

*Thes.*

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

*1 Ejemplar  
11-18*

**ANALISIS DE LOS METODOS TAXONOMICOS USADOS EN  
LA IDENTIFICACION DE LAS ESPECIES DEL GENERO  
Meloidogyne (Goeldi, 1887) Chitwood, 1949.**

**T E S I S**

Que para obtener el titulo de :

**B I O L O G O**

**P r e s e n t a :**

**DELTA CASTILLO FERNANDEZ**

**MEXICO, D. F**

**1 9 7 9**

**6343**

*164/p*

*28*





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## I N D I C E

	Pág.
I. RESUMEN.	1
II. INTRODUCCION.	3
III. REVISION BIBLIOGRAFICA.	13
A.- Características del género <u>Meloidogyne</u> .	13
a) Antecedentes históricos.	13
b) Clasificación zoológica.	15
c) Distribución geográfica.	18
d) Morfología, fisiología y desarrollo.	21
1.- Tamaño y forma.	21
2.- Cutícula.	21
3.- Hipodermis.	25
4.- Sistema nervioso.	27
5.- Musculatura y movimiento.	28
6.- Sistema digestivo.	31
7.- Sistema excretor.	36
8.- Sistema reproductor.	38
9.- Reproducción.	44
10.- Proceso de la muda.	46
11.- Desarrollo y ciclo de vida.	48
e) Relaciones hospedero-parásito.	52
f) Histología y patogénesis.	56
g) Efectos producidos por el parásito en la planta huésped.	59

	Pág.
h) Ecología.	61
B.- Generalidades sobre los métodos taxonómicos actuales usados en la identificación de las especies del género <u>Meloidogyne</u> .	64
a) Método morfológico o clásico.	64
b) Método de identificación por hospedantes diferenciales.	71
c) Método de identificación citogenético.	73
d) Método de identificación por inmunodifusión.	75
e) Método de identificación por electroforesis.	77
IV. MATERIAL Y TÉCNICAS.	80
A.- Muestreo.	80
B.- Extracción.	82
a) Extracción de nemátodos del suelo por centrifugación.	82
b) Extracción de nemátodos por incubación.	85
c) Extracción de nemátodos de las raíces.	85

	Pág.
d) Extracción y tinción de hembras de - <u>Meloidogyne</u> .	86
C.- Fijación.	88
D.- Deshidratación.	90
E.- Montaje.	91
a) Montaje de machos y larvas de 2° es- tadio.	91
b) Montaje de patrones verineales.	91
F.- Pruebas de identificación para las espe- cies del género <u>Meloidogyne</u> mediante hos- pedantes diferenciales.	94
a) Colecta de poblaciones de nemátodos- noduladores.	94
b) Cultivo de poblaciones de nemátodos- del género <u>Meloidogyne</u> .	94
c) Preparación de inóculo.	95
1.- Método de Hussey y Barker.	95
2.- Método de McClure.	97
d) Pruebas con los hospedantes diferen - ciales.	98
e) Terminación de la prueba y califica - ción del sistema radicular inoculado.	99
f) Respuesta de las cuatro especies más comunes de <u>Meloidogyne</u> a las pruebas con los seis hospedantes diferencia- les.	101

	Pág.
V. RESULTADOS.	102
A.- Descripción y medidas de las hembras.	102
B.- Descripción y medidas de los machos.	117
C.- Descripción y medidas de las larvas de - 2º estadio.	124
D.- Análisis de correlación de los índices a, c y c' .	127
E.- Resultados de las pruebas con los houe- dantes diferenciales.	136
VI. DISCUSION.	138
VII. CONCLUSIONES.	144
VIII. LITERATURA CITADA.	146

## I. RESUMEN.

Este trabajo tiene como principal objetivo hacer un análisis de los métodos taxonómicos, que se usan en la identificación de especies del género Meloidogyne, para mostrar que la Taxonomía clásica, que es la más usada en nuestro país, es una Taxonomía obsoleta si la comparamos con la Taxonomía experimental, la cual, cubre todos los campos de la Biología y los integra, para dar una información completa acerca de los organismos que estudia.

Mucha gente piensa que ser taxónomo es solamente identificar organismos y elaborar claves, después de lo cual, debe mantener sus colecciones en perfecto orden, describir nuevas especies y tener cada organismo perfectamente bien etiquetado. De acuerdo con este punto de vista, la Sistemática y la Taxonomía se concretarían a encasillar organismos en lugares arbitrariamente elegidos y, las personas que se dedican a este tipo de disciplinas solamente se podrían calificar como técnicos.

Mediante esta tesis, se observa que el taxónomo actual debe ser algo más que un simple cuidador de colecciones, debe ser un científico interesado en conocer las relaciones de los organismos con su medio ambiente, su filogenia, la formación de especies, los factores de la evolución que propician esto, la estructura de las poblaciones naturales, etc.

Así mismo se hace una revisión bibliográfica, lo más completa posible, de la morfología, fisiología, desarrollo, etc., del género Meloidogyne, género al que pertenece la especie M. hapla, identificada

mediante dos de los métodos analizados en esta tesis. Esta especie proviene de la localidad de San José Villa Guerrero, Estado de México, lugar en donde los daños ocasionados por este nemátodo en los cultivos de margaritón (Crisantemum maximum Ramond) son muy graves y ocasionan fuertes pérdidas económicas a los floricultores de esa zona.

Los métodos analizados, teórica y prácticamente, son el morfológico o clásico y el de los hospedantes diferenciales. El análisis realizado, demuestra que no se puede establecer la identificación de una especie, basándose exclusivamente en caracteres morfológicos, puesto que la variación existente en los seres vivos impide que se establezcan caracteres invariables que puedan tomarse como puntos de referencia, además que debido a esta misma variabilidad las relaciones usadas entre dos medidas presentan una correlación mínima, lo que reduce su validez. Complementando este estudio con las pruebas hechas con los hospedantes diferenciales, se puede tener una identificación más correcta de las especies en estudio.

Se propone el estudio de los métodos de identificación citogenético, por inmunodifusión y por electroforesis para realizar una investigación taxonómica más completa y apoyada a la realidad, ya que mediante los resultados obtenidos con estos métodos se pueden conocer las relaciones genéticas, serológicas y filogenéticas intra e interespecíficas de estos organismos, lo cual viene a cumplir uno de los propósitos de la Sistemática actual.

## II. INTRODUCCION.

Actualmente las ciencias biológicas han adquirido amplias dimensiones y, a veces, los conceptos y definiciones son tan ambiguos que es necesario, antes de realizar un trabajo de investigación, definir que es lo que se va a hacer. Precisamente por esta razón, se hace la siguiente definición y división entre Sistemática y Taxonomía, clasificación e identificación.

La Sistemática es una de las ciencias más completas que existen, como ha dicho Simpson: " la Sistemática es la más científica de todas las ciencias " (98). Si esto es cierto, entonces cada biólogo debería tener un conocimiento adecuado de la Sistemática.

Varios autores dan su propia definición de Sistemática, pero todos concuerdan con que la Sistemática es la ciencia que estudia científicamente todas las clases de organismos, la diversidad y las relaciones que existen entre ellos. Esto implica que quien quiera ser sistemático deberá tener conocimientos sobre filogenia, evolución, genética, bioquímica y demás ciencias auxiliares de la Sistemática.

Una de las mayores preocupaciones de los sistemáticos es determinar por comparación cuál es la verdadera relación y posición de las especies en los taxa superiores y que semejanzas o relaciones tienen estos entre sí y cuales son las causas biológicas de estas semejanzas y diferencias de caracteres que proporcionan la variabilidad dentro de los taxa.

La Sistemática trata con poblaciones, especies y taxa mayores. Ninguna otra rama de la Biología ocupa por sí misma, en una forma simi

lar, este nivel de integración en el mundo orgánico.

En la actualidad, la Sistemática es una de las mayores subdivisiones de la Biología, incluye, no solo, las funciones de identificación y clasificación, sino también el estudio comparativo de todos los aspectos del organismo, como la interpretación del papel que juegan los taxa, tanto superiores como inferiores, en la economía de la naturaleza y en la historia de la evolución. Es una síntesis de muchas ciencias de conocimiento, teoría y método aplicado a todos los aspectos de la clasificación. La última tarea del sistemático no solamente es describir la diversidad del mundo viviente, sino contribuir a su conocimiento (78).

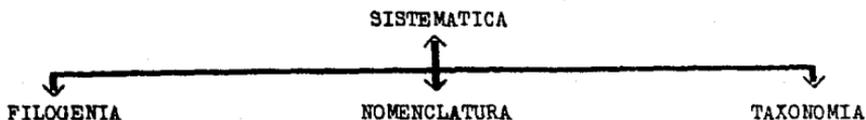
La Sistemática por lo tanto, es una ciencia que abarca infinidad de conocimientos, entre los cuales se pueden señalar tres ramas -- que le son completamente necesarias:

La Filogenia, mediante la cual la Sistemática se aproxima más a una clasificación natural de los organismos por el estudio de -- las relaciones entre ellos y sus posibles ancestros, siendo reforzados estos estudios por la Paleontología, Fisiología, Genética, etc.

La Nomenclatura, que provee las reglas, bases y principios -- necesarios para dar un nombre correcto a los organismos estudiados y clasificados.

La Taxonomía, que es el estudio de los principios y métodos de la clasificación. A esta rama la analizaremos posteriormente -- con más detenimiento.

De acuerdo con esto, podemos esquematizar a la Sistemática y sus ramas de la siguiente forma (98) :



Con esto podemos entonces entender uno de los problemas que se presentan cuando se habla de Sistemática o de Taxonomía, como es :

¿ Qué nombre recibe quien se dedica al estudio y práctica de estas disciplinas?

Obviamente un taxónomo es el que realiza los estudios necesarios para clasificar correctamente a los organismos que le interesan y hace uso también de la Filogenia y la Nomenclatura, por lo que queda incluido dentro de la práctica de la Sistemática y pueda, por lo tanto, recibir el nombre de sistemático, aunque esto implique un estudio más profundo de la diversidad y relaciones de los organismos y no solo del lugar que ocupan en la escala de la evolución orgánica.

La Taxonomía es el estudio teórico de la clasificación, incluyendo sus bases, principios, procedimientos y reglas (85).

Esta ciencia ha sufrido un cambio gradual a través del tiempo, el cual se puede dividir en tres etapas (78) :

En la primera, a la que generalmente se le da el nombre de Taxonomía Alfa, se hace énfasis sobre la descripción de nuevas especies y su arreglo preliminar dentro de los géneros comprensibles.

En la segunda etapa o de la Taxonomía Beta, se pone más cuidado y atención a las posibles relaciones entre las especies y categorías superiores.

En la tercera etapa o de la Taxonomía Gamma, se presta mu

cha atención a la variación intraespecífica, a los estudios evolucionistas y a la interpretación causal de la diversidad orgánica.

De la Sota (32) propone solamente dos etapas en el desarrollo de la Taxonomía: la Taxonomía Alfa o clásica, que es meramente descriptiva y estática, y se basa en datos o caracteres morfológicos. Su objetivo es describir o clasificar a los seres vivos según categorías de parentesco en un sistema u orden. Y la Taxonomía Omega o experimental, que se basa en toda la información posible y es una interminable síntesis. Su punto de partida no son los organismos aislados, sino poblaciones que permiten analizar el comportamiento reproductivo y genético, y que ofrecen un panorama de las variaciones de sus integrantes.

Actualmente es objeto de estudio la Taxonomía Gamma o experimental, pues la Taxonomía Alfa y la Beta, o sea la Taxonomía clásica, ya han sido estudiadas en numerosos grupos de organismos y los estudios sobre éstos deben ser complementados con los hechos por la Taxonomía experimental, a lo cual se han dedicado los taxónomos actuales para aumentar el conocimiento integral de estos grupos de organismos. Lógicamente la razón de la Taxonomía Gamma o experimental es el hecho de presentar una explicación causal, lo cual es una de las partes esenciales de cualquier ciencia y la Sistemática no es una excepción. Si la Sistemática fuera satisfecha con solamente encasillar la diversidad de organismos vivos, entonces sería simplemente una técnica y no una ciencia.

Por todo lo expuesto se puede hacer una pregunta :

¿Cuál es la función de un sistemático o de un taxónomo?

Mucha gente piensa que ser taxónomo es solamente identificar -

organismos y elaborar claves, después de lo cual debe mantener sus colecciones en perfecto orden, describir nuevas especies y tener cada organismo perfectamente bien etiquetado. De acuerdo con este punto de vista, la Sistemática solamente sería encasillar organismos y los que se dedicaran a este tipo de disciplina serían simplemente técnicos -- (78) .

Pero un taxónomo moderno es más que un cuidador de colecciones, es un experto naturalista que estudia la ecología y conducta de los organismos que se encuentran en el medio ambiente. El hacer una clasificación no es su último objetivo, sino que, de acuerdo con la definición de Simpson (98), en donde dice que la Sistemática "es el estudio científico de todas las clases de organismos, su diversidad y de todas las relaciones que existen entre ellos" , el sistemático estudia todos los aspectos de los organismos vivos, y más que en una descripción, como científico, está interesado en conocer el significado de la causalidad de estos aspectos, como son la formación de las especies, los factores de la evolución, la estructura de las poblaciones naturales, su biogeografía y, estas actividades, entran dentro del estudio de la Taxonomía Gamma o experimental.

Un taxónomo no solamente debe detectar las diferencias y similitudes entre los animales o plantas que estudia, sino que tiene que decidir también que diferencias son debidas a algo más que la adaptación a diferentes medios ambientes y que similitudes son el resultado de un ancestro común o de una evolución convergente. También tiene que realizar una difícil elección de los caracteres más importantes que tomará en cuenta para que la clasificación sea más natural, si se equivo

cu en esto, su clasificación no será verdaderamente filogenética.

Como todo científico, el taxónomo frecuentemente debe tomar una decisión sobre lo que hará. Puede concentrar su trabajo en la Taxonomía Alfa, describir nuevas especies y preparar catálogos de nombres. O puede concentrarse en la Taxonomía Beta y preparar una revisión básica o monografía, basada en el examen de todas las especies incluidas, preferentemente de todos los tipos de organismos y culminar su trabajo con una reclasificación bien balanceada y cuidadosamente razonada. O finalmente debería avocarse a los aspectos de la Taxonomía Gamma o experimental, haciendo un estudio individual y de variación geográfica en una sola especie, basado en las muestras de grandes poblaciones, o estudiar las características conductuales o químicas de un grupo de especies. Pero para tomar esta decisión, es muy importante conocer cuál es el nivel de madurez que tiene la investigación sobre el grupo en que se está especializando el estudio y en cuál de estos niveles sería más provechoso el mismo, tomando en cuenta que, actualmente, el carácter taxonómico de éste no significa el observar solamente los aspectos morfológicos, sino cualquier manifestación del genotipo, así que siempre hay una transgresión entre la Taxonomía, Fisiología, Genética, Bioquímica, etc.

La taxonomía de hoy en día sigue diferentes escuelas, como son:

La Fonética o clásica, que es la que se basa en los caracteres morfológicos únicamente (109).

La Numérica, en la cual los niveles de similitud y diferencia entre los organismos son estudiados mediante un sistema tridimensional matemático (103).

La Taxonomía Bioquímica, que a su vez se divide en la Taxonomía Serológica, Citogenética, etc.

Los términos Sistemática y Taxonomía ya han sido descritos, pero hay otros términos ligados a éstos, los cuales son la clasificación y la identificación, que también son completamente diferentes.

En la clasificación pueden encontrarse dos significados: uno, el más común, es el que se aplica al trabajo del taxónomo cuando encasilla o clasifica a diversos organismos, y el otro es el que se refiere a la actividad de clasificar: "la clasificación zoológica es el ordenamiento de los animales en grupos sobre la base de sus relaciones" (98). En este sentido la clasificación coincide con el propósito de la Taxonomía Beta. En resumen, la clasificación es el ordenamiento de las poblaciones y grupos de poblaciones en todos los niveles por procedimientos inductivos.

En cambio la identificación coloca a los organismos en su lugar correcto, mediante procesos deductivos, o sea en las clases previamente establecidas (32).

Ya que hemos definido y limitado el campo de estas ciencias, haremos notar que el presente trabajo cae dentro de la Taxonomía experimental y dentro de la clásica también, puesto que con el estudio que se ha hecho sobre una especie del género Meloidogyne, grupo de nemátodos fitoparásitos, se pretende hacer una comparación entre la validez, efectividad y eficiencia de los métodos empleados, tanto de los clásicos como de los experimentales.

Este trabajo de tesis tiene como objetivo ampliar el conocimiento sobre el campo que abarca la Taxonomía como ciencia y, desear

tar un mayor interés del estudiante sobre la misma, así como aportar nuevas técnicas que simplifiquen, un poco, la tarea que tiene el investigador al identificar las poblaciones de nemátodos fitoparásitos a las que se enfrenta, ya que estos organismos todavía no han sido ampliamente estudiados y no se han reconocido totalmente como organismos fitopatógenos.

El estudio sistemático y taxonómico de estos organismos, reviste gran importancia en la actualidad, pues si anteriormente no se podía asegurar que los nemátodos eran los causantes de graves daños en las plantas cultivadas, ahora si se tienen mayores evidencias de que éstos son altamente dañinos a los cultivos y que ocasionan graves pérdidas económicas no solamente en México, sino en todo el mundo.

El género que nos ocupa, Meloidogyne, es muy peligroso, pues hasta el momento, no se ha encontrado ningún cultivo que no sea susceptible a su ataque, y aunque algunas gramíneas no formen nodulaciones, se ha encontrado que si son atacadas por estos nemátodos (5).

Mientras mayor sea el conocimiento de estos organismos, no sólo desde el punto de vista morfológico, sino desde todos los ángulos en que se pueda estudiar su biología, tendremos más armas para combatirlos y controlarlos.

La Taxonomía clásica no nos puede aportar ningún arma para cubrir este propósito, puesto que solamente se conforma, como ya se ha mencionado, con observar los caracteres morfológicos del organismo y encasillarlo en donde corresponde, en cambio usando la Taxonomía experimental se obtienen conocimientos acerca de la fisiología, genética, bioquímica, etc. de los nemátodos fitoparásitos.

Por ejemplo, al usar grupos de hospederos diferenciales, se conoce, no solamente la especie a que corresponde el organismo en estudio, sino la resistencia o tolerancia de algunas plantas al ataque de estos nemátodos. Este sistema se ha programado actualmente para usarlo con los nemátodos del género Meloidogyne, pero sería interesante hacerlo para los demás géneros de nemátodos fitoparásitos. Este método se basa en la especificidad hospedatoria que presentan estos nemátodos, aún en este género que es cosmopolita, puesto que se reproduce y prolifera mejor en unas plantas que en otras.

Al aplicar la Citogenética a la Taxonomía, se pueden separar especies y razas de una población mixta. Puesto que los nemátodos del género Meloidogyne se reproducen por anfimixia y por partenogénesis, el estudio de los cariotipos de éstos nos puede dar una idea de la especie a que pertenecen y al producirse la poliploidía, estos nemátodos forman poblaciones que presentan gran variabilidad, por lo que si basamos nuestro estudio en los caracteres morfológicos solamente, jamás podremos llegar a concluir de que especie se trata, en cambio al aplicar la Genética y sus métodos, obtendremos resultados más seguros y al profundizar acerca de los genotipos y sus respuestas fenotípicas y fisiológicas, tendremos un mayor conocimiento sobre los mismos.

Algo parecido sucede cuando aplicamos la inmunodifusión y la electroforesis al estudio taxonómico de las especies de nemátodos, pues por medio de éstos métodos obtenemos la caracterización de las proteínas y enzimas de cada especie y con estos patrones, podemos hacer una identificación mucho más completa que la que se logra con los métodos de la Taxonomía clásica solamente.

Como vemos, todo este cúmulo de conocimientos que nos aporta la Taxonomía experimental, cubren perfectamente los objetivos que persigue la Sistemática actual : el ampliar el conocimiento de los organismos, de su biología, su filogenia y sus relaciones con otros organismos y con el medio ambiente en que se desarrolla, para lograr una clasificación de los mismos lo más apegada posible a su distribución en la naturaleza.

### III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

#### A.- Características del género Meloidogyne.

##### a) Antecedentes históricos.

El género Meloidogyne fue observado por primera vez en 1871 - por Schmidt, quien lo encontró en las raíces de la caña de azúcar. Debido a que presentaba una forma globosa, Schmidt pensó que se trataba de estadios no enquistados o inmaduros del género que en ese momento - estaba describiendo, así que los nemátodos noduladores fueron incluidos en un grupo con el nombre de Heterodera schachtii.

Algunos años después en 1877, en la provincia de Río de Janeiro en Brasil, Jobert descubre numerosas nodulaciones en las raíces de los cafetos de esa zona. Estas nodulaciones algunas veces eran terminales y otras se encontraban en el eje de la raíz. Observó que estos nódulos tenían en algunas partes una especie de ampollas hialinas dentro de las cuales se encontraban huevos de forma elíptica que contenían pequeños gusanos de forma nematoide. Jobert también observó que estos gusanos salían de los huevos y que se encontraban en grandes cantidades - en el suelo que rodeaba a la planta. Pero Jobert no escribió ningún reporte específico sobre esto y sólo lo menciona como un hecho curioso - en otro informe (107).

En Francia, Cornu en 1879, encuentra un nemátodo globoso en un nódulo de la raíz de Onobrychis sativa y lo bautizó con el nombre de - Anguillula marioni.

Hasta 1884 se tiene otra referencia de los nemátodos noduladores, dada por Müller en Alemania, quien reporta haberlos encontrado en nódulos de las raíces de Dodartia orientalis y los describe con el nombre de Heterodera radicumicola.

En 1887, Goeldi continúa con la investigación que empezó Jo - bert en 1877. Estudia los nódulos producidos por el nemátodo en las raíces de los cafetos y describe un nuevo género con una especie tipo: Meloidogyne exigua.

En 1932, Goodey hace una revisión de los géneros de nemátodos noduladores y cambia el nombre de Heterodera radicumicola por el de Heterodera marioni y el de Anguillula radicumicola por el de Anguillulina radicumicola (51).

Chitwood revisa todo lo reportado sobre los nemátodos noduladores y convencido por los estudios morfológicos hechos sobre ellos, los reúne en un sólo género, Meloidogyne, en donde separa varias especies. En este reporte, hecho en 1949, Chitwood menciona que los miembros de este género son extremadamente adaptables y que sus caracteres morfológicos muestran una variación considerable, ya que reporta no haber encontrado dos ejemplares idénticos, aunque sí encuentra varias similitudes entre ellos (107).

## b) Clasificación zoológica.

El género Meloidogyne establecido por Chitwood en 1949, primeramente estuvo ubicado dentro de la subfamilia Heteroderinae, perteneciente a la familia Heteroderidae, propuesta por Thorne en 1949 (19).

En 1959, Skarbilovich hizo una revisión de los géneros incluidos en la familia Heteroderidae y la dividió en 5 subfamilias, en donde se incluía la subfamilia Meloidogyninae que contenía a los géneros Meloidogyne y Meloidodera.

En 1969, Paramonov reconoce solamente dos subfamilias, Heteroderinae y Meloidogyninae, dentro de la familia Heteroderidae e incluye dentro de la segunda subfamilia a los géneros Meloidogyne e Hypoperine.

En 1973, Wouts propone que se establezca la familia Meloidogynidae, basándose en los caracteres morfológicos únicos que presenta la subfamilia Meloidogyninae (124).

De esta manera la clasificación del género Meloidogyne queda de la forma siguiente (107) :

- Phylum : Nematoda.  
 Clase : Secernentea (von Linstow, 1905) Dougherty, 1958.  
 Orden : Tylenchida (Filipjev, 1934) Thorne, 1949.  
 Superfamilia : Tylenchoidea (Filipjev, 1934) Chitwood & Chitwood, 1937.  
 Familia : Meloidogynidae Wouts, 1973.  
 Género : Meloidogyne (Goeldi, 1887) Chitwood, 1949.

## Especies :

- M. acrita (Chitwood, 1949) Esser, Perry y Taylor, 1976.
- M. acronea Coetsee, 1956.
- M. africana Whitehead, 1960.
- M. ardenensis Santos, 1968.
- M. arenaria (Neal, 1889) Chitwood, 1949.
- M. artiella Franklin, 1961.
- M. bauruensis (Lordello, 1956) Esser, Perry y Taylor, 1976.
- M. brevicauda Loos, 1953.
- M. coffeicola Lordello y Zamith, 1960.
- M. decalineata Whitehead, 1968.
- M. deconincki Elmilgy, 1968.
- M. ethiopica Whitehead, 1968.
- M. exigua Goeldi, 1887.
- M. graminicola Golden y Birchfield, 1965.
- M. graminis (Sledge y Golden, 1964) Whitehead, 1968.
- M. hapla Chitwood, 1949.
- M. incognita (Kofoid y White, 1919) Chitwood, 1949.
- M. indica Whitehead, 1968.
- M. inornata Lordello, 1956.
- M. javanica (Treb, 1885) Chitwood, 1949.
- M. kikuyensis De Grisse, 1960.
- M. kirjanovae Terenteva, 1965.
- M. litoralis Elmilgy, 1968.
- M. lordelloi Du Ponte, 1969.
- M. lucknowica Singh, 1969.

- M. mali Itoh, Oshima e Ichinohe, 1969.
- M. megadora Whitehead, 1968.
- M. megriensis (Pogosyan, 1971) Esser, Perry y Taylor, 1976.
- M. microtyla Mulvey, Townshend y Potter, 1975.
- M. naasi Franklin, 1965.
- M. oteifae Elmilgy, 1968.
- M. ottersoni (Thorne, 1969) Franklin, 1971 .
- M. ovalis Riffle, 1963.
- M. poghossiana Kirjanova, 1963.
- M. soartinae (Rau y Fassuliotin, 1965) Whitehead, 1968.
- M. tadshikistanica Kirjanova e Ivanova, 1965.
- M. thamesi (Chitwood, 1952 in Chitwood, Specht y Havis) Gooday, 1963.

## c) Distribución geográfica.

El género Meloidogyne tiene una amolísima distribución mundial y se encuentra parasitando muchas plantas de importancia agrícola, por lo que es difícil saber cual es su lugar de origen.

La diversidad de las características biológicas que presenta este género hacen que sea muy adaptable a los diferentes medios ambientes en los que se encuentra, lo que propicia su dispersión y establecimiento.

Las especies pertenecientes a este género pueden dividirse en dos grupos, el primero lo forman las especies más comunes y mejor conocidas como son : M. incognita, M. javanica, M. arenaria y M. hapla y se encuentran distribuidas en la zona comprendida entre los 40° latitud N y 40° latitud S. (Fig. 1)

En el segundo grupo se encuentran las demás especies, tienen una distribución más restringida como se ve en la siguiente lista (92, 107) :

## Centro y Sudamérica:

M. oxycrura, M. coffeicola, M. lordelloi, M. inornata y M. bauruensis

## África:

M. africana, M. acronea, M. kikuyensis, M. ethiopica, M. dacalinea, M. megadora y M. oteifae.

## India:

M. indica, M. lucknowica, M. brevicauda y M. graminicola.

## Inglaterra:

M. artiellia, M. naasi y M. ardenensis .

## Resto de Europa y Región Mediterránea:

M. deconincki, M. litoralis y M. naasi.

## Rusia:

M. kirjanovae, M. megriensis, M. tadshikistanica.

## Japón:

M. mali.

## Canadá:

M. microtyla.

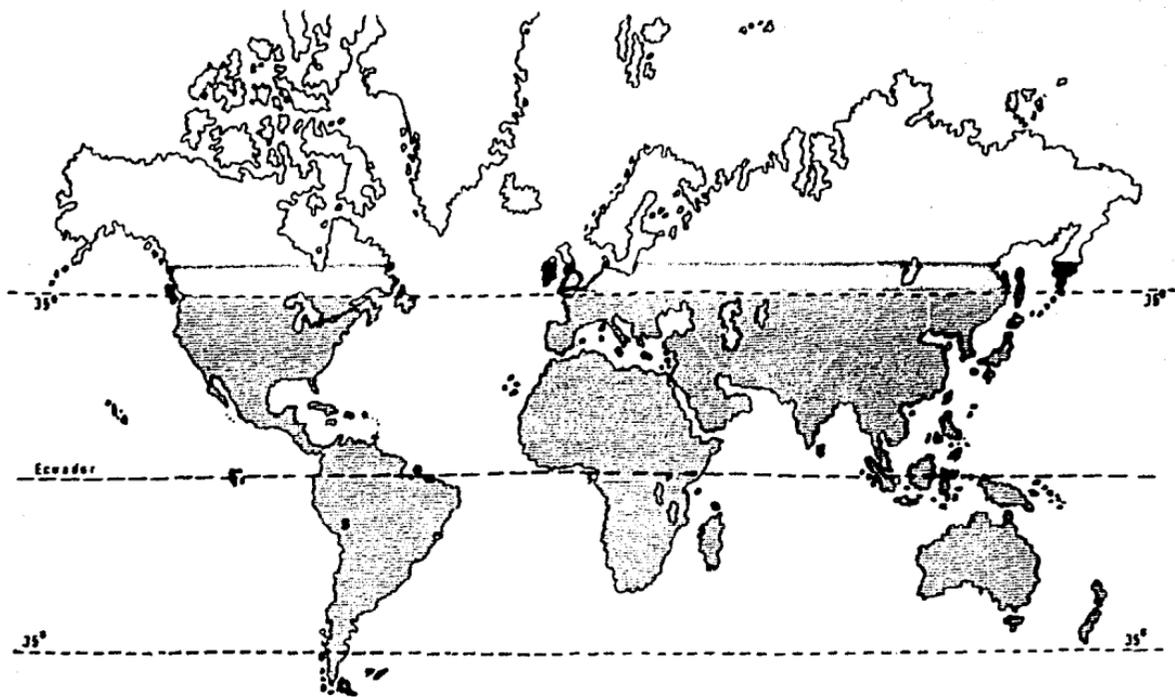


FIGURA 1.- Distribución geográfica de las cuatro especies más comunes de *Meloidogyne*.

