



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

11
2ej-

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

ESPECIES DE *Meloidogyne* ASOCIADAS A DIVERSOS
CULTIVOS DE IMPORTANCIA AGRICOLA EN
MEXICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERA (O) AGRICOLA

P R E S E N T A N :

FLORES CAMACHO ROSALINDA

AGUILAR PEREZ JAVIER ALEJANDRO

ASESORES: ING. AGR. JUDITH HERNANDEZ ALFONSINA
DR. IGNACIO CID DEL PRADO VERA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO. 1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

268136



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA 14
MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E.

ATN.: Q. M. DEL CARMEN GARCIA MIJARES
JEFE DEL DEPARTAMENTO.

Con base al articulo 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a Usted que revisamos el TRABAJO de Tesis con el nombre de:

"Especies de Meloidogyne Asociadas a Diversos Cultivos de Importancia Agrícola en México".

que presenta la pasante: FLORES CAMACHO ROSALINDA
con número de cuenta : 8724191-4 para obtener el Título de :

INGENIERA AGRICOLA

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E.

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izc., México, a 19 de Octubre de 1998

Presidente ING. GUILLERMO BASANTE BUTRON

Vocal ING. CARLOS CESAR MAYCOTTE MORALES

Secretario ING. JUDITH HERNANDEZ ALFONSINA

1er. Sup. ING. ANGEL LOPEZ CORTES

2do. Sup. ING. JOSE MANUEL CHAVEZ BRAVO



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES - CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E.

ATN.: Q. M. DEL CARMEN GARCIA MIJARES
JEFE DEL DEPARTAMENTO.

Con base al articulo 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a Usted que revisamos el TRABAJO de Tesis con el nombre de:

"Especies de Meloidogyne Asociadas a Diversos Cultivos de Importancia Agrícola en México".

que presenta el pasante: AGUILAR PEREZ JAVIER ALEJANDRO con número de cuenta : 8716893-6 para obtener el Título de :

INGENIERO AGRICOLA

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E.

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izc., México, a 19 de Octubre de 1998

Presidente ING. GUILLERMO BASANTE BUTRON

Vocal ING. CARLOS CESAR MAYCOTTE MORALES

Secretario ING. JUDITH HERNANDEZ ALFONSINA

1er. Sup. ING. ANGEL LOPEZ CORTES

2do. Sup. ING. JOSE MANUEL CHAVEZ BRAVO

Handwritten signatures and stamps, including a circular stamp with illegible text and several overlapping signatures.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación que nos brindo en especial a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Al Colegio de Postgraduados, particularmente al Instituto de Fitosanidad por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Al Dr. Ignacio Cid del Prado Vera por su dirección en el trabajo y darnos la oportunidad de incorporarnos a su equipo de colaboradores compartiendo sus conocimientos en el área y brindarnos su confianza.

A la Ing. Agr. Judith Hernández Alfonsina por su valiosa y acertada asesoría en el presente trabajo, por el apoyo y comprensión en los momentos difíciles que compartió incondicionalmente con nosotros y el constante estímulo para seguir adelante.

A la Dra. Rosa Etena Manzanilla por sus observaciones y sugerencias en la presente investigación y por estimularnos a trabajar con dedicación y perseverancia.

Al M.C. Jorge Valdéz Carrasco por su apoyo y disponibilidad para la realización de este trabajo, por su valiosa amistad y constante motivación.

Al Biol. Francisco Durán de Anda por sus acertadas observaciones en el trabajo, por su constante estímulo para la realización del mismo, por su valiosa amistad y compartir momentos importantes en nuestro desarrollo profesional.

A la Dra. Elizabeth Cárdenas Soriano por depositar su confianza y amistad en nosotros.

Al Dr. Roberto García Espinoza por su gran humanismo, que mostró con nosotros.

A los compañeros del laboratorio de Nematología Agrícola del IFIT en el Colegio de Postgraduados.

Al personal académico y docente del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados por las facilidades brindadas.

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	I
LISTA DE FIGURAS	II
I. INTRODUCCION	1
1.1. Objetivos	2
II. REVISION DE LITERATURA	3
2.1. Aspectos generales de <i>Meloidogyne</i>	3
2.2. Reseña histórica del género <i>Meloidogyne</i> y sintomatología de plantas hospederas	4
2.3. Importancia económica del género <i>Meloidogyne</i>	5
2.3.1. Importancia económica a nivel mundial	5
2.3.2. Importancia económica a nivel nacional	7
2.4. Ubicación taxonómica de <i>Meloidogyne</i> spp	9
2.5. Caracteres morfológicos distintivos para la identificación de especies de <i>Meloidogyne</i>	9
2.5.1. Descripción de las cuatro especies más comunes del género <i>Meloidogyne</i>	13
2.6. Area de estudio	17
III. MATERIALES Y METODOS	19
3.1. ETAPA DE CAMPO	19
3.1.1. Localización geográfica de los sitios de muestreo	19
3.1.2. Tipo de muestreo para nematodos	21
3.1.3. Procedimiento de muestreo	21
3.1.4. Número de muestras	21
3.1.5. Toma de las muestras	22
3.1.6. Obtención de las muestras	22

3.1.7. Cuidado y manejo de las muestras de suelo y raíz	23
3.1.8. Localización geográfica de los sitios de muestreo	23
3.2 TRABAJO DE LABORATORIO	23
3.2.1. Técnica de extracción tamizado-centrifugado	23
3.2.2. Técnica de tinción de raíces	24
3.2.3. Técnica de muerte, fijación y deshidratación	24
3.2.4. Método para realizar cortes perineales	25
3.2.5. Técnica de montaje con anillo de cera	25
3.2.6. Técnica de extracción de espículas	26
3.2.7. Iluminación Köhler	26
3.2.8. Calibración del microscopio y cámara clara	26
3.2.9. Identificación de las especies	27
IV. RESULTADOS	28
4.1. Identificación de especies	28
4.2. Localidades y cultivos asociados a <i>Meloidogyne</i>	38
4.3. Distribución de especies de <i>Meloidogyne</i>	39
4.4. Morfología y morfometría de espículas	40
V. DISCUSION	46
VI. CONCLUSION	53
VII. LITERATURA CITADA	54
VIII. APENDICE	60

LISTA DE CUADROS

CUADROS	Pag.
3.1. Localización geográfica y clima de los sitios de muestreo	20
4.1. Especies y localidades de cultivos asociados a <i>Meloidogyne</i>	38
4.2. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo	40
4.3. Medidas promedio de las partes que componen la espícula	42

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	Pag
2.1. Morfología general de un modelo perineal	11
2.2. Morfología básica del estilete de un nematodo agallador	11
2.3. Morfología de la parte anterior de una hembra	12
2.4. Morfología de la parte anterior de un macho y partes de un estilete	12
4.1. <i>Meloidogyne incognita</i>	30
4.2. <i>Meloidogyne arenaria</i>	31
4.3. <i>Meloidogyne javanica</i>	32
4.4. <i>Meloidogyne hapla</i>	33
4.5. Patrones perineales de <i>M. incognita</i>	34
4.6. Patrones perineales de <i>M. incognita</i> y <i>M. arenaria</i>	35
4.7. Patrones perineales de <i>M. javanica</i> y <i>M. hapla</i>	36
4.8. Región anterior de machos y hembras de <i>M. incognita</i> y <i>M. arenaria</i>	37
4.9. Partes que componen una espícula	43
4.10. Diferencias morfológicas de espículas en las cuatro especies	44

I. INTRODUCCION

Muchos son los factores que limitan la producción hortícola en nuestro país, dentro de ellos puede citarse al grupo de los nematodos fitoparásitos, éstos viven en el suelo o en tejidos de plantas; comunmente no se desplazan a grandes distancias, su dispersión se efectúa principalmente por intermediación del hombre ya que en ocasiones no se limpia la herramienta o maquinaria que se ocupa en las labores agrícolas, trasladando suelo o plantas infestadas de una parcela a otra diseminando facilmente estos organismos. Estos parásitos inducen una sintomatología específica como achaparramiento, follaje reducido, muerte regresiva, bajo rendimiento, clorosis, caída de frutos y malformación de los mismos en diversos cultivos, ocasionando pérdidas económicas significativas (Bridge, 1991).

El género *Meloidogyne* es el más importante en México (Comunicación personal Phillip, 1995). A nivel mundial por su amplia distribución y número de hospedantes, ocasiona grandes daños a las plantas cultivadas, disminuyendo considerablemente el rendimiento e incrementa los costos de producción. De éste género las cuatro especies más comunes son: *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White), Chitwood; *M. arenaria* (Neal), Chitwood; *M. javanica* (Treub), Chitwood y *M. hapla* Chitwood.

En nuestro país se han venido realizando trabajos aislados de identificación de especies y razas, en ésta investigación se identificaron especies mediante las metodologías establecidas, las cuales consideran las características morfológicas de los patrones perineales, región cefálica de los machos, cuellos y estiletos de hembras, así como la morfología y morfometría de las espículas de machos, mediante la técnica de extracción de estiletos desarrollada por Eisenback, 1981 (Citada por Jepson, 1987). Se obtuvieron datos complementarios como la ubicación cartográfica, auxiliados de un geoposicionador (GPS).

