 1967. Histological aspects of the *Fusarium* wilt-root knot complex in flue-cured tobacco. *Phytopathology* 57, 286-292.
- Mendoza de A, Sequeira de A, Mota M, Pereira AN, Simoes V. 1980. Applicability of immunosorbent electron microscopy (ISEM) for the detection and identification of CM 112 virus in grapevine. *Estação Agronomica Nacional, Oeiras, Portugal. In: AJ Mcginnis (Ed.) Proc. 7th Meeting Int. Counc. Study of Viruses and Virus-like Dis. of the Grapevine*. Niagara Falls, 245-249.

- Minton NA, Jackson CR. 1967. Invasion of peanut pods by *Aspergillus flavus* and other fungi in the presence of root-knot nematodes. *Oléagineux* 22, 543-546.
- Miralles VJ. 1989. Síntomas y muestreo del virus GFLV en la variedad de uva de mesa Italia Alicante 1988. *XIV Reunión del Grupo de Trabajo de la Vid.* MMA.2000. *Libro Blanco del Agua en España. Ministerio de Medio Ambiente. Secretaría de Estado de Aguas y Costas. Dirección General de Obras Hidráulicas y Calidad de las Aguas*, 637 pp.
- Moral del J. 1996. *Estudio Bioecológico de Nematodos del Suelo y su Relación con Síntomas de Virus Vegetales Cultivados de Extremadura: Xiphinema index Thorne et Allen y la Degeneración Infecciosa de la vid.* Tesis Doctoral, Universidad de Extremadura, 210 pp.
- Mumm R, Burow M, Bukovinszkinékiss G, Kazantzidou E, Wittstock U, Dicke M, Gershenzon J. 2008. Formation of simple nitriles upon glucosinolate hydrolysis affects direct and indirect defense against the specialist herbivore, *Pieris rapae*. *J. Chem. Ecol.* 34, 1311-1321.
- Murphy FA, Fauquet CM, Bshop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, May MA o, Summers MD. 1995. *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses.* Springer-Verlag Wien New York, 565 pp.
- Navacerrada G. 1975. Nuevos focos de *Tylenchulus semipenetrans* (Nematoda) en los viñedos españoles. *An. Edafol. Agrobiol.* 34, 113-114.
- Navas A. 1979. *Estudio de los nematodos ectoparásitos y transmisores de virus del género Xiphinema Cobb (Nematoda: Dorylaimida) encontrados en la Cuenca Baja del Alberche. Memoria de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid*, 171 pp.
- Navas A. 1984. Nematodos transmisores de virus en los cultivos de La Rioja. *Berceo* 2, 7-22.
- Navas A, Arias M. 1986. On the distribution and ecology of *Xiphinema index* and *Xiphinema italiae* in Spain. *Nematol. Medit.* 14, 207-215.
- Navas A, Bello A, Arias M. 1988. Ecology and potential distribution of *Xiphinema diversicaudatum* and *Xiphinema pachtaicum* (Nematoda: Longidoridae). *Nematologica* 34, 314-330.
- Nolasco GNB. 1982. *A Diagnose Rápida do Vírus do Urticado (no curto) da Videira Pelo Teste ELISA.* Relatório de actividade do Aluno estagiário do curso de Agronomia, Universidad Técnica de Lisboa, 51 pp.
- Nolasco G, Blas C de, Borja MJ, Torres V, Ponz F. 1992. *Procedimiento para la Detección e Identificación de Patógenos Virales y Subvirales.* Patente P9201232. Registro de la Propiedad Industrial de España.
- Nombela G, Bello A. 1983. Modificaciones al método de extracción de nematodos fitoparásitos por centrifugación en azúcar. *Bol. Serv. Plagas* 9, 183-189.
- Olmeda M, Castillo JS, Bernabeu R, Díaz M. 2003. Regulación de mercados y perspectivas del vino en la UE. *El viñedo y el Vino de Castilla- La Mancha*, Cuenca: Servicio de publicaciones de la Universidad de Castilla- La Mancha, 233 pp.

- Orton Williams KJ. 1973. *Meloidogyne incognita*. CIH Descriptions of Plant Parasitic Nematodes, Set 2, N° 18, 4 pp.
- Orton Williams KJ. 1975. *Meloidogyne arenaria*. CIH Descriptions of Plant Parasitic Nematodes, Set 5, N° 62, 4 pp.
- Ouertani R, Savino V, Minagra A, Boscia D, Castellano MA, Martelli GP, Greco N. 1992. Properties of a previously undescribed grapevine nepovirus from Tunisia. *Arc. Virol.* 26, 107-117.
- Ozores Hampton M, Stansly PA, McSorley R, Obreza TA. 2005. Effects of long-term organic amendments and solarisation on pepper and watermelon growth, yield, and soil fertility. *HorScience* 40, 80-84.
- Padilla V. 1989. *El Síndrome de la Madera Rizada*. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Madrid, 149 pp.
- Palmisano AM, Ambrogioni L. 2000. *Meloidogyne ulmi* sp. n., a root-knot nematode from elm. *Nematol. Medit.* 28, 279-293.
- Pascual JA, Lloret E, Mercader D, Fernández P, Lacasa A. 2008. Implicaciones medioambientales de la biosolarización en cuanto a la lixiviación de nitratos. Estudios sobre columnas de suelo inalteradas. *VIII Congreso SEAE*. 17-20 septiembre, Bullas, Murcia, 97 p.
- Peña Iglesias A. 1972. La selección sanitaria de la vid en España. *II Jornadas Técnicas de La Rioja. Vid y Vino*. Haro, Logroño, 166-177.
- Pérez Camacho F. 1981. Importancia y distribución de enfermedades de etiología supuestamente viral en viñedos de la zona de denominación de origen "Montilla-Moriles". *An INIA/Serv.Agric/N* 15, 151-156.
- Phillis J. 1996. The life cycle of *Xiphinema index* in Cyprus. *Nematol. Medit.* 24, 215-218.
- Piedra Buena A, García Álvarez A, Díez Rojo MA, Bello A. 2006. Use of crop residues for the control of *Meloidogyne incognita* under laboratory conditions. *Pest Manag. Sci.* 62, 919-926.
- Piedra Buena A, García Álvarez A, Díez Rojo MA, Ros C, Fernández P, Lacasa A, Bello A. 2007. Use of pepper crop residues for the control of root-knot nematodes. *Bioresource Technol.* 98, 2846-2851.
- Pinochet J, Bergua J. 1983. Reconocimiento de nematodos fitoparásitos asociados al cultivo de la vid en Cariñena y su posible importancia económica. *ITEA*, 50, 39-42.
- Pinochet J, Cisneros T. 1986. Seasonal fluctuations on nematode populations in three Spanish vineyards. *Rev. nematol.* 9, 391-398.
- Ploeg AT, Maris PC. 1999. Effect of temperature on the duration of the life cycle of a *Meloidogyne incognita* population. *Nematology* 1, 89-393.
- Porrás M, Romero E, Barrau C, Romero F. 2008. Efecto de la biofumigación con *Brassica carinata* y de la solarización sobre *Phytophthora cactorum* en el cultivo de la fresa. *XIV Congreso SEF*, 15-19 sept., Lugo, 361 p.
- Porter DM, Powell NT. 1967. Influence of certain *Meloidogyne* species on *Fusarium* wilt development in flue-cured tobacco. *Phytopathology* 57, 282-285.