- M. incognita*, *M. arenaria* y *M. javanica*.  
 *M. hapla*.

## d) Morfología, fisiología y desarrollo.

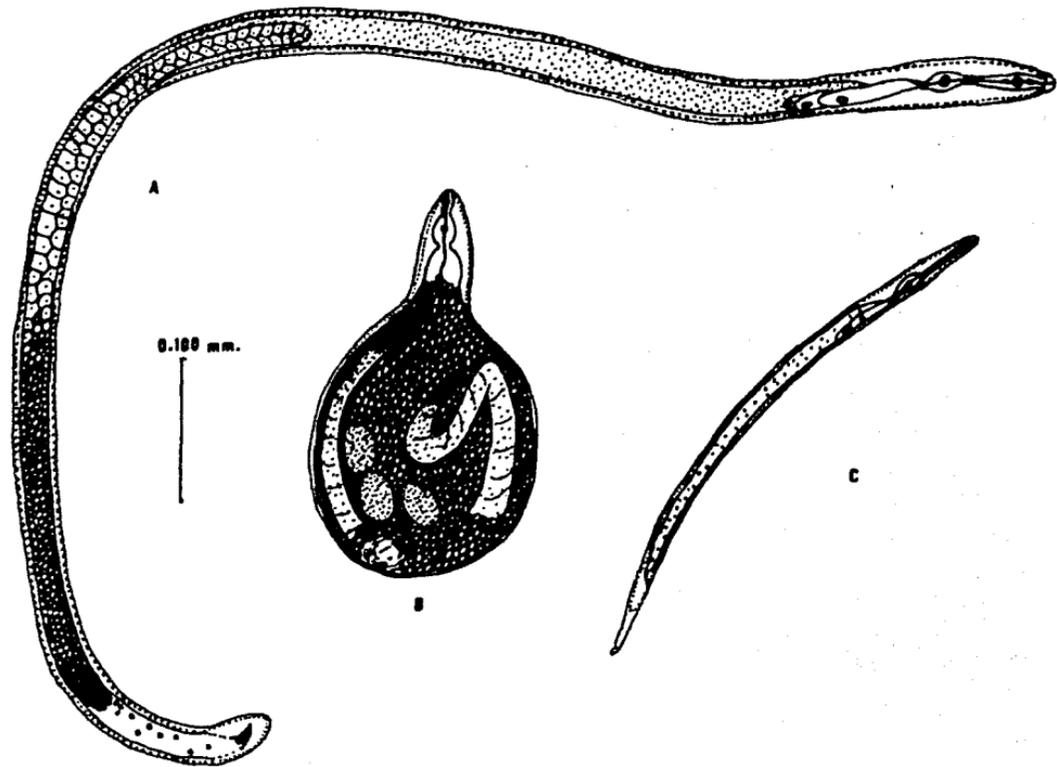
## 1.- Tamaño y forma.

Los nemátodos pertenecientes al género Meloidogyne tienen un tamaño pequeño. Los machos son vermiformes y pueden alcanzar a medir de 1 a 1.5 mm. Las hembras tienen una forma esférica y miden un promedio de 0.44 a 1.3 mm de longitud por 0.325 a 0.7 mm de ancho aproximadamente. Las larvas de 2º estadio, llamadas larvas infectivas, miden en promedio 0.6 mm de largo. Los huevos sin embrionar miden 0.08 mm de largo por 0.04 mm de ancho (11,123,125). (Fig. 2)

## 2.- Cutícula.

Esta estructura es muy importante en la fisiología de los nemátodos, puesto que, a través de ella, se llevan a cabo los procesos de intercambio gaseoso y regulación osmótica, además que es la cubierta que protege al nemátodo del contacto directo con el medio ambiente que lo rodea.

La cutícula de la hembra se ha estudiado ampliamente sobre todo la zona cercana al ano y vulva. Está formada por una capa cortical compuesta por polifenol oxidasa, queratina y colágeno, siendo estos dos últimos elementos los que le dan cierta rigidez y firmeza para conservar la forma del nemátodo. Inmediatamente se encuentra una capa matriz o capa media compuesta por proteínas albuminosas de bajo peso molecular, proteínas fibrosas, pequeñas cantidades de carbohidratos y lípi-



**FIGURA 2 .-** Tamaño y forma.

**A-** Macho de Meloidogyne. **B-** Hembra. **C-** Larva de 2º estadio.

dos que conjuntamente con la polifenol oxidasa presente en la corteza, nos indican que esta cutícula está activa metabólicamente y que no es una cubierta inerte.

La capa interna tiene una estructura ligeramente fibrosa compuesta por colágeno, lo que le dá elasticidad (12,39,65). (Fig. 3,A)

La cutícula del macho es un poco más delgada y su configuración parece ser uniforme, aunque presenta algunos adelgazamientos en las áreas laterales y que corresponden a las llamadas incisuras laterales. (Fig. 3,C)

La cutícula de estos nemátodos presenta anulaciones que facilitan el movimiento del mismo (Fig. 3, B y C), además de otras estructuras que son de gran importancia en la diagnosis de las especies. Algunas de estas estructuras son los llamados campos laterales (Fig. 3,B), los cuales son el resultado de las incisuras que corren a lo largo del cuerpo y que en este género pueden ser desde 4 hasta 10. Frecuentemente estos campos están atravesados por las anulaciones del cuerpo, a esta condición se le conoce como areolación de los campos laterales. Estas estructuras ayudan a que el nemátodo tenga mayor flexibilidad y pueda aumentar su grosor sin sufrir daño (39).

Otras estructuras cuticulares son las llamadas puntuaciones, descritas por algunos autores como poros de la capa cortical. Estos se encuentran frecuentemente en un arreglo transversal o longitudinal.

En la parte anterior de la cabeza se encuentran estructuras esclerotizadas que reciben el nombre de labios (Fig. 3,D), éstos son 6, uno dorsal, otro ventral, dos laterodorsales y dos lateroventrales (2).

En la superficie lateral de la parte anterior se encuentran lo

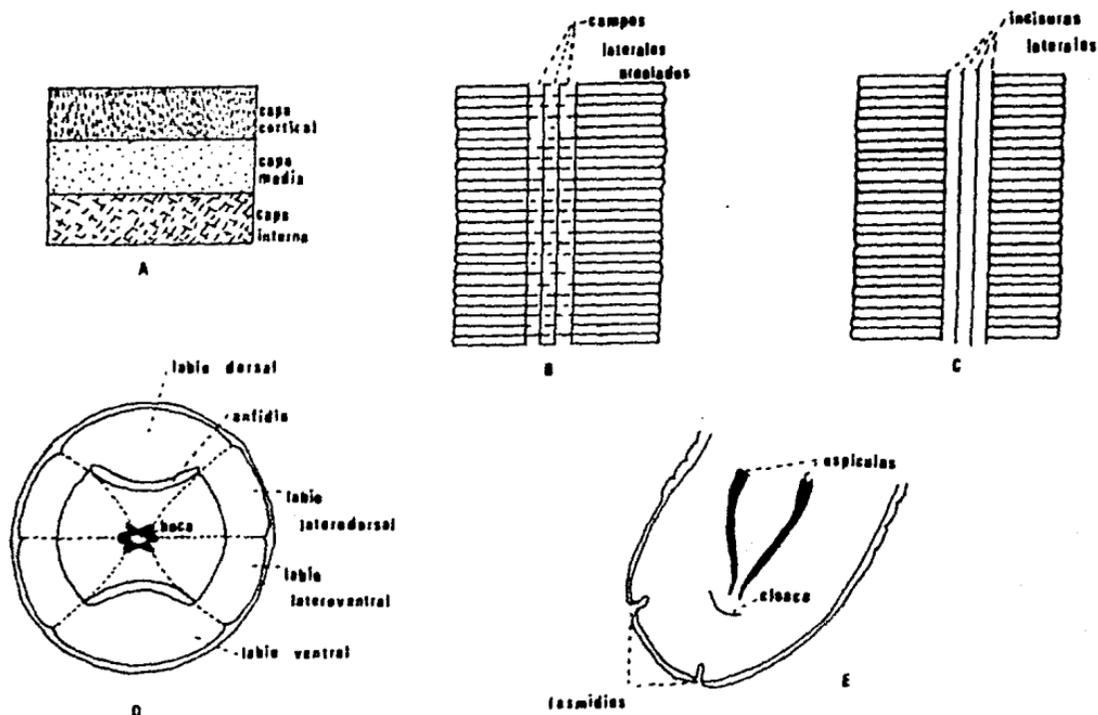


FIGURA 3.-Cutícula y estructuras relacionadas

A-Esquema de un corte transversal de la cutícula. B-Cutícula anillada con campos laterales areolados. C-Incisuras laterales y campos laterales lisos. D-Vista frontal de la región cefálica de un macho de *Meloidogyne* sp. (Tomado de M.W. Allen, 1952) E-Fasmidios de un macho de *M. hapla*.

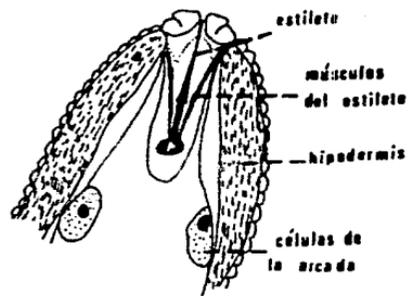
calizadas un par de estructuras en forma de bolsitas que tienen una --  
 abertura semicircular llamadas anfidios, las cuales tienen una fun --  
 ción quimorreceptora (Fig. 3,D). Se ha observado que estas estructuras  
 alteran su tamaño cuando se colocan en soluciones hipertónicas, lo que  
 sugiere que tal vez desempeñen algún papel en la osmoregulación (8,45,  
 118,121,122).

En la parte posterior y cerca de la cloaca se encuentran un --  
 par de estructuras sensoriales llamadas fasmidios (Fig. 3,E), los cua --  
 les externamente parecen dos poros. Los fasmidios son estructuras qui --  
 moreceptoras y hasta ahora no se ha podido comprobar que tengan otra --  
 función (11,65,125).

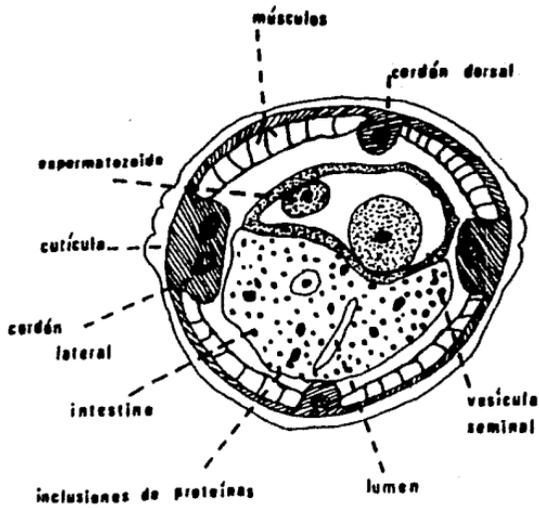
### 3.- Hipodermis.

La hipodermis es un tejido sincicial que se encuentra inmedia --  
 tamente debajo de la cutícula y rodea por completo al nemátodo. Esta --  
 hipodermis se adelgaza considerablemente en la región cefálica y en es --  
 ta zona se encuentra una modificación de la misma a la cual se le lla --  
 ma arcada y forma una banda circular que rodea al tracto digestivo en  
 el nivel estomatal. (Fig. 4,A)

En la hembra la hipodermis se engruesa en la región posterior --  
 de la zona llamada del cuello y presenta un número moderado de núcleos  
 redondos, repartidos a lo largo del cuerpo. En la región media del --  
 cuerpo, la hipodermis aumenta su grosor y posteriormente se proyecta  
 dentro de la cavidad del cuerpo en 4 cordones longitudinales. En la --  
 parte terminal del cuerpo el tejido hipodermal es masivo y se encuen --



A



B

FIGURA 4 .- Hipodermis.

A-Corte longitudinal de la parte anterior de una hembra joven de Meloidogyne hapla. B- Corte transversal de un macho de M. hapla. (Tomado de Eisea, 1951).

tra una granulaci3n eosin3fila en 3l.

En el macho los 4 cordones hipodermales son prominentes y se encuentran dos laterales, uno dorsal y uno ventral (11,39,125).(Fig. 4,B)

#### 4.- Sistema nervioso.

El sistema nervioso de estos nem3todos no se diferencia del de los dem3s til3nquidos. Consiste en un anillo de c3lulas simples organizadas en filamentos que rodean al istmo esof3gico y grupos de ganglios localizados en pares que corren a lo largo del cuerpo dorsolateral y ventralmente.

De este anillo surgen seis nervios que se extienden anteriormente y que inervan a los anfidios, papilas y dem3s estructuras sensibles de la regi3n cef3lica.

En la parte dorsal se localiza un nervio que corre a lo largo del cord3n hipodermal y que constituye al principal nervio del cuerpo, conjuntamente con 3ste, corre otro que tiene una funci3n motora y surge de la regi3n dorsal media del anillo nervioso, de este nervio dorsal parten tres ramificaciones que inervan las estructuras posteriores del nem3todo como son los fasmidios, esp3culas, gl3ndulas rectales, etc.

Los nem3todos en general poseen varios 3rganos sensibles adem3s de los anfidios y fasmidios, como son los deiridios que se encuentran lateralmente a la altura del anillo nervioso. El hemizonidio es una estructura semicircular que se encuentra localizada ventralmente junto al poro excretor, es altamente refractario y tiene una forma bi-

convexa, aún no se ha definido cuál es su función. Cerca del hemizo - nido se encuentra el hemizonio, no se conoce su función y todavía no se ha observado en el género Meloidogyne (16,45,49) .

Las cefalidias son delgadas bandas que rodean la región cefálica del nemátodo, se localizan debajo de la cutícula en contacto con la capa superior de la hipodermis.

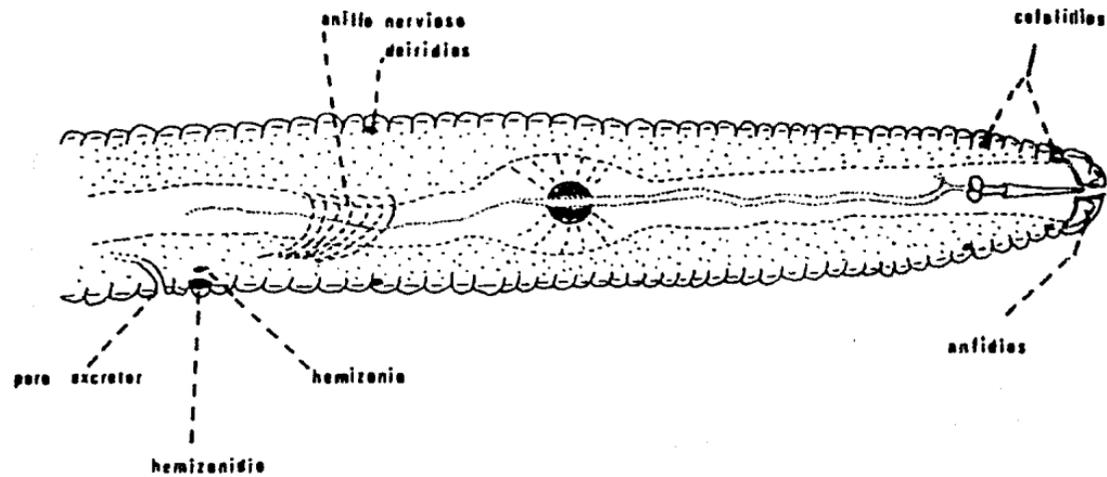
A lo largo del esófago corren tres nervios que se unen entre sí por comisuras y que constituyen lo que se podría llamar un sistema nervioso simpático esofágico (29,39,65,104,109,125). (Fig. 5)

#### 5.- Musculatura y movimiento.

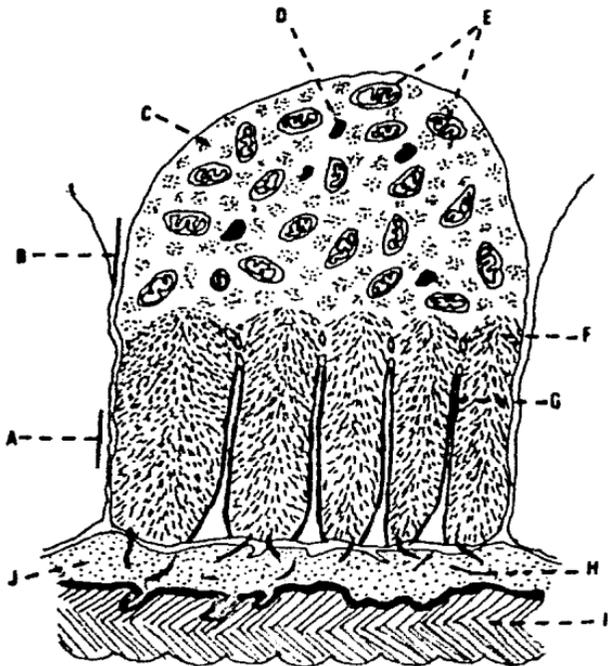
Los músculos de estos nemátodos son longiyudinales, en forma de huso, y se encuentran inmediatamente después de la hipodermis (Fig. 4,B). Estos músculos se encuentran formados por células del tipo plati miario (Fig. 6) y están divididas en dos porciones, una contráctil y otra no contráctil. La parte contráctil contiene elementos de soporte en donde se adhieren los miofilamentos. La parte no contráctil contiene al núcleo, mitocondrias, glicógeno y lípidos (65).

La musculatura que presenta la hembra, debido a que es sedentaria, está muy reducida y consiste solamente de una capa delgada de fibras musculares localizada en el área cefálica, debajo de la hipodermis. La vulva está rodeada por bandas de músculos dilatadores al igual que la vagina (Fig. 11,A) y el útero presenta músculos que ayudan a la expulsión de los huevos.

El macho en cambio tiene una musculatura muy desarrollada a to



**FIGURA 5 .- Anillo nervioso y estructuras relacionadas con el sistema nervioso.**



- A - Parte contráctil del músculo
- B - Parte no contráctil del músculo
- C - Glicógeno
- D - Lípidos
- E - Mitocondrias
- F - Miofilamentos
- G - Estructuras de soporte
- H - Fibras que adhieren el músculo a la cutícula
- I - Cutícula
- J - Hipodermis

**FIGURA 6 .-Corte transversal de un músculo de la pared del cuerpo de un nemátodo. (Tomado y modificado de D.L.Lee, 1965.)**

do lo largo del cuerpo.

La inervación de los músculos es algo peculiar, proyecciones nerviosas pasan desde la parte no contráctil del músculo atravesándolo, hasta los nervios longitudinales o hasta el anillo nervioso.

Los músculos están adheridos a la cutícula por fibras que corren desde la parte central de la célula a través de la membrana basal hasta la capa interna de la cutícula (39).

Los machos y sobre todo, las larvas de 2º estadio o infectivas, presentan un movimiento serpenteante, las ondulaciones del cuerpo son producidas por un patrón coordinado de movimientos musculares de relajamiento y contracción de puntos opuestos en el cuerpo (Fig. 7). Los nemátodos se mueven en la delgada capa de agua que se encuentra entre las partículas del suelo, con las que se ayuda, empujándose, para avanzar (11,65,125).

#### 6.- Sistema digestivo.

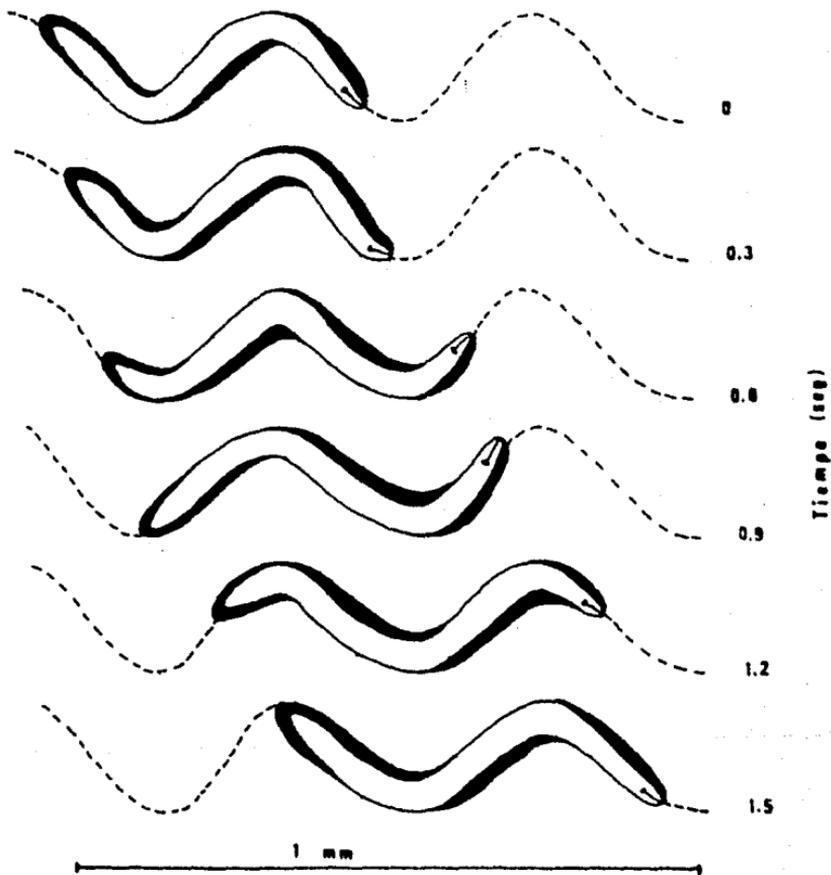
El tracto digestivo se puede dividir en tres partes o regiones:

i) El estomodeo, que incluye la boca, los labios, la cavidad bucal, el estilete y las estructuras relacionadas con él y el esófago.

ii) El intestino.

iii) El proctodeo, que incluye al recto y al ano o cloaca.

i) El estomodeo sufre una adaptación dependiendo de la forma de alimentación del nemátodo y se encuentra recubierto interiormente por la cutícula.



**FIGURA 7 .- Movimiento.**

Movimiento de un nemátodo en una película fina de agua. Las zonas oscuras representan el desplazamiento del agua sobre la superficie del cuerpo. (Tomado de D.L.Lee, 1965).

Los nemátodos del género Meloidogyne son fitoparásitos, por lo que su aparato bucal está sumamente especializado para alimentarse de las células radiculares de las plantas que son sus hospedantes. La boca se abre en la parte anterior de la región cefálica, se encuentra rodeada por seis labios de forma triangular que pueden o no estar fusionados por nares (Fig. 8, A, B, C.). Debajo de la cutícula de esta zona se encuentran unas estructuras esclerotizadas que forman el llamado esqueleto cefálico, el cual le da rigidez a la cabeza y le permite alimentarse con facilidad.

En la cavidad bucal se encuentra el estilete que es una especie de aguja hiodérmica que el nemátodo inserta en las células para absorber su contenido, está formado por tres partes: una anterior en forma de saeta, una media y una posterior constituida por tres nódulos basales que están orientados uno dorsal y dos subventralmente y que sirven como puntos de inserción de los músculos protractores del estilete (65). (Fig. 8,A)

El esófago se encuentra dividido en una parte anterior o procorpus, una parte media llamada metacorpus o bulbo medio y una parte posterior glandular (Fig. 8,A). El procorpus puede a su vez subdividirse en dos zonas, una anterior cilíndrica y una posterior redondeada, ambas de la misma longitud aproximadamente.

El metacorpus o bulbo medio está constituido por una pared muscular muy desarrollada y presenta un lumen trirradiado. Ahí se encuentran dos células grandes, adyacentes a la pared dorsal del bulbo y que rodean al lumen en su conexión con el intestino, reciben el nombre de cardias. Se ha pensado que posiblemente su función sea la de una

válvula esofágico-intestinal.

Arriba de la zona en donde el esófago se une al intestino se localiza un estrechamiento que recibe el nombre de istmo y es en donde se encuentra el anillo nervioso.

La parte posterior del esófago la constituye la porción glandular, subdividida en tres lóbulos, uno dorsal, el más importante y dos subventrales. La desembocadura de la glándula esofágica dorsal se encuentra inmediatamente después de los nódulos basales del estilete (Fig. 8,A). Las otras dos glándulas desembocan en la parte media anterior del metacarpus.

La región glandular presenta tres núcleos grandes localizados en la parte distal de esta región. El núcleo de la glándula dorsal generalmente es anterior a los de las glándulas subventrales.

ii) El intestino se encuentra dividido en tres regiones, una anterior, una media y una posterior. Estas regiones se diferencian entre sí por la forma del lumen, el peso y el contenido celular y probablemente también por su función.

La pared del intestino está constituida por una simple capa celular y una membrana basal. La superficie interna del intestino presenta un aspecto afelpado, debido a las proyecciones celulares llamadas microvilli, las cuales aumentan la superficie intestinal para lograr una mayor absorción. Se piensa que estas células aparte de su función de absorción, tienen una función secretora, aunque hay poca evidencia de que la parte anterior del intestino es la que tiene esta función y que el resto tiene una función absorbente (65).