Las especies identificadas se asocian a cultivos de: vid, plátano, café, oca, sandía, pifia y margaritón. Estos cultivos representan la base de la economía de

las regiones en las que se producen, algunos de estos son productos de exportación, tienen importancia regional y nacional, para esto se plantean los siguientes objetivos:

1. Identificación de especies del género *Meloidogyne* presentes en cultivos de vid, café, plátano, piña, sandía, oca y margaritón.
2. Ubicación cartográfica de las especies de *Meloidogyne*, considerando los siguientes factores latitud, longitud y altitud (msnm).
3. Estudio morfológico comparativo de espículas por medio del microscopio electrónico de rastreo.
4. Contribuir con información específica, mediante la identificación y conservación de material biológico en laboratorio e invernadero, para que en estudios posteriores se elaboren diferentes estrategias encaminadas al manejo integrado.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. Aspectos generales de *Meloidogyne*

Los nematodos estan ubicados en el Phylum Nemata, el cual se divide en dos clases Adenophorea y Secernentea, en esta última se clasifica la mayoría de los géneros que tienen importancia económica para la agricultura (Comunicación personal Cid del Prado, 1995).

Los nematodos tienen diferentes hábitos parasíticos de acuerdo a la forma en que atacan a la planta: 1) Los formadores de quistes, en los cuales se clasifican los siguientes géneros: *Afenestrata* (Luc, Baldwin y Netscher, 1973), *Cactodera* (Krall' y Krall', 1978), *Globodera* (Skarbilovich, 1959), *Dolichodera* (Mulvey y Ebsery, 1980), *Heterodera* (Shmidt, 1892) y *Punctodera* (Mulvey y Stone, 1976); 2) Los endoparásitos, que se establecen y desarrollan dentro de la raíz como *Meloidogyne* y *Nacobbus* (Thome y Allen, 1949), entre otros; 3) Los ectoparásitos se alimentan de la superficie de la raíz y normalmente no penetran al tejido de la misma, algunos géneros de éste tipo son: *Belonolaimus* (Steiner, 1949), *Cacopaurus* (Thome, 1946), *Criconemella* (De Grisse y Loof, 1965), *Dolichodorus* (Cobb, 1914), etc.; 4) Los que se alimentan de tejidos de partes aéreas, se clasifican en los géneros *Anguina* (Scopoli, 1777), *Aphelenchoides* (Fischer, 1984), *Bursaphelenchus* (Fuchs, 1937) y *Ditylenchus* (Filipjev, 1936) (De la Jara, 1988).

Meloidogyne ocasiona el grado más alto de parasitismo siendo un endoparásito sedentario, este microorganismo causa daños directos en el sistema radical, el síntoma más evidente es la formación de agallas, debido a la hipertrofia e hiperplasia en tejidos de la raíz. Hay más de 60 especies de éste género que tienen diferencias significativas en el número de hospederos (Nickle, 1991). Las cuatro especies más importantes son: *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* y *M. hapla*, (Eisenback, 1983). En el caso de *Meloidogyne incognita*, tiene aproximadamente 1000 hospederos (Nickle, 1991), estos parásitos poseen la capacidad de desarrollar una rápida adaptación y diferenciación en razas.

Actualmente se conocen cuatro razas de *M. incognita*, dos de *M. arenaria* y dos de *M. hapla*, las cuales se determinan mediante la prueba de hospederos diferenciales. (Sasser y Carter, 1985). Las pérdidas económicas que se tienen en climas templados son menores en comparación con las pérdidas que hay en los trópicos (Lamberti y Taylor, 1979). Descubrimientos preliminares indican que *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*, habitan en zonas con una temperatura media anual de 15 a 33°C; *M. hapla* ocurre más frecuentemente en áreas con una media anual inferior a los 15°C. (Marbán y Thomason 1985).

2.2. Reseña histórica del género *Meloidogyne* y sintomatología de plantas hospederas

El conocimiento de éste género se remonta a 1855, cuando Berkeley observó en invernadero agallas en raíces de pepino; por su parte Jobert (1878) encontró árboles de café enfermos, en las cuales detectó raíces fibrosas con numerosas agallas; diez años después, Göeldi (1887) señala al nematodo de los nódulos de la raíz como *Meloidogyne exigua* y precisó que esta especie era un nuevo género; posteriormente Goodey, (1932) sinonimizó este género y sus especies una de ellos fue *Heterodera marioni* (Citados por Christie, 1959); hasta que Chitwood (1949) redescubrió las cuatro especies más comunes y ampliamente distribuidas: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla* (Sasser y Carter, 1983). Este género ha sido estudiado por más de un siglo, sin embargo en México es el nematodo fitopatógeno que más se ha trabajado en investigación pero, aún faltan muchos aspectos por conocer en cuanto al manejo integrado de este parásito. Gándara (1906) fué de los primeros investigadores mexicanos que observó la presencia de *Heterodera marioni* (*Meloidogyne* spp) en plantas de café en nuestro país (Gándara, 1906), catorce años después reporta la presencia de éste nematodo en naranja (Gándara, 1920). En algodón se reporta a *Heterodera marioni* en el norte y noroeste de la República (Del Valle, 1948). Fué entonces cuando la Dirección General de Defensa Agrícola (1951) publicó la presencia de *Meloidogyne* spp. en jitomate (Dirección General de Defensa Agrícola, 1952). En

1954 Acosta y de la Isla, reportaron a *Meloidogyne hapla* en fresa, en la región del Bajío. Posteriormente una contribución importante fue el libro *An advanced treatise on Meloidogyne*. Actualmente se han realizado algunos trabajos sobre éste género, lo más reciente es la colecta nacional realizada por el Dr. Ignacio Cid del Prado Vera et al (1995), en el trabajo titulado "Colección e identificación de las especies y razas de *Meloidogyne* y su distribución en los cultivos más importantes para México".

2.3. Importancia económica del género *Meloidogyne*

2.3.1. Importancia económica a nivel mundial del género *Meloidogyne* spp.

Meloidogyne spp es el nematodo de mayor importancia económica mundialmente, es cosmopolita y polífago, disminuye considerablemente el rendimiento e incrementa los costos de producción de 30% a 40% de la inversión total de los cultivos para su control (Comunicación personal, Cid del Prado, 1995) las pérdidas estimadas mundialmente son de aproximadamente 5%; esta cifra no significa mucho si estuviese distribuida equitativamente; pero no es así, la mayor parte de las pérdidas afectan a quienes menos pueden soportarlas, es decir a los pequeños agricultores de los países en desarrollo como el nuestro, sus pérdidas pueden ser de un 25 % a 50 % sobre grandes áreas de cultivo (Taylor y Sasser, 1979); tal es la situación de las regiones tropicales, las pérdidas son considerables dado que son siete las especies que se encuentran presentes en estos climas mediterraneos, *M. incognita* es la más común y ampliamente distribuida sobre todo cuando la textura de los suelos de cultivo es arenosa. La mayoría de las hortalizas son las más susceptibles a estas especies, como el tomate que reporta pérdidas en el rendimiento de un 50% (Lamberti and Cirulli, 1970) y puede suprimir el rendimiento hasta un 85% (Barker et al, 1976) en tabaco se han tenido que liberar variedades resistentes por las grandes infestaciones que presenta; en remolacha azucarera, en suelos altamente infestados el rendimiento se reduce de 60% a 80% (Di Vito y Lamberti, 1977; Di Vito et al., 1977) otros cultivos en los que se ha observado son: papaya, soya, algodón, clavel, begonias,

almendra, vid, y algunos árboles forestales.

M. javanica, es la segunda especie más distribuida en el mundo está reportada en: Sudan, Cyprus, Egipto, Grecia, Italia, California, (Lamberti, 1970) y México (Gándara, 1906). Las plantas que más afecta son tomate, frijol, sandía, calabaza, berenjena, oca, zanahoria, apio, flame, papa, remolacha azucarera, tabaco; leguminosas forrajeras; ornamentales como nochebuena y clavel (Siddiqui et al., 1973); frutales como, papaya, pistache y olivo. (Citados por Lamberti, 1979)

M. arenaria es otra especie importante, parasita a tomate, chile, sandía, apio, betabel, zanahoria, cebolla; los más susceptibles a esta especie son cacahuete, tabaco, y remolacha azucarera.

M. hapla es considerada una especie de climas fríos, pero también es común en países subtropicales, parasita los cultivos en los meses de invierno, cuando las temperaturas son relativamente bajas, se han reportado pérdidas del 36% en el rendimiento de alfalfa, cacahuete 70%, zanahoria 50%, remolacha azucarera 20%, papa 46%, cebolla 64%, (Williams, 1974) citado por Lamberti. También se asocia a trebol y lechuga (Olthof y Potter, 1972) y frambuesa (Griffin et al 1968). Otras especies involucradas son *M. nasii*, *M. graminis* y *M. artiellia* las cuales son de menor importancia que las anteriores (Autores citados por Lamberti, 1979).