- Porter IJ, Mattner SW, Lazarovits G. 2008. Soil biofumigation – a strategy for the new world or a complexity too hard to get right?. *Proc. 3th International Biofumigation Symposium*. Canberra, Australia, 21-25 July, 12 p.
- Porter IJ, Trinder L, Partington D. 2006. Special report validating the yield performance of alternatives to methyl bromide for preplant fumigation. *TEAP/MBTOC Special Report*, UNEP, Nairobi, Kenia, mayo 2006, 97 pp.
- Prot JC, Van Gundy SD. 1981. Influence of photoperiod and temperature on migrations of *Meloidogyne* juveniles. *J. Nematol.* 13, 217-220.
- Prota U. 1961. La degenerazione infettiva del Vitigno “Cannonan”. Parte II: Comparsa, sucesione, ripetizione dei sintomi. Produzioni delle piante degenerate. *Notiz. Mal. Piante* 55, 53-67.
- Prota U. 1970. Sull'influenza di alcune caratteristiche del suolo e dell'età delle viti sulla distribuzione di *Xiphinema index* Thorne et Allen in Sardegna. *Studi Sassar. Sez. III.* 18, 1-12.
- Prota U, Garau R. 1973. Indagini sulla biologia di *Xiphinema index* Thorne et Allen in vigneti sardi. *Nematol. Medit.* 1, 36-54.
- Provedo J, Fernández Sevilla JL. 1973. Planteamiento del problema de las virosis de la vid a nivel regional. *IV Jornadas de Estudio AIDA*, 16 pp.
- Radewald JD, Raski DJ. 1962. A study of the life cycle of *Xiphinema index*. *Phytopathology* 52, 748-749.
- Rahmmah A, Hirschmann H. 1990. Morphological comparison of three host races of *Meloidogyne javanica*. *J. Nematol.* 22, 56-68.
- Ramsdell DC, Andrews RW, Gillet JW, Morris CE. 1979. A comparison between enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and *Chenopodium quinoa* for detection of peach rosette mosaic virus in Concord grapevines. *Plant Dis. Rep.* 63, 74-78.
- Ramsdell DC, Myers RL. 1974. Peach and rosette mosaic virus symptomatology and nematode associated with grapevine degeneration in Michigan. *Phytopatology* 64, 1174-1178.
- Raski DJ, Goheen AC. 1988. Comparison of 1,3-dichloropropene and methyl bromide for control of *Xiphinema index* and grapevine degeneration complex. *Am. J. Enol. Viticult.* 39, 334-336.
- Raski DJ, Goheen AC, Lider LA, Meredith CP. 1983. Strategies again the grapevine fanleaf virus and its nematode vectors. *Plant Dis.* 67, 335-339.
- Raski DJ, Hewitt WM. 1960. Experiments with *Xiphinema index* as a vector of fanleaf of grapevines. *Nematologica* 5, 166-170.
- Raski DJ, Hewitt VB. 1963. Plant parasit Nematodes as vectors of plant viruses. *Phytopathology* 53, 39-47.
- Raski DJ, Hewitt WM, Goheen AC, Taylor CE. 1965. Survival of *Xiphinema index* and reservoirs of fanleaf virus in fallowed vineyard soils. *Nematologica* 11, 349-352.
- Raski DJ, Krusberg LR. 1984. Nematode parasites of grapes and other small fruits. In: Nickle WR (Ed.). *Plant and Insect Nematodes*. Marcel Dekker, New York, 457-506.