La elevada presión de turgencia del pseudoceloma del nemátodo

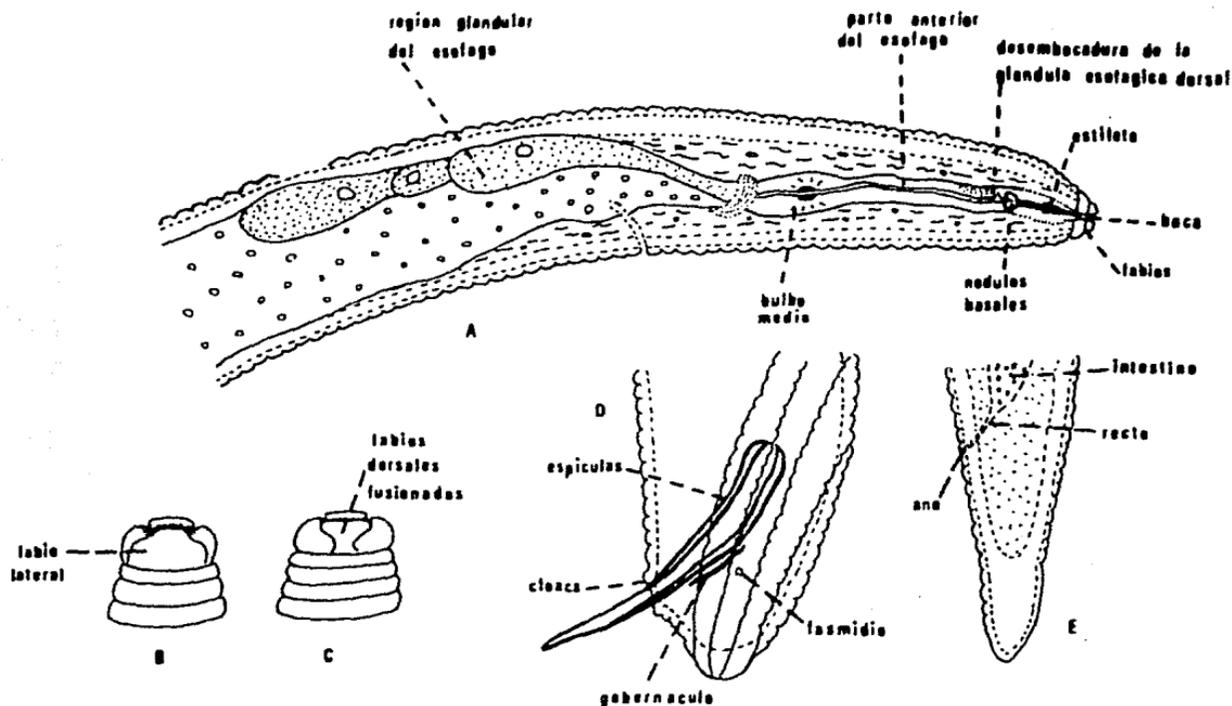


FIGURA 8 .- Aparato digestivo.

A-Parte anterior de un macho.

Meloidogyne brevicauda. B-Vista lateral y C-Vista dorsal de la cabeza de un macho. D-Cola de un macho. E-Cola de una larva de 2º estado. (Tomado de C.A. Loos, 1953).

tiene un papel muy importante en la organización estructural del sistema digestivo. El intestino normalmente se encuentra colapsado, excepto cuando está lleno de comida. El esófago ejerce una gran presión para empujar el alimento hacia dentro del intestino, este contenido se mueve a lo largo del mismo debido a la actividad motora del nemátodo y de la ingestión de más alimento, conjuntamente con los movimientos peristálticos del intestino.

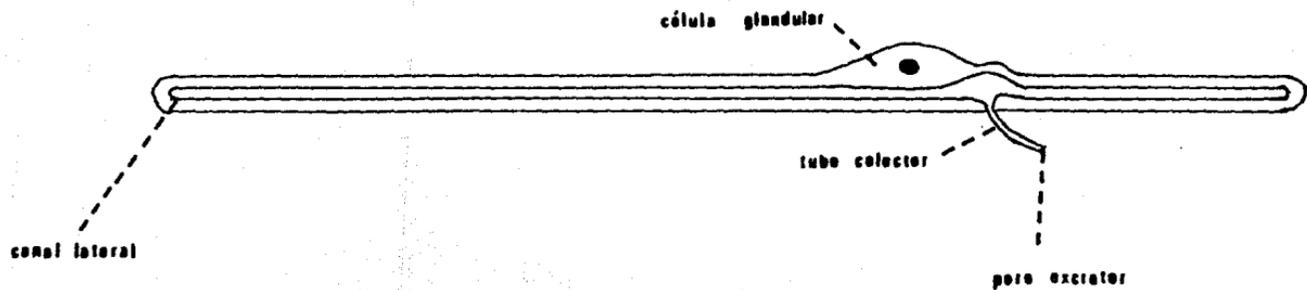
iii) El proctodeo también se encuentra recubierto internamente por cutícula y lo constituye el recto, que es un fino tubo al que desemboca el intestino por la zona prerectal (Fig. 8,E).

Los desechos son empujados desde el intestino hacia el recto para ser expulsados por el ano, el cual, en la hembra, se abre en el centro de la zona llamada perineo. En el macho se abre en la cloaca, en la cual también desemboca el tracto reproductor (65). (Fig. 8,D)

#### 7.- Sistema excretor.

El sistema excretor de estos nemátodos es asimétrico, consiste de un solo canal lateral que corre a lo largo del cuerpo y que desemboca en un tubo recubierto por cutícula que se abre al exterior por el poro excretor, localizado en la parte ventral de la zona esofágica. (Figs. 5 y 9)

En la hembra de Meloidogyne hapla, este conducto excretor se extiende hasta la parte posterior de los apéndices glandulares esofágicos, en donde se une a una estructura tubular no recubierta internamente por cutícula. Elsea (39) reporta que este tubo se reduce de tamaño-



**FIGURA 9 .- Sistema excretor de tipo Tylenchoide. (Según Chitwood y Chitwood, 1950 ).**

y se ramifica en la parte posterior del nemátodo, aunque no está muy clara la unión de este tubo con el sistema de canales de la región posterior.

Se sabe poco acerca de la función de este sistema, pero existe evidencia de que se eliminan a través de él agua, productos de desecho nitrogenados y algunos iones. También se ha observado que este sistema juega un papel muy importante en la osmoregulación del nemátodo.

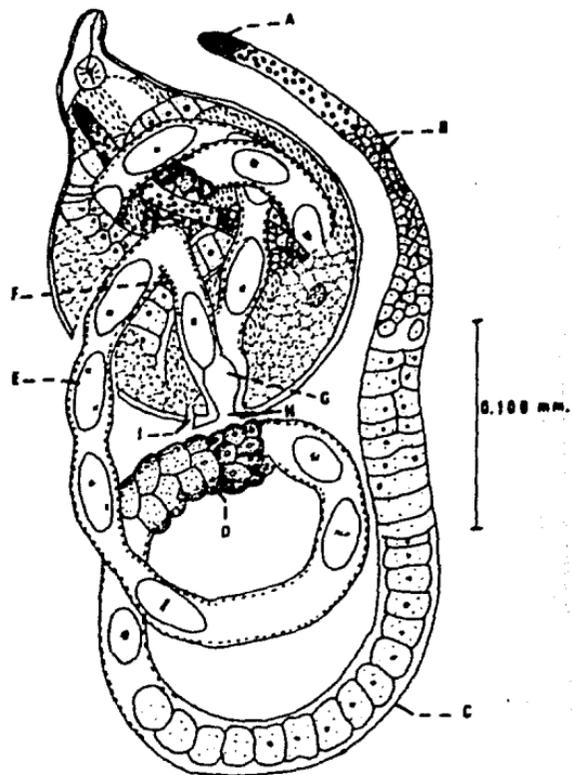
La cutícula probablemente también intervenga en los procesos de excreción, pues se ha demostrado que el dióxido de carbono y el amoníaco se mueven rápidamente a través de ella.

Los nemátodos también excretan otras sustancias como aminoácidos, ácidos grasos y aminas, pero los mecanismos por los cuales se lleva a cabo este proceso no se conocen todavía (11,65,84,125).

## 8.- Sistema reproductor.

En la hembra se presentan dos ovarios muy grandes que ocupan casi toda la cavidad del cuerpo, éstos representan cerca del 60% de la longitud del tracto reproductor. (Fig. 10)

El ovario está compuesto por una célula germinativa localizada en la zona ciega del ovario, se continúa con la parte germinativa (Fig. 10,A), en donde los oocitos (Fig. 10,B) se arreglan en forma de una roseta alrededor de un eje central; sigue la zona de crecimiento (Fig. 10,C), en la cual los oocitos aumentan de tamaño y pasan por la espermateca (Fig. 10,D) y después al útero (Fig. 10,F), el cual constituye la mayor parte del 40 % restante del tracto reproductor (39,116).



- A - Zona germinativa
- B - Oocitos
- C - Zona de crecimiento
- D - Espermateca
- E - Ovulos
- F - Utero
- G - Vagina
- H - Vulva
- I - Ano

FIGURA 10 .- Aparato reproductor femenino de *Meloidogyne* sp.  
(Tomado de Southey, 1965).

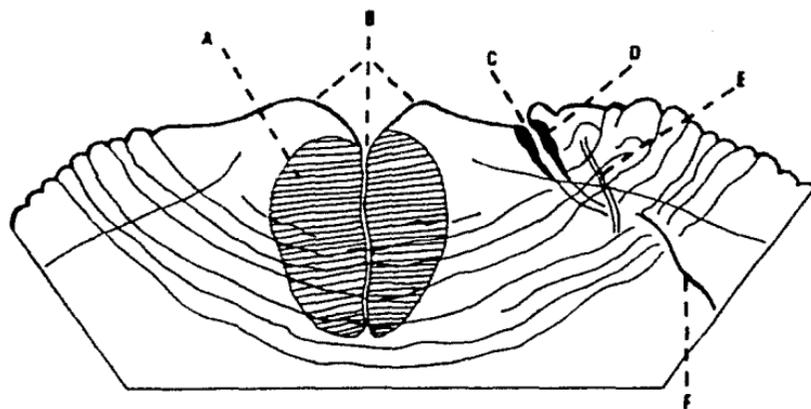
En Meloidogyne hapla cerca de la unión del ovario con el útero se localiza una estructura cuya función todavía no se define y que se ha denominado arbitrariamente como "órgano molar". Está compuesto por 10 o 15 células largas y delgadas, se ha observado que los huevos apenas pasan a través de esta estructura, poseen ya una capa protectora como un "cascarón". Algunos autores piensan que solamente se trata de una modificación de la espermateca (39).

Después del ovario sigue el útero, uno para cada ovario. La vagina (Fig. 10,G) se origina de la unión de los dos úteros, generalmente se encuentra colapsada y doblada sobre sí misma cuando está contraída, pero es una estructura capaz de dilatarse considerablemente cuando pasan a través de ella los huevos.

La vulva (Fig. 10,H) en su parte interna está recubierta por cutícula y se abre al exterior, transversalmente, en la parte posterior del nemátodo, cerca del polo terminal. Dos labios cuticulares rodean exteriormente al orificio vulvar y se encuentran ligeramente elevados por encima de la superficie del cuerpo. (Fig. 11).

Relacionado con el sistema reproductor femenino se encuentran seis glándulas localizadas en el recto (Fig. 12), dos subdorsales, dos laterales y dos subventrales, que producen una sustancia gelatinosa que protege a los huevos cuando éstos son depositados. Esta sustancia es secretada poco a poco y se va acumulando en el ano hasta formar una masa gelatinosa que cubre la vulva y que va recubriendo los huevos conforme van siendo expulsados (77,82). (Fig. 13)

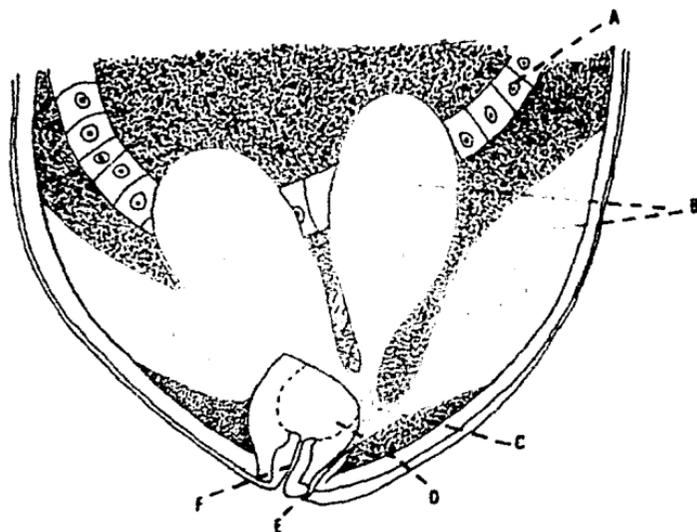
En contraste con el aparato reproductor femenino que está bastante modificado, debido a la vida parasitaria, el aparato reproductor



- A- Area muscular de la vagina
- B- Vulva y labios vulvares
- C- Ano
- D- Recto
- E- Lumen del fasmidio
- F- Incisura lateral

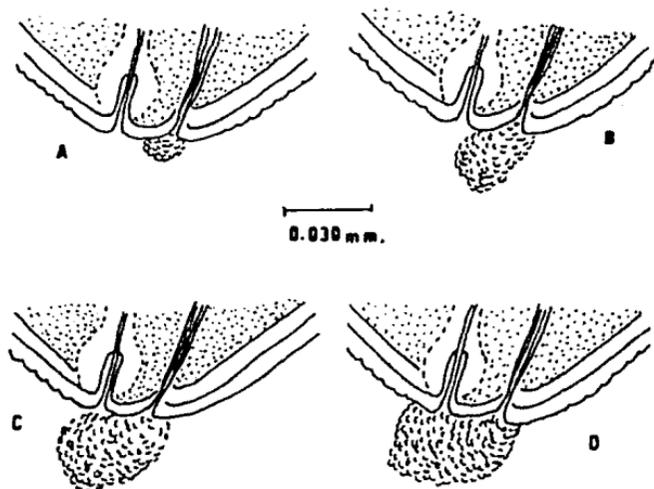
**FIGURA 11 .- Meloidogyne arenaria, parte posterior de una hembra madura. (Tomado de Esser, Perry y Taylor, 1976).**

0.050 mm.



- A - Ovario
- B - Glándulas rectales
- C - Desembocadura de las glándulas
- D - Utero
- E - Ano
- F - Vagina

FIGURA 12 . Meloidogyne incognita, hembra madura con glándulas rectales. (Tomado de Maggenti y Allen, 1960).



**FIGURA 13 .- Meloidogyne arenaria. A- Comienzo de la deposición de la matriz gelatinosa. B- Dos horas después. C- Tres horas después. D- Cuatro horas después. (Tomado de Maggenti y Allen, 1960.)**

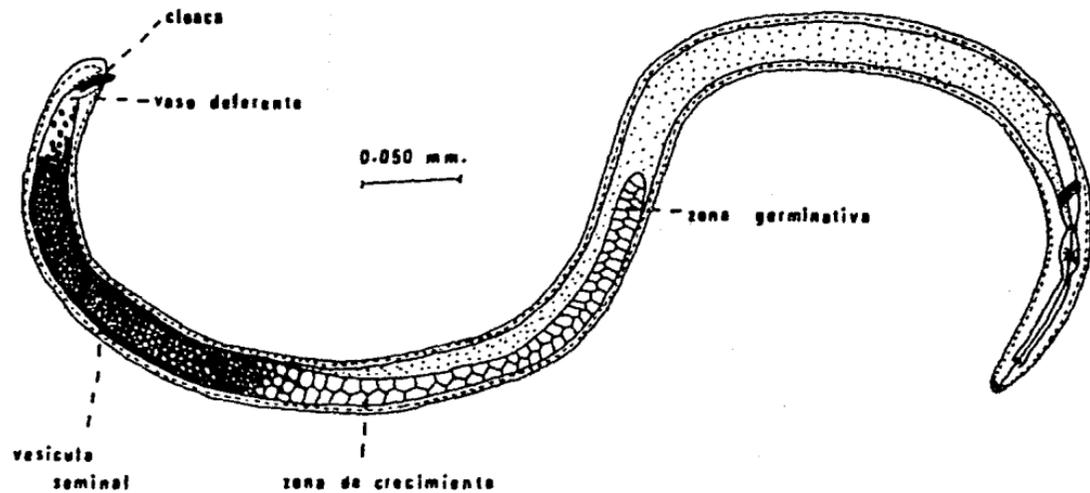
del macho es comparativamente simple (Fig. 14). Se pueden presentar 1 o 2 testículos. El tracto reproductor es una estructura tubular alargada que ocupa el tercio inferior de la longitud total del nemátodo. El testículo ocupa la mitad del largo total de este tracto y se divide en dos zonas, una anterior que es la germinativa y una posterior de crecimiento. En la parte ciega del testículo se encuentra una célula germinativa al igual que en el ovario.

El resto del tracto reproductor está ocupado por la vesícula seminal y sirve como un lugar de almacenamiento para los espermatozoides. De esta vesícula surge un vaso deferente que desemboca en la cloaca (11,62,65,125).

#### 9.- Reproducción.

Según lo postulado por el Dr. Triantaphyllou, existen tres tipos de reproducción en el género Meloidogyne: el anfimictico, el partenogenético meiótico y el partenogenético mitótico.

En la reproducción por anfimixis, cuando el oocito sale de su estado de reposo o profase y entra en metafase o telofase, se puede observar, con la ayuda del microscopio electrónico, que cerca del núcleo del óvulo se encuentra el núcleo espermático. Conforme el oocito va madurando se observan dos formas prenucleares muy cercanas una de otra, una pertenece al núcleo del óvulo y la otra pertenece al núcleo espermático. Estas dos formas prenucleares se unen y se lleva a cabo la meiosis, dando como resultado la combinación genética de ambos progenitores.



**FIGURA 14** .- Aparato reproductor masculino de Meloidogyne sp.  
( Tomado de Southey , 1965 ).

En la partenogénesis meiótica, el número cromosómico somático que tiene el oocito, se reduce conforme el huevo va madurando, esto es que durante este proceso los dos cromosomas homólogos se aparean y se reduce su número y en vez de tener un núcleo espermático que aporte la mitad de los cromosomas, como en la anfigenesis, aquí es el segundo cuerpo polar quien los aporta y lleva a cabo la combinación genética, quedando los huevos con el mismo número cromosómico somático.

En la partenogénesis mitótica el número cromosómico somático no se reduce, los cromosomas homólogos no se aparean, así que el óvulo maduro tiene el mismo número cromosómico somático y no necesita ni del espermatozoide, ni del 2º cuerpo polar para mantenerlo (65,111,112,115, 116).

#### 10.- Proceso de la muda.

Se sabe poco acerca del proceso de la muda en los nemátodos, este se lleva a cabo a intervalos durante el desarrollo del nemátodo y la larva crece en los periodos comprendidos entre cada muda (Fig. 15).

La muda se realiza en tres pasos :

- i) Formación de la nueva cutícula.
- ii) Desprendimiento de la cutícula vieja.
- iii) Ruptura de la cutícula vieja y salida de la larva o adulto.

Durante la muda en los nemátodos fitoparásitos, la parte basal del estilete se disuelve y la cabeza se separa de la parte anterior del estilete viejo, el cual permanece unido a la cutícula desechada.

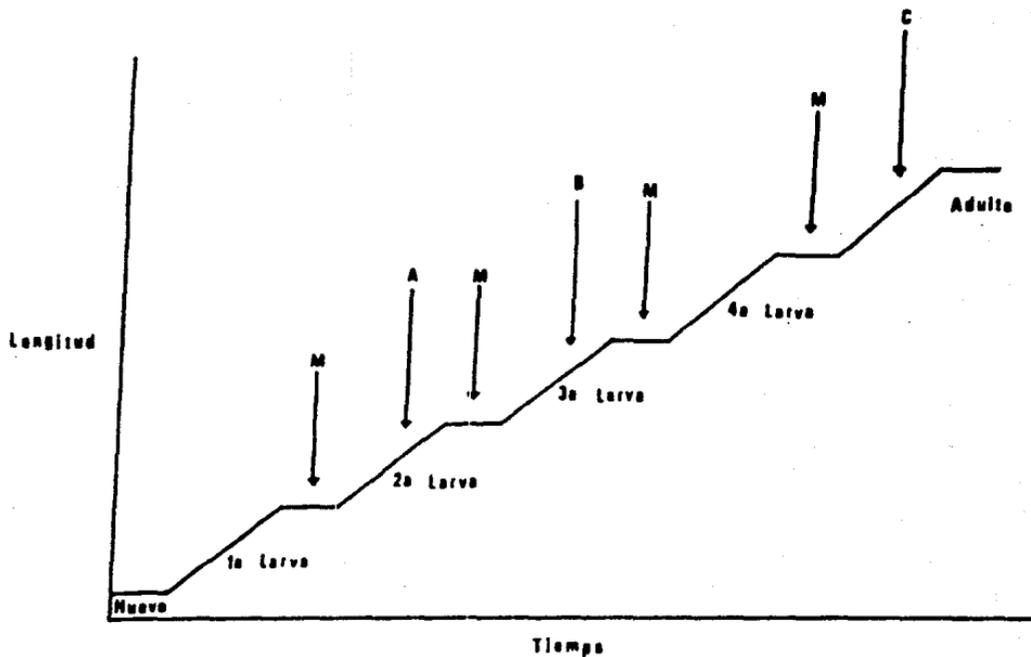


FIGURA 15 .- Ciclo de vida de un nematodo del género Meloidogyne.

M- Procesos de muda. A- Salida de la larva del huevo y penetración en el tejido radicular. B- Desarrollo del nemátodo. C- Salida del macho al suelo.

Se ha observado que en M. javanica cuando comienza el proceso de la muda, la hipodermis se engruesa y aparecen en ella pequeñas gránulos parecidos a ribosomas (Fig. 16,A). La capa fibrosa (interna) de la cutícula se separa de la hipodermis, la cual empieza a secretar la capa cortical externa de la nueva cutícula y forma consecutivamente las dos capas restantes (Fig. 16,B).

El espacio entre las cutículas se encuentra lleno de partículas que parecen estar asociadas con la disolución y reabsorción de las capas media e interna de la cutícula vieja, y al final del proceso la capa cortical externa de la cutícula vieja es eliminada (Fig. 16, C y D).

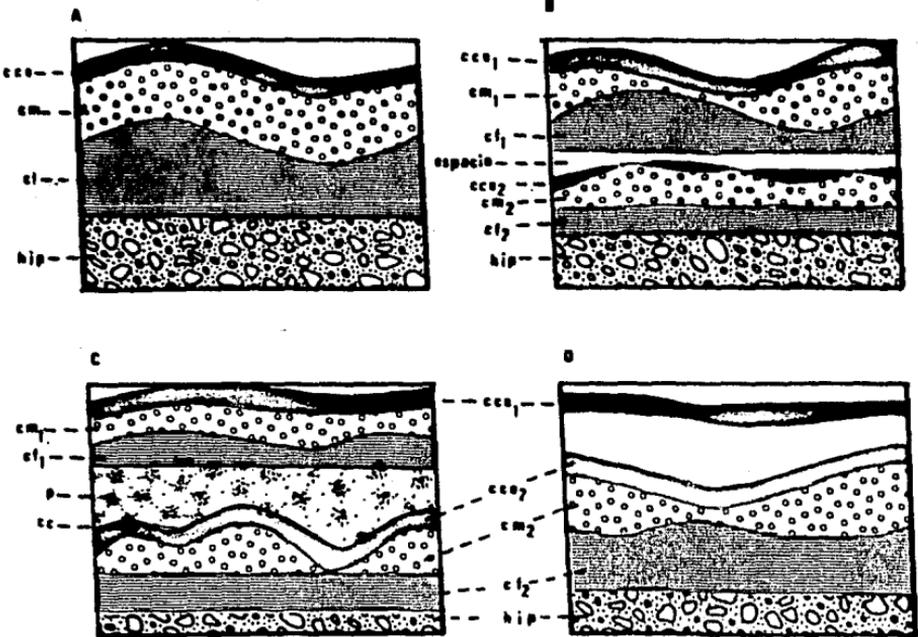
Después de la muda, la nueva cutícula mantiene una estrecha unión citoplásmica con la hipodermis y comienza a aumentar su grosor (12,65,119,125).

Cuando se ha completado el proceso de la muda, el nemátodo escapa de la cutícula vieja, la cual ha quedado como una envoltura transparente que rodea al nemátodo, rompiéndola con el estilete o rasgándola por abrasión en contra de las partículas del suelo.

#### 11.- Desarrollo y ciclo de vida.

El huevo generalmente es depositado en el estado de una sola célula. En M. incognita se ha observado que esta célula se encuentra en profase y que una vez que ha sido depositado pasa a metafase y se lleva a cabo la mitosis (116).

El huevo es depositado en la matriz gelatinosa (Fig. 13), la

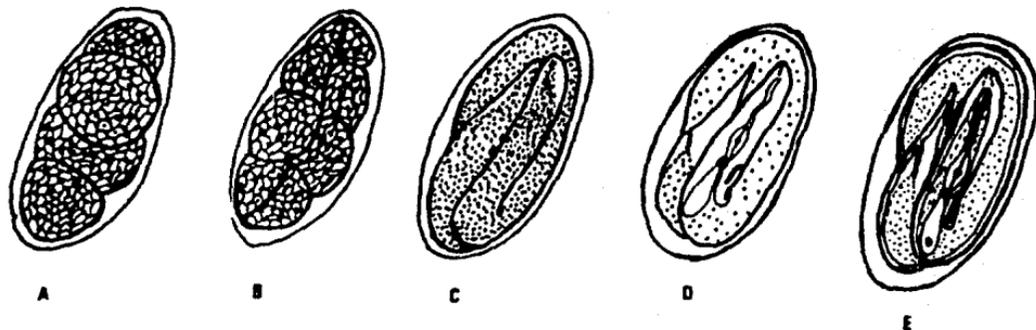


**FIGURA 16 -** Esquema que ilustra los procesos que ocurren durante la muda en *Meloidogyne javanica*. A-Cutícula de una larva antes de que se realice la muda, (cce) capa cortical externa, (cm) capa media, (cf) capa fibrosa, (hip) hipodermis. B-Comienzo de la muda en donde se observan las dos cutículas, la vieja (1) y la nueva (2) y el espacio entre ellas. C- Reabsorción de las capas media e interna de la cutícula vieja en forma de partículas (p), a través de la capa cortical (cc). D-Terminación de la muda quedando solamente la capa cortical externa de la cutícula vieja (cce<sub>1</sub>), que es desechada.

(Tomado de A. F. Bird, 1965).

cual mantiene juntos y protegidos a todos los huevos. El desarrollo del huevo comienza unas horas después de la deposición, se empieza a dividir y pasa por el estado de 2, 4, 8 células, hasta formar una larva completa con todo y estilete, que permanece dentro de la membrana del huevo (Figs 17, A, B, C y D). Este es el primer estado larval, la primera muda se lleva a cabo dentro del huevo (Fig. 17,E). Poco después esta larva emerge haciendo con el estilete un agujero en el extremo de la membrana del huevo. Esta larva es la de 2° estadio o larva infectiva, la cual a veces permanece un corto tiempo embebida dentro de la matriz gelatinosa. Después, al liberarse de la matriz, la larva se mueve libremente en el suelo en busca de alimento (Fig. 18,A). Esta larva es guiada hasta las raíces de su huésped por algunas sustancias que emanan de él. La larva infectiva penetra por la punta de la raíz y migra a través de las células no diferenciadas, hasta que llega al lugar en donde se está desarrollando el sistema vascular o estile (Fig. 18, B). El nemátodo atraviesa las células con su estilete e inyecta algunas secreciones de la glándula esofágica. Estas secreciones causan que las células del cilindro vascular se desorganicen y se aumente la división celular en el periciclo (hiperplasia), al mismo tiempo las células que están en contacto con el nemátodo coalescen y se forman las células gigantes (hinertrofia) (Fig. 18,E). Esto produce la formación de nódulos o agallas típicas que caracterizan a la infección de las raíces por estos nemátodos. (Fig. 18,C)

Mientras se forman las células gigantes y los nódulos, la larva aumenta su tamaño y grosor (Fig. 18,D). Se lleva a cabo una metamorfosis en donde las glándulas esofágicas crecen, las células del primor



**FIGURA 17 .- Desarrollo de Meloidogyne spp.**

**A- Huevo en estado de 4 células. B- Huevo en estado de 8 células. C- Principio de la formación de la larva. D- Larva de 1er. estadio completa. E- Larva de 2º estadio después de la muda .**

**(Tomado de Taylor y Sasser, 1978).**

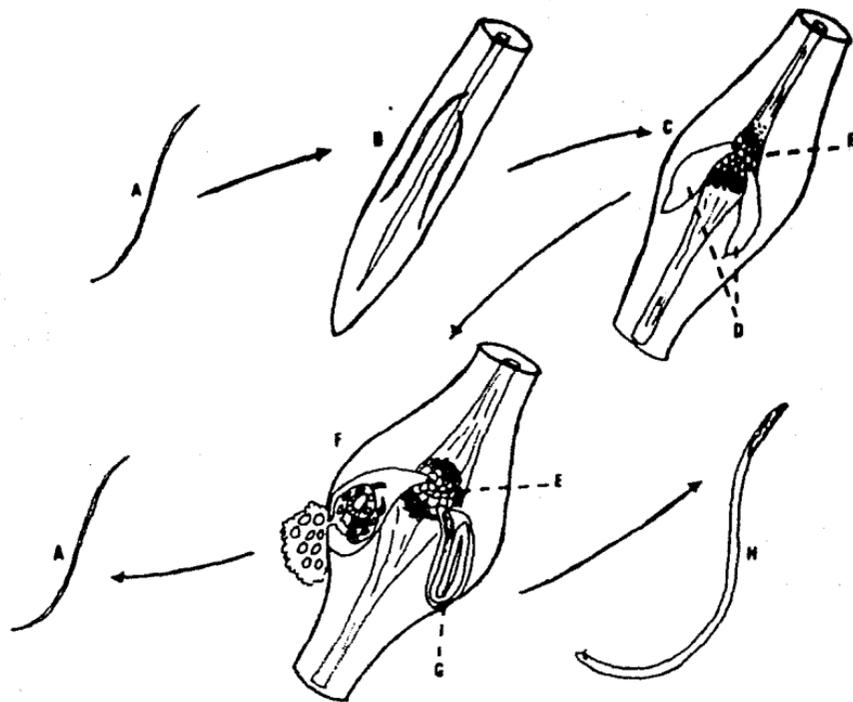
dio genital se dividen y diferencian en dos porciones en la hembra y una en el macho. Las seis glándulas rectales de la hembra empiezan a crecer cerca de la parte posterior. Conforme la larva continúa alimentándose, su cuerno aumenta de tamaño y toma una forma sacular. Al completarse la 2a. y 3a. muda el estilete y el bulbo medio desaparecen, poco después de la 4a. muda el estilete y el bulbo medio se regeneran, el útero y la vagina se forman y el patrón cuticular posterior se hace visible.