Se han realizado diversos trabajos en cuanto a pérdidas económicas causadas por este nematodo en la agricultura mundial; la mayoría de estos trabajos se han realizado en E.U. Como se mencionó anteriormente el tabaco es un cultivo altamente susceptible al ataque de *M. arenaria*; en 1984 se estimó que las pérdidas son del 5.4% en Alabama, 0.5% en Oklahoma, 1.0% en Kansas, 2.7% en Georgia, 3.0% en Texas, en relación a la producción de cada estado; en el mismo año se evaluaron pérdidas causadas por *M. hapla* en Georgia 0.3%, en Carolina del Norte 0.025%, en Oklahoma 2.5%, y en Virginia 2.5%, en la producción total de cada estado. Cabe mencionar que en Carolina del Norte se incrementó la pérdida de producción al 4.7% del total de la producción (Society of nematologist crop loss assesment committee, 1987).

En 1991 en Carolina del Norte se tuvieron pérdidas de 8.5% en rendimiento del cultivo de soya, que calculados a pérdidas económicas son aproximadamente \$ 19 millones de dólares (Davis et al., 1996). Por otra parte en Florida se evaluaron 40 variedades de soya en suelos infestados con *M. incognita* de las cuales 5 variedades no tuvieron pérdidas mayores al 0.5% de la producción evaluada en tres años (Kinloch et. al., 1987). En pepino *M. incognita*, *M. hapla*, *M. arenaria* y *M. javanica* causan el 12% de pérdidas en el estado de Carolina del Norte (Wehner et. al., 1991). *M. hapla* y *M. arenaria* disminuyen del 24% al 30% respectivamente el rendimiento de cacahuete en Texas (Nelson et al., 1989). En Carolina del Norte en el cultivo de sorgo *M. arenaria* causa pérdidas del 8% al 10% del rendimiento (Fortnum et al., 1988), en chile morrón, *M. incognita* disminuye el rendimiento un 12.2% (Di vito et al., 1992), en la República de Chile *M. hapla* disminuye del 28% al 33% del rendimiento en kiwi (Philippi y Budge, 1992) y *M. javanica* disminuye del 30% al 40% en el rendimiento de piña Hawaii (Sipes y Schmitt, 1994).

Un estudio en campos de algodón en el Este de Georgia en 1974, la Universidad del estado mostró que *Meloidogyne* spp. se encontraba en el 48% de los campos que se estudiaron. Un trabajo similar en el Sureste de dicho estado determinó que *Meloidogyne* spp. afectó el 12% de los campos estudiados, el objetivo de este proyecto fué examinar la frecuencia y distribución geográfica de nematodos parásitos de algodón en Georgia, basado en el estudio de un amplio número de muestreos y recientemente recopilados por la Universidad de Georgia (Baird et. al., 1996).

2.3.2. Importancia económica nacional del género *Meloidogyne* spp

En México se ha investigado poco a los nematodos parásitos de plantas, pero uno de los géneros en los que más se ha indagado es *Meloidogyne* spp. Sin embargo existen trabajos que son muy específicos, algunos de estos se mencionan en el libro Avances de nematología agrícola en México (Montes, 1988). Hasta 1995 no se habían hecho investigaciones nacionales en cuanto a la

distribución geográfica de cultivos asociados a dichas especies; por otra parte son escasos los trabajos que hablan de pérdidas económicas que se tienen a causa de este parásito, ya que los cultivos más susceptibles son hortalizas, que en su mayoría son de exportación como el tomate, berenjena y oca, en los que el grado de infestación es muy alto, incrementándose considerablemente los costos de producción por el control que requieren; un ejemplo de ello es la región de Iguala, Gro. siendo éste el único lugar en dónde se produce estropajo comercialmente, se ha visto que las aplicaciones de nematicidas incrementan los costos. La oca es otro producto de exportación que presenta la misma problemática; por otra parte se han reportado pérdidas directas que *M. chitwoodi* ocasiona daños en raíces y tubérculos de papa en infestaciones graves, afectan el rendimiento hasta un 68% (Pinkerton, 1986 citado por Guevara et al. 1989). Las pérdidas indirectas están determinadas por la reducción de la calidad de los tubérculos que presentan abultamientos (agallas) y manchas internas que obligan a rechazarlos para consumo directo y aún más para la industria (Griffin, 1985). En nuestro país la vid es un cultivo de suma importancia y se ha encontrado que sólo 24 larvas de *Meloidogyne* spp. por 100 cc de suelo pueden disminuir el rendimiento hasta de un 85% del cultivar Grenache (Ramírez et al., 1991). Este género ocupa el primer lugar en importancia económica para México por su amplia distribución y número de hospederos, ya que no sólo parasita hortalizas sino también a plantas ornamentales, frutales y gramíneas; desafortunadamente no se le ha dado la importancia que representa, dado que existe desconocimiento de los productores en cuanto a este tipo de enfermedades.

2.4. Ubicación taxonómica del género *Meloidogyne* (Cid del Prado, 1995)

Phylum: Nematoda

Clase: Secernentea

Subclase: Diplogasteria

Orden: Tylenchida

Suborden: Tylenchina

Superfamilia: Tylenchoidea

Familia: Heteroderidae

Subfamilia: Meloidogyninae

Género: *Meloidogyne*

2.5. Características morfológicas para la identificación de especies del género *Meloidogyne*

Este género tiene un marcado dimorfismo sexual; la hembra es globosa, en forma de pera, con cutícula delgada, sin cola, el ano y la vulva son terminales, es endoparásita sedentaria.

Las anulaciones corporales se marcan en todo el cuerpo haciéndose más evidentes en la parte posterior del cuerpo, estas anulaciones forman un patrón a manera de huella digital alrededor del ano y la vulva, conocido como patrón perineal, el cual es muy importante para la identificación de especies.

El macho es vermiforme y puede encontrarse en el suelo, no son infectivos, su morfología es la siguiente: la cola es corta, redondeada y sin bursa (Eisenback, 1983). La cola es una característica importante para diferenciar el género, esta posee un par de espículas esclerosadas, con un gubernáculo que sirve de guía durante la proyección y retracción de las espículas.

Las espículas se dividen en tres regiones: manubrio o cabeza, calamus y lámina, algunas veces en la parte ventral tienen una extensión membranosa llamada velum. Poseen un par de músculos: el retractor y el protractor, asociados con cada espícula. Los músculos retractores se extienden hacia adelante para aproximar la depresión en el manubrio a la pared del cuerpo. El origen del

músculo en la pared del cuerpo, varía de acuerdo a la especie y puede ser dorsolateral, ventrolateral o subdorsal. Los músculos protractores se extienden para la región dorsolateral del manubrio y están insertados postanalmente en la pared del cuerpo (Maggenti, A. 1981).

En un estudio de espículas en el microscópio electrónico de rastreo (MER) realizado por Jepson (1987), encontró diferencias morfológicas entre especies en el tamaño de las espículas; menciona que deben tomarse dos tipos de medidas: el largo de la lámina en la parte cóncava y en la parte dorsal de la misma, sin embargo en algunos casos no se observa claramente la posición adecuada para medirlas (Jepson, 1987).

La morfología básica de las especies de *Meloidogyne* es muy similar; sin embargo, existen caracteres distintivos como: la morfología del patrón perineal de las hembras y la forma de la cabeza de machos, hembras (Fig. 2.1) y juveniles. La morfología del estilete de hembras y machos, así como la forma de la cola de los juveniles J2.

La morfología general de un corte perineal se divide en dos partes la dorsal y el área ventral; en la parte dorsal encontramos, el arco dorsal, campos laterales, el termino de la cola, las fasmidias y puntuaciones en el caso de *M. hapla*. En la parte ventral se localiza: el ano, la vulva, estrías que abarcan las dos partes y en algunas especies se presenta una ala (Fig. 2.2).

La morfología básica del estilete consiste en: un cono con abertura que continúa con la columna que puede ser recta o curvada el ancho es variable según la especie y los nódulos basales; en la parte posterior de los nódulos esta la desembocadura de la glándula esofágica dorsal la cual puede estar cerca o alejada de los nódulos basales (Fig. 2.3 y 2.4)

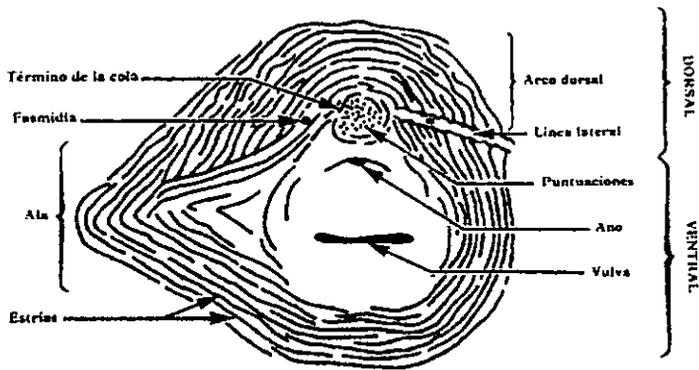


Fig. 2. 1. Morfología general de un modelo perineal. (Eisenback et al 1981)