- Raski DJ, Schmitt RV, Luvisi DA, Kissler JJ. 1973. 1,3-D and methyl bromide for control of root-knot and other nematodes in vineyard replants. *Plant Dis. Rep.* 57, 619-623.
- Reudel M. 1971. Vorkommen einiger Arten der Gattung *Xiphinema* in Pfalz und Rheinhessen. *Wein. Kell.* 18, 505-520.
- Ridolfi M, Patumi M, D'Addabbo T, Sassanelli N, Lemos RJ. 2001. Enzymatic response of olive varieties to parasitism by *Xiphinema index* (Nematoda: Longidoridae). *Russian J. Nematol.* 9, 25-32.
- Ripoll F. 1980. *Contribució a L'estudi de la Nematofauna Peri-Radicular de la Vinya (Vitis vinifera L.) a dos Camps del Vallés Occidental (Barcelona)*. Memoria de Licenciatura. Fac. de Ciencia Univ. Autónoma de Barcelona, 111 pp.
- Ripoll F, Mínguez S. 1984. Presencia de *Xiphinema* spp. i *M. xenoplax* en les vinyes del Penedès. *X Jornadas de productos fitosanitarios*, 23-24 de Octubre 1984, Barcelona, 123-128.
- Ritter M. 1972. Rôle économique et importance de *Meloidogyne* en Europe et dans le bassin Méditerranéen. *OEPP/EPPO Bulletin* 6, 17-22.
- Rivas Martínez S. 1987. *Mapa de Series de Vegetación de España y Memoria*. Ed. ICONA. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Memoria, 268 pp.
- Roberts IM, Brown DJF. 1980. Detection of six nepoviruses in their vectors by immunosorbent electron microscopy. *Ann. appl. Biol.* 96, 187-192.
- Roberts PA. 1987. The influence of planting date of carrot on *Meloidogyne incognita* reproduction and injury to roots. *Nematologica* 33, 335-342.
- Roberts PA, Van Gundy SD, McKinney HE. 1981. The effects of soil temperature and planting date of wheat on *Meloidogyne incognita* reproduction, soil populations and grain yield. *J. Nematol.* 13, 338-345.
- Robertson L, Díez Rojo MA, López Pérez JA, Bello A, Piedra Buena A, Escuer M, López Cepero J, Martínez C. 2010. Characterization of *Meloidogyne arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita*, and *M. javanica* populations from Spain parasitizing tomato (*Solanum lycopersicum* L.) carrying the *Mi* resistance gene. *Crop Prot.* (en revisión).
- Robertson L, Díez Rojo MA, López Pérez JA, Piedra Buena A, Escuer M, López Cepero J, Martínez C, Bello A. 2009. New host races of *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*, and *M. javanica* from horticultural regions of Spain. *Plant Dis.* 93, 180-184.
- Robertson L, López Pérez JA, Bello A, Díez Rojo MA, Escuer M, Piedra Buena A, Ros C, Martínez C. 2006. Characterization of *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* and *M. hapla* populations from Spain and Uruguay parasitizing pepper (*Capsicum annum* L.). *Crop Prot.* 25, 440-445.
- Robertson L, López Pérez JA, Díez Rojo MA, Escuer M, Piedra Buena A, Bello A. 2005. Virulencia de nematodos formadores de nódulos del género *Meloidogyne* y la reconversión del viñedo. *Actas XI Jornadas Técnicas de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica*.

- Robertson WM, Henry CE. 1986. An association of carbohydrates with particles of arabis virus retained within *Xiphinema diversicaudatum*. *Ann. Appl. Biol.* 109, 299-305.
- Rodríguez Kábana R, Morgah Jones G, Chet Y. 1987. Biological control of nematodes: Soil amendments and microbial antagonists. *Plant and Soil* 100, 237-247.
- Roggen DR. 1966. On the morphology of *Xiphinema index*, reared on grape fanleaf virus infected grapes. *Nematologica* 12, 287-296.
- Romero E, Zurera C, Porrás M, Barrau C, Romero I. 2008. Evaluación del potencial biofumigante de *Brassica* spp. para el control de *Phytophthora cactorum* y *Verticillium dahliae*. *XIV Congreso de la SEF*, 15-19 septiembre, Lugo, 365 p.
- Ros C, Guerrero MM, Lacasa CM, Martínez V, Cano A, Martínez MC, González A, Lacasa A. 2008. Control de nematodos en cultivos de pimiento mediante biosolarización e injerto. *XIV Congreso de la SEF*, 15-19 septiembre, Lugo, 381 p.
- Rowhani A, Walker M, Rokni B. 1992. Sampling strategies for the detection of grapevine fanleaf virus and the grapevine strain of tomato ringspot virus. *Vitis* 31, 35-44.
- Rüdel M. 1986. Grapevine damage induced by particular virus-vector combinations. *Phytopathol. Medit.* 24, 183-185.
- Rüdel M. 1988. Schadnematoden im Weinbau und ihre Bekämpfung. *Rebe und Wein, Weisberg* 42, 29-31.
- Rüdel M, Alebrand M, Altamayer B. 1983. Investigations of the use of ELISA-test to detect different grape viruses. *Wein-Wiss* 38, 177-185.
- Sahebani N, Hadavi N. 2008. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2016-2020.
- Sahoo NK, Sudershan G, Eapen SJ. 2000. Description of *Meloidogyne piperi* sp. n. (Nematoda: Meloidogynidae) isolated from the roots of *Piper nigrum* in South India. *Indian J. Nematol* 30, 203-209.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sandground JH. 1923. "Oxyuris incognito" or *Heterodera radicum*. *J. Parasitol.* 10, 92-94.
- Santos M, Martín F, Diáñez F, Carretero F, García Alcazar M, de Cara M, Tello J.C. 2008. Efecto de la aplicación de vinaza de vino como biofertilizante y en el control de enfermedades en el cultivo de pepino. *VIII Congreso SEAE*, 16-20 septiembre, Bullas, Murcia, 90 p.
- Santos M, Vicente N, Diáñez F, Cara de M, Tello JC. 2007. Vinazas y hongos del suelo. *Agroecología* 2, 39-45.