Un poco antes de la 2a. muda, la gónada del macho se encuentra cerca de la parte posterior del cuerno y se ve el recto. Después de la 2a. y 3a. muda no se observa el estilete y el bulbo medio degenera, solamente la gónada ha crecido. En este momento se lleva a cabo una metamorfosis rápida, el cuerno se alarga dentro de la cutícula y se desarrolla completamente, observándose el estilete, el anófago con el bulbo medio, las esículas y el espermatozoide en el testículo (Fig. 18,G). Poco después, el macho se libera de la cutícula y sale de la raíz quedando en el suelo adyacente a ella (8,21,26,62,65,76,95,107,111,112,113,114, 115,116,117,118,119,121,122). (Fig. 18,H)

e) Relaciones hospedero-parásito.

El estudio fisiológico de la relación hospedero-parásito, prácticamente se inicia en el siglo XX.

La primera evidencia de que los nemátodos noduladores de raíces presentaban cierta especificidad hospedatoria fue reportada en 1939 por Sherbakoff, quien encontró que en cultivos de algodón (Gossy-



**FIGURA 18 .-** Esquema del ciclo de vida de Meloidogyne spp .  
 A- Larva de 2º estadio. B- Dos larvas adheridas al estele alimentándose. C- Principio de la formación del nódulo. D- Larvas en desarrollo. E- Células gigantes. F- Nódulo con hembra madura y masa de huevos. G- Macho después de la metamorfosis. H- Macho libre en el suelo. (Tomado de Taylor y Sasser, 1978).

nium hirsutum) que habían sido sembrados en tierras en donde anteriormente se había cultivado algodón también, se presentaba un alto índice de infección por nemátodos noduladores; pero si sembraba algodón en tierras en donde se había cultivado jitomate (Lyconersicon esculentum) y que había presentado graves daños por la infección de este nemátodo, el algodón no sufría daño alguno. Esto demostraba la diferente susceptibilidad de los cultivos al ataque de los nemátodos.

Tyler (23) definió esta susceptibilidad de las plantas como una condición en la que el hospedero debía ser el adecuado para que fuera atacado por un parásito dado, sin embargo, no definió la resistencia de la planta basándose en esto, sino que la definió como la habilidad o capacidad de la planta para evitar la invasión de los parásitos. Obviamente Tyler concibió la resistencia de la planta al ataque de los parásitos como una condición en la que las larvas no podían penetrar en las raíces de las plantas, o si lo hacían, eran tan pocas que no causaban daño. Esta concepción probablemente se reflejó en el punto de vista tomado por los investigadores de ese tiempo. Sin embargo Barrons (4) había demostrado que si dos plantas tenían una oportunidad igual de ser atacadas por los parásitos, un número semejante de larvas entraría en las raíces, pero no presentarían ambas los mismos signos de la infección.

La Page (64), refiriéndose a los nemátodos parásitos de animales propuso como criterios de resistencia del huésped al parásito los siguientes:

- 1.- La incapacidad de los nemátodos para vivir dentro de su huésped o su muerte inmediata dentro de él.

2.- Decrecimiento en la producción de huevos y larvas.

3.- Inhibición del crecimiento o desarrollo del parásito.

Como resultado del trabajo realizado por Gemmell (43) en 1943, sobre Heterodera rostochiensis, se concluyó que estos criterios enunciados por La Page se podían aplicar a los nemátodos fitoparásitos y no sobre todo a los sedentarios como los del género Meloidogyne, ya que éstos permanecen en un sólo lugar de la planta y debido a una secreción producida por ellos mismos (68,69), provocan grandes cambios en la morfología y fisiología de los tejidos vegetales que los rodean, produciéndose las células gigantes (21), por lo que la planta "se vé obligada" a alimentar al parásito sin que éste cambie de lugar (23).

Pero si estos cambios no tienen lugar y la raíz continúa su desarrollo normal, el parásito se verá rápidamente rodeado por las células de la corteza y los tejidos especializados del cilindro vascular, muchas de las células tendrán una pared muy gruesa y los nemátodos sedentarios al poseer un estilete pequeño serían incapaces de perforar estas paredes y al no poder alimentarse morirían rápidamente.

Barrons (4) sugirió como una hipótesis especulativa, con base en los experimentos que hizo, que la resistencia puede ser debida a la presencia de ciertas sustancias químicas dentro de las raíces de las plantas resistentes que contraactúan o neutralizan el efecto de la inducción de la formación de las células gigantes producidas por las secreciones salivales de los nemátodos. Esta hipótesis puede ser posible, pues los diferentes grados de resistencia, por ejemplo, pueden ser debidos a la capacidad de diferentes plantas para sintetizar sustancias neutralizadoras.

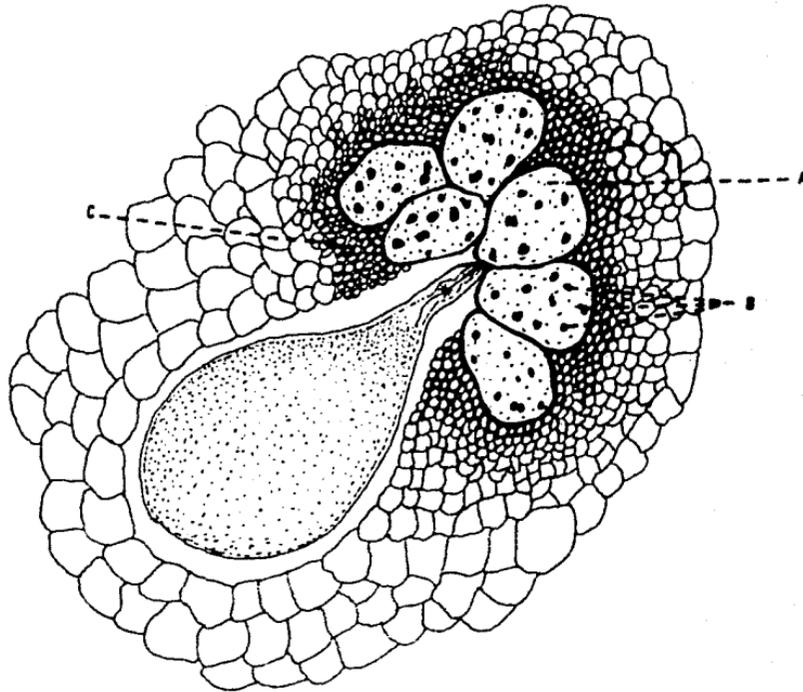
De cualquier forma, los tejidos de diferentes plantas o los diferentes tejidos de una misma planta, reaccionan de una manera distinta a un estímulo dado, y aquí se encuentra también la razón del por qué algunas plantas son susceptibles y otras no al ataque de ciertas especies de Meloidogyne, y por qué algunas plantas no forman agallas, aún cuando se encuentran infectadas (1,4,5,21,22,23,62,107,125).

f) Histología y patogénesis.

En el género Meloidogyne, al quedar la larva de 2º estadio libre en el suelo, se acerca a las raíces de su posible hospedero y penetra en él. Christie (21) reporta que estas larvas migran entre las hileras de células sin dañarlas la mayoría de las veces, aunque también observó que algunas larvas atraviesan las células causándoles un daño ligero. Cuando la larva llega al lugar en donde se está desarrollando el sistema vascular de la planta, comienza a alimentarse, las células aumentan su presión de turgencia, probablemente por la hidrólisis del almidón contenido en ellas, producida por la acción de la amilasa presente en las secreciones de la larva.

La secuencia del desarrollo de las células gigantes, es de la siguiente manera (37) :

Cerca de la cabeza de la larva se empieza a observar una intensa multiplicación celular seguida por una hipertrofia de las células que se encuentran en las inmediaciones de la boca; la disolución de las paredes celulares de estas células hipertrofiadas da como resultado células multinucleares, que son las células gigantes (Fig. 19).



**FIGURA 19** .- Hembra de Meloidogyne alimentándose del tejido radicular. A- Células gigantes. B- Núcleos. C- Zona de proliferación celular (hiperplasia).

Estas células no llevan a cabo la división nuclear y se pueden dividir en cuatro tipos dependiendo del huésped, si es o no favorable al desarrollo del nemátodo, o sea, si es o no susceptible. Esta clasificación de las células gigantes se basa en la morfología que presentan. El tipo I se refiere a una reacción hipersensitiva, en la cual las células que rodean a la larva mueren y no se lleva a cabo ningún desarrollo posterior. En el tipo II, las células realizan una fusión moderada y presentan grandes números de inclusiones celulares de diferentes clases. En el tipo III, las células son muy grandes con varios núcleos y con un citoplasma difuso y muy vacuolado. Estos tipos, el I, II y III, siempre están asociados con parásitos muy poco desarrollados y que solamente logran depositar unos cuantos huevos, o sea que corresponden a huéspedes resistentes y tolerantes. En el tipo IV, las células son multinucleadas con una pared celular gruesa, un citoplasma denso y unas pocas inclusiones celulares. Están asociadas con el rápido desarrollo del parásito y una producción de huevos muy abundante, o sea que siempre se encuentran en los huéspedes que son susceptibles a la infección por el nemátodo nodulador.

Como se ha visto, para que la infección de una planta por las larvas de un nemátodo fitoparásito sea efectiva, tanto la planta como el parásito deben ser compatibles. Cuando una larva penetra en la raíz de una planta resistente pueden presentarse las siguientes situaciones:

- 1.- El nemátodo puede desarrollarse hasta llegar a ser una hembra madura, pero que no produce huevos o estos son defectuosos.
- 2.- El nemátodo puede desarrollarse y ser un macho adulto.
- 3.- No tener un desarrollo completo, o sea que no lleve a cabo

la 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> o 4<sup>a</sup> muda.

4.- La larva puede morir por una reacción inmune o dejar la raíz y buscar otro huésped más adecuado.

Todo esto hace que la población de nemátodos de un suelo infestado se reduzca, pero no se puede decir que estas reacciones sean completamente positivas, puesto que al llevarse a cabo éstas, tienden a seleccionar poblaciones que sean más adaptables al medio ambiente adverso, ya que entre todos los nemátodos de la población, tal vez haya uno que si se pueda reproducir y dar origen a un nuevo tipo o raza del parásito (9,14,23,31,62,76,86,87,95,107,118,121,122,125).

g) Efectos producidos por el parásito en la planta huésped.

Como se ha visto ya, las raíces sufren deformaciones debidas a la hipertrofia e hiperplasia ocasionadas en ellas por la acción del nemátodo, esto obviamente induce a que el sistema radicular se vea afectado en su desarrollo y esto afecta directamente al crecimiento y producción de la planta. Por consiguiente la fisiología de la misma también se ve afectada, pues se ha visto que en las plantas afectadas se incrementa la síntesis de proteínas en la raíz y se reduce el transporte de las sustancias para el resto de la planta, aunado a esto se tienen evidencias de que la fotosíntesis disminuye notablemente debido a la infección de los nemátodos.

Todo esto debilita a la planta y hace que sea fácilmente atacada por otros fitopatógenos, condición a la que se le llama predisposi-

ción.

Por ejemplo en variedades o cultivares resistentes al ataque de Fusarium sp., se ha observado que en presencia de Meloidogyne spp. se presentan graves infecciones por este hongo. Lo mismo sucede con Alternaria, Phytophthora, Verticillium y Rhizoctonia.

Pythium ultimum es el causante del Damping-off del tabaco, cuando éste se encuentra en la etapa de germinación. Cuando la planta se encuentra en estado de madurez, el ataque de este hongo no representa un grave peligro para los cultivos. Sin embargo, se ha podido comprobar que si las plantas maduras de tabaco están infectadas con Meloidogyne y presentan nodulaciones radiculares, el efecto del hongo es notable, o sea que los cultivos que son atacados gravemente por Pythium, llegan a alcanzar pérdidas hasta de un 57 % (107).

Lo mismo sucede con Curvularia trifolii, Botrytis cinerea, Aspergillus ochraceus, Penicillium martensii y Trichoderma harzianum, los cuales no están considerados como patógenos para el tabaco, o sea que no causan un daño significativo cuando se inoculan solos en las plantas de tabaco, pero cuando interactúan con Meloidogyne, se convierten en hongos patógenos para el tabaco (107).

Esto nos hace afirmar que los nemátodos al ser los responsables inmediatos de los cambios sufridos en la fisiología de la planta, son también los responsables indirectos del ataque de otros patógenos, aunque éstos estén considerados como inocuos cuando la planta está saludable, por lo que el daño que presentan las plantas, muchas veces es debido a la interacción del nemátodo con otro fitopatógeno, más que a la sola acción del nemátodo o del otro fitopatógeno (62,65,76,107,118,

119, 121, 122, 125).

## h) Ecología.

Las poblaciones de Meloidogyne más importantes las encontramos en los suelos cultivables, generalmente se hallan en la capa de tierra superficial, de 5 a 30 cm. de profundidad y se van haciendo más escasos a 1 m.

Cuando en el suelo se encuentran plantas susceptibles, el factor más importante para la supervivencia de los nemátodos es la temperatura del suelo, la cual es determinada por el clima, el cual a su vez depende de la latitud, elevación sobre el nivel del mar, localización geográfica y variación estacional.

El segundo factor importante es la humedad del suelo, la cual depende del riego del terreno o de las lluvias. En los suelos cultivables, la humedad suficiente para el crecimiento de las plantas es la necesaria para la actividad de los nemátodos.

También la textura del suelo es importante para la densidad de la población de nemátodos.

Para los huevos y larvas dos rangos de temperatura son importantes, puesto que una determina la supervivencia de huevos y larvas en el suelo frío ( de 0° hasta 5° C.) y la otra determina la infectividad de éstos en el suelo caliente ( de 35° hasta 40° C.).

Las especies de Meloidogyne dependen del agua del suelo para llevar a cabo sus actividades. La humedad óptima para su supervivencia debe estar cerca del 100 %, si hay una humedad menor, la emergencia de

larvas de los huevos decrece, ya que los huevos se deshidratan. Si es mayor esta humedad, también decrece la emergencia de larvas y sus movimientos se ven afectados por la falta de oxígeno.

Las larvas se mueven entre las partículas del suelo y los espacios por donde se deslizan los nemátodos dependen del tamaño de las partículas. Se ha visto que los nemátodos tienen una mayor reproducción y desarrollo en los suelos arenosos. En los suelos arcillo-arenosos, también se ha observado una densidad de la población de nemátodos bastante importante.

La presión osmótica también afecta la emergencia de las larvas, puesto que conforme el agua se va evaporando del suelo, la concentración de sales aumenta y a veces la presión osmótica excede de las 2 atmósferas. Cuando el suelo se humedece de nuevo, las larvas pueden salir de los huevos. Esta reacción es importante en las zonas en donde se presentan estaciones de sequía muy prolongadas.

El pH del suelo en un rango de 4.0 - 8.0 tiene poca influencia directa sobre la actividad de las larvas de Meloidogyne. Pero si el pH se encuentra en un rango favorable ( 6.5 - 7.5 ) para el crecimiento de las plantas, los nemátodos se encuentran en una condición óptima para desarrollar su máxima actividad (107,125).

Los exudados radiculares también afectan en cierta medida a las larvas, ya que algunas sustancias las atraen hacia las raíces y otras las repelen.

El oxígeno que se encuentra en el suelo también afecta al desarrollo de los nemátodos, pues se ha visto que en suelos bien aireados, la producción de huevos y nódulos radiculares es mayor que en los sue-

los pobres en oxígeno ( 6,8,62,106,120,125).

B.- Generalidades sobre los métodos taxonómicos actuales para la identificación de las especies del género Meloidogyne.

a) Método morfológico o clásico.

El estudio morfológico de los nemátodos se basa en el análisis de algunos caracteres esenciales, que posteriormente nos ayudarán a presentar una diagnosis adecuada de la especie, que se quiere identificar.

Primeramente antes de iniciar el análisis morfológico de la especie, debemos asegurarnos de tener suficientes ejemplares fijados y montados, además de tener en un invernadero, algunas plantas infectadas que mantengan la población de organismos que estamos estudiando y de las que podamos extraerlos si nos es necesario, ya que algunas observaciones y medidas son más exactas cuando los nemátodos están vivos, pues a veces los procesos de preservación y montaje dificultan la observación de algunos caracteres.

En 1949 Chitwood publicó un artículo en donde se hace una revisión del género Meloidogyne (19) y propuso una serie de caracteres morfológicos básicos para la identificación de las especies. Este sistema de clasificación fue el primero en que se hace una diagnosis de las características de los patrones cuticulares posteriores de las hembras, además de tomar en cuenta las características de las larvas de 2º estadio, machos, hembras y huevos.

En 1968 Whitehead publicó una monografía en donde propone una descripción similar a la de Chitwood.

En 1976 Esser, Perry y Taylor (41) publicaron un compendio de la diagnosis del género Meloidogyne, en donde se presentan tablas formadas por datos seleccionados y que se consideran esenciales para la identificación de las especies.

Los criterios de selección de caracteres para estas tablas se basan en los siguientes puntos:

- 1.- Las estructuras deben ser fácilmente observables.
- 2.- Las estructuras deben ser fácilmente medibles.
- 3.- Las medidas deben estar bien representadas en todas las especies.
- 4.- Las medidas deben ser lo suficientemente discretas para poderlas usar comparativamente.

Los datos y estructuras a observar propuestas por estos autores son las siguientes:

I.- Hembras :

1.- Protuberancia posterior. Este es un caracter importante en la diferenciación de las hembras, ya que la mayoría de las especies que lo presentan son inconfundibles.

2.- Incisuras laterales. La presencia o ausencia de éstas es un caracter importante en la identificación.

3.- Longitud del estilete.

4.- Estrías en los labios de la vulva.

5.- Poro excretor. La posición de éste puede servir como un carácter auxiliar en el análisis y es más fácil de observar en organismos vivos.

6.- Patrones cuticulares posteriores o patrones perinea -

les. Este es un carácter que varía bastante, aún dentro de la misma especie, sin embargo, conserva una disposición determinada en cada especie que puede servir como una guía para el análisis de la misma.

Para simplificar un poco el estudio y descripción del patrón perineal, éste se ha dividido en 4 regiones o zonas (Fig. 20).

La primer área es la del perineo (P) que se encuentra dentro de la zona 1. El perineo se define como el triángulo que forman el ano y la vulva.

La zona 1 es un área circular que se encuentra en el centro del patrón, generalmente está libre de estrías y si las presenta éstas son continuas, pocas y aisladas.

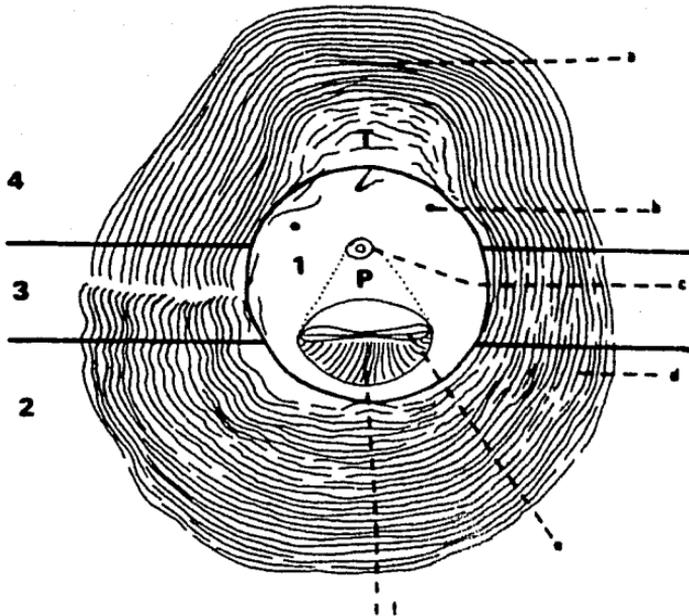
La zona 2 es el área que se encuentra debajo de la vulva y específicamente se refiere a la masa o banda de estrías que se encuentran directamente debajo del área del perineo.

La zona 3 comprende al grupo de estrías laterales al perineo, cuando se presentan las incisuras laterales, éstas se deben considerar en el análisis como estructuras discretas y no como estrías interrumpidas o incompletas.

La zona 4 engloba al grupo de estrías que se encuentran arriba del ano. El área de la cola (T) es un área circular que se encuentra exactamente arriba del ano y está caracterizada por presentar la protuberancia posterior o cola y algunas estrías cortas y quebradas.

## II.- Machos :

- 1.- Desembocadura de la glándula esofágica dorsal.(Fig. 8)
- 2.- Longitud de las espiculas. (Fig. 8)



**FIGURA 20.** Patrón perineal dividido en zonas.

a - Estrías lisas. b - Fasmidios. c - Ano. d - Estrías interrumpidas. e - Vulva. f - Estrías de la vulva. T - Zona de la cola. P - Perineo. (Tomado de Esser, Perry Taylor, 1976.)

3.- Anillos cuticulares cefálicos. (Fig. 8)

4.- Líneas laterales e incisuras laterales. Estas son estructuras definitivas y fácilmente observables, se pueden usar como un carácter importante para la identificación. (Fig. 3)

### III.- Larvas de 2º estadio :

1.- Longitud del cuerpo.

2.- Dilatación del recto. Este carácter se puede observar fácilmente a inmersión en los ejemplares vivos y está considerado como un carácter importante en la identificación. (Fig. 8)

3.- Hemizonidio. La posición de éste, anterior o posterior al poro excretor constituye otro de los caracteres importantes en la identificación (Fig. 5).

4.- Alfa (a). Es un índice dado por la división del largo total del cuerpo entre el ancho del mismo.

5.- Gamma (c). Este índice se obtiene mediante la división de la longitud total del cuerpo entre la longitud de la cola, siendo ésta última medida tomada desde el ano hasta la parte terminal del nemátodo.

6.- Gamma' (c'). Este índice se obtiene dividiendo la longitud de la cola entre el ancho del cuerpo.

7.- Longitud del estilete.

Para proceder a la identificación de las especies se sugiere que los datos que se tomen se arreglen en el orden siguiente:

I.- Hembras maduras :

- Protuberancia posterior.

- Incisuras laterales.
  - Posición del poro excretor en relación al estilete.
  - Nivel del poro excretor dado en función a la longitud del estilete.
  - Estrías en los labios vulvares.
  - Estrías en el perineo.
  - Estrías en la zona 1
  - Estrías en la zona 2
  - Estrías en la zona 3
  - Estrías en la zona 4
- } Descripción.

## II.- Machos :

- Longitud del estilete.
- Número de anillos entre los nódulos basales y la desembocadura de la glándula esofágica dorsal.
- Longitud de las espículas.
- Número de incisuras laterales.
- Campos laterales areolados.
- Número de anillos cefálicos.
- Alfa (a)

## III.- Larvas de 2º estadio :

- Longitud total.
- Recto dilatado.
- Localización del hemizonidio en relación al poro excretor.

- Alfa (a).
- Gamma (o).
- Gamma' (c').
- Longitud del estilete.

Con estas medidas se elaboran tablas y los promedios obtenidos de ellas se comparan con los datos presentados en las claves para la identificación.

Generalmente la identificación así obtenida se refuerza con di bujos hechos con la cámara clara y con fotografías tomadas con un foto microscopio.

Ya con todo este material se procede a hacer la diagnosis de -  
la especie identificada (19,35,41,44,47,50,94,106,107,109).

- b) Método de identificación por hospedantes diferenciales.

El género Meloidogyne es uno de los principales responsables de la formación de nódulos radiculares en las plantas.

El estudio de la resistencia y susceptibilidad de las plantas al ataque de este nemátodo, ha llevado a los investigadores a realizar numerosos experimentos, para determinar la especificidad hospedatoria de las especies de este género, la cual puede ser demostrada por la distinta "preferencia" de huéspedes que presentan estos organismos. Con estos experimentos se ha observado que algunas especies son más específicas que otras, ya que para cada especie hay cultivos que no son susceptibles a su ataque.

Estas diferencias de susceptibilidad, han hecho posible que se obtenga un esquema de identificación, basado en la respuesta a la infección de ciertas especies de plantas con una sola especie de nemátodos perteneciente a este género. Este método se ha denominado como identificación mediante hospedantes diferenciales, en donde éstos son expuestos a la infección de una especie del género Meloidogyne, pudiéndose identificar a ésta dependiendo del hospedante atacado y del grado de la infección.

Este método ayuda también a hacer una separación de las diferentes razas de cada especie de acuerdo con los patrones de infección, de los hospedantes diferenciales, etc. Un ejemplo de esto lo presenta M. incognita, especie de la cual se han podido separar 4 razas diferentes por este método.

El término raza o raza biológica al que nos referimos, simple-

mente indica que en una especie se pueden encontrar poblaciones que tengan un comportamiento fisiológico diferente y que su morfología no presente casi o ningún cambio visible, por lo que no se les puede separar morfológicamente, pero fisiológicamente sí. Estas razas se pueden producir por varias causas, siendo una de ellas el aislamiento geográfico, con la consiguiente adaptación al medio ambiente particular.

Es por estas razones que este método de identificación ha tenido tanto éxito en la separación de razas de una misma especie en el género Meloidogyne.

Los experimentos realizados por Sasser (90) en E.U. confirman la validez de este método. Este autor propone los siguientes cultivos o variedades como los más apropiados para la realización de estas pruebas :

Tabaco	( <u>Nicotiana tabacum</u> )	var. NC 95
Pimentón	( <u>Capsicum frutescens</u> )	var. California Wonder.
Algodón	( <u>Gossypium hirsutum</u> )	var. Delta Pine 16.
Cachuate	( <u>Arachis hypogaea</u> )	var. Florunner.
Sandía	( <u>Citrullus vulgaris</u> )	var. Charleston Gray.
Tomate	( <u>Lycopersicon esculentum</u> )	var. Rutgers.

Estos cultivos son muy utilizados en la identificación de las especies más comunes como son :

M. incognita

M. arenaria

M. javanica

M. hapla

## c) Método de identificación citogenético.

Este método se basa en el estudio citogenético de las especies del género Meloidogyne. Triantaphyllou ha reportado la variación genética existente en las especies de este género, por ejemplo, al estudiar los cariotipos de M. graminis y M. ottersoni, encontró una estrecha relación de estas dos especies, lo mismo sucedió con M. graminicola y M. naasi. Estas cuatro especies tienen una relación entre sí, se reproducen por partenogénesis meiótica cuando, por cambios en el medio ambiente, la cantidad de machos en la población se reduce demasiado, pero si el número de machos es suficiente, se reproducen por anfimixis - (113,114,115,116).