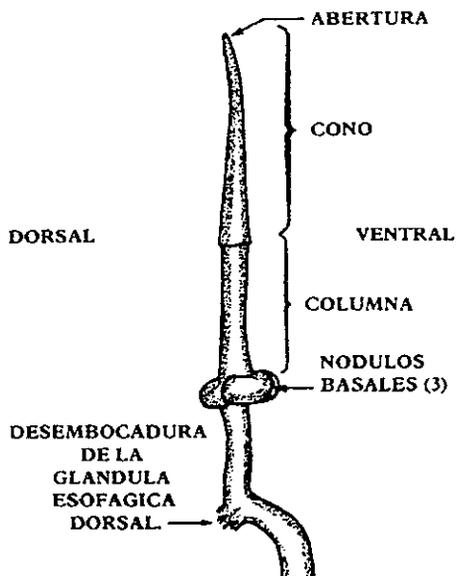


Fig. 2.2. Morfología básica del estilete de un nematodo agallador. (Eisenback et al 1981)

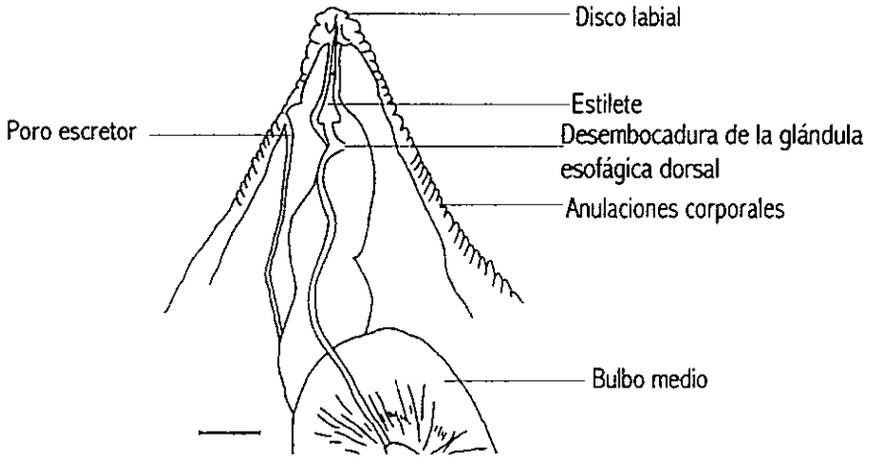


Fig. 2.3. Morfología de la parte anterior de una hembra

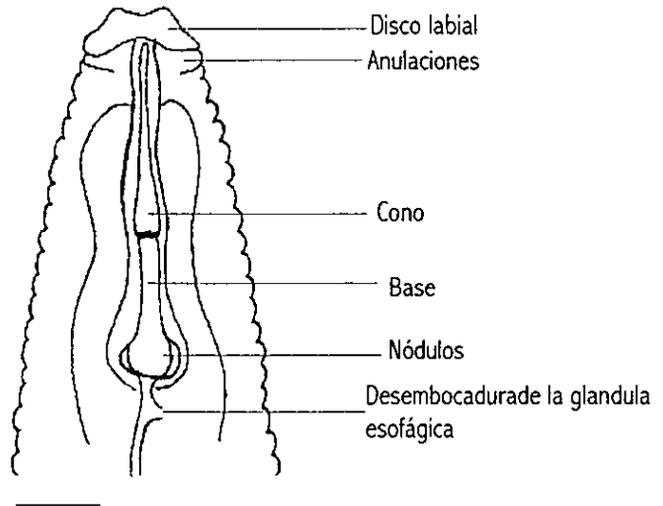


Fig. 2.4. Morfología de la parte anterior de un macho y partes que componen al estilete

2.5.1. Descripción de las cuatro especies más comunes del género *Meloidogyne* según Eisenback, et al, traducida por Sosa Moss, 1983 y Jepson, 1987.

Meloidogyne incognita

1. Hembra

a) Modelo perineal. Tienen un arco dorsal alto comunmente cuadrado formado por estrías que van de lisas a onduladas, algunas estrías son gruesas otras se bifurcan cerca de las líneas laterales y frecuentemente las estrías se dirigen hacia la vulva, los campos laterales son ausentes.

b) Estilete. El cono del estilete es claramente curvado dorsalmente, la porción anterior es cónica y la mitad posterior cilíndrica. La columna es ligeramente más ancha en la base. Los nódulos son anchos, planos y separados con proyecciones hacia la parte anterior.

c) Cabeza. El disco labial tiene forma de "mancuerna". Los labios laterales son grandes y están separados de los labios medios, generalmente se fusionan con la región cefálica en un tramo lateral corto. La región cefálica está frecuentemente surcada por un anillo discontinuo.

2. Macho

a) Cabeza. El disco labial es grande y redondeado, cóncavo centralmente; generalmente presenta 3 anillos completos.

b) Estilete. La punta del estilete de los machos es roma y más ancha que la porción media del cono. Una proyección en el lado ventral del cono marca la abertura del lumen del estilete, la cual queda localizada a una distancia equivalente a un cuarto de la longitud del cono, a partir de la punta del estilete. La columna es generalmente cilíndrica y con frecuencia es más angosta cerca de los nódulos basales; éstos están separados de la columna, con proyecciones hacia la parte anterior, son anchos y redondeados.

3. Segundo estadio juvenil

a) Cabeza. El disco labial presenta forma de "mancuerna" en vista frontal, ligeramente más elevado que los labios medios, usualmente presenta 4 anillos

completos.

b) Cola. Es polimórfica de 48.7 μm de largo, con la terminación hialina ancha redondeada, midiendo 8.9 μm de largo.

Meloidogyne javanica

1. Hembra

a) Modelo perineal. Tienen un arco dorsal redondo aplanado. Las características más evidentes son las incisuras del campo lateral, están bien definidas y dividen en dos regiones el patrón dorsal y ventral, ninguna estría cruza las incisuras laterales y algunas se dirigen hacia la vulva.

b) Estilete. El cono está ligeramente curvado en su posición dorsal y se incrementa gradualmente el ancho en la parte posterior. La columna se ensancha ligeramente en la parte posterior, los nódulos basales son cortos y anchos proyectados frecuentemente hacia la parte anterior.

c) Cabeza. El disco labial tiene forma de "mancuerna", con dos protuberancias prominentes, en el lado ventral. Usualmente los labios medios presentan una incisura lo que sugiere una división de los mismos en pares de labios medios. Los labios laterales son grandes elongados, separados de los labios medios y de la región cefálica. Esta presenta con frecuencia un anillo completo.

2. Macho

a) Cabeza. El disco labial es grande y plano, los labios medios están fusionados y la región cefálica es alta. En algunas poblaciones de *Meloidogyne javanica* se observan 3 anillos.

b) Estilete. El cono del estilete es angosto en la punta y muy ancho en la parte posterior. La columna es cilíndrica y se estrecha frecuentemente cerca de la unión con los nódulos basales, éstos son aplanados, anchos y separados de la columna.

3. Segundo estadio juvenil

a) Cabeza. Los labios medios tienen forma de "corbata de moño". Los labios laterales son triangulares y están abajo del nivel del disco labial y los labios medios ocasionalmente, pueden tener un anillo corto.

b) Cola. Presenta una cola de 49 μm de largo, es delgada, la terminación es finamente redondeada. En ocasiones presenta constricciones a la mitad de la porción hialina, la cual tiene 13.7 μm de largo.

Meloidogyne arenaria

1. Hembra

a) Modelo perineal. El arco dorsal es aplanado, redondeado, las estrías en el arco se curvan ligeramente hacia las líneas laterales y forman generalmente una ondulación pronunciada, llamada "hombreira". Las estrías son lisas a onduladas y se dirigen hacia la vulva. Los modelos perineales pueden también presentar estrías que se prolongan lateralmente para formar una o dos alas.

b) Estiletos. El estilete es muy robusto, el cono y la columna son gruesos, esta última incrementa su anchura hacia la base y emerge gradualmente de los nódulos basales, éstos son anchos y redondos en su parte posterior.

c) Cabeza. El disco labial tiene forma de "mancuerna", generalmente presenta un anillo incompleto.

2. Macho

a) Cabeza. La región cefálica es baja, con declive hacia la parte posterior. Forma una estructura lisa y continua presenta tres anillos incompletos.

b) Estilete. El cono es puntiagudo, la abertura del lumén está señalada en el lado ventral, por una pequeña protuberancia. La porción posterior del cono es mucho más ancha que la parte anterior de la columna, ésta generalmente es cilíndrica, aunque su diámetro puede incrementarse ligeramente en la parte media. Los nódulos basales están proyectados hacia la parte anterior, son muy grandes y emergen gradualmente de la columna.

3. Segundo estadio juvenil

a) Cabeza. El disco labial tiene forma de "mancuerna", en la mayoría de los especímenes la región cefálica no está anillada.

b) Cola. Presentan una cola angosta, su término es redondeado mide 55.8 μm de largo, la parte hialina presenta una constricción, esta mide 14.8 μm de largo.