- Sasanelli N, Coiro M, D'Addabbo T, Lemos RJ, Ridolfi M, Lamberti F. 1999. Reaction of an olive cultivar and an olive rootstock to *Xiphinema index*. *Nematol. medit.* 27, 253-256.
- Sasser JN. 1954. Identification and host-parasite relationships of certain root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Bulletin of the Maryland Agricultural Experiment Station* n° A-77 (Technical) 31 pp.
- Sasser JN, Freckman DW. 1987. A world perspective on nematology: The role of the society. In: JA Veech, DW Dickson (Eds). *Vistas on Nematology: A Commemoration of the Twenty-fifth Anniversary of the Society of Nematologist*. Hyaltsville, Maryland, USA, 7-14.
- Schneider JJ. 1969. Les nematodes parasites des begonias. *Phytoma* 21, 9-12.
- Scotto la Massese C, Minot TC, Voisin R, Castaing LRM, Fabre A. 1988. Relationship between soil type, previous crop and age of plantation on the composition and the distribution of the nematofauna associated with vineyards of the south-east of France. *Act. Oecol., Oecol. Aplic.* 9, 137.
- Shanmuganathan N, Fletcher G. 1982. Enzyme-linked immunosorbent Assay to detect fanleaf virus in grapevines grown in containers. *Plant Dis.* 66, 704-707.
- Siddiqi MR. 1986. *Xiphinema index*. CIH Descriptions of Plant-parasitic Nematode, Set 3, n°45, 4 pp.
- Siddiqi MR. 2000. *Tylenchida Parasites of Plants and Insects*. CABI, UK. 833 pp.
- Society of Nematologists. 1971. Estimated crop losses from plant-parasitic nematodes in the United States. *Spec. Publ. Soc. Nematologist*, USA 1, 7 pp.
- Stirling GR. (Ed.) 1991. *Biological Control of Plant Parasitic Nematodes: Progress, Problem and Prospects*. CAB International, Wallingford, Oxon, 282 pp.
- Stobbs L, Schagen JG van. 1996. Occurrence of peach rosette mosaic virus on grapevine in Southern Ontario. *Plant Dis.* 80, 105.
- Sultan SA, Ferris H. 1991. The effect of soil moisture and soil particle size on the survival and population increase of *Xiphinema index*. *Rev. Nématol.* 14, 345-351.
- Sumner DR, Johnson AW. 1972. The effect of nematodes and crop sequence on Fusarium wilt of watermelon. *Phytopathology* 62, 7t91.
- Talavera M, Magunacelaya JC, Tobar A. 1999. Plant parasitic nematodos from a forest tree nursery in Southern Spain with some notes about the influence of soil storage on the quantitative recovery of *Meloidogyne arenaria*. *Nematology* 1, 261-266.
- Talavera M, Verdejo Lucas S, Ornat C, Torres J, Vela MD, Macias FJ, Cortada L, Arias DJ, Valero J, Sorribas FJ. 2009. Crop rotations with *Mi* gene resistant and susceptible tomato cultivars for management of root-knot nematodes in plastic houses. *Crop Prot.* 28 662-667.

- Tanne E. 1980. The use of ELISA for the detection of some NEPO-viruses in grapevines. *Proc. 7th Int. C. Viruses and Vectors of Grapevines*. Niagara Falls, 293-296.
- Tarjan AC. 1969. Variation within the *Xiphinema americanum* group. *Nematologica* 15, 241-252.
- Taylor CE, Raski DJ. 1964. On the transmission of grape fanleaf by *Xiphinema index*. *Nematologica* 10, 489-495.
- Taylor CE, Robertson WM. 1970. Sites of virus retention in the alimentary tract of the nematode vectors, *Xiphinema diversicaudatum* (Micol.) and *X.index* (Thorne and Allen). *Ann. Appl. Biol.* 66, 375-380.
- TEAP. 2006. Report of the technology and economic assessment panel, October 2006. Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer, UNEP, Nairobi.
- Thames WHJr, Langley BC. 1967. Effects of sorghum rotations on yield of Spanish peanuts from plots infested with *Meloidogyne arenaria*. *Phytopathology* 57, 464.
- Tobar Jiménez A, Pemán Medina C. 1970. Especies de *Xiphinema* Cobb 1913 (Nematoda: Dorylaimida) y la "Degeneración infecciosa" de los viñedos de Jerez I. Valoración de los niveles de población de nematodos. *Rev. Ibér. Parasitol.* 30, 25-26.
- Toledo Paños J, Albuje Sánchez E, Serra Aracil J. 2003. Prospección de virosis en variedades de uva de mesa en el Medio Vinalopó. *XXVIII Reunión del Grupo de Trabajo de la Vid.*
- Torres JM, Díez Rojo MA, Robertson L, López Pérez JA, de Cara M, Tello J, Bello A. 2007. *Nematodos Fitoparásitos del Género Meloidogyne Goeldi, 1892 y su Manejo Ecológico en Cultivos Enarenados de Almería*. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, Madrid, 203 pp.
- Treskova VS. 1972. [Gall nematodes and *Fusarium* in tomatoes] *In: Nematody rastenií. Voronezh, USSR:Tsentral' no-Chernozemnoe Knizhnoe Isdatel'stvo* 59-66.
- Trudgill DL. 1995. An assessment of the relevance of thermal time relationships to nematology. *Fund. Appl. Nematol.* 18, 407-417.
- Trudgill DL, Blok VC. 2001. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annu. Rev. of Phytopathol.* 39, 53-77.
- Trudgill DL, Brown DJF, McNamara DG. 1983. Methods and criteria for assessing the transmission of plant viruses by longidorid nematodes. *Rev. nématol.* 6, 133-141.
- Urbano P. 1992. *Tratado de Fitotecnia General*. 2ª Edición. Mundi Prensa, 895 pp.
- Urbano P. 2002a. *Fitotecnia: Ingeniería de la Producción Vegetal*. Mundi Prensa, 528 pp.
- Urbano P. 2002b. Fertilización orgánica con vinazas de alcoholera. *Vida rural* 155, 50-52.