Hackney reporta la utilidad del uso de este método en la identificación de especies de este género que se encuentran atacando los viñedos del Valle de California en E.U. Mediante esta técnica, este autor, logró separar diferentes especies de una sola población que morfológicamente correspondía a M. arenaria. Los números cromosómicos que obtuvo fueron:

43, 47, 42, 37, 52 y 17

que corresponden respectivamente a:

M. javanica, M. javanica, M. incognita, M. arenaria (forma 2n), M. arenaria (forma 3n) y M. hapla raza A. Aunque los números cromosómicos de 43 podrían indicar que se trataba de M. javanica o de M. incognita, pues ambas especies pueden presentar este número, se vió que se trataba de M. javanica al observar los patrones perineales correspondientes (47,54,55).

El uso de los cariotipos es también muy útil, sobre todo cuando existen dudas acerca de la respuesta de las pruebas con los hospedantes diferenciales, ya que a veces estas respuestas son confusas, puesto que estos nemátodos pueden cambiar su "preferencia" por los hospedantes, dependiendo de las alteraciones del medio ambiente y al hacer un estudio citogenético de estas poblaciones, se eliminan las dudas acerca de que especie se trata, o sabemos si nuestra población es una mezcla de razas de una misma especie, como sucede con las dos razas de M. hapla, cuya respuesta a los hospedantes diferenciales es idéntica y solamente se pueden separar mediante el número cromosómico que en la raza A corresponde a 17 y en la raza B corresponde a 15. (107,116).

## d) Método de identificación por inmunodifusión.

La inmunodifusión es una de las técnicas más simples y directas para demostrar las reacciones de antígenos y anticuerpos en el laboratorio. La aplicación de estos métodos de inmunodifusión en la Taxonomía apenas están siendo probados, pero hasta ahora se han tenido resultados muy interesantes, sobre todo para aclarar las relaciones filogenéticas entre las especies, pues mientras más cercanas son éstas, las reacciones serológicas presentan una respuesta de identidad positiva -- más definida.

La técnica empleada en la identificación de las especies del género Meloidogyne es la de doble difusión en agar, la cual se basa en el principio de que el antígeno, así como el anticuerpo, difunden a través de un medio semisólido como en el agar y forman complejos inmunes estables que pueden ser analizados visualmente.

La prueba se realiza colocando agar en una caja de Petri, al cual, después de que se solidifica, se le practican unos pequeños agujeros en donde se coloca el anticuerpo en el agujero central y el antígeno en los periféricos. Al reaccionar el antígeno con el anticuerpo, se forman bandas de precipitación entre cada uno de estos agujeros y que son fácilmente visibles. (126).

Este método aún no ha sido del todo aceptado para la identificación de las especies de Meloidogyne, aunque se ha visto que da buenos resultados cuando se quiere conocer que tan relacionadas están, serológicamente, dos o más poblaciones de una misma especie que se encuentran distribuidas en diferentes partes del mundo y, por lo tanto,

presenten un rango de hospedantes diferente.

Un ejemplo está dado en el reporte de Hussey (57), en donde establece la relación entre dos poblaciones de M. incognita, una de Perú y otra de Taiwan, siendo las dos idénticas serológicamente, ya que las bandas de precipitación que se formaron en la placa de agar entre los antisueros correspondientes, coalescieron, indicando una reacción positiva. En cambio, en las bandas formadas por los antisueros de dos poblaciones de M. arenaria, una del estado de Virginia en E.U. y otra proveniente de Grecia, las bandas de precipitación observadas en la placa, no fueron uniformes y no todas las bandas coalescieron, lo que indicó una diferencia entre estas dos poblaciones.

Estos experimentos nos dan una información mayor acerca de las características filogenéticas de estas especies y, por tanto, podemos aclarar las dudas que quedan al hacer los estudios morfológicos y fisiológicos, además de poder comprobar si por la variación en los números cromosómicos, es que se dan las diferentes respuestas serológicas (66, 57).

a) Método de identificación por electroforesis.

El análisis de la heterogeneidad de las proteínas de un individuo siempre está dado por el uso de los métodos de electroforesis, donde las proteínas son separadas mediante las cargas eléctricas que presentan en su superficie.

En el método de electroforesis de zona, las sustancias que se desean analizar, se colocan en una tira o banda de acetato de celulosa, la cual es una materia inerte que no causa interferencia en el campo eléctrico y por lo tanto no impide que las proteínas migren hacia su polo respectivo.

La banda de acetato de celulosa con la sustancia que se desea analizar se coloca en un recipiente con un buffer electrolito y se aplica la energía; en un lapso de 60 a 90 minutos las proteínas se separan y posteriormente se tiñen con técnicas específicas para poder identificar las diferentes proteínas que se separaron. Esta banda también se puede pasar por un densitómetro de barrido, el cual nos dará una gráfica, en donde cada pico de la misma corresponderá a cada una de las proteínas separadas. (126)

Actualmente se ha observado que los nemátodos, como cualquier otro organismo, presentan patrones de proteínas específicas para cada especie. Se han investigado proteínas y varias isozimas, mediante un análisis directo de ejemplares únicos, con el objeto de conocer la variabilidad genética de los mismos, lo cual no es raro debido a que algunos nemátodos como los del género Meloidogyne, se pueden reproducir por partenogénesis. Esta variación se ha encontrado en la formación de

esterasas, a-glicerofosfatos y malato-deshidrogenasas, en cambio parece que la producción de catalasa está dada por un solo loci que se mantiene constante en el género Meloidogyne.

De acuerdo con estas características, se pueden hacer electroforetogramas para cada especie, Dalmasso y Berge (30) reportan los que obtuvieron para M. arenaria, M. javanica, M. incognita, M. hapla y M. naasi, proponiendo a los patrones de esterazas obtenidos como un punto de referencia para su identificación, ya que éstos son los que mejor mantienen su uniformidad y las mismas características para cada especie.

Este método, para establecer los patrones enzimáticos y proteínicos de las especies de Meloidogyne, es muy útil para realizar la identificación de las mismas, ya que muchas poblaciones presentan caracteres morfológicos atípicos, diferentes rangos de hospedantes y variación en los cariotipos. Es bien conocida la variación de los patrones perineales dentro de una población, lo que ocasiona innumerables confusiones, así mismo las pruebas con los hospedantes diferenciales, pueden ocasionar resultados equivocados, ya que puede tratarse de una mezcla de poblaciones o razas.

La determinación de las especies mediante el análisis cromosómico o de cariotipos, ha progresado bastante, pero requiere del examen citológico de varios ejemplares y, a veces, se presenta el problema de que dos especies tienen el mismo número cromosómico. Se ha observado que las hembras de Meloidogyne, al reproducirse por partenogénesis, presentan mutaciones que se aíslan genéticamente, con la consecuencia de que se forma una multitud de clones, lo que complica más la tarea de

los taxónomos.

La genética molecular ataca el problema de la especiación en los organismos partenogénéticos y, la electroforesis, ha empezado a usarse como una ayuda taxonómica (10,30,33,34,53,59,60,81,89).

## IV. MATERIALES Y TECNICAS.

## A.- Muestreo.

En un terreno de cultivo, en donde se sospecha que existen nemátodos que pueden atacar a las plantas, es necesario examinarlas, así como al suelo en donde se encuentran, para poder determinar las especies de nemátodos que pudieran causar daño al cultivo.

El lugar de muestreo se determina por la observación directa del cultivo y, prestando mayor atención a aquellas zonas en donde las plantas presentan síntomas de ataque, como pueden ser un crecimiento reducido, baja producción, clorosis en las hojas y, en el caso particular del género Meloidogyne, la nodulación típica de las raíces.

De acuerdo con esto, el cultivo seleccionado para realizar este trabajo, fue el de margaritón (Crisantemum maximum Ramond), localizado en el poblado de San José Villa Guerrero, Estado de México; puesto que ahí se observó un fuerte ataque del nemátodo nodulador, Meloidogyne spp., lo que ha causado grandes pérdidas a los floricultores de la localidad, cuya fuente principal de ingresos es la venta de esta flor.

El terreno muestreado tenía una extensión de 2 Ha. Se trazó una cuadrícula imaginaria sobre él, y se tomaron las muestras al azar hasta completar 25. De esta forma se realizaron los tres muestreos necesarios, uno en el verano de 1977, otro en el otoño de ese mismo año y el último en el invierno 77-78.

Para tomar la muestra, se retiraron los primeros 5 cm. superfi

cialan que rodeaban a la planta elegida. Después se extrajo la planta, cuidando de sacar la raíz completa; se tomó aproximadamente 1 kg. del suelo que la rodeaba y se colocó dentro de una bolsa de plástico, conjuntamente con la planta. La profundidad a que fueron tomadas las muestras, fluctuaba entre 20 y 40 cm., dependiendo del tamaño de la raíz.

La bolsa con la muestra se cerró perfectamente con una liga y se etiquetó, anotándose los siguientes datos :

Nombre de la localidad.	Fecha del muestreo.
Número de la muestra.	Nombre vulgar y científico
Nombre del colector.	del hospedante.

Estas muestras se trataron con cuidado para no afectar a los nemátodos y por esta razón se tuvo cuidado de no exponerlas al sol.

La muestra debe analizarse, si no el mismo día, al día siguiente de ser tomada, pues si se deja que pase el tiempo, disminuirá la población de nemátodos fitoparásitos y aumentará la de saprófitos.

Cuando por causas de fuerza mayor no se pueden procesar las muestras inmediatamente, se pueden conservar en el refrigerador a 4° C por no más de 10 días, o también se puede homogenizar la muestra, separar unos 200 gr. y fijar esta porción del suelo con formol al 10 % , aunque de esta forma los nemátodos no quedan en muy buenas condiciones para hacer un estudio taxonómico, si se pueden identificar para hacer con ellos una cuantificación de la población (61).

## B.- Extracción.

Para hacer un estudio de identificación de nemátodos es necesario obtenerlos de diferentes formas, dependiendo de la movilidad de los mismos, de su sexo o estadio, o sea, machos, hembras y larvas. También es necesario tomar en cuenta si son endo o ectoparásitos y si son móviles o sedentarios. Para obtener a los nemátodos del género Meloidogyne, empleamos las siguientes técnicas:

## a) Extracción de nemátodos del suelo por centrifugación.

1.- Se coloca la muestra sobre un plástico, se deshacen los terrones y se retiran las basuras, piedras, etc. Se remueve bien la tierra para homogenizarla.

2.- En una probeta o vaso de precipitados se ponen 200 ml. de agua y se agrega el suelo, hasta que la marca del agua llegue a los 400 ml. Esto se hace con el objeto de tener una referencia del tamaño de la población de nemátodos que se encuentra en 200 ml. de suelo, sobre todo si se desea hacer un estudio cuantitativo.

3.- Esta mezcla se vacía en una cubeta A, con un poco más de agua, se deshacen los grumos y se vacía el sobrenadante en un tamiz de 100 mallas y otro de 325 mallas por  $\text{cm}^2$ , y éste se recoge en la cubeta B.

4.- Esta operación se repite dos veces más. La arenilla que queda en el tamiz de 100 mallas se retiene en un vaso de precipitados aparte para realizar la técnica de extracción por incubación.

5.- La arenilla que quedó en el tamiz de 325 mallas se recoge en un vaso de precipitados con una pizeta, procurando que el ángulo que forma el chorro de agua con el tamiz sea lo más agudo posible, nunca recto, ya que de esta forma, el agua ayudaría a pasar a los nemátodos a través de la malla del tamiz y los dañaría.

6.- El agua que se recogió en la cubeta B, se vierte a través de dos tamices de 325 mallas cada uno y se recoge en la cubeta A, la cual se limpió previamente.

7.- Esta operación se repite dos veces más.

8.- La arenilla que quedó en los tamices se recoge con una pizeta, de la forma en que se mencionó en el numeral 5, y se pasa al mismo vaso de precipitados.

9.- La arenilla recogida se distribuye en los tubos de centrífuga, se le agrega un poco de caolín a cada tubo y se agitan bien.

10.- Se centrifugan durante 5 minutos a 2,900 rpm.

11.- Se tira el sobrenadante.

12.- Al sedimento se le agrega una solución azucarada preparada con 55 gr. de azúcar en 100 ml. de agua, se agitan bien los tubos.

13.- Se centrifugan durante 3 minutos a 2,900 rpm.

14.- Se pasa el sobrenadante por un tamiz de 500 mallas y se lava el sedimento perfectamente bien, hasta eliminar totalmente el azúcar.

15.- Se recoge el sedimento con una pizeta y se pasa a un disco de Syracuse, con un poco de agua.

16.- Se observa al microscopio.

Este método de extracción de nemátodos por centrifugación (18), fue modificado por el Dr. Adam Szozygiel en noviembre de 1977, quedando como ahora se presenta aquí y se emplea para separar a los nemátodos del suelo y de las partículas orgánicas, por medio de la flotación en una solución de gravedad específica mayor a la que tienen los nemátodos.

El caolín se utiliza para sedimentar a los nemátodos y poder eliminar el agua sobrante de la muestra. La solución azucarada que se usa, como tiene una gravedad específica mayor a la que presentan los nemátodos, hace que éstos floten y queden suspendidos en la solución.

Este método no es muy recomendable cuando se quiere que los ejemplares estén en buenas condiciones para hacer algunas observaciones taxonómicas, puesto que a veces sufren distorsiones, debido a la acción de la solución azucarada, pero esto se puede evitar, lavando los nemátodos inmediatamente después de terminar el paso 13 de la técnica.

La extracción de nemátodos por centrifugación tiene la ventaja de que en un tiempo mínimo, se pueden aislar el máximo de nemátodos del suelo, además de que es útil para separar a los nemátodos poco activos, que no pasan a través de los filtros usados en otras técnicas, esto hace que este método sea el más usado para la extracción de nemátodos del suelo (105).

## b) Extracción de nemátodos por incubación.

La arenilla que se apartó en el paso 4 de la técnica anterior, se usa en este método, pero también se pueden usar raíces para llevarlo a cabo. Esta técnica consta de los siguientes pasos:

1.- Las raíces infectadas se lavan bien y se cortan en trozos de 1 cm. aproximadamente.

2.- En una caja de Petri se coloca un triángulo de varilla de vidrio, encima se coloca una malla circular de alambre o plástico y, después, se coloca encima un trozo circular de papel sanitario o de pañuelos absorbentes.

3.- Los trozos de las raíces o la arenilla se colocan sobre el papel, y se le agrega agua a la caja, hasta que toque la parte inferior del papel, sin cubrirlo totalmente.

4.- Se tapa la caja de Petri y se deja reposar por espacio de 24 horas, para observar los resultados.

Este método es bueno para obtener larvas móviles de 2º estadio y machos, todos en buenas condiciones para hacer observaciones taxonómicas. La única desventaja es que se obtiene un número muy reducido de ejemplares (105).

## c) Extracción de nemátodos de las raíces.

Los nemátodos sedentarios como las hembras de Meloidogyne spp. no pueden ser extraídas mediante las técnicas anteriores, por lo que -

es necesario emplear otras, como la siguiente (105) :

1.- Se lavan las raíces muy bien y se cortan en trozos - de 1 cm.

2.- Estos trozos de raíz se muelen en una licuadora con - 200 ml. de agua.

3.- Se licúan durante 20 seg. a 12,500 rpm. y el sobrona dante se pasa por un tamiz de 200 mallas y se recoge en un vaso de pre cipitados.

4.- Las raíces que quedan en el tamiz, se lavan bien con una poca de agua corriente y ésta se recoge en el mismo vaso de preci pitados. Se debe procurar que no sea mucha el agua que se use para la var las raíces.

5.- Se lleva a cabo la técnica de centrifugación mencio nada anteriormente, desde el paso 9 hasta el 16.

Con este tipo de extracción se puede obtener una cantidad con siderable de hembras, larvas de 2º, 3º y 4º estadio y huevos (105).

d) Extracción y tinción de hembras de Meloidogyne.

Mediante esta técnica se pueden extraer fácilmente las hembras ya teñidas, para obtener los patrones perineales tan importantes en la identificación de las especies del género mencionado (42,79,105,108).

1.- Se lavan bien las raíces para quitarles todas las --

partículas de suelo que tengan adheridas y se cortan en trozos de 1 cm.

2.- Se calienta la Fucsina ácida hasta que hierva, se --  
agregan los trozos de raíz y se dejan hervir durante 1 minuto.

3.- Se escurre la Fucsina y se lavan las raíces con agua  
corriente, para quitar el exceso de colorante.

4.- Las raíces se colocan en lactofenol durante 24 h.

5.- Después se observan los trozos de raíz al microscopio  
estereoscópico y se extraen las hembras con la ayuda de agujas de  
disección.

## C.- Fijación.

Después de pasar el sedimento recogido del método de extracción por centrifugación a un disco de Syracuse, con una jeringa se quita la mayor cantidad posible de agua. Esto debe hacerse con mucho cuidado para no absorber a los nemátodos con la jeringa.

Un método de fijación es el de Seinhorn (100), en el cual la fijación se lleva a cabo agregando simultáneamente F.A.A. 4 : 1 (10 ml. de formol 40 % + 1 ml. de ácido acético glacial + 89 ml. de agua destilada) calentado a baño maría a 80° C y formol al 4 %. Este método de fijación tiene la desventaja de que si se le agrega el F.A.A. más caliente o anticipadamente, los nemátodos se distorsionan bastante, además de que el formol los opaca y toman un color blanquecino que impide ver con claridad las estructuras internas.

Otro método de fijación es usando T.A.F. ( 2 ml. de trietanolamina + 91 ml. de agua destilada + 7 ml. de formol 40 % ). En este método se le agrega a 10 ml. de la muestra 10 ml. del fijador. La ventaja que tiene este fijador es que mantiene la transparencia de los nemátodos y se pueden observar bien sus estructuras internas (28).

Recientemente el Dr. Carlos Sosa-Moss ha modificado una mezcla de glicerina ( 33 % ) más agua de coco ( 33 % ) y una resina de la casa Turtox ( 33 % ), produciendo un fijador excelente que posee varias ventajas, una de ellas es que si se dejan los nemátodos en el fijador durante una 8 h., éstos se pueden montar en la misma sustancia, sin necesidad de llevar a cabo ningún método de deshidratación, obteniéndose montajes permanentes muy buenos, ya que los nemátodos conservan una --

gran transparencia que hace muy fácil la observación de los mismos.

( Comunicación personal ).

Esta mezcla del Dr. Sosa-Moss solo necesita calentarse a bañomaria hasta 40° C aproximadamente y después ser agregado a los nemátodos, a los que previamente se les ha quitado el exceso de agua. Generalmente se agregan de 4 a 5 gotas para cada 3 ml. de muestra.

Después de fijados los nemátodos, se recomienda colocarlos en frascos de 20 ml. de capacidad, cerrarlos muy bien y etiquetarlos, así deben permanecer de 8 a 72 h., dependiendo del fijador usado, antes de iniciar los procesos de deshidratación, cuando sean necesarios, y el montaje (Fig. 21).

## D.- Deshidratación .

Los nemátodos fijados se colocan en un disco de Siracuse grande, se observan al microscopio estereoscópico y ayudándonos con clavetas y un "pescador" de nemátodos, procedemos a seleccionar y separar los ejemplares que nos interesan. Después los colocamos en un microsiracuse que contiene 1 ml. de formol al 4 %.

Cuando ya hemos seleccionado y separado una cantidad adecuada de nemátodos, se coloca el microsiracuse en una cámara de etanol al 96 % en una estufa a 40°C durante 12 horas.

Ya que el formol se ha evaporado y ha sido sustituido por el etanol, los nemátodos se transfieren a otro microsiracuse que contiene 1 ml. de la solución A, compuesta por 20 partes de etanol 96 % + 1 parte de glicerina + 79 partes de agua destilada. Se coloca el microsiracuse en la estufa a 40°C, para que se evapore el agua y el etanol. En este paso es muy importante que la evaporación sea muy lenta para que no se deformen los nemátodos. Este proceso se realiza en 3 o 4 horas aproximadamente.

Ya que se ha evaporado gran parte de la solución A, se le agrega al microsiracuse 1 ml. de la solución B, compuesta por 7 partes de etanol 96 % + 93 partes de glicerina; se coloca otra vez dentro de la estufa a 40°C durante 3 o 4 horas, para que se evapore el etanol.

Al evaporarse la solución B, se agregan unas gotas de glicerina pura deshidratada, quedando los nemátodos listos para montarse. Los nemátodos se pueden conservar así por tiempo indefinido dentro de una cámara de cloruro de calcio (  $\text{Ca Cl}_2$  ). (Fig. 21)

## E.- Montaje .

## a) Montaje de machos y larvas de 2° estadio.

Primeramente se procede a limpiar perfectamente un cubreobje -  
tos redondo y uno cuadrado con un poco de alcohol o acetona.

El montaje se realiza colocando una gota de glicerina pura - -  
deshidratada o de la mezcla del Dr. Sosa-Moss, si es que los nemátodos  
están fijados en ésta, sobre el cubreobjetos cuadrado que previamente-  
se ha colocado en una lámina de Cobb. Se ponen tres filamentos peque -  
ños de fibra de vidrio en la gota, para que sirvan de calzas y los ne -  
mátodos no se aplasten ni se deformen. Después se colocan en la gota  
los nemátodos que se quieren montar, se les coloca encima un cubreobje  
tos redondo, con mucho cuidado para que no se formen burbujas y los ne  
mátodos no se muevan. Por último se sella la preparación con barniz -  
transparente de uñas, glyceel o zut y se escriben en los cartoncitos -  
de los lados de la lámina de Cobb los datos correspondientes como son:

Lugar de la colecta.	Fecha del muestreo.
Número de la muestra.	Nombre vulgar y científico del
Nombre científico del ne	huésped .
mátodo.	Nombre del colector.

( 105,109 ). (Fig. 21)

## b) Montaje de patrones perineales.

Siendo los patrones perineales de las hembras de Meloidogyne -

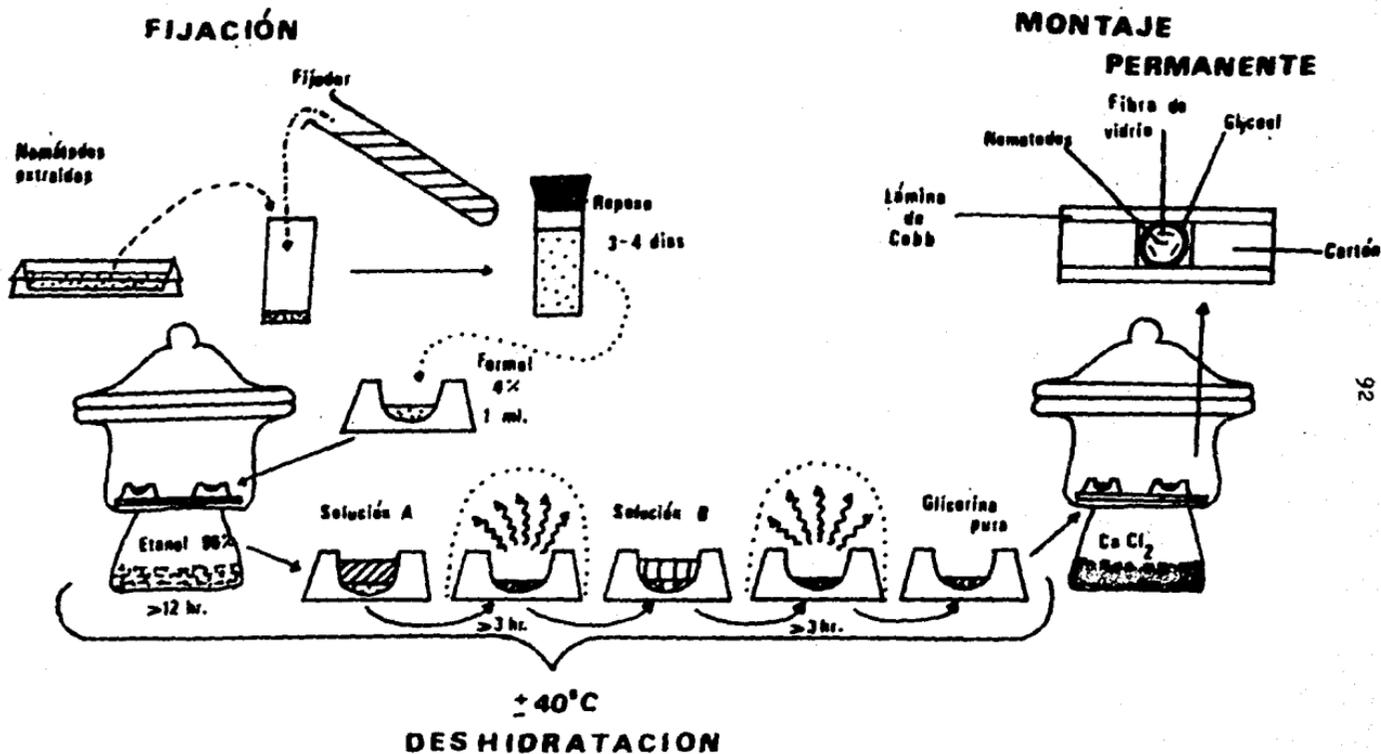


FIGURA 21.- Procesos de fijación, deshidratación y montaje.

uno de los caracteres taxonómicos más importantes en la identificación de las especies de este género, es necesario emplear una técnica especial para hacer los montajes adecuados.

Primeramente se extraen las hembras de las raíces que previamente ya han sido fijadas y teñidas con Fucosina ácida. Se colocan en un portaobjetos en una gota de glicerina o lactofenol, se corta la hembra por la mitad, en la región ecuatorial, y se coloca la mitad posterior en ácido láctico al 45 % para limpiar perfectamente la cutícula. Después, esta cutícula limpia se pasa a otra gota de lactofenol y se ajusta el corte con una navaja, dejando un cuadro en donde se encuentra el patrón. Se pasa esta gota a una gota de glicerina pura deshidratada, que se encuentra en un cubreobjetos cuadrado colocado en una lámina de Cobb y, se le coloca encima un cubreobjetos redondo. Se sella la preparación con barniz de uñas transparente, con glyceel o con zut. Se escriben en los cartoncitos laterales de la lámina de Cobb los datos correspondientes (42,105,108).

F.- Pruebas de identificación para las especies del género Meloidogyne mediante hospedantes diferenciales.

a) Colecta de poblaciones de nemátodos noduladores.

La colecta de poblaciones se inicia tomando muestras de suelo de campos infestados con Meloidogyne o colectando 30 masas de huevos de raíces infectadas, en diferentes áreas del cultivo que se desea muestrear. Se pueden trasplantar al suelo infestado, plantas de tomate susceptibles de tres semanas de edad, o inocularlas con las masas de huevos para aumentar la población colectada para la prueba de los hospedantes diferenciales.

b) Cultivo de poblaciones de Meloidogyne.

Estos nemátodos son fácilmente mantenidos y multiplicados en plantas de tomate (Lycopersicon esculentum), utilizando un cultivar susceptible como es el Rutgers. Estas poblaciones requieren renovarse mediante la inoculación de nuevas plantas de tomate con 15 masas de huevos cada 2 o 3 meses. Las plantas de tomate tienen un desarrollo vigoroso cuando se les proporciona buena iluminación, riego diario y fertilización cada 2 semanas con un compuesto fertilizante soluble en agua.

## c) Preparación del inóculo.

Es necesario tener una cantidad suficiente del inóculo viable para poder obtener éxito en las pruebas realizadas con los hospedantes diferenciales, por lo que se emplearon las siguientes técnicas para -- obtenerlo :

## 1.- Método de Hussey y Barker (58) :

1.1 Se lavan en agua corriente las raíces infectadas de plantas de tomate, 45 días después de ser inoculadas. Si se usan plantas con un período mayor de inoculación, hay que evitar que las raíces se encuentren en un estado avanzado de deterioro, ya que los huevos -- que se encuentran en éstas son menos uniformes en su desarrollo que -- los que se encuentran en plantas más jóvenes.

1.2 Se cortan las raíces en trozos de 2 a 3 cm. y se lavan bien, mientras más limpias estén, será más fácil la extracción de los huevos mediante el tamizado. Por otra parte si la raíz procesada -- está muy desarrollada, solamente se usará la mitad de ésta.

1.3 Se prepara una solución al 10 % de Clorox ( $\text{NaOCl}$  al 5.25 % ) o un detergente blanqueador líquido de composición química similar, añadiendo 20 ml. del detergente a 180 ml. de agua, con lo que -- se obtiene una solución de  $\text{Na O Cl}$  al 0.525 %.