Meloidogyne hapla

1. Hembra

a) Modelo perineal. Es hexagonal, redondeado u ovalado ligeramente aplanado. El arco dorsal es generalmente aplanado; las líneas laterales no son visibles, aunque pueden estar indicadas por ligeras irregularidades en las estrías o porque las estrías dorsales y ventrales se unen formando un ángulo. Algunas estrías pueden prolongarse lateralmente y formar una o dos alas. Las estrías son lisas u onduladas. El área terminal de la cola presenta generalmente puntuaciones que son una buena característica para identificar a esta especie; estas puntuaciones pueden estar ausentes en algunos especímenes, debido al proceso de fijación.

b) Estilete. Es pequeño, el cono está curvado sólo ligeramente hacia la parte dorsal y la columna es más ancha en la base. Los nódulos basales son redondos y claramente separados de la columna.

c) Cabeza. El disco labial es asimétrico, los labios laterales son pequeños y triangulares, se fusionan con el labio ventral, pero están separados del labio dorsal. La región cefálica es grande y no presenta anillos.

2. Macho

a) Cabeza. La región cefálica no es anillada, porque su diámetro es mayor que el del primer anillo corporal, la anchura y grosor de los anillos del cuerpo decrecen a medida que están más cerca del anillo basal.

b) Estilete. Es delgado, el cono incrementa gradualmente su anchura hacia la parte posterior, y en su base no es más ancho que la parte anterior de la columna, los nódulos basales son redondos y separados de la columna.

3. Segundo estadio juvenil

a) Cabeza. La región cefálica es lisa.

b) Cola. El término de la cola es largo y delgado con el extremo ancho y redondeado, mide 51.5 μm de largo; el término de la parte hialina presenta los costados más o menos paralelos, mide 15.7 μm

2.6. Area de estudio

Las áreas que se contemplaron para los muestreos se seleccionaron con base en los antecedentes fitopatológicos que se tienen en relación a la importancia económica y la representatividad de los cultivos en estas zonas; se consideraron varios cultivos, con la finalidad de señalar que es un parásito polífago que causa grandes pérdidas a los productores mexicanos. Tal es el caso de los agricultores de Chiapas que cultivan plátano macho en tierras de temporal, con una superficie actual de 23, 041 ha, esta entidad es el primer Estado productor de plátano, en el país aportando más del 35% de la producción nacional, *Meloidogyne* spp, causa el debilitamiento de las plantas.

Por otra parte en la región de Villa Guerrero, Estado de Mex., es sumamente importante en cuanto a floricultura se refiere, sus condiciones ambientales son adecuadas para la producción de ornamentales, principalmente para flor de corte, de las cuales el margaritón es una de las especies importantes dado que actualmente se siembran más de 100 ha y se producen 750,500 ton anuales, cabe señalar que esta región es la principal productora de margaritón en el país, este parásito causa pérdidas considerables en el rendimiento y calidad de este producto.

La oca o angú es un producto netamente de exportación, en México sólo cinco entidades lo producen, la segunda región productora más importante es el Valle de Iguala, Gro., el cual tiene una superficie sembrada de 414 ha, de las cuales se obtiene un rendimiento anual de 17, 560 ton, de las cuales el 100% de la producción se exporta a E. U. Este cultivo es altamente susceptible al ataque de este nematodo, el cual disminuye el rendimiento y calidad del producto, además de que incrementa los costos, por el uso excesivo de nematicidas.

Sin embargo no es la única hortaliza que se ve afectada por este nematodo en nuestro país, la sandía es el cultivo más representativo y redituable de la región de Putla, Oax., ya que se siembran 3,700 ha, de las cuales 3,500 ha., se cultivan en tierras de temporal, ocupando el segundo lugar de los estados productores en el país, pero se tienen mermas en el rendimiento a causa de este parásito. Otra

región importante de dicho estado es Loma Bonita, Oax., siendo la principal zona productora de piña en nuestro país, la superficie cultivada es de aproximadamente 3, 000 ha; es un producto de temporal que al igual que los cultivos antes mencionados tiene pérdidas por el daño que ocasiona *Meloidogyne* spp. La vid es el frutal de mayor importancia en la Costa de Hermosillo, Son., en la actualidad de las 28, 800 ha que se siembran en todo el país; 10, 500 ha, se cultivan en dicha región y también se ven afectadas por este nematodo, causando la declinación lenta del viñedo, acortando la longevidad del cultivo, con la consecuente reducción del rendimiento y calidad del producto; el control en viñedos resulta difícil, debido a que el parásito puede encontrarse a profundidades de 5.18 m., lo cual no permite un control químico satisfactorio y se crea la necesidad de generar variedades resistentes a esta enfermedad. (S.A.G.A.R.1995).

Al igual que la vid, el café es importante para la economía de nuestro país; la superficie que ocupa este cultivo es de 152,000 ha, de las cuales 50,000 ha se ven afectadas por la "corchosis" de la raíz del cafeto, esta es la enfermedad más importante de los últimos años (García y colaboradores, 1996), ya que parasita a la planta desde la fase de plántula hasta plantas adultas, esta enfermedad es causada por la asociación de *Meloidogyne* spp. y el hongo *Fusarium oxisporum*, los cuales provocan la suberización de los tejidos de la raíz provocando la muerte de la planta. Al igual que en el caso de la vid es necesario crear materiales resistentes, dado que el control químico es muy costoso y complicado. En el estado de Veracruz se ven afectados 11 municipios productores de café entre los cuales se encuentra el municipio de Córdoba, siendo una región productora importante por tradición. (S.A.G.A.R. 1990; 1995)

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Etapa de campo

Se consideraron los Estados de Sonora, Oaxaca, Chiapas, Estado de México, Guerrero y Veracruz. Se seleccionaron algunos de los cultivos representativos y de mayor importancia agrícola, que según la literatura son severamente afectados por especies de este nematodo.

Los muestreos se realizaron con fines exploratorios dado que se desconocían las especies presentes en estos cultivos, las cuales fueron identificadas posteriormente.

3.1.1. Localización geográfica de los sitios de muestreo

Como se menciona en el apartado 2.6, los sitios de muestreo se seleccionaron por antecedentes de la presencia del nematodo, asimismo se consideraron estados que producen cultivos importantes para el país y de los cuales no hay mucha información, en otros casos, ya se conocía esta asociación pero no se habían precisado las especies y los sitios geográficos exactos de muestreo.

En la Costa de Hermosillo, Son. se colectaron muestras de vid; en la región del Istmo-Costa de Chiapas se tomaron muestras de plátano; las colectas de café se realizaron en Córdoba, Ver. En Oaxaca, se colectaron muestras de piña y sandía, éste último hospedante se colectó en la región de la Mixteca Baja. En el Valle de Iguala, se tomaron muestras de oca y el margaritón se colectó en Villa Guerrero, Edo. Mex, puesto que es la principal zona productora de flor de corte.

CUADRO 3.1 Localización geográfica y clima de los sitios de muestreo

LOCALIDAD	LOCALIZACION	PP. ANUAL (mm)	TEMP. MEDIA ANUAL °C	CLIMA
Campo Experimental CIANO, Son.	Lat. 29°5' Long. 110°57' 237 msnm.	244.9	25.2	Seco Cálido, muy extremoso BW(h)hw(e')
Finca San Antonio, Ver.	Lat. 18°54' Long. 96°36' 927 msnm.	2199.1	20.4	Templado Húmedo (A) C(m)a (i')g
Mesones Hidalgo, Oax.	Lat. 17°48' Long. 97°47' 572 msnm.	720.5	20.6	Templado Húmedo, Semicalido (A)C(w'')(w)a (i')g
Ejido Tierra Alta, Oax.	Lat. 18°6' Long. 98°7' 90 msnm.	2451.8	25.8	Tropical Lluvioso, Cálido Am(w'')(i')g
Ejido Villa Comaltitlan, Chis.	Lat. 14°55' Long. 92°15' 137 msnm.	2488.0	26.0	Tropical Lluvioso, Cálido Am(w'')ig
San Jose de Los Ranchos, Edo. Méx.	Lat. 19°3' Long. 99°28' 1800 msnm	1261.2	14.0	Templado Húmedo C(w'')bi
Valle de Iguala, Gro.	Lat. 18°22' Long. 99°33' 635 msnm.	1086.3	26.7	Subtropical Subhumedo Aw(w)(i')g

(García, 1973)

3.1.2. Tipo de muestreo para nematodos

Los tipos de muestreo que se emplearon en este trabajo son de diagnóstico, dado que se identificaron las especies del género *Meloidogyne*. Así mismo se realizó un muestreo prospectivo para conocer la distribución en áreas infestadas de acuerdo a los cultivos que se mencionaron. Los procedimientos de muestreo se determinaron en base a los patrones de distribución de nematodos, los más comunmente usados son: simple estratificado, estratificado aleatorio, sistemático, al azar, en conglomerados y el muestreo en dos etapas (Barker, 1978). Los patrones que se emplearon fueron al azar y sistemático, los cuales se seleccionaron en un recorrido previo por la parcela, para elegir el área donde los síntomas aéreos fueran más evidentes, tales como enanismo, clorosis, frutos pequeños, entre otros, además de las condiciones del terreno y cultivo que permitiesen tomar las muestras correctamente (apéndice 1). Cuando se terminó de coleccionar se tomaron los datos de longitud, latitud y altitud con un Geoposicionador (GPS), con el fin de ubicar cartográficamente estos sitios de muestreo.