- Urbano P. 2008. *Fitotecnia. Ingeniería de la Producción Vegetal*. 2ª Edición. Edit. Mundi-Prensa, 528 pp.
- Valcarce E, Laborda E. 1980. El nematodo de los cítricos. *Tylenchulus semipenetrans* Cobb, 1913. Estudios de especificidad. *An. Edafol. Agrobiol.* 39, 2087-2092.
- Van Regenmortel MHV, S Burckard. 1980. Detection off a whide specktrum of tobacco Mosaic Virus strain by indierect enzyme-linked Inmunosorbent Assay (ELISA). *Virology* 106, 327-334.
- Van Gundy SD, Munecke D, Bricker J, Minter R. 1972. Response of *Meloidogyne incognita*, *Xiphinema index* and *Dorylaimus* sp. to methyl bromide fumigation. *Phytopathology* 62, 191-192.
- Verdejo Lucas S, Cortada L, Sorribas FJ, Ornat C. 2008. Selection of virulent population of *Meloidogyne javanica* by repetaed cultivation of *Mi* tomato rootstocks in the field. *Proc. of Fifth Internacional Congress of Nematology*, 13-18 julio, Brisbane, Australia.
- Verdejo Lucas S, Sorribas FJ. 2008. Resistance response of the tomato rootstock SC 6301 to *Meloidogyne javanica* in a plastic house. *Eur. J. Plant Pathol.* 121, 103-107.
- Vicente M, Fernández Rebollo P, Trapero A, Sánchez ME. 2008. Eficacia *in vitro* de biofumigantes vegetales y enmiendas orgánicas en el control de *Phytophthora cinnamomi*. XVI Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, 15-19 de septiembre, Lugo, P 222, 364 p.
- Vilaseca JC. 2007. *Papel Biofumigante de los Restos de Cosecha en el Control de ToMV, PepMV y O. brassicae*. Tesis doctoral. Departamento de Ecosistemas Agroforestales, Universidad Politécnica de Valencia, 478 pp.
- Villamar LP, Melero JM, Basallote MJ, Prados AM. 2008. Efecto de los aportes de gallinaza al suelo y de las temperaturas de incubación en el control de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. XIV Congreso de la SEF, 15-19 septiembre, Lugo, 368 p.
- Vuittenez AJ. 1970. Fanleaf of grapevine. In: Frazier (Ed.) *Virus Diseases of Small Fruits and Grapevines*. University of California, 217-228.
- Wachira PM, Kimenju JW, Okoth SA, Mibey RK. 2009. Stimulation of nematode-destroying fungi by organic amendments applied in management of plant parasitic nematode. *Asian J. Plant Sci.* 8, 153-159.
- Walter B, Demangeat G. 1995. Les virus du court-noué de la vigne. II. Les voies de la contamination. *Progrés Agricole et Viticole* 112, 295-303.
- Walter B, Martelli CP. 1996. Selection clonal de la vigne; selection sanitaire et Selection promologique. Influence des viroses et qualité. *OIV*, 35 pp.
- Walter B, Vuittenez AJ, Kuszala J, Stocky G, Burckard J, van Regenmortel H. 1983. Serological detection of fanleaf virus of grapes by ELISA. *Agr. Sc. Prod. Veg. Environ.* Paris. INRA 4, 527-534.
- Weischer B. 1974. *Xiphinema*-Arten. *Europäischer Weinberge* 21, 61-76.

- Weischer B. 1975. Ecology of *Xiphinema* and *Longidorus*. In: F Lamberti, CE Taylor, JW Seinhorst (Eds). *Nematode Vectors of Plant Viruses*. Plenum Press, 291-306.
- Werland Ardaiz C, Pérez Camacho F. 1993. Nematodos vectors of viruses in the "Denominación de origen Condado de Huelva", Spain. In: F Pérez Camacho, M Medina (Eds). *International Symposium on Viticultura and Enology. Acta Hort.* 388, 31-35.
- Williamson VM, Gleason CA. 2003. Plant-nematode interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 327-333.
- Winfield AL, Cooke DA. 1975. The ecology of *Trichodorus* In: F Lamberti, Taylor CE, Seinhorst JW (Eds) *Nematode Vectors of Plant Viruses*. Plenum Press, London, 309-341.
- Winoto Suatmadji R. 1968. *Studies in the Effect of Tagetes Species on Plant Parasitic Nematodes*. Veenman H and Zonen NV, Wageningen, 132 pp.
- Xiao J, Zhu J, Chen S, Ruan W, Miller C. 2007. A novel use of anaerobically digested liquid swine manure to potentially control soybean cyst nematode. *J. Environ. Sci. Health* 42, 749-757.
- Yao LX, Li GL, Tu SH, Sulewski G, He ZH. 2007. Salinity of animal manure and potential risk of secondary soil salinization through successive manure application. *Sci. Total Environ.* 383, 106-114.
- Yassin AM. 1974. Root-knot nematodes in the Sudan and their chemical control. *Nematol. Medit.* 2, 103-112.
- Zanón MJ. 2009. *Efecto de la Biofumigación y Biosolarización en el Control de Bacterias Fitopatógenas*. Tesis Doctoral, Escuela Universitaria de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politecnica de Valencia, 301 pp.
- Zanón MJ, Vilaseca JC, Rodríguez JM, Heliodoro JS, Jordá C. 2004. La biofumigación como alternativa ecológica para el control de virus y bacterias fitopatógenas. *VI Congreso de la SEAE*, 27 septiembre-2 octubre, Almería, 691-699.
- Zhou XG, Everts KL. 2004. Suppression of *Fusarium* wilt of watermelon by soil amendment with hairy vetch. *Plant Disease* 88, 1357-1365.
- Zinati GM. 2005. Compost in the 20th century: A tool to control plant diseases in nursery and vegetable crops. *HortTechnology* 15, 61-66.

Tabla 1. Nematodos en suelo antes de la biodesinfección, Invernadero I (Indiv. 100 cc⁻¹ suelo). Muestreo a 0-20 y 20-40 cm. El Perelló (Sueca, Valencia) (2-8-2006).

Muestra	Peso(g)	<i>Meloidog.</i>	Dorilái.	Rabdít.	Monónq.	Enquit.
Muestreo 0-20 cm		Vinaza de vino 4 l/m²				
28407 V4AA	115	24	22	106	4	4
28408 V4BA	114	24	18	46	10	0
28409 V4CA	112	36	40	120	16	2
28410 V4DA	122	28	36	94	8	2
Total		112	116	366	38	8
Media		28	29	92	10	2
		Vinaza de vino 2 l/m²				
28415 V2AA	115	8	18	82	4	0
28416 V2BA	117	20	24	64	14	2
28417 V2CA	113	0	10	118	8	0
28418 V2DA	121	2	30	128	14	0
Total		30	82	392	40	2
Media		8	21	98	10	1
		Testigo solarizado				
28419 TAA	120	14	20	64	4	0
28420 TBA	118	18	20	164	0	6
28421 TCA	117	40	18	86	8	4
28422 TDA	118	2	28	76	14	6
Total		74	86	390	26	16
Media		19	22	98	7	4
Muestreo 20-40 cm		Vinaza de vino 4 l/m²				
28423 V4AB	144	0	14	82	0	0
28424 V4BB	150	2	6	20	0	0
28425 V4CB	150	0	4	18	4	0
28426 V4DB	155	34	0	8	4	0
Total		36	24	128	8	0
Media		9	6	32	2	0
		Vinaza de vino 2 l/m²				
28431 V2AB	144	16	18	22	4	0
28432 V2BB	150	0	12	30	0	10
28433 V2CB	150	0	8	24	0	0
28434 V2DB	147	0	16	30	0	4
Total		16	54	106	4	14
Media		4	14	27	1	4
		Testigo solarizado				
28435 TAB	148	10	24	36	0	0
28436 TBB	148	0	16	44	2	0
28437 TCB	141	30	6	46	10	2
28438 TDB	147	0	4	82	8	0
Total		40	50	208	20	2
Media		10	13	52	5	1

Meloidog. = *Meloidogyne*; Dorilái. = Doriláimidos; Rabdít. = Rabdítidos; Monónq. = Monónquidos; Enquit. = Enquitreidos.