1.4 Se colocan las raíces lavadas y cortadas en un frasco de vidrio de 500 ml. de capacidad, de boca ancha y cierre hermético. Se añaden 200 ml. de la solución al 10 % de  $\text{Na O Cl}$  y el recipiente se

cierra herméticamente. Inmediatamente se somete el frasco a una agitación fuerte por espacio de 4 minutos. Se debe tener cuidado de no exponer los huevos extraídos de las raíces a la acción del hipoclorito de sodio por un tiempo superior a los 4 minutos.

1.5 Después de la agitación se pasa rápidamente la suspensión de huevos y  $\text{Na O Cl}$  por dos tamices, uno de 200 y otro de 500-mallas. Una vez que la solución se ha vertido a través de los dos tamices, se colocan las raíces en un recipiente con agua corriente. Al mismo tiempo se remueve el tamiz de 200 mallas y se coloca el tamiz de 500 mallas que contiene a los huevos bajo una corriente de agua no muy fuerte para remover el exceso de  $\text{Na O Cl}$ . Mediante lavado se desplazan los huevos retenidos en este último tamiz a un vaso de precipitados de 2,000 ml.

1.6 Se enjuagan nuevamente las raíces, por lo menos dos veces más, para remover la mayor cantidad de huevos posible, para lo cual, después de cada enjuague, se siguen las indicaciones dadas en el paso anterior.

1.7 Para determinar la concentración de huevos por mililitro, se remueven tres alícuotas de 1 ml. de la suspensión, la cual previamente se ha agitado, haciendo pasar una corriente de aire con la pipeta, se cuentan los huevos en cada muestra y el promedio se usa para determinar el número de huevos por ml. de solución. Finalmente se deberá ajustar el volumen de agua para obtener una concentración aproximada de 1,000 huevos por ml., con lo cual se simplifica la labor de inoculación.

## 2.- Método de McClure (80) :

- 2.1 Se lavan bien las raíces hasta que se elimine todo el suelo que esté adherido.
- 2.2 Se cortan las raíces en trozos de 1 cm.
- 2.3 Se colocan los trozos de raíz en una licuadora con 200 ml. de una solución hecha con 5 partes de NaOCl al 1% + 1 parte de agua destilada y se licúan durante 40 seg.
- 2.4 La suspensión resultante se pasa por dos tamices, - uno de 200 y otro de 500 mallas, lavando bien con agua destilada para eliminar el hipoclorito de sodio.
- 2.5 El sedimento que queda en el tamiz de 500 mallas se recoge con agua destilada y se pasa a un tubo de centrifuga con 40 ml. de agua destilada y un poco de caolín, se agita bien.
- 2.6 Se centrifuga durante 5 minutos a 2,900 rpm.
- 2.7 Se tira el sobrenadante.
- 2.8 Se agrega una solución azucarada compuesta por 45.4 gr. de azúcar disueltos en 100 ml. de agua destilada; se agita bien y se centrifuga durante 40 seg. a 2,900 rpm.
- 2.9 Para eliminar las larvas que puedan quedar en el sobrenadante, se pasa éste por dos tamices, uno de 200 y otro de 500 mallas, lavando bien con agua destilada, hasta eliminar toda la solución azucarada.
- 2.10 Los huevos así obtenidos se colocan en un vaso de precipitados de 1,000 ml. y se toman tres alícuotas de 1 ml. cada una para sacar un promedio y ajustar la cantidad de agua hasta tener apro-

aproximadamente 1,000 huevos por ml.

d) Pruebas con los hospedantes diferenciales.

Para llevar a cabo estas pruebas, es necesario tener suficientes plántulas de tomate de 2 semanas para hacer tres repeticiones y algunas plántulas extra de tomate para usarlas como testigo y como indicadores, para determinar el momento de cosechar la prueba.

Las plantas que se usaron como hospedantes diferenciales son las siguientes :

Tomate	<u>Lycopersicon esculentum</u>	var. Rutgers.
Tabaco	<u>Nicotiana tabacum</u>	var. NC 95.
Pimentón	<u>Capsicum frutescens</u>	var. California Wonder.
Sandía	<u>Citrullus vulgaris</u>	var. Charleston Gray.
Algodón	<u>Gossypium hirsutum</u>	var. Delta Pine 16.
Cacahuete	<u>Arachis hypogaea</u>	var. Florunner.

Después de determinar el número de huevos por ml., las plantas se inoculan. Las plantas con un buen desarrollo de follaje, se pueden inocular con 10,000 huevos por maceta. La suspensión de huevos puede ser vertida en una depresión del suelo, si la planta se va a trasplantar a la maceta, o se puede introducir el inóculo al suelo de la maceta practicando, alrededor de la plántula en crecimiento, de 4 a 5 orificios de 5 cm. de profundidad y depositando ahí el inóculo.

La suspensión de huevos puede adicionarse a la maceta utilizando una pipeta calibrada de 10 ml. La suspensión se puede mantener homogeneizada

genizada mediante la inyección de aire con esta misma pipeta, segundos antes de extraer la cantidad requerida para la inoculación.

Se empleó otro método de inoculación, en donde se eligieron raíces fuertemente infectadas que presentaban más de 100 masas de huevos por raíz. Se lavaron bien para quitarles todo el suelo adherido y se pesaron 10 gr., los cuales se depositaron en orificios practicados en el suelo de la maceta, muy cerca de las raíces de las plántulas que se quería inocular. Se calculó que el promedio de huevos presentes en el inóculo adicionado a las macetas era de 100,000 huevos por cada 10 gr. de raíces.

Se debe tener cuidado de conservar las macetas inoculadas libres de malezas, ya que la mayoría de ellas son susceptibles a la infección por Meloidogyne y de esta forma las raíces de las malezas infectadas pueden confundirse fácilmente con las raíces de las plantas diferenciales, dando como resultado una calificación errónea durante la toma de datos (90,107).

- e) Terminación de la prueba y calificación del sistema radicular inoculado.

Como la temperatura puede influir en el desarrollo del nemátodo nodulador (6), la duración de la prueba tendrá alguna variación de acuerdo con la temperatura predominante en el lugar utilizado para la misma. La calificación para número de nódulos y masas de huevos debe efectuarse 50 días después de la inoculación, si el material se desarrolla en un ambiente cuya temperatura fluctúe entre 24° y 30°C.

Si la temperatura se mantuvo a niveles muy inferiores a los límites antes mencionados, la duración del experimento debe prolongarse hasta los 55 días; si por el contrario, los niveles de temperatura fueron superiores a estos límites, entonces la prueba puede acortarse hasta los 45 días.

Deben incluirse en cada prueba plantas adicionales de tomate - que estén inoculadas, que sirvan para observar y determinar si el tiempo de inoculación y la temperatura han sido suficientes para permitir la maduración de las masas de huevos, las cuales adquieren un color marrón claro característico.

Para obtener la calificación de raíces hay que tener cuidado - de no omitir ninguna que presente nodulaciones, pues esto acarrearía una estimación equivocada.

La calificación de nodulaciones y masas de huevos puede hacerse de acuerdo con la siguiente escala, la cual fue propuesta por el Dr. J. N. Sasser (90,91,107) :

0 - 0	Nodulaciones y/o masas de huevos.		
1 = 1 - 2	"	"	"
2 = 3 - 10	"	"	"
3 = 11 - 30	"	"	"
4 = 31 - 100	"	"	"
5 = Más de 100	"	"	"

f) Respuesta de las cuatro especies más comunes de Meloidogyne a las pruebas con los seis hospedantes diferenciales (89,90) :

Especies de <u>Meloidogyne</u>	Hospedantes			Diferenciales		
	Tabaco ( N C 95 )	Algodón (Delta Pine)	Pimentón (California Wonder)	Sandía (Charleston Gray)	Cacahuete (Florunner)	Tomate ( Rutgers )
<u>M. incognita</u>	(-)[+]	(+)[-]	+	+	-	+
<u>M. javanica</u>	+	-	(-)	+	-	+
<u>M. hapla</u>	+	-	+	(-)	(+)	+
<u>M. arenaria</u>	+	-	+	+	(+) [-]	+

( ) Este signo indica que la respuesta dada por esta diferencial es una clave para la identificación de la especie.

[ ] Este signo indica que algunas poblaciones de Meloidogyne pueden presentar esta respuesta.

## V. RESULTADOS.

Para obtener los resultados siguientes del estudio morfológico y fisiológico, mediante los hospedantes diferenciales de estos nemátodos, se llevaron a cabo tres muestreos en el terreno elegido de la localidad de San José Villa Guerrero, Estado de México; el primero fue realizado en Junio de 1977, el segundo en Noviembre de 1977 y el tercero en Febrero de 1978.

De acuerdo con las tablas de medidas, dibujos, fotografías y respuestas de las pruebas con los hospedantes diferenciales dados a continuación, los nemátodos estudiados correspondieron a Meloidogyne hanla Chitwood, 1949.

## A.- Descripción y medidas de las hembras.

Las características y medidas de las hembras coincidieron en las tres poblaciones muestreadas en el mismo terreno y en diferentes fechas, la única diferencia notable que se observó fue la variación de los patrones perineales que en las tres poblaciones fueron diferentes.

La descripción general de las hembras es la siguiente:

Cuerpo globoso o viriforme, con un cuello más o menos corto; no presenta cola; la cabeza presenta dos anillos cefálicos; estilete pequeño con nódulos redondeados y reducidos; hemizonidio posterior al poro excretor, separado de éste por 3 o 4 anillos cuticulares.

Tabla I. (Fig. 22,F)

Los patrones perineales correspondientes a la población mues -

treada en Junio de 1977, no presenta alas laterales características de esta especie, aunque sí se observan claramente las puntuaciones típicas en la zona localizada entre los fasmidios (zona de la cola, T, Fig. 20). En el área del perineo no se encuentran estrías; en la zona 1 las estrías son pocas, pequeñas, interrumpidas y aisladas, son muy tenues - con excepción de una o dos fuertemente marcadas. En la zona 2 las estrías son lisas y continuas sin variación. En la zona 3 las estrías son lisas y continuas, a veces ligeramente onduladas. En la zona 4 las estrías están ligeramente onduladas y son continuas. En la parte inferior de la zona 4 las estrías están marcadas más profundamente que en el resto de la zona. Tabla II. (Fig. 23) Fot. 1 y 2.

Los patrones de la población muestreada en Noviembre de 1977, presentan un ala lateral indistintamente del lado derecho o izquierdo, pero siempre una a la vez. Las puntuaciones en la zona de la cola son claramente visibles, ya que hay pocas estrías en esta zona. En el área del perineo no se observan estrías y en la zona 1 solamente hay unas pocas estrías lisas, cortas y profundamente marcadas. En la zona 2 se encuentran estrías lisas y continuas. En la zona 3, las estrías del lado que no presenta el ala lateral, son lisas y continuas, las del lado del ala son algo onduladas, poco interrumpidas y tienden a dirigirse hacia la parte superior del patrón. En la zona 4 las estrías son lisas y continuas. Tabla III. (Fig. 24) Fot. 3.

Los patrones de la última población muestreada en Febrero de 1978, presentan alas laterales en ambos lados y las puntuaciones son claramente observables. En el área del perineo se encuentran pocas estrías, cortas y profundamente marcadas, interrumpidas, lisas y aisladas.

das. En la zona 1 las estrías presentan las mismas características . En la zona 2 las estrías son lisas y continuas, al igual que las de la zona 4. En la zona 3 se encuentran las alas laterales y las estrías de esta zona son lisas y continuas y tienden a dirigirse hacia la parte superior del patrón. Tabla IV (Fig. 25).

En los patrones de las poblaciones que presentan alas laterales, éstas se consideran como una característica propia del patrón y no como incisuras laterales, debido a que no se prolongan hacia la región cefálica por los costados del nemátodo.

TABLA I .- Medidas de las hembras de Meloidogyne extraídas de las raíces del margaritón (Crisantemum maximum Ramond).

( 30 ♀♀ )<sup>+</sup>

Largo ( $\mu$ m )	542.2	( 462.0 - 630.0 ) <sup>++</sup>
Ancho ( $\mu$ m )	388.4	( 322.0 - 476.0 )
Distancia de la cabeza al poro-excretor ( $\mu$ m )	38.7	( 17.3 - 52.7 )
OGDE <sup>+++</sup> ( $\mu$ m )	7.5	( 5.5 - 9.9 )
Estilete ( $\mu$ m )	7.3	( 6.9 - 8.0 )
Longitud del bulbo medio ( $\mu$ m )	41.8	( 35.0 - 49.1 )
Ancho del bulbo medio ( $\mu$ m )	38.9	( 31.5 - 45.5 )

+ Datos obtenidos del promedio de las medidas de 30 ejemplares, 10 de cada población muestreada.

++ Los números entre paréntesis muestran las medidas menor y mayor observadas.

+++ OGDE = Distancia de la desembocadura de la glándula esofágica-dorsal a la base de los nódulos del estilete.

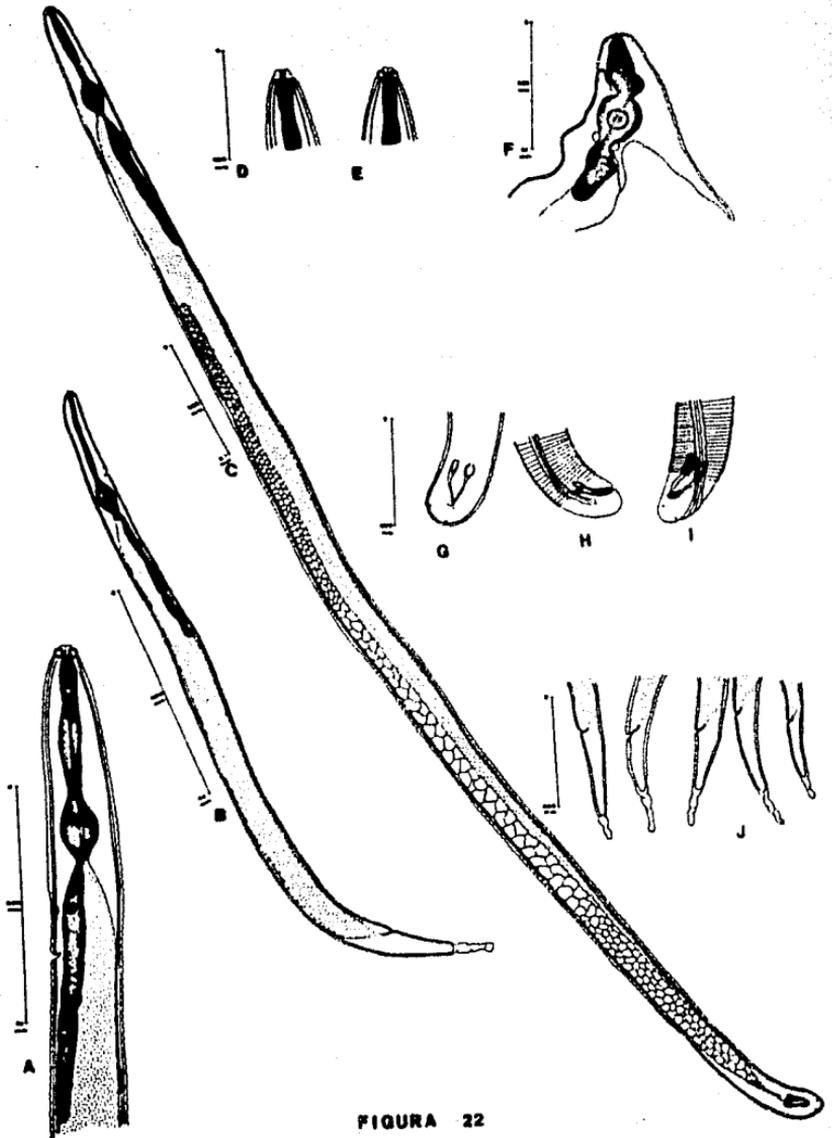


FIGURA 22

FIGURA 22.- Dibujos hechos con la cámara clara de la nublación de ne-  
mátodos identificados como pertenecientes a la especie Meloido  
gyne hapla Chitwood, 1949.

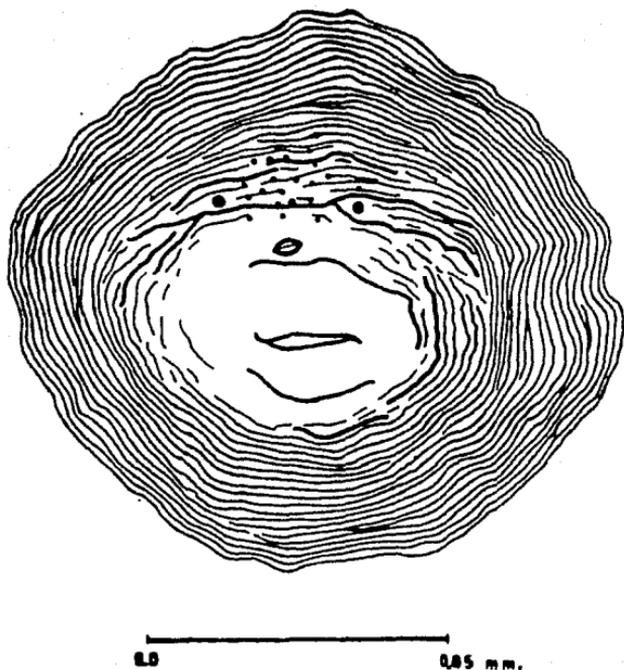
- A.- Porción delantera de un macho, donde se observa el poro excre-  
tor, inmediatamente arriba de él se encuentra el hemizonidio.  
También se muestra la sobreposición ventral de las glándulas -  
esofágicas.
- B.- Larva de 2° estadio.
- C.- Macho completo.
- D.- Vista lateral de la cabeza de un macho.
- E.- Vista ventral de la cabeza de un macho.
- F.- Detalle de la porción anterior de la hembra, mostrando el poro  
excretor y el hemizonidio posterior a éste.
- G, H, I.- Detalles de la cola del macho mostrando las espículas, guber-  
náculo, fasmidios y campos laterales.
- J.- Detalles de las colas de larvas de 2° estadio.

TABLA II .- Descripción de los patrones perineales de la población muestreada en Junio de 1977.

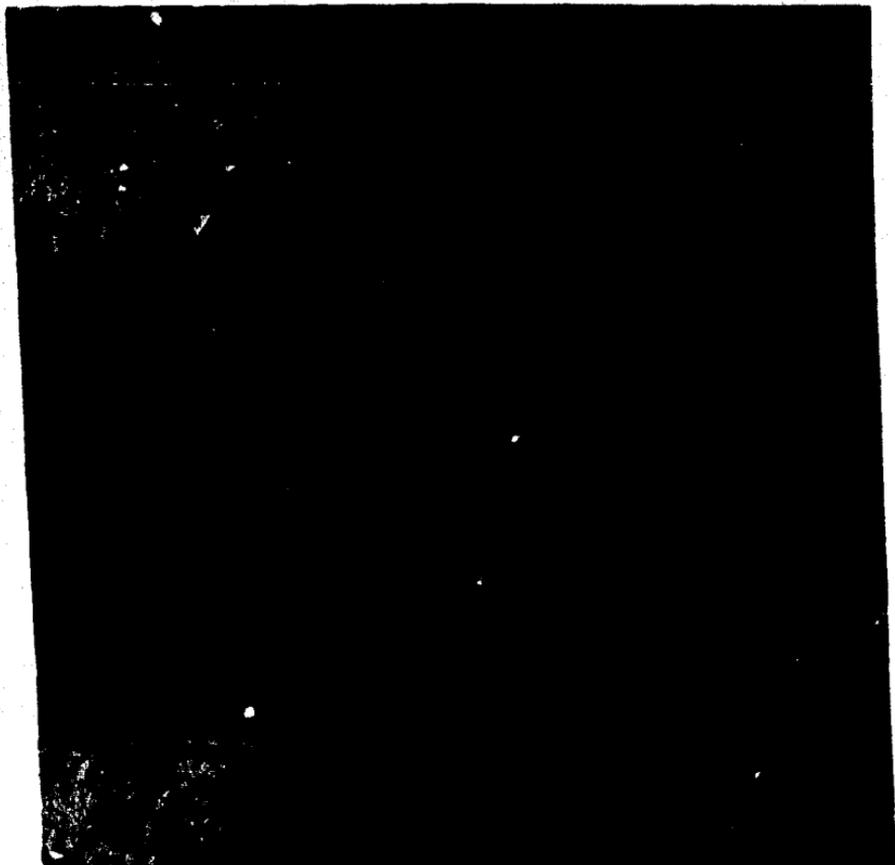
Alas laterales.	Ausentes
Incisuras laterales	Ausentes +
Puntuaciones zona de la cola	Presentes
Estrías del perineo	Ausentes
Estrías zona 1	L, I, P, A.
Estrías zona 2	L, C.
Estrías zona 3	L, C.
Estrías zona 4	L, C.

L = Lisas; O = Onduladas; I = Interrumpidas; P = Pocas; C = Continuas;  
A = Aisladas.

+ Aunque en la población se encontraron algunas hembras que presentaban una incisura lateral parcial como se ve en la fotografía 1, su número no fue significativo como para poder afirmar que la población presentaba estas estructuras.



**FIGURA 23.-** Patrón perineal de la población de Meloidogyne hapla, muestreada en Junio de 1977.



FOTOGRAFIA 1.- Patrón perineal de una hembra de la población muestreada en Junio de 1979. No presenta ningún ala lateral. La flecha indica el campo lateral parcial.

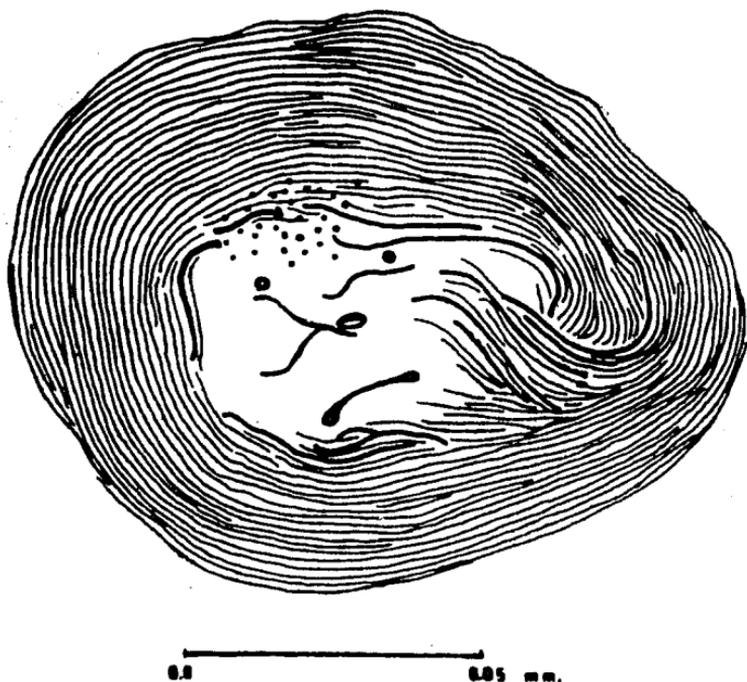


FOTOGRAFIA 2 .- Patrón perineal de una hembra de la población muestra-  
trada en Junio de 1979. No presenta ningún ala lateral y no -  
se observan campos laterales.

TABLA III .- Descripción de los patrones perineales de la población muestreada en Noviembre de 1977.

Alas laterales	Unicamente de un lado
Incisuras laterales	Ausentes
Puntuaciones zona de la cola	Presentes
Estrías del perineo	Ausentes
Estrías zona 1	L, P, A.
Estrías zona 2	L, C.
Estrías zona 3	L, C, O.
Estrías zona 4	L, C.

L = Lisas; O = Onduladas; I = Interrumpidas; P = Pocas; C= Continuas;  
A = Aisladas.



**FIGURA 24.-** Patrón perineal de la población de Meloidogyne hapla, muestreada en Noviembre de 1977.



FOTOGRAFIA 3 .- Patron perineal de una hembra de la población -  
muestreada en Noviembre de 1977, en donde se observa una sola  
ala lateral marcada con la flecha.

TABLA IV .- Descripción de los patrones perineales de la población muestreada en Febrero de 1978.

Alas laterales	Ambos lados
Incisuras laterales	Ausentes
Puntuaciones zona de la cola	Presentes
Estrías del perineo	L, I, P, A.
Estrías zona 1	L, I, P, A.
Estrías zona 2	L, C.
Estrías zona 3	L, C.
Estrías zona 4	L, C.

L = Lisas; O = Onduladas; I = Interrumpidas; P = Pocas; C = Continuas;

A = Aisladas.

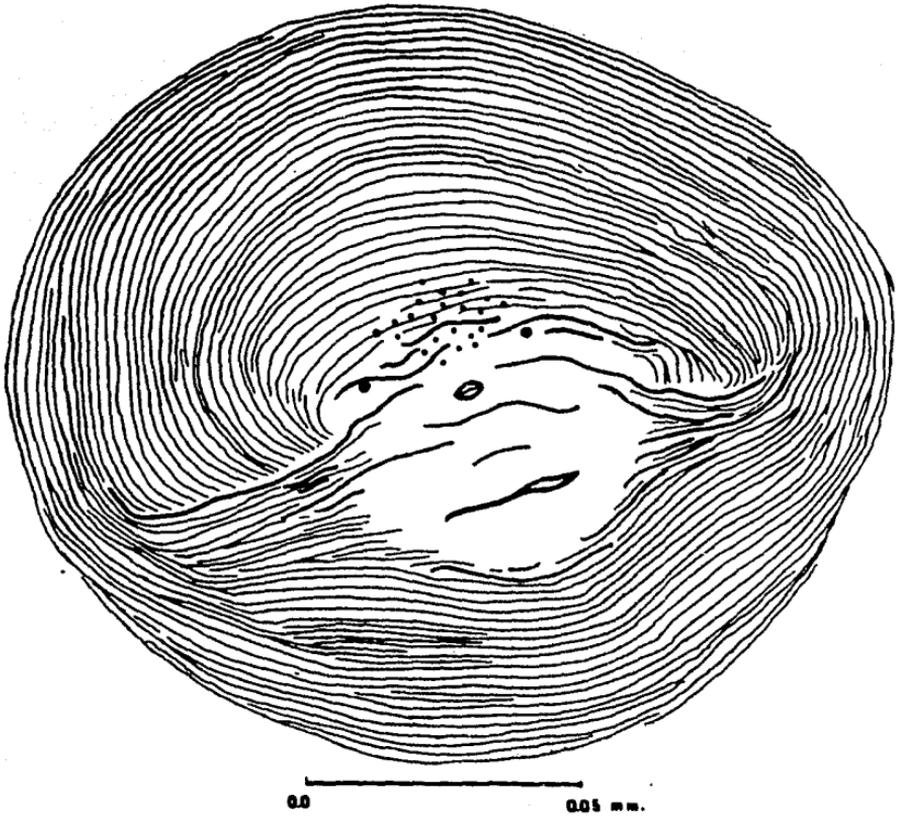
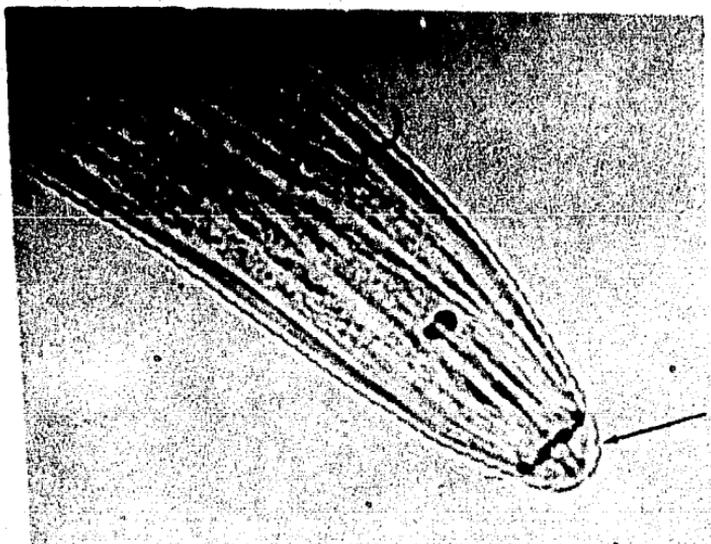


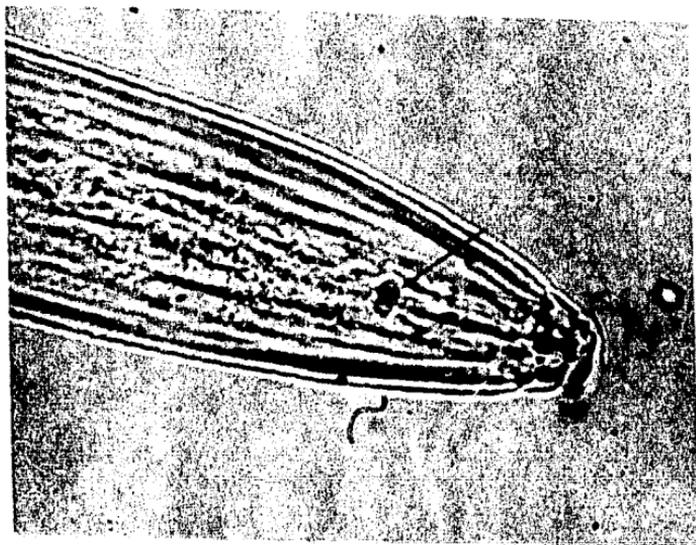
FIGURA 25.- Patrón perineal de la población de Meloidogyne hapla, muestreada en Febrero de 1978.