3.1.3. Procedimiento de muestreo

En aquellos cultivos anuales establecidos en surcos, el muestro se hizo en la zona de la raíz de 5 a 12 cm de profundidad; para los frutales las muestras se tomaron en la zona de goteo. En cultivos perennes de raíces profundas como la vid, las muestras se coleccionaron a tres profundidades 30, 60 y 90 cm (Barker, 1978). Cuando el área de muestreo es grande (más de 3 ha) se sigue un patrón en zig-zag que cubra todo el campo (Barker y Cambell, 1981). Estas áreas pueden subdividirse de tal forma que toda la zona quede cubierta.

3.1.4. Número de muestras

El número de muestras se determino según el área de la parcela se tomaron 20 muestras por ha para áreas chicas (menos de 3 ha) y para áreas

grandes 30 muestras por ha (más de 3 ha). El área se dividió en subáreas y en cada punto de muestreo se tomó de 100 a 150 g de suelo y 50 g de raíces, lo cuál nos dio una muestra de 2 a 3 kg.

3.1.5. Toma de muestras

En la toma de muestras se consideraron principalmente la humedad del suelo y si había cultivo en pie, dado que de estos factores depende la obtención de muestras que contengan todos los estadios posibles del nematodo; como lineamientos generales:

1. Al tomar las muestras el suelo debe estar húmedo (por debajo de la capacidad de campo)
2. El suelo y raíces superficiales no se consideran como parte de la muestra.
3. Cerciorarse que las plantas presenten el síntoma característico (agallas), se separan y se envuelven en papel húmedo.
4. Se realiza un muestreo de plantas sanas que se encuentren en la periferia de las enfermas con el fin de localizar mayores poblaciones de nematodos en diferentes estadios, se reporta que cuando las plantas mueren los nematodos emigran a otros hospederos.
5. En zonas con climas cálidos y secos las muestras se colectan de 30 a 40 cm de profundidad.
6. Se toman notas de campo (antecedentes agrícolas, manejo del cultivo, observaciones del productor y observaciones personales) (apéndice 2)

3.1.6. Obtención de las muestras

En los puntos de muestreo se eliminaron los 5 cm de la superficie del suelo y se tomaron 100 g de suelo y 50 g de raíz, dependiendo del cultivo, ya que generalmente son de 15 a 40 cm en la periferia de las raíces; las muestras se depositaron en bolsas de polietileno y se etiquetaron con los siguientes datos: nombre y dirección del productor, localización, de la parcela, localidad del sitio de muestreo, fecha de muestreo y nombre del colector.

3.1.7. Cuidado y manejo de las muestras de suelo y raíz

Las muestras de suelo se protegieron del sol colocandolas en una hielera o en una caja de cartón, las raíces se envolvieron con papel húmedo y se conservaron en refrigeración a temperaturas de 10° a 15°C. El envío de las muestras al laboratorio fué lo más rápido posible, porque las temperaturas altas y la escasa humedad provocan la deshidratación y muerte de los especímenes, e impiden la identificación y cuantificación de ellos.

3.1.8. Localización geografica de los sitios de muestreo

Los datos que se tomaron para ubicar geográficamente los sitios de muestreo son: longitud, latitud y altura sobre nivel del mar para cada muestra que se colecto, con el apoyo de un geoposicionador, que trabaja con señales que recibe de 24 satélites, el cual permitió obtener mayor confiabilidad en los datos de los sitios de muestreo y si en un momento dado se requiriera regresar a tomar muestras, el aparato nos señalará el sitio en donde se tomó la muestra.

3.2. Trabajo de laboratorio

3.2.1. Técnica de extracción tamizado-centrifugado

Se considera, que las técnicas de extracción de nematodos en una muestra de suelo o de partes aéreas de plantas, puede ser activa cuando los nematodos se mueven a través del agua en una interfase suelo-agua; inducida cuando son separados del suelo y transferidos al medio acuoso por un medio físico tal como es el tamizado.

Existen varios métodos de extracción de nematodos del suelo, para elegir la técnica de extracción adecuada se consideró el hábito parasítico del nematodo, en este caso se trata de un endoparásito sésil sedentario; por lo que se procesó el suelo con el método tamizado-centrifugado (Ayoub, 1980) para la obtención del ssegundo estado juvenil (J2) y machos, esto permitió obtener el material vivo y procesar varias muestras en poco tiempo (apéndice 3).

3.2.2. Técnica de tinción de raíces

Las raíces fueron procesados con una técnica de tinción, que se basa en el uso de Fucsina - Ácida (3.5 g de fuccina ácida, 250 ml de ácido acético y 750 ml de agua destilada) (Byrd et al, 1983. Citado por Barker et al, 1985), esta técnica consiste en la tinción de raíces con color rojo que facilita la disección y observación de las hembras adultas que se encuentran en el cilindro vascular de dicho órgano (apéndice 4).

3.2.3. Técnicas de muerte, fijación y deshidratación

Cabe señalar que estas son las técnicas en las que se debe extremar los cuidados en su proceso, si no se realizan a temperaturas y tiempos adecuados, se pueden precipitar las proteínas de los tejidos y perder las características que son de interés para identificar los especímenes.

La muerte de nematodos con fines de montaje se puede llevar a cabo por varios métodos, utilizando calor, fijadores diluidos o por asfixia; se obtienen mejores resultados si se matan por calor suave (55° a 60°C), con ello se evita la precipitación de las proteínas, además de que sus órganos internos no sufren cambios y los organismos presentan una forma relajada que permite su identificación. Matar los nematodos en la suspensión obtenida de la extracción, es lo más recomendable. Estos deben ser concentrados en el menor volumen de agua posible (menos de 20 ml.), ya sea decantando o centrifugando. En éste volumen de agua, se pueden calentar directamente a la flama del mechero, en plancha caliente, horno o sumergiendo parcialmente el recipiente en baño maría a 60°C. El agua con los nematodos no debe hervir.

Posteriormente se procede a la fijación (apéndice 5), ocupando como fijador Formol al 8% (comunicación personal Cid del Prado, 1997) el cual se agrega proporcionalmente al volumen de agua que se tiene con la fijación se conservan las estructuras en un estado lo más aproximado al estado vivo, no disuelve los componentes intracelulares; pero provoca un incremento en los índices de refracción debido a la coagulación de proteínas, por ello es

necesario eliminar el agua de las células y tejidos, para evitar refringencia al observar los ejemplares al microscópio. Para ello se sustituirá en los especímenes el fijador por el etanol al 96%, a continuación se pasan los especímenes a través de soluciones que contienen etanol y glicerina, en diferentes proporciones, logrando una deshidratación gradual y la transparencia de la cutícula, para una mayor nitidez (apéndice 5).

3.2.4. Método para realizar córtes perineales

Las raíces previamente teñidas se disectan y se extraen las hembras, las cuales se cortan en dos partes, en una se obtiene el cuello y en la otra se localiza el modelo perineal, en éste último se eliminan los restos de tejido con una gota de ácido láctico y posteriormente se hacen cortes de ajuste a manera que se obtenga un cuadrado donde se observe la vulva, el ano, las fasmidias y las incisuras del campo lateral (Taylor and Netscher, 1974). Estos caracteres son útiles para la identificación de especies (apéndice 6).

3.2.5. Técnica de montaje en anillo de cera

En un porta objetos limpio, se coloca en el centro una pequeña gota de glicerina deshidratada colocando los nematodos deshidratados dentro de la gota, se adicionan fibras de vidrio del mismo diámetro del nematodo, los cuales se colocan alrededor del espécimen dentro de la gota. Se forma un círculo de cera, alrededor de la gota, con la ayuda de un tubo de cobre de 1/2" para formar una circunferencia de 1.5 cm de diámetro, se coloca un cubre objetos redondo en la parte superior del círculo de cera y se trasladan a una plancha con una temperatura de 60°C durante 1 min, se retira de la plancha (Cid del Prado, 1995) (apéndice 7).

3.2.6. Técnica de extracción de espículas

El método desarrollado por Eisenback (1982) para extracción de estiletes (Citado por Jepson, 1987), fué modificado por Cid del Prado y Rowe, 1996; para extracción de espículas. Esto consiste en separar las espículas del cuerpo del nematodo, para poder observar la morfología de estas estructuras por medio del microscópio electrónico de rastreo (MER), que permite observar las diferencias de las espículas entre especies (apéndice 8).

3.2.7. Iluminación Köhler

La iluminación del microscópio es indispensable, ya que es la principal herramienta que se tiene para obtener una mejor resolución del microscopio para observar así a los nematodos adecuadamente; con una iluminación y nitidez apropiada se puede dar un diagnóstico correcto. Existen una serie de pasos ya establecidos para obtener una iluminación apropiada, este método fue establecido por KÖHLER (apéndice 9).

3.2.8. Calibración del microscópio y cámara clara

Para realizar una buena identificación se requiere de medidas de las estructuras morfológicas. La obtención de dichas medidas están determinadas por el coeficiente micrométrico, el cual se obtiene con la ayuda del ocular micrométrico y la reglilla micrométrica u objetivo micrométrico. La unidad de estas mediciones será el micrón, que tiene un valor de 0.001mm.

Un complemento de la morfología son los dibujos realizados con la cámara lúcida; al igual que el microscópio es importante su calibración, determinando las magnificaciones que permite conocer la escala y las mediciones de los especímenes, las cuales se determinan por la combinación de los objetivos, resolución ocular y la colocación del espejo (apéndice 10).