Tabla 2. Influencia de la biodesinfección y solarización en los nematodos del suelo (Indiv. 100 cc⁻¹ suelo). Muestreo a 0-20 y 20-40 cm. El Perelló (Sueca, Valencia) (30-8-2006).

Muestra	Peso (g)	Meloidog.		Dorilái.		Rabdít.		Monónq.		Enquit.
		V	M	V	M	V	M	V	M	
Muestreo de 0-20 cm										
Vinaza de vino 4 l/m²										
28508 V4AA	106	0	4	2	6	6	12	0	0	2
28509 V4BA	119	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28510 V4CA	117	0	0	8	6	12	12	16	0	2
28511 V4DA	125	2	2	6	0	2	6	0	0	0
Total		2	6	16	12	20	24	16	0	4
Media		0,5	2	4	3	5	6	4	0	1
Vinaza de vino 2 l/m²										
28516 V2AA	115	0	6	12	2	4	8	0	0	4
28517 V2BA	127	0	4	4	0	4	16	0	0	0
28518 V2CA	120	0	0	4	2	16	2	4	0	0
28519 V2DA	127	0	4	2	8	2	2	0	0	0
Total		0	14	22	12	26	20	4	0	4
Media		0	4	6	3	7	5	1	0	1
Testigo										
28520 TAA	119	0	14	0	12	4	8	0	0	0
28521 TBA	121	0	0	10	14	30	10	0	0	0
28522 TCA	120	0	18	4	2	4	4	0	0	0
28523 TDA	124	0	14	4	20	26	4	4	0	0
Total		0	46	18	48	64	26	4	0	0
Media		0	12	5	12	16	7	1	0	0
Muestreo de 20-40 cm										
Vinaza de vino 4 l/m²										
28524 V4AB	142	2	12	4	0	6	8	2	2	0
28525 V4BB	143	0	6	8	2	10	34	0	0	0
28526 V4CB	144	0	8	4	2	6	14	0	0	0
28527 V4DB	138	0	8	0	0	2	54	0	0	0
Total		2	34	16	4	24	110	2	2	0
Media		0,5	9	4	1	6	28	0,5	0,5	0
Vinaza de vino 2 l/m²										
28532 V2AB	141	0	2	6	4	2	6	0	4	0
28533 V2BB	149	0	6	0	0	2	14	6	0	0
28534 V2CB	159	0	6	6	0	8	12	0	0	0
28535 V2DB	142	0	0	2	2	22	0	0	0	0
Total		0	14	14	6	34	32	6	4	0
Media		0	4	4	2	9	8	2	1	0
Testigo										
28536 TAB	143	32	18	4	0	38	14	2	0	0
28537 TBB	142	0	0	4	2	32	0	0	0	2
28538 TCB	132	0	4	2	0	16	4	0	0	0
28539 TDB	134	0	0	4	0	36	4	0	0	0
Total		32	22	14	2	122	22	2	0	2
Media		8	6	4	0,5	31	6	0,5	0	1

Meloidog. = *Meloidogyne*; Dorilái. = Dorilaimidos; Rabdít. = Rabdítidos; Monónq. = Monónquidos; Enquit. = Enquitreidos; M= muertos; V=vivos.

Tabla 3A. Nematodos en suelo antes de la biodesinfección e Índice de nodulación, Invernadero II (Indiv. 100 cc⁻¹ suelo). Muestreo a 0-20 cm. El Perelló (Sueca, Valencia).

Muestra	Peso (g)	<i>Meloidog.</i>	Dorilái.	Rabdít.	Monónq.	Enquit.	Índice Nodulación
Vinaza de vino 2 l/m²							
28606-V2A	117	74	14	154	0	20	3
28607-V2B	120	72	12	96	4	38	4
28608-V2C	119	88	24	222	4	24	1
28609-V2D	117	70	16	94	2	38	1
Total		304	66	566	10	120	9
Media		76	16	94	3	30	2
Vinaza de vino 1 l/m²							
28600-V1A	116	34	10	72	2	50	2
28601-V1B	114	186	10	78	2	40	5
28602-V1C	120	146	14	84	4	72	3
28603-V1D	119	64	22	62	6	18	5
28604-V1E	126	50	20	66	8	28	1
28605-V1F	115	64	14	68	4	20	3
Total		544	90	430	26	228	19
Media		91	15	72	4	38	3
Testigo 1							
28610-T1A	120	48	12	54	4	16	5
28611-T1B	116	84	12	134	2	26	5
28612-T1C	123	48	24	90	2	8	3
28613-T1D	111	48	14	40	2	2	3
Total		228	62	318	10	52	16
Media		57	16	80	3	13	4
Testigo 2							
28614-T2A	120	96	16	74	2	20	1
28615-T2B	119	76	10	56	6	12	4
28616-T2C	123	94	24	98	6	16	3
28617-T2D	115	70	30	60	8	14	4
28618-T2E	122	44	28	74	8	18	1
28619-T2F	116	42	10	34	0	10	2
Total		422	118	396	30	90	15
Media		70	20	66	5	15	3

Meloidog. = *Meloidogyne*; Dorilái. = Dorilaimidos; Rabdít. = Rabdítidos; Monónq. = Monónquidos; Enquit. = Enquitreidos.

Tabla 3B. Nematodos en suelo antes de la biodesinfección e Índice de nodulación, Invernadero II (Indiv. 100 cc⁻¹ suelo). Muestreo a 20-40 cm. El Perelló (Sueca, Valencia).