## B.- Descripción y medidas de los machos.

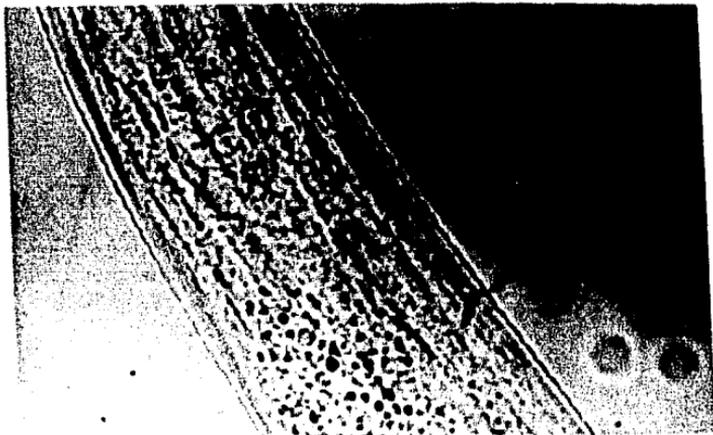
Los machos fueron relativamente abundantes en los tres muestreos que se realizaron. En estas poblaciones muestreadas, los machos presentaron características iguales sin variación notable en ninguna estructura. La cabeza presenta una forma de cono truncado con dos anillos cefálicos (Fot. 4); el estilite es largo con nódulos basales bien desarrollados (Fot. 5); el hemizonidio se encuentra entre los 50 y 57 anillos cuticulares después de los dos anillos cefálicos y de 3 a 5 anillos antes del poro excretor (Fot. 6); los campos laterales se encuentran claramente areolados y presentan cuatro incisuras laterales (Fot. 7 y 8); la cola es redondeada con la cloaca en posición terminal y no presenta ala caudal (Fot. 9); los faneridios se encuentran al nivel de la cloaca, en ambos lados, las espiculas son curvas y el gubernáculo es fusiforme (Fot. 8 y 9), cercano al extremo distal de las espiculas. Tabla V. (Fig. 22, A, C, D, E, G, H, I)



FOTOGRAFIA 4 .- Cabeza de un macho mostrando la forma de cono truncado y los dos anillos cefálicos.



FOTOGRAFIA 5 .- Cabeza de un macho mostrando el estilete y los nódulos basales.



FOTOGRAFIA 6 .- Poro excretor de un macho (señalado con la flecha).



FOTOGRAFIA 7 .- Campos laterales areolados de un macho, se observan las cuatro incisuras laterales.



FOTOGRAFIA 8 .- Campos laterales areolados e incisuras laterales de un macho. Los fasmidios se observan cerca de las espículas en la parte inferior de la fotografía.



FOTOGRAFIA 9 .- Cola de un macho, de forma redondeada, no presenta ala caudal y la cloaca es terminal. En la parte inferior de las espículas se observa el gobernáculo.

TABLA V .-- Medidas de los machos de Meloidogyne extraídos del -  
suelo.

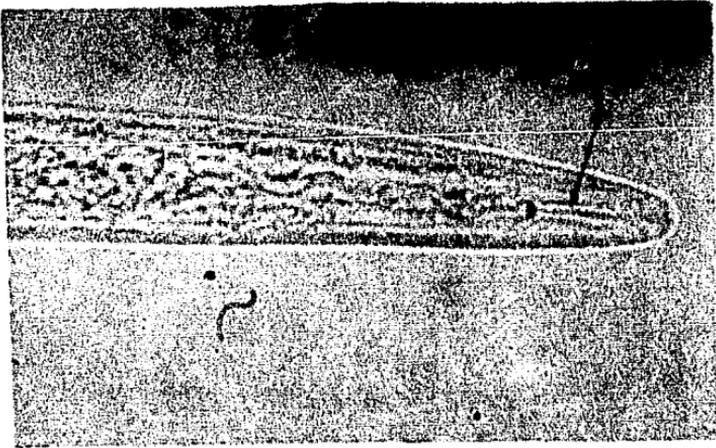
( 30 ~~de~~ )\*

Largo ( $\mu$ m )	1 157.4	( 910.0 - 1 428.0 ) <sup>++</sup>
Ancho ( $\mu$ m )	37.2	( 30.3 - 43.4 )
Estilete ( $\mu$ m )	20.9	( 19.5 - 22.5 )
OGDE <sup>+++</sup> ( $\mu$ m )	26.7	( 12.8 - 35.5 )
Longitud del bulbo medio ( $\mu$ m )	19.9	( 16.5 - 22.4 )
Ancho del bulbo medio ( $\mu$ m )	11.9	( 11.0 - 12.8 )
a <sup>++++</sup>	31.5	( 22.6 - 43.4 )

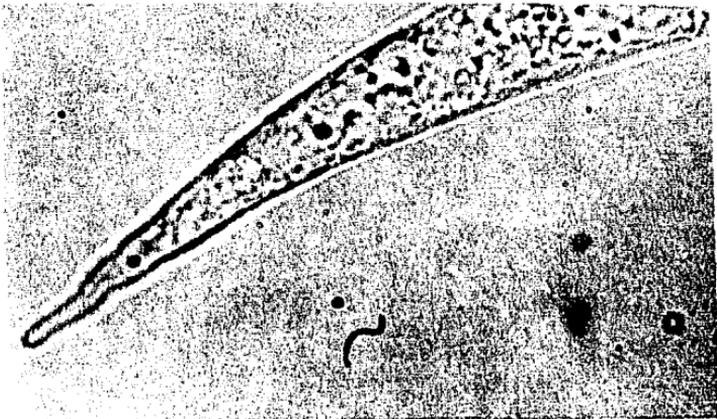
- + Datos obtenidos del promedio de las medidas de 30 ejemplares, 10 de cada población muestreada.
- ++ Los números entre paréntesis muestran las medidas menor y mayor observadas.
- +++ OGDE = Distancia de la desembocadura de la glándula esofágica - dorsal a la base de los nódulos del estilete.
- ++++ a = Largo total del cuerpo entre el ancho del mismo.

C.- Descripción y medidas de las larvas de 2º estadio.

Las larvas de 2º estadio o larvas infectivas, fueron muy abundantes en los tres muestreos realizados. Estas, al igual que los machos, no presentaron ninguna variación morfológica en las tres poblaciones muestreadas. La cabeza presenta dos anillos cefálicos (Fot. 10); el egtilite es pequeño y delgado, con nódulos refringentes; las incisuras laterales son de 3 a 4 y los campos laterales son lisos; el recto no está dilatado y la cola presenta la punta redondeada, subaguda o bifida (Fot. 11 y Fig. 22,J); el hemizonidio se encuentra antes del poro excretor. Tabla VI.



FOTOGRAFIA 10 .- Cabeza de una larva de 2º estadio mostrando los dos anillos cefálicos y el estilete pequeño y delgado.



FOTOGRAFIA 11 .- Punta de la cola de una larva de 2º estadio.

TABLA VI .- Medidas de las larvas de 2º estadio extraídas del suelo y raíces de margaritón.

( 30 Lv )<sup>+</sup>

Largo ( $\mu$ m)	373.5 ( 349.0 - 430.0 ) <sup>++</sup>
Ancho del cuerpo al nivel del ano ( $\mu$ m)	9.7 ( 6.9 - 12.7 )
Estilete ( $\mu$ m)	12.3 ( 11.0 - 14.1 )
Longitud de la cola ( $\mu$ m)	40.2 ( 33.5 - 54.6 )
a <sup>+++</sup>	40.2 ( 27.8 - 57.1 )
c <sup>++++</sup>	9.5 ( 6.7 - 12.3 )
c' <sup>+++++</sup>	4.3 ( 2.9 - 6.2 )

+ Datos obtenidos del promedio de las medidas de 30 ejemplares, 10 de cada población muestreada.

++ Los números entre paréntesis muestran las medidas menor y mayor observadas.

+++ a = Longitud total del cuerpo entre el ancho del mismo a nivel del ano.

++++ c = Longitud total del cuerpo entre la distancia que hay entre el poro anal y el extremo terminal de la cola (longitud de la cola).

+++++ c' = Longitud de la cola entre el ancho del cuerpo a nivel del ano.

## D .- Análisis de correlación de los índices a, c y c' .

En el estudio taxonómico clásico o morfológico, frecuentemente se usan relaciones entre dos medidas bien definidas, en lugar de las medidas absolutas, para obtener una serie de índices que se emplean como puntos importantes de referencia para la identificación de las especies. Los índices usados en este trabajo de tesis son los siguientes :

a = Largo total del cuerpo entre el ancho del mismo.

c = Largo total del cuerpo entre la longitud de la cola.

c' = Longitud de la cola entre el ancho del cuerpo.

Estos índices se obtuvieron para las larvas de 2º estadio y para los machos solamente se obtuvo el índice a.

Para comprobar su validez y confiabilidad, se hizo un análisis de correlación de estos índices. El análisis de correlación nos permite conocer la relación que hay entre dos variables aleatorias, X y Y, en donde cualquiera de las dos puede ser la variable independiente.

Para realizar este análisis consideramos una muestra

$$(x_1, y_1), (x_2, y_2) \dots (x_n, y_n)$$

Donde el promedio de los valores de X en la muestra es :

$$\bar{x} = \frac{1}{n} (x_1 + x_2 + \dots + x_n)$$

y la varianza es :

$$S_x^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (x_j - \bar{x})^2$$

De la misma forma, para los valores de Y, el promedio es :

$$\bar{y} = \frac{1}{n} (y_1 + y_2 + \dots + y_n)$$

y la varianza es :

$$S_y^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (y_j - \bar{y})^2$$

Y la covarianza de la muestra sería entonces :

$$S_{xy} = \frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (x_j - \bar{x})(y_j - \bar{y})$$

Para obtener el coeficiente de correlación de nuestra muestra, obtenemos el cociente r de la siguiente manera :

$$r = \frac{S_{xy}}{S_x S_y}$$

Este coeficiente r nos indica si existe una relación entre - nuestras variables, o sea, si X depende de Y, o viceversa, ya que esta relación será más estrecha cuanto más se acerque r a 1 o a -1.

Nuestra población de machos está constituida por 30 ejemplares ya que se tomaron 10 de cada población muestreada.

Los datos obtenidos para calcular la correlación existente entre el largo total del cuerpo ( $\bar{X}$ ) y el ancho del mismo (Y), son los siguientes :

$$\bar{x} = 1\ 157.97$$

$$\bar{y} = 37.4$$

$$S_x = 23\ 808.0$$

$$S_y = 16.16$$

$$S_{xy} = 11\ 542.118$$

El coeficiente de correlación que tiene el índice  $a$  para nuestra población de machos es :

$$r = 0.03$$

Si graficamos nuestros puntos ( $X, Y$ ) y hacemos un análisis de regresión con ellos, la independencia de las variables no es tan obvia como la que se observa en el análisis de correlación, puesto que la distribución de nuestros datos queda localizada a lo largo de la línea de regresión (Gráfica 1).

En la población de larvas, constituida también por 30 ejemplares, 10 de cada muestreo, se analizaron los índices  $a$ ,  $c$  y  $c'$ .

Para el índice  $a$  se tomó el largo del cuerpo como ( $X$ ) y el ancho del cuerpo al nivel del ano como ( $Y$ ). Se obtuvieron los siguientes resultados :

$$\bar{x} = 373.47$$

$$\bar{y} = 9.71$$

$$S_x = 368.74$$

$$S_y = 4.1$$

$$S_{xy} = 114.899$$

El coeficiente de correlación obtenido es :

$$r_a = 0.076$$

El análisis de regresión de nuestros datos confirma la independencia de las variables (Gráfica 2).

Para obtener el índice  $c$  se tomó el largo total del cuerpo - como (X) y la longitud de la cola como (Y). Los datos obtenidos son - los siguientes :

$$\bar{x} = 373.47$$

$$\bar{y} = 40.197$$

$$s_x = 368.74$$

$$s_y = 37.58$$

$$s_{xy} = 3\ 187.17$$

El coeficiente de correlación para  $c$  es:

$$r_c = 0.23$$

En la Gráfica 3, que representa el análisis de regresión, se - observa una aparente independencia de las variables.

Para el índice  $c'$  se tomó la longitud de la cola como (X) y el ancho del cuerpo a nivel del ano como (Y). Los datos obtenidos son:

$$\bar{x} = 40.197$$

$$\bar{y}$$

$$s_x = 37.58$$

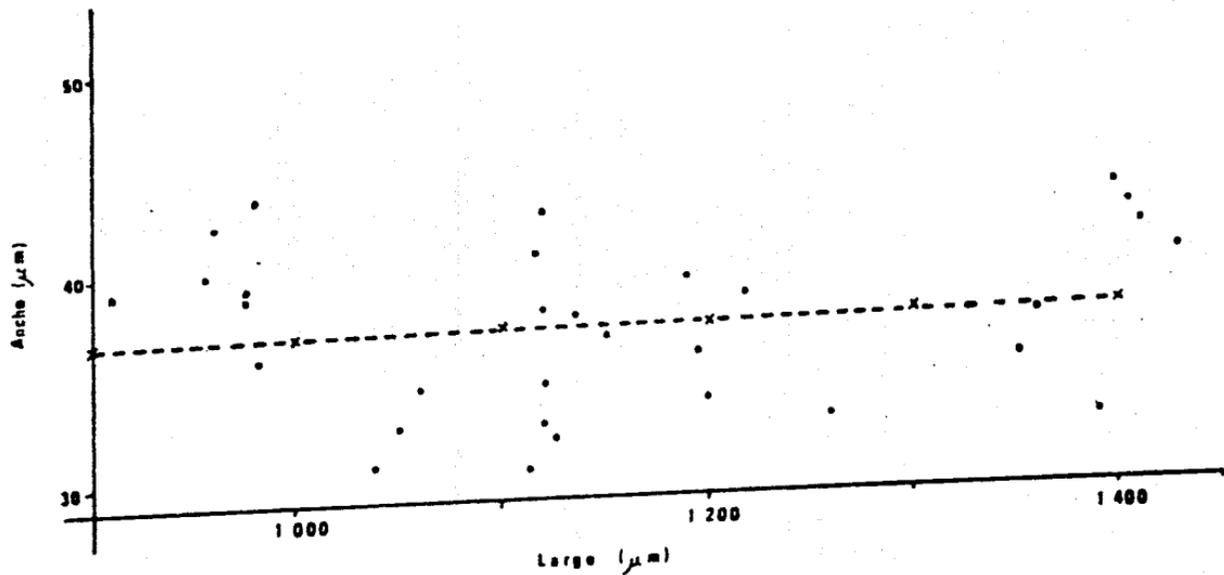
$$s_y = 4.1$$

$$s_{xy} = 66.254$$

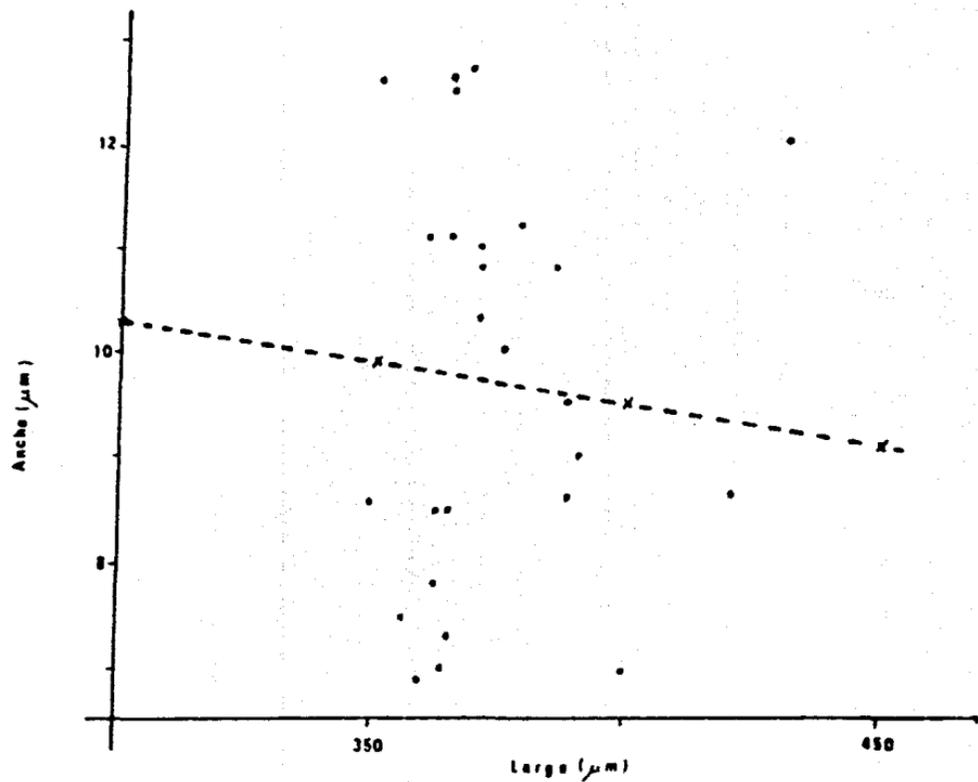
El coeficiente de correlación de  $c'$  es :

$$r_{c'} = 0.43$$

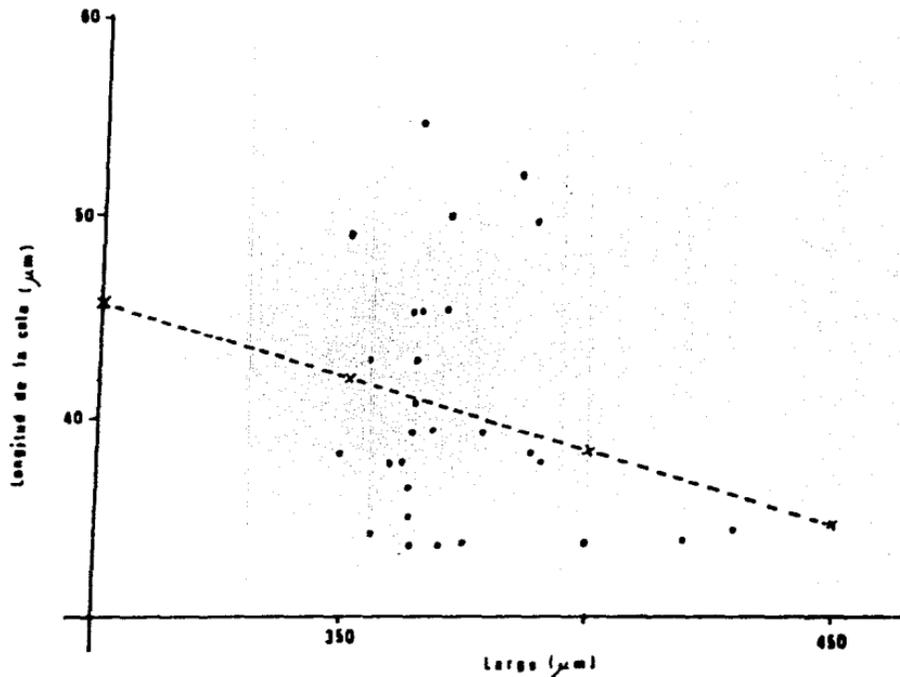
El análisis de regresión hecho para este índice muestra cierta dependencia de las variables (Gráfica 4).



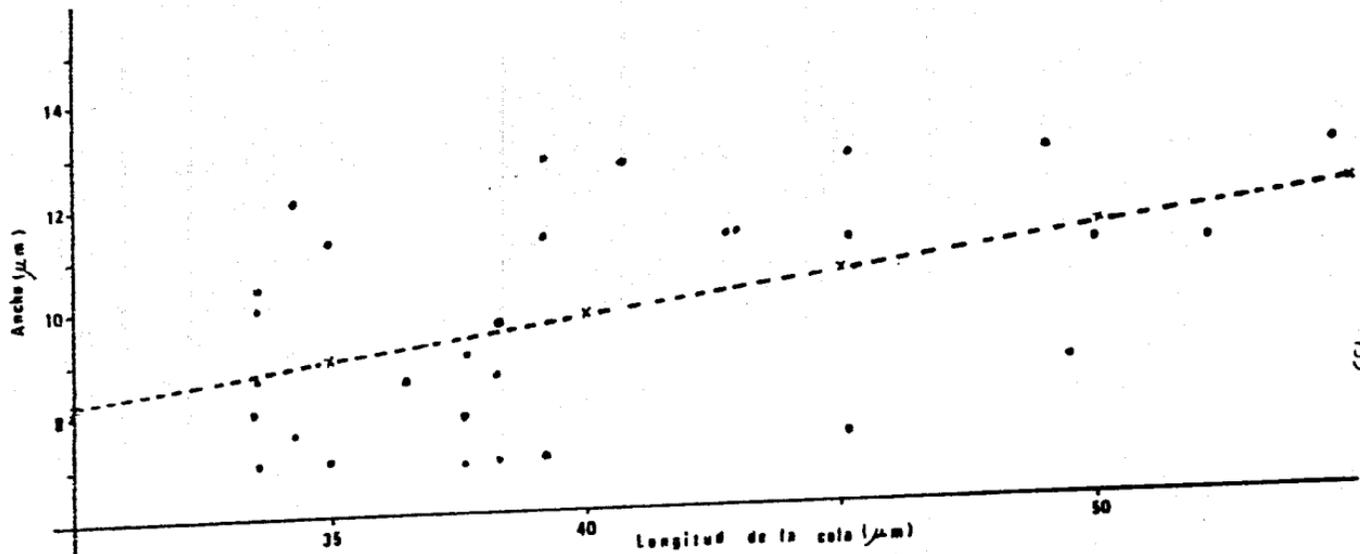
GRAFICA 1.- Línea de regresión para las medidas de los machos de Meloidogyne hapla que se relacionan para obtener el índice a .



GRAFICA 2.- Línea de regresión para las medidas de las larvas de 2º estado de Meloidogyne hapla que se relacionan para obtener el índice a .



GRAFICA 3.- Línea de regresión de las medidas de las larvas de 2º estadio de Meloidogyne hapla que se relacionan para obtener el índice c.



GRAFICA 4.- Línea de regresión para las medidas de las larvas de 2º estadio de Meloidogyne hapla que se relacionan para obtener el índice  $c'$ .

E.- Resultados de las pruebas con los hospedantes diferenciales.

Los resultados que se presentan son los obtenidos en 6 repeticiones de las pruebas, realizadas en un invernadero con una temperatura promedio de  $28^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  y en un intervalo de 55 días. Tabla VII

Los organismos extraídos de las raíces de los hospedantes diferenciales, fueron comparados con los obtenidos directamente de los muestreos hechos en la localidad escogida y, tanto las medidas como los caracteres morfológicos generales, coincidieron en ambas poblaciones, comprobándose así que la especie sometida a las pruebas fue la misma que se había colectado.

TABLA VII .- Resultados obtenidos de las pruebas con los hospedantes diferenciales ( 6 repeticiones).

Hospedante	Respuestas	Calificación de nodulaciones y/o masas de huevos
Tabaco NC 95	+	3
Algodón Delta Pine 16	-	0
Pimentón California Wonder	+	2
Sandía Charleston Gray	-	0
Cacahuato Florunner	+	3
Tomate Rutgers	+	5

## VI. DISCUSION.

En este trabajo se pretende ampliar el conocimiento de los estudiantes de Biología en el campo de la Taxonomía. Como se mencionó en la introducción, un taxónomo no es un simple coleccionista, ni un técnico, es un científico que estudia a fondo los problemas de la clasificación de los organismos, para lo cual debe tener un profundo conocimiento del organismo que estudia, sea animal o vegetal.

Los nemátodos fitoparásitos aún no están reconocidos como organismos patógenos para los vegetales, pero la evidencia existente de los enormes daños que causan, los señalan como organismos patógenos y, los problemas económicos ocasionados por ellos no se pueden ignorar. La investigación sobre estos nemátodos apenas empieza en México y, para hacer estudios reales y prácticos sobre estos organismos, es necesario emprender una extensa exploración taxonómica, que nos indique cuáles son los géneros y especies de estos fitonemátodos que se encuentran en nuestro territorio, pues no basta con la información que obtenemos de otros países, sino que exista la necesaria acerca de nuestro propio país.

La Taxonomía es una ciencia con fama de "aburrida", pero en el desarrollo de esta tesis se puede observar que eso no es cierto, sino que la Taxonomía obliga al investigador a hacer una integración total de los conocimientos adquiridos para realizar un trabajo satisfactorio. En México actualmente se cuenta con todos los aparatos e instrumentos para hacer investigaciones taxonómicas a un nivel bastante elevado, pero para llevarlo a cabo faltan interés y conocimientos, siendo

este último factor fácil de cubrir cuando existe la voluntad de hacerlo.

Los dos métodos taxonómicos que se emplearon en la identificación de la especie estudiada en esta tesis, merecen ser discutidos por separado.

El método morfológico al que nos referiremos como método clásico, solamente nos aportó un conocimiento mínimo sobre el nemátodo en estudio, si bien nos ayudó a situarlo dentro de los Taxa mayores y a localizar al género al cual pertenecía. Sin embargo, no nos pudo dar más información, pues actualmente es bien conocida la variación fenotípica o morfológica de los seres vivientes, la cual depende de infinidad de factores intrínsecos y extrínsecos, lo que nos lleva a enfrentarnos con una variación considerable de los caracteres, mismos que los antiguos taxónomos consideraban como invariables, debido a que siempre describían sus ejemplares empleando un sólo organismo, pero ahora ese método no es válido y se usan poblaciones enteras para estudiar esos caracteres, los cuales varían a través de las generaciones.

Un ejemplo está dado en las tres poblaciones estudiadas, provenientes de una misma localidad, pero con los muestreos hechos en diferente fecha y época del año. La variación en los patrones perineales que se observa en las figuras 23, 24 y 25, nos demuestra que no podemos asegurar que esta especie tiene un solo tipo de patrón característico, sino que cuenta, cuando menos, con tres tipos diferentes, entre los cuales se encuentran todos los tipos intermedios que presentan una gradación de las características que ligan a un patrón con otro.

Lo mismo sucede con las medidas tomadas, pues estas son tan -

subjetivas que se pueden confundir con las de otras especies, ya que - muchas veces la desviación estandard de los promedios obtenidos se sobrepone a los de otras especies del género. Todas las medidas que tomemos nunca serán suficientes para caracterizar a una especie.

Dentro de las medidas que se toman, existen relaciones entre - algunas de ellas, como el largo y el ancho del cuerpo, el largo del - cuerpo y el largo de la cola, etc., estas relaciones propuestas por - De Man son ahora obsoletas e inoperantes, pues como se ve en el análisis de correlación hecho con estos índices, en el caso de los machos, el índice "a" carece de casi cualquier correlación de una variable con la otra, o sea que ambas son independientes una de otra, lo que se expresa con el coeficiente  $r_a = 0.03$ , por lo que es simplemente una pérdida de tiempo y falta de conocimientos estadísticos, el pretender que un índice de este tipo sea válido. Lo mismo sucede con los índices obtenidos para la población de larvas, aunque en el índice "c" se obtiene una correlación de  $r_c = 0.23$ , en la gráfica correspondiente en donde se hace el análisis de regresión, se observa que la distribución de los datos no se apega mucho a la recta teórica.