3.2.9. Identificación de las especies

La identificación de las especies fué basada en la morfología de los modelos perineales, la forma de la cabeza y estilete de hembras, forma de colas en estadíos juveniles J2 y morfología de las espículas región labial y estilete de los machos observadas a través del Microscópio Electrónico de rastreo (MER).

IV. RESULTADOS

4.1. Identificación de especies

Se seleccionaron siete localidades, en las cuales se identificaron cuatro especies, la de mayor incidencia fué *Meloidogyne incognita*, la cual se encontró parasitando oca, café y plátano en diferentes Estados de la República. Según las claves de Eisenback, 1983; la población Iguala, Gro., presentó un patrón perineal típico, observándose un arco dorsal alto, cuadrado con estrías bien definidas (Fig. 4.1 C y Fig. 4.5 A); sin embargo, en la población de Villa Comaltitlán, Chis., el patrón perineal muestra un arco dorsal alto, las estrías son finamente marcadas, mostrando una forma ligeramente redonda, que no permite una clara apreciación de las características típicas de los patrones de esta especie (Fig. 4.1 B). En el caso de la población de Córdoba, Ver., se observó un arco dorsal alto con una elongación hacia el lado izquierdo (Fig. 4.1 A). El macho, en las tres poblaciones, presenta un disco labial grande, redondo, cóncavo en el centro, alto de los labios centrales y presenta tres anillos (Fig. 4.8 C). Del cuello de la hembra sólo se tomó en cuenta el estilete, que se observó claramente curvado hacia la parte dorsal, los nódulos son anchos, separados de la columna, orientados hacia la parte anterior; la columna es más ancha que la base (Fig. 4.8 A). Las características que se mencionan se observaron en todas las poblaciones de *M. incognita* (Fig. 4.1)

Meloidogyne arenaria, se ubica en segundo lugar de incidencia en relación a la especie anterior, dado que se encontró parasitando sandía y piña. El patrón perineal presenta pliegues en los lados laterales en forma de hombreras, no presenta ala (Fig. 4.2 A y B; Fig. 4.6 B). La cabeza de los machos es baja, forma una estructura lisa y continúa. El estilete de la hembra presenta la columna y el cono engrosado, los nódulos son anchos y redondeados en su parte posterior (Fig. 4.2 C y Fig. 4.8 D).

Meloidogyne javanica se encontró asociada a vid, en esta especie el patrón perineal muestra los campos laterales muy marcados, separando la

región dorsal de la región ventral, siendo éste el caracter más importante para diferenciar dicha especie (Fig. 4.3 A y B; Fig. 4.7 A). Los machos de esta población presentan el disco labial grande, plano, los labios medios están fusionados y no presenta anillos (Fig. 4.3 C). El estilete de la hembra tiene la columna ancha en la parte posterior, los nódulos basales son cortos y anchos, proyectados hacia la parte anterior.

Meloidogyne hapla, se asocia a margaritón en la región de Villa Guerrero. El patrón perineal es de forma hexagonal, con puntuaciones en la parte superior del ano, así como un ala lateral que es típica de dicha especie (Fig. 4.4 A y Fig. 4.7 B). El macho presenta la región cefálica reducida, no presenta anillos y está separada del cuerpo (Fig. 4.4 C). El estilete de la hembra es pequeño, con el cono curvado hacia la parte dorsal; la columna es más ancha en la base, los nódulos son redondos y separados de la columna.

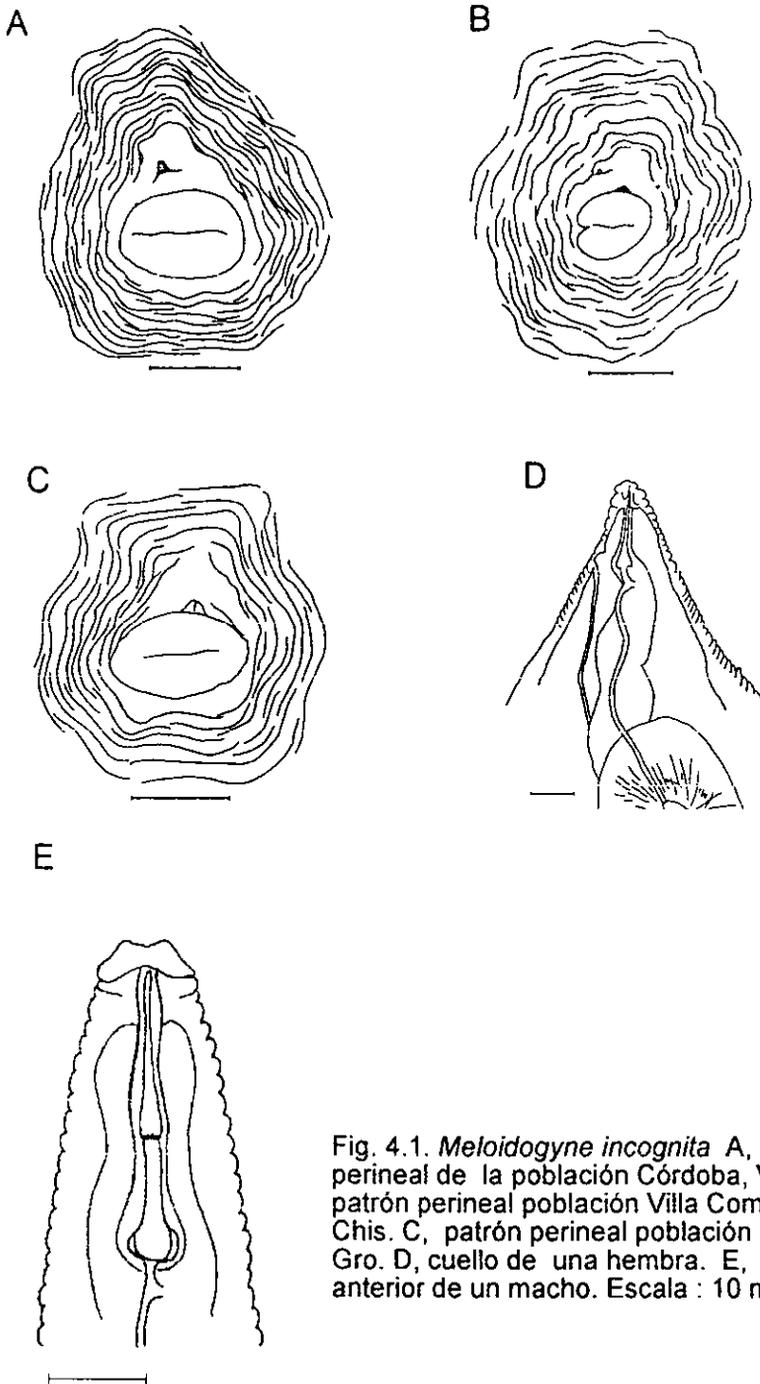
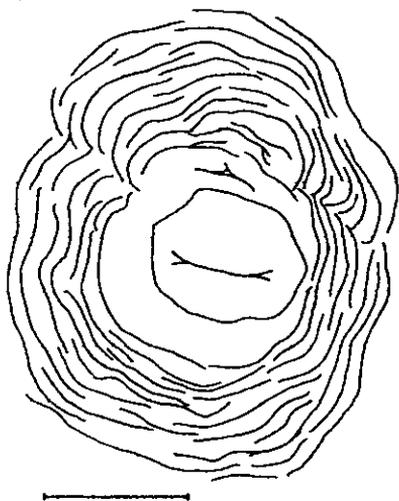
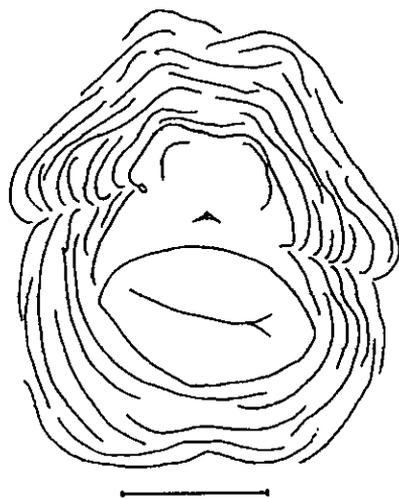


Fig. 4.1. *Meloidogyne incognita* A, patrón perineal de la población Córdoba, Ver. B, patrón perineal población Villa Comaltitlán, Chis. C, patrón perineal población Iguala, Gro. D, cuello de una hembra. E, región anterior de un macho. Escala : 10 micras.