Muestra	Peso (g)	<i>Meloidog.</i>	Dorilái.	Rabdít.	Monónq.	Enquit.	Índice Nodulación
Vinaza de vino 2 l/m²							
28626-V2A	120	40	18	32	8	16	2
28627-V2B	122	16	14	42	4	18	3
28628-V2C	119	16	6	28	4	22	2
28629-V2D	130	20	0	38	4	4	3
Total		92	38	140	20	60	10
Media		15	9	35	5	15	3
Vinaza de vino 1 l/m²							
28620-V1A	119	26	14	56	4	28	4
28621-V1B	128	116	12	80	0	16	6
28622-V1C	125	24	10	60	6	26	5
28623-V1D	131	58	8	28	2	12	7
28624-V1E	124	8	8	28	8	8	3
28625-V1F	123	22	8	18	4	4	2
Total		254	60	270	24	94	27
Media		42	6	45	4	16	5
Testigo 1							
28630-T1A	130	28	10	60	4	6	6
28631-T1B	124	64	16	40	6	22	7
28632-T1C	124	60	8	54	0	8	4
28633-T1D	122	10	20	48	0	4	3
Total		254	54	202	10	40	20
Media		64	14	51	3	10	2
Testigo 2							
28634-T2A	123	40	8	80	8	16	1
28635-T2B	128	22	10	92	8	10	1
28636-T2C	128	0	4	38	6	0	3
28637-T2D	141	10	4	28	4	4	5
28638-T2E	121	4	12	24	8	0	2
28639-T2F	122	4	8	36	4	6	3
Total		80	46	470	38	36	15
Media		13	8	78	6	6	3

Meloidog. = *Meloidogyne*; Dorilái. = Dorilaimidos; Rabdít. = Rabdítidos; Monónq. = Monónquidos; Enquit. = Enquitreidos.

Tabla 4A. Influencia de la biodesinfección con vinaza de vino sobre los nematodos del suelo, Invernadero II (Indiv. 100 cc⁻¹suelo). Muestreo de 0-20 cm. El Perelló (Sueca, Valencia).

Muestra	Peso(g)	<i>Meloidog.</i>		Dorilái.		Rabdít.		Monónq.		Enquitr.
		V	M	V	M	V	M	V	M	
Vinaza de vino 2 l/m²										
28706-V2A	126	14	4	32	0	50	12	4	0	34
28707-V2B	118	16	8	28	0	72	8	4	0	32
28708-V2C	127	18	0	20	0	44	4	4	0	8
28709-V2D	125	36	8	26	0	118	10	4	0	10
Total		84	20	106	0	284	34	16	0	84
Media		21	5	27	0	71	9	4	0	21
Vinaza de vino 1 l/m²										
28710-V1A	127	8	0	24	0	46	6	2	0	0
28711-V1B	120	14	0	12	0	48	6	0	0	2
28712-V1C	126	32	6	14	0	28	12	0	0	6
28713-V1D	128	24	4	14	0	44	6	2	0	8
28714-V1E	126	36	8	6	0	68	8	2	0	12
28715-V1F	129	12	4	14	0	34	8	2	0	8
Total		180	22	84	0	268	46	8	0	36
Media		30	4	14	0	45	8	2	0	6
Testigo 1										
28720-T1A	112	82	10	12	4	54	16	2	0	14
28721-T1B	115	126	4	30	0	32	8	2	0	58
28722-T1C	112	130	6	30	0	74	8	2	0	38
28723-T1D	112	126	4	28	4	58	8	8	0	16
Total		464	24	100	8	218	40	14	0	126
Media		116	6	25	2	55	10	4	0	32
Testigo 2										
28724-T2A	114	26	0	24	0	94	0	4	0	44
28725-T2B	107	23	0	6	0	44	4	0	0	20
28726-T2C	106	8	4	8	0	48	10	4	0	10
28727-T2D	112	16	0	8	0	58	4	2	0	24
Total		73	4	46	0	2441	18	10	0	98
Media		18	1	12	0	61	5	3	0	25

Meloidog. = *Meloidogyne*; Dorilái. = Dorilaimidos; Rabdít. = Rabdítidos; Monónq. = Monónquidos; Enquit. = Enquitreidos; M= muertos, V= vivos.

Tabla 4B. Influencia de la biodesinfección con vinaza de vino sobre los nematodos del suelo, Invernadero II (Indiv. 100 cc⁻¹ suelo). Muestreo 20-40 cm. El Perelló (Sueca, Valencia).

Muestra	Peso(g)	<i>Meloidog.</i>		Dorilái.		Rabdít.		Monónq.		Enquitr.
		V	M	V	M	V	M	V	M	
Vinaza de vino 2 l/m²										
28728-V2A	128	6	12	10	0	58	4	6	2	60
28729-V2B	115	8	10	10	2	36	8	0	2	12
28730-V2C	131	4	18	4	0	30	12	2	0	24
28731-V2D	125	0	16	12	4	16	6	2	0	0
Total		18	56	38	6	140	30	10	4	96
Media		5	14	10	2	35	8	3	1	24
Vinaza de vino 1 l/m²										
28732-V1A	121	4	0	14	4	22	4	2	0	0
28733-V1B	120	6	0	16	2	30	4	2	0	0
28734-V1C	126	12	4	20	4	32	10	2	2	4
28735-V1D	123	18	0	8	4	22	6	4	0	0
28736-V1E	120	20	4	4	4	26	0	4	4	6
28737-V1F	118	14	4	14	0	6	6	2	14	12
Total		74	12	76	18	160	30	16	20	22
Media		12	2	13	3	27	5	3	3	4
Testigo 1										
28742-T1A	110	24	4	10	0	58	4	4	0	6
28743-T1B	114	158	22	12	0	26	0	0	0	20
28744-T1C	110	36	6	10	0	48	0	2	0	4
28745-T1D	115	168	4	12	0	30	0	4	0	8
Total		386	36	44	0	162	4	10	0	38
Media		97	9	11	0	41	1	3	0	10
Testigo2										
28746-T2A	117	8	4	10	0	56	0	2	0	10
28747-T2B	124	4	0	10	0	32	4	0	1	2
28748-T2C	120	4	0	6	0	72	6	0	0	2
28749-T2D	125	12	8	12	0	32	0	2	0	4
Total		28	12	38	0	192	10	4	1	18
Media		7	3	10	0	48	3	1	0,25	5

Meloidog. = *Meloidogyne*; Dorilái. = Dorilaimidos; Rabdít. = Rabdítidos; Monónq. = Monónquidos; Enquit. = Enquitreidos; M= muertos, V= vivos.