Por todo esto, el empleo de dichos índices no tiene la suficiente validez en el campo de la Taxonomía actual, que más que teórica es experimental.

En suma, las diagnósis o descripciones de las especies hechas en base al estudio y observaciones morfológicas, tienen una validez - muy discutible, pues como ya se mencionó anteriormente, los organismos vivos están sujetos a presiones de su medio ambiente que pueden hacer que los fenotipos cambien. Otro ejemplo que ilustra esto, es la carac-

terística observada en las poblaciones de machos revisadas en este trabajo, la cual es que los tres campos laterales están totalmente areolados. Esta característica se presenta, pero solamente en los dos campos externos, en unas poblaciones de machos de Meloidogyne hanla, colectadas en las provincias de Heredia, Cartago y Alajuela en Costa Rica (74), sin embargo, en las claves y en la literatura se menciona que estos machos tienen los campos laterales lisos. Tal vez ahora con esta alteración morfológica encontrada, las claves se cambien, pero de todos modos, la identificación de una especie no puede estar dada totalmente por evidencias tan variables como son las morfológicas.

En el campo de la Taxonomía moderna se ha empezado a trabajar, desde hace más de 50 años, con las respuestas fisiológicas que dan los vegetales hospedantes, cuando son atacados por nemátodos fitoparásitos. Las observaciones hechas por el Dr. J. N. Garner, le llevaron a elaborar un método de identificación de las especies de Meloidogyne, basándose en estas respuestas. Este método fue el segundo usado en este trabajo de tesis y realmente es sencillo, objetivo y práctico. El único inconveniente encontrado fue que la preparación del inóculo usando hipoclorito de sodio ( $\text{NaOCl}$ ) no es muy conveniente, pues reduce la viabilidad de los huevos y las pruebas realizadas con este inóculo dieron resultados pobres e inexactos. Por esta razón se implementó otro método de obtención de inóculo, como es el de inocular las plantas de prueba directamente con raíces que presentaban nodulaciones y masas de huevos. Aunque este método da resultados muy rápidos, se puede afirmar que resulta algo inexacto, si queremos saber cuál fue la cantidad de huevos inoculada. Pero de la cantidad de huevos calculada que fue de -

100, 000, se puede discutir que no todas las masas tienen huevos, ni todos estos son viables. Sin embargo, los resultados obtenidos fueron satisfactorios, por lo que las respuestas de las pruebas realizadas, con este tipo de inoculación, fueron aceptadas como confiables.

El resultado de las pruebas corroboró que la especie identificada morfológicamente era M. hapla. Sin embargo es necesario hacer un estudio más profundo de esta especie, abarcando los aspectos citogenéticos y bioquímicos, para dar un panorama completo de la identificación del mismo, ya que esta especie tiene dos razas que se distinguen una de otra por su número cromosómico. Los demás métodos de identificación no fueron empleados, lo cual no significa que no se puedan llevar a cabo en una investigación posterior y en donde se discutirá la eficacia y ventajas que poseen y los beneficios que aporten al estudio de los nemátodos fitoparásitos. Sin embargo se pensó que sería conveniente mencionarlos, ya que son pocos los investigadores y estudiantes que los conocen y que saben cual es su utilidad en el campo de la Taxonomía experimental.

Estos métodos ayudan a establecer las relaciones serológicas, genéticas y filogenéticas intra e interespecíficas existentes, ayudándonos a lograr una clasificación de los organismos más anegada a la realidad, propósito que persigue la Sistemática.

Las técnicas de laboratorio que se emplearon en el desarrollo de esta tesis, son una recopilación de las técnicas más usadas, que tienen una eficacia mayor y que aportan las ventajas de rapidez y facilidad en el manejo de los nemátodos fitoparásitos.

Con todo esto, se espera cumplir con el principal objetivo de-

esta tesis, que es el de aumentar el interés de los estudiantes e investigadores sobre la Taxonomía experimental y sobre el estudio de los nemátodos fitoparásitos.

## VII. CONCLUSIONES.

En base al trabajo de tesis expuesto, se puede concluir que:

En México la Taxonomía todavía no ha llegado a desarrollarse plenamente, pues aún se halla en la primera etapa, o sea que en nuestro país, la Taxonomía que se maneja es la Alfa o clásica, que es meramente descriptiva y estática y, solamente se basa en los caracteres morfológicos, por lo que es necesario impulsar la investigación por los caminos de la Taxonomía experimental.

Siendo la Taxonomía una de las ramas de la Sistemática, se espera que las personas dedicadas al estudio de ella no se conformen con ser técnicos, sino que amplíen el campo de sus conocimientos para llegar a ser verdaderos investigadores de la Sistemática y de todas las ramas de la Biología que están involucradas con esta ciencia.

Es necesario también hacer una investigación completa sobre la fauna nematológica de México, para así poder ser capaces de comprender la problemática a que nos enfrentamos y poder pensar en darle alguna solución, ya que al no conocer ni los géneros ni las especies de nemátodos fitoparásitos que atacan los principales cultivos, no se pueden tomar las medidas de control adecuadas para evitar las pérdidas ocasionadas por estos organismos.

Se propone también la búsqueda de esquemas de respuestas de hospedantes diferenciales adecuados para cada especie o género de nemátodos que se deseen identificar.

Otra investigación interesante, podría ser el empezar a crear un catálogo, en donde se coloquen todos los patrones enzimáticos y pro

técnicos válidos para la identificación bioquímica de las diferentes especies de nemátodos fitoparásitos.

## VIII. LITERATURA CITADA.

- 1.- Allard, R. W. 1954. Sources of root-knot resistance in Lima beans. *Phytopathology* 44 : 1 - 4.
- 2.- Allen, M. W. 1952. Observations on the genus Meloidogyne Goeldi, 1887. *Proc. Helm. Soc. Wash.* 19 : 44 - 51.
- 3.- Angervall, L. & E. Carlström. Theoretical criteria for the use of relative organ weights and similar ratios in Biology. *J. Theor. Biol.* 4 : 254 - 259.
- 4.- Barrons, K. C. 1939. Studies of the nature of root-knot resistance. *J. Agric. Res.* 58 : 263 - 272.
- 5.- Becerra, L. E. & C. Sosa-Moss. 1977. Reporte de Meloidogyne incognita (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, atacando maíz (Zea mays L.) en México, sin causar agallas radiculares. Memorias de la X reunión de la ONTA, Tabasco, México.
- 6.- Bergeson, G. B. 1959. The influence of temperature on the survival of some species of the genus Meloidogyne in the absence of a host. *Nematol.* 4 : 344 - 354.

- 7.- Bird, A. F. 1959. The attractiveness of roots to the plant parasitic nematodes Meloidogyne javanica and M. hapla. Nematol. 4 : 322 - 335.
- 8.- Bird, A. F. 1960. Additional notes on the attractiveness of root to plant parasitic nematodes. Nematol. 5 : 217.
- 9.- \_\_\_\_\_ . 1962. The inducement of giant cells by - - Meloidogyne javanica. Nematol. 8 : 1 - 10.
- 10.- \_\_\_\_\_ . 1966. Esterases in the genus Meloidogyne. - Nematol. 12 : 359 - 361.
- 11.- \_\_\_\_\_ . 1971. The structure of nematodes. Academic Press. New York & London. 318 pp.
- 12.- \_\_\_\_\_ . & G. E. Rodgers. 1965. Ultrastructure of the cuticle and its formation in Meloidogyne javanica. Nematol. 11 : 224 - 230.
- 13.- \_\_\_\_\_ . & W. Saurer. 1967. Changes associated with parasitism in nematodes. 2. Histochemical and microspectrophotometric analyses of preparasitic and parasitic larvae of Meloidogyne javanica. J. Parasitol. 53 : 1 262 - 1 269.

- 14.- Bird, G. W. 1971. Biology of nematodes and their phytopathogenic mechanisms. J. Parasitol. 57 : 1 sec. 2.
- 15.- Brundin, L. 1972. Evolution, Causal Biology and Classification. Zool. Scrip. 1 : 107 - 120.
- 16.- Caveness, F. E. 1961. The "hemizonion" an unrecorded companion structure of the ocephalids and the hemizonid. Proc. Helm. Soc. Wash. 28 : 169 - 170.
- 17.- \_\_\_\_\_ . & J. Jensen. 1955. Modification of the centrifugal-flotation technique for the isolation and concentration of nematodes and their eggs from soil and plant-tissue. Proc. Helm. Soc. Wash. 22 : 87 - 89.
- 18.- \_\_\_\_\_ . & J. D. Panzer. 1960. Nemic Galvanotaxis. Proc. Helm. Soc. Wash. 27 : 73 - 74.
- 19.- Chitwood, B. G. 1949. Root-knot nematodes. Part I. A revision of the genus Meloidogyne Goeldi, 1887. Proc. Helm. Soc. Wash. 16 : 90 - 104.
- 20.- Chitwood, M. D. 1951. Notes on the physiology of Meloidogyne javanica Treub, 1885. J. Parasitol. 37 : 96 - 98.

- 21.- Christie, J. R. 1936. The development of root - knot nematode galls. *Phytopathology* 26 : 1 - 22.
- 22.- \_\_\_\_\_. 1946. Host-parasite relationships of the root-knot nematode Heterodera marioni. II. Some effects of the host on the parasite. *Phytopathology* 36 : 340-352.
- 23.- \_\_\_\_\_. 1949. Host-parasite relationships of the root-knot nematodes Meloidogyne spp. III. The nature of resistance in plants to root-knot. *Proc. Helm. Soc. Wash.* 16 : 104 - 107.
- 24.- \_\_\_\_\_. 1959. Plant nematodes, their bionomics and control. *Agric. Exp. Stn. Univ. Fla. Gainesville.* 256 pp.
- 25.- \_\_\_\_\_. & F. E. Albin. 1944. Host-parasite relationships of the root-knot Heterodera marioni. I. The question of races. *Proc. Helm. Soc. Wash.* 11 : 31 - 37.
- 26.- \_\_\_\_\_. & G. S. Cobb. 1941. Notes on the life history of the root-knot nematode Heterodera marioni. *Proc. Helm. Soc. Wash.* 8 : 23 - 26.
- 27.- Clark, W. C. 1962. Measurements as taxonomic criteria in nematology. *Nematol.* 7 : 10.

- 28.- Courtney, W. D., D. Polley & V. L. Miller. 1955. T.A.F., an improved fixative in nematode technique. Plant Dis. Rep. 39 : 570 - 571.
- 29.- Croll, N. A. & A. R. Maggenti. 1968. A peripheral nervous system in nematode with a discussion of its functional and phylogenetic significance. Proc. Helm. Soc. Wash. 35 : 108 - 115.
- 30.- Dalmasso, A. & J. B. Berge. 1978. Molecular polymorphism - and phylogenetic relationship in some Meloidogyne spp. : Application to the taxonomy of nematode Meloidogyne. Inst. Nat. Rech. Agron., Sta. Rech. Nem. Antibes, France. 24 pp.
- 31.- Davis, A. R. & R. J. Jenkins. 1960. Histopathology of gardenia (Gardenia jasminoides) infected with three species of Meloidogyne. Nematol. 5 : 228 - 230.
- 32.- De la Sota, E. R. 1967. La taxonomía y la revolución en - las ciencias biológicas. Dento. de asuntos científicos. Unión Panamericana. Sria. Gral. OEA. Washington, D.C.
- 33.- Dickson, D.W., D. Huisinigh & J. N. Sasser. 1971. Dehydrogenases and alkaline phosphatases and esterases for chimo - taxonomy of selected Meloidogyne, Ditylenchus, Heterodera and Aphelenchus. J. Nematol. 3 : 1 - 16.

- 34.- Dronkin, V. A. 1963. Cellulase in phytonarasitic nematodes. *Nematol.* 9 : 444 - 454.
- 35.- \_\_\_\_\_ . 1953. Studies on the variability of anal plate patterns in pure lines of Meloidogyne spp. The root knot nematode. *Proc. Helm. Soc. Wash.* 20 : 32 - 39.
- 36.- \_\_\_\_\_ . & W R. Boone. 1966. Analysis of host-parasite relationships of root-knot nematodes by single larva - inoculations of excised tomato roots. *Nematol* 12 : 225 - 236.
- 37.- \_\_\_\_\_ . & P. E. Nelson. 1960. The histopathology of root-knot nematode infections in soybeans. *Phytopathology* 50 : 442 - 447.
- 38.- El-Sheriff, M. & W. F. Mai. 1968. The use of immunodiffusion in nematode identification. *Nematol.* 14 : 593 - 595.
- 39.- Elsen, J. R. 1951. The histological anatomy of the nematode Meloidogyne hapla (Heteroderidae). *Proc. Helm. Soc. Wash.* 18 : 53 - 63.
- 40.- Erlich, P. R. 1964. Some axioms of Taxonomy. *Syst. Zool.* 13 : 109 - 123.

- 41.- Esser, R. P., V. G. Perry & A. L. Taylor. 1976. A diagnostic compendium of the genus Meloidogyne (Nematoda : Heteroderidae). Proc. Helm. Soc. Wash. 43 : 138 - 150.
- 42.- Franklin, M. T. 1962. Preparation of posterior cuticular patterns of Meloidogyne spp. for identification. Nematol. 7 : 336 - 337.
- 43.- Gemmell, A. R. 1943. The resistance of potato varieties to Heterodera schachtii Schmidt, the potato eelworm. Ann. Appl. Biol. 30 : 67 - 70.
- 44.- Geraert, E. 1961. Corrections of measurements of nematode diameters. Nematol. 6 : 258 - 259.
- 45.- \_\_\_\_\_. 1965. The head structures of some Tylenchs - with special attention on amphidial apertures. Nematol. 11 : 131 - 136.
- 46.- \_\_\_\_\_. 1968. Morphometric relations in nematodes. Nematol. 14 : 171 - 183.
- 47.- Golden, A. M. 1974. Meloidogyne incognita a single homogeneous species or a complex of two or more taxa? Nematol. 6 : 141.

- 48.- \_\_\_\_\_ . & W. Birchfield. 1965. Meloidogyne graminio-  
la (Heteroderidae) a new species of root-knot nematode --  
from grass. Proc. Helm. Soc. Wash. 32 : 228 - 231.
- 49.- Goodey, J. B. 1951. The hemizonid, a hitherto unrecorded -  
structure in members of the Tylenchoidea. J. Helminth. 25;  
33 - 36.
- 50.- \_\_\_\_\_. 1959. Data to be considered, observed, and -  
where possible, reported upon when presentings descrip -  
tions of new species. Nematol. 4 : 211 - 216.
- 51.- Goodey, T. 1932. On the nomenclature of the root-gall nema-  
todes. J. Helminth. 10 : 21 - 28.
- 52.- \_\_\_\_\_. 1951. Soil and Freshwater nematodes. John Wiley  
& Sons, Inc. New York. 544 pp.
- 53.- Gysels, H. 1968. Electrophoretic observations on the pro -  
tein composition of free-living and plant-parasitic nema-  
todes, with a special reference to some components show -  
ing digestive activity. Nematol. 14 : 489 - 496.
- 54.- Hackney, R. W. 1974. The use of chromosome number to iden-  
tify Meloidogyne spp. on grasses. J. Nematol. 6 : 141 -142.

- 55.- \_\_\_\_\_. 1977. Identification of field populations - of Meloidogyne spp. by chromosome number. J. Nematol. 9 : 248 - 249.
- 56.- Hussey, R.S. 1971. A technique for obtaining quantities of living Meloidogyne females. J. Nematol. 3 : 99 - 100.
- 57.- \_\_\_\_\_. 1972. Serological relationship of Meloidogyne incognita and M. arenaria. J. Nematol. 4 : 101 - 104.
- 58.- \_\_\_\_\_. & K. R. Barker. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of Meloidogyne spp. including a new technique. Plant Dis. Rep. 57 : 1 025 - 1 028.
- 59.- \_\_\_\_\_. & L. R. Krumsberg. 1971. Disc electrophoretic patterns of enzymes and soluble proteins of Ditylenchus dipsaci and D. triformis. J. Nematol. 3 : 79 - 84.
- 60.- \_\_\_\_\_, J. N. Sasser & D. Huisingsh. 1972. Disc electrophoresis studies of soluble proteins and enzymes of - Meloidogyne incognita and M. arenaria. J. Nematol. 4 : 183 - 189.
- 61.- Instructivo para toma y envío de muestras para análisis nematológico. Univ. Auton. Chapingo., Dpto. de Parasitología Agrícola., Secc. Fitonematología. 10 pp.

- 62.- Jenkins, W. R. & D. P. Taylor. 1967. Plant Nematology. Reinhold Publishing Co., New York. 270 pp.
- 63.- Kreyszig, E. 1978. Introducción a la estadística matemática, principios y métodos. Ed. Limusa, México.: 315 - 378.
- 64.- La Page, G. 1937. Nematodes parasitic in animals. Methuen & Co., London. 172 pp.
- 65.- Lee, D. L. 1965. The physiology of nematodes. W. H. Freeman & Co., San Francisco. 154 pp.
- 66.- Lee, S. E. 1965. Attempts to use immunodiffusion for species identification of Meloidogyna. Nematol. 11 : 41.
- 67.- Lehninger, A. L. 1970. Biochemistry. Worth Publishers, Inc. New York. 833 pp.
- 68.- Linford, M. B. 1937. The feeding of some hollow-stylet nematodes. Proc. Helm. Soc. Wash. 4 : 41 - 46.
- 69.- \_\_\_\_\_. 1937. The feeding of the root-knot nematodes in root tissue and nutrient solution. Phytopathology 27 : 824 - 835.

- 70.- Loos, C. A. 1953. Meloidogyne brevicauda, n. sp. a cause -  
of root-knot of mature tea in Ceylan. Proc. Helm. Soc.  
Wash. 20 : 83 - 91.
- 71.- Lopez, R & D. W. Dickson. 1976. Host response and morphome  
tric variations among three populations of Meloidogyne -  
incognita and one of M. javanica from Florida. J. Nematol.  
9 : 293.
- 72.- \_\_\_\_\_ . & D. W. Dickson. 1977. Morfometría y resnes  
ta de hospedantes diferenciales a tres poblaciones de - -  
Meloidogyne incognita y una de M. javanica. Agron.  
Costarr. 1 : 119 - 127.
- 73.- \_\_\_\_\_ ., D. W. Dickson & R. C. Littell. 1977. Efecto  
de Meloidogyne incognita y M. javanica en el crecimiento  
de dos cultivares de tabaco estufado. Nematologica 7 :  
36 - 44.
- 74.- \_\_\_\_\_ . & L. A. Salazar. 1978. Morfometría y algunos  
hospedantes de Meloidogyne hanla en la cordillera volcáni  
ca central de Costa Rica. Agron. Costarricense. 2 : 29 -  
38.
- 75.- Lordello, L. G. E. & A. P. L. Zamith. 1958. On the morphob  
gy of the coffee root-knot nematode Meloidogyne exigua -  
Goeldi, 1887. Proc. Helm. Soc. Wash. 25 : 133 - 137.

- 76.- Lownsberry, B. F. & D.R. Viglierchio. 1961. Importance of response of Meloidogyne hanna to an agent from germinating tomato seeds. Phytopathology 51 : 219 - 221.
- 77.- Maggenti, A. R. & M. W. Allen. 1960. The origin of the gelatinous matrix in Meloidogyne. Proc. Helm. Soc. Wash. 27 : 4 - 10.
- 78.- Mayr, E. 1969. Principles of Systematic Zoology. McGraw - Hill, London. 395 pp.
- 79.- McBeth, C. W., A. L. Taylor & A. L. Smith. 1941. Notes on staining nematodes in root tissues. Proc. Helm. Soc. - Wash. 8 : 26.
- 80.- McClure, M. A., T. H. Kruk & I. Misaghi. 1973. A method for obtaining quantities of clean Meloidogyne eggs. J. Nematol. 5 : 230.
- 81.- Miller, C. W. & W. R. Jenkins. 1964. Proteolytic enzymes in certain free-living and plant-parasitic nematodes. Nematol. 10 : 480 - 488.
- 82.- Minton, N. A. 1965. Rectal matrix glands in Meloidogyne arenaria. Proc. Helm. Soc. Wash. 32 : 163 .

- 83.- Morgan, G. T. & J. W. McAllan. 1962. Hydrolytic enzymes -  
in plant-parasitic nematodes. Nematol. 8 : 209 - 215.
- 84.- Myers, R. F. 1965. Organic substances discharged by plant-  
parasitic nematodes. Phytopathology 55 : 429 - 437.
- 85.- Ochoterena, E. L. 1964. Tendencias actuales de la Taxo -  
nomía. Rev. Soc. Mex. Hist. Nat. 25 : 109 - 119.
- 86.- Oteifa, B. A. 1952. Potassium nutrition of the host in re-  
lation to infection by a root-knot nematode Meloidogyne -  
incognita. Proc. Helm. Soc. Wash. 19 : 99 - 104.
- 87.- Paulson, R. E. & J. M. Webster. 1970. Giant cell formation  
in tomato root caused by Meloidogyne incognita and M. hapla  
infection. A light and electron microscope study. J. Bot.  
48 : 271 - 276.
- 88.- Riffle, J. W. 1963. Meloidogyne ovalis (Nematoda ; Hetero-  
deridae) a new species of root-knot nematode. Proc. Helm.  
Soc. Wash. 30 : 287 - 292.
- 89.- Rhode, R. A. 1960. Acetylcholinesterase in plant-parasi-  
tic nematodes and an anticholinesterase from asparagus.  
Proc. Helm. Soc. Wash. 27 : 121 - 123.

- 90.- Sasser, J. N. 1952. Identification of root-knot nematodes (Meloidogyne spp.) by hosta reactions. Plant Dis. Rep. 36 : 84 - 86.
- 91.- \_\_\_\_\_. 1972. Physiological variation in the genus Meloidogyne as determined by differential hosts. OEPP/EPPD Bull. 6 : 41 - 48.
- 92.- \_\_\_\_\_. 1977. Worldwide dissemination and importance of the root-knot nematodes Meloidogyne spp. J. Nematol. 9 : 26 - 29.
- 93.- \_\_\_\_\_. 1978. Resultados de los estudios de hospedantes diferenciales, frecuencia de las especies, razas e importancia relativa de las especies individuales de Meloidogyne. Conferencia sostenida en San José, Costa Rica, en la 1a. Reunión de la Región I del IMP. Septiembre 1978.
- 94.- \_\_\_\_\_. & W. R. Jenkins. 1960. Nematology, fundamentals and recent advances with emphasis on plant-parasitic and soil forms. Univ. N. Carol. Press., Chapel Hill. 480 p.
- 95.- \_\_\_\_\_. & A. L. Taylor. 1952. Studies on the entry of larvae of root-knot nematodes into roots of susceptible and resistant plants. Phytopathology 42 : 474.

- 96.- \_\_\_\_\_ . & A. C. Triantaphillou. 1977. Identification of Meloidogyne species and races. J. Nematol. 9 : 283.
- 97.- Sattler, R. 1964. Methodological problems in Taxonomy. Syst. Zool. 13 : 19 - 27.
- 98.- Savory, T. H. 1970. Animal Taxonomy. Heinemann Educational Books, London. 205 pp.
- 99.- Schaad, N. W. & J. T. Walker. 1975. The use of density - gradient centrifugation technique for the purification - of eggs of Meloidogyne spp. J. Nematol. 7 : 203.
- 100.- Seinhorst, J. W. 1966. Killing nematodes for taxonomic study with hot F.A. 4 : 1. Nematol. 12 : 178.
- 101.- Sibley, C. G. 1962. The comparative morphology of protein molecules as data for classification. Syst. Zool. 11 : 108 - 116.
- 102.- Sledge, E. B. & A. M. Golden. 1964. Hypsoverine graminis (Nematoda : Heteroderidae) a new genus and species of - plant-parasitic nematode. Proc. Helm. Soc. Wash. 31 : 83-88.

- 103.- Sokal, R. R. 1966. Numerical Taxonomy. Sci. Am 215 : 106-116.
- 104.- Southey, J. F. 1965. Plant Nematology. 2a. Ed. Tech. Bull. 7, H. M. S. O., London. 282 pp.
- 105.- Southey, J. F. 1970. Laboratory methods for work with - - plant and soil nematodes. Tech. Bull. 2, H. M. S. O., London. 148 pp.
- 106.- Taylor, A. L., V. H. Dropkin & G. C. Martin. 1955. Perineal patterns of root-knot nematodes. Phytopathology 45 : 26 - 34.
- 107.- \_\_\_\_\_ & J. N. Sasser. 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes (Meloidogyne spp.) N. Carol. Sta. Univ. Graphics. 111 pp.
- 108.- Taylor, D. P. & C. Natcher. 1974. An improved technique - for preparing perineal patterns of Meloidogyne spp. Nematol. 20 : 268 - 269.
- 109.- Thorne, G. 1961. Principles of Nematology. McGraw-Hill, Co. New York. 553 pp.

- 110.- Tracey, M. V. 1958. Cellulase and chitinase in plant nematodes. *Nematol.* 3 : 179 - 183.
- 111.- Triantanhyllou, A. C. 1962. Oogenesis in the root-knot nematode Meloidogyne javanica. *Nematol.* 7 : 105 - 113.
- 112.- \_\_\_\_\_. 1963. Polyploidy and parthenogenesis in the root-knot nematode Meloidogyne arenaria. *J. Morphol.* 113 : 489 - 499.
- 113.- \_\_\_\_\_. 1969. Gametogenesis and chromosomes of two root-knot nematodes Meloidogyne graminicola and M. naasi. *J. Nematol.* 1 : 62 - 71.
- 114.- \_\_\_\_\_. 1971. Genetics and Cytology. Vol II. Pag 1-34, in *Plant parasitic nematodes*, Eds. B. M. Zuckerman, W. F. Mai & R. A. Rhode. Academic Press, New York and London.
- 115.- \_\_\_\_\_. 1973. Gametogenesis and reproduction of - - Meloidogyne graminis and M. ottersoni (Nematoda : Heteroderidae). *J. Nematol.* 5 : 84 - 87.
- 116.- \_\_\_\_\_. 1978. Citología y reproducción de los nemátodos noduladores Meloidogyne spp. Conferencia sostenida en San José, Costa Rica durante la 1a. Reunión de la Región I del IMP. Septiembre 1978.

- 117.- \_\_\_\_\_ & J. N. Sasser. 1960. Variation in merineal - patterns and host specificity of Meloidogyne incognita. Phytopathology 50 : 724 - 735.
- 118.- Viglierchio, D.R. 1961. Attraction of parasitic nematodes by plant root emanations. Phytopathology 51 : 136 - 142.
- 119.- Viglierchio, D. R. & B. F. Lownsberry. 1968. The hatching response of Meloidogyne species to the emanations from the roots of germinating tomatoes. Nematol. 5 : 153 - 157.
- 120.- Webster, J. M. 1972. Economic Nematology. Academic Press, London, New York. 563 pp.
- 121.- Wieser, W. 1955. The attractiveness of plants to larvae of root - knot nematodes. I. The effect of tomato seedlings and excised roots on Meloidogyne hapla Chitwood. Proc. - Helm. Soc. Wash. 22 : 106 - 112.
- 122.- Wieser, W. 1956. The attractiveness of plants to larvae of root - knot nematodes. II. The effect of excised bean, eggplant and soybean roots on Meloidogyne hapla Chitwood. Proc. Helm. Soc. Wash. 23 : 59 - 64.
- 123.- Williams, K. J. G. 1974. Meloidogyne hapla. Commonwealth - Institute of Helminthology. Descriptions of Plant-parasitic nematodes. Set 3 No. 31.

- 124.- Wouts, W. M. 1972. A revision of the family Heteroderidae  
( Nematoda : Tylenchoidea ) I. The family Heteroderidae -  
and its subfamilies. Nematol. 18 : 439 - 446.
- 125.- Zuckerman, M. B., W. F. Mai & R. A. Rhode. 1971. Plant Para-  
sitic Nematodes. Vol I y II. Academic Press, New York y  
Londres.
- 126.- Fudenberg, H. H., D. P. Sites, J. L. Caldwell & J. V. Wells.  
1976. Basical & Clinical Immunology. Lange Medical Publi-  
cations. California. 653 pp.