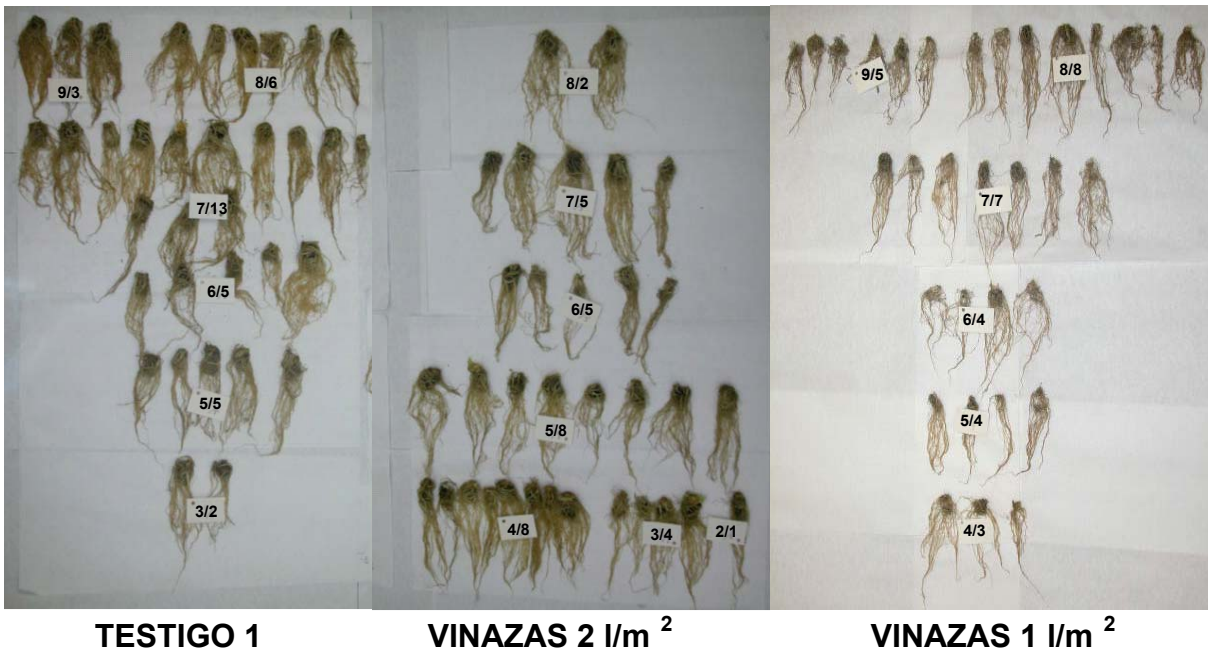
Figura 1. Biodesinfección con vinaza de vino y solarización. El Perelló (Sueca, Valencia).



Figura 2. Recolección del cultivo de repollo chino (*Brassica juncea*) después de la biodesinfección. El Perelló (Sueca, Valencia).



Figura 3. Raíz de pepino infectado por *M. incognita* (Índice 9). El Perelló (Sueca, Valencia).



TESTIGO 1

VINAZAS 2 l/m²

VINAZAS 1 l/m²

Figura 4. Raíces de apio agrupadas por tratamiento y por índices de nodulación. El Perelló (Sueca, Valencia).



Figura 5. Cebada: A. zona con vinaza de vino; B. testigo. El Pedernoso (Cuenca).



Figura 6. Cereal tratado con vinaza de vino. El Pedernoso (Cuenca).

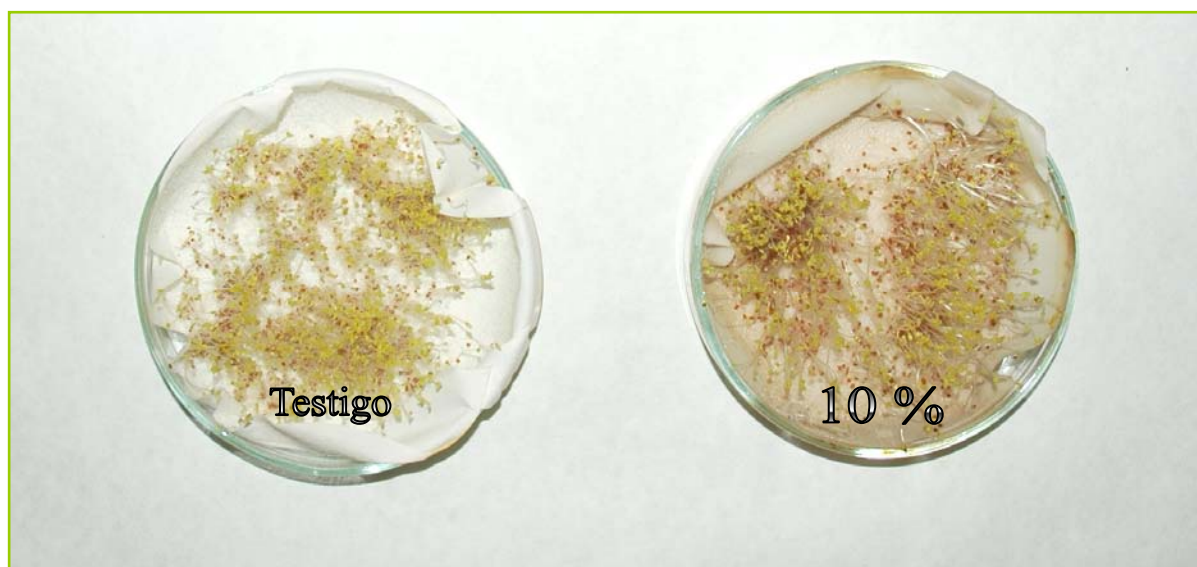


Figura 7. Efecto de la aplicación de un 10% v:v de vinaza de vino en la germinación de semillas de *Lepidium sativum* L.



Figura 8. Aplicación de vinaza de vino en viñedo. Membrilla (Ciudad Real).