A



B



C

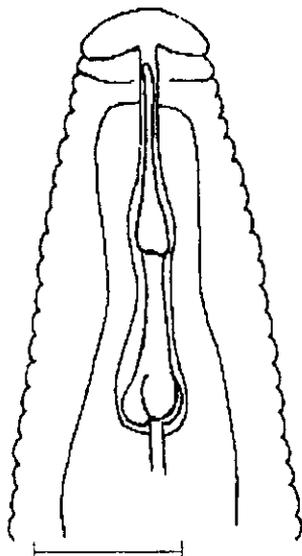
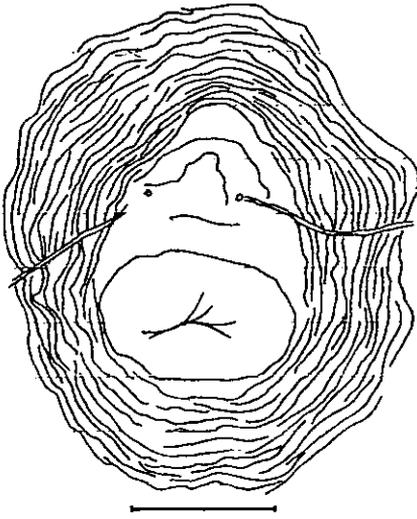
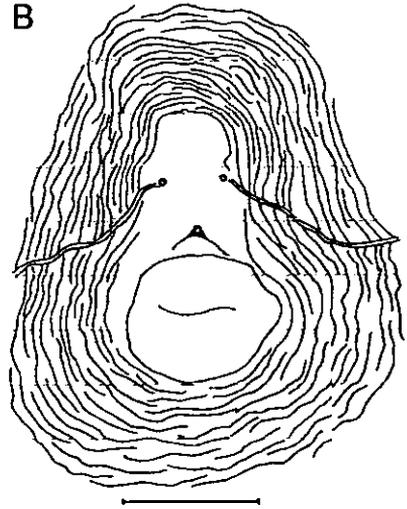


Fig. 4.2. *Meolidogyne arenaria* A, patrón perineal de la población Loma Bonita, Oax. B, patrón perineal de la población Putla, Oax.; C, región anterior de un macho.
Escala : 10 micras

A



B



C

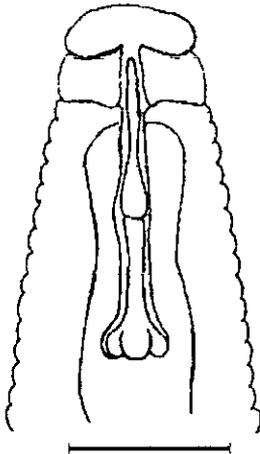
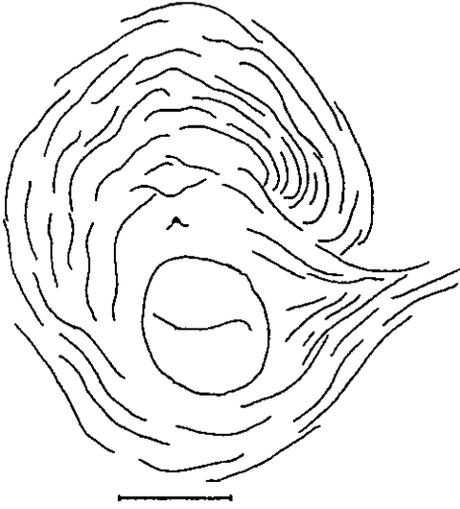
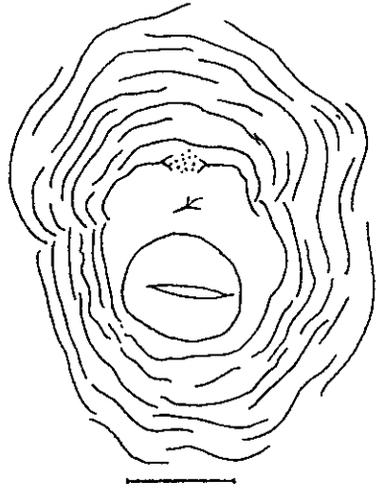


Fig. 4. 3. *Meloidogyne javanica*. A y B, patrones perineales de la población Hermosillo, Son. C, región anterior de un macho : 10 micras.

A



B



C

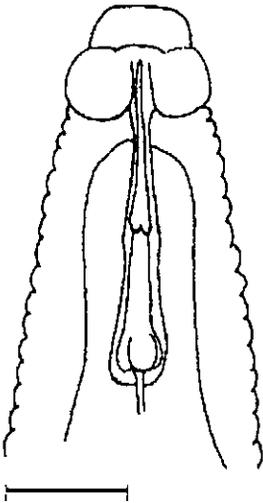


Fig. 4.4. *Meloidogyne hapla*. A y B; patrones perineales de la población Villa Gro., Edo. Mex. C, región anterior de un macho. Escala : 10 micras.

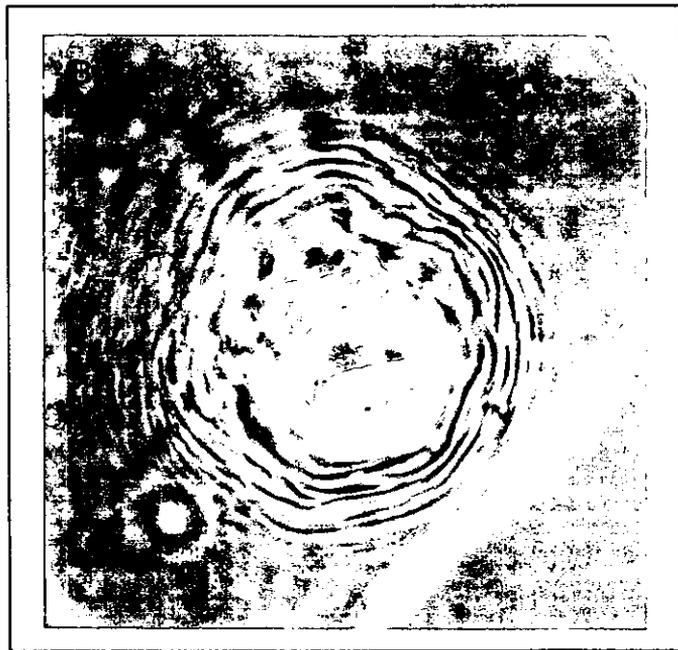
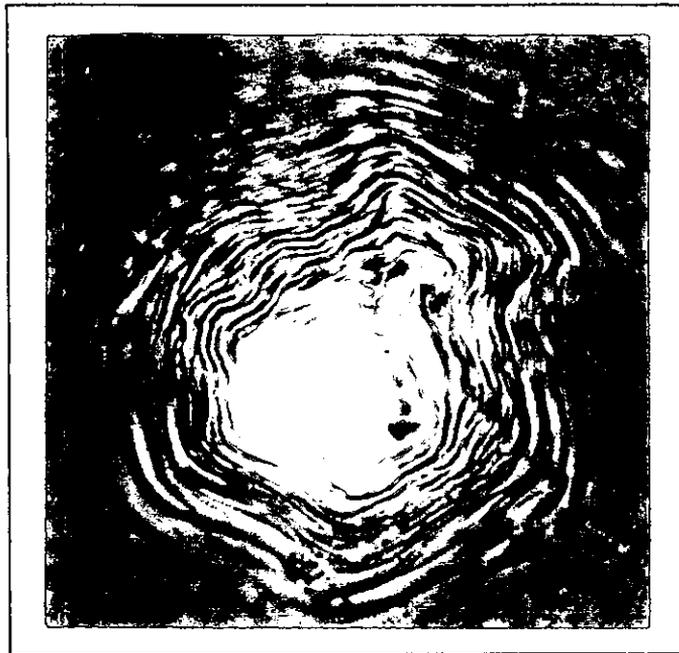


Fig 4.5. Patrones perineales de *M. incognita* de las poblaciones:
A, Iguala, Gro., B Villa Comaltitlan, Chis. Contraste de fases 40x

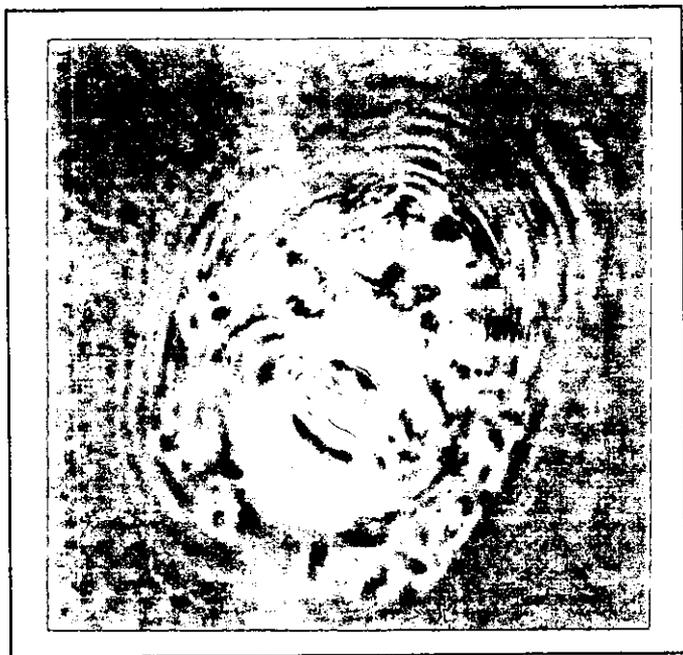


Fig 4.6. Patrones perineales: A, *M. incognita* población Córdoba, Ver., B, *M. arenaria*, población Putla, Oax. Contraste de fases 40x



Fig 4.7. Patrones perineales de: A, *M. javanica*, población Hermosillo, Son., B, *M. hapla*, población Villa Guerrero, Edo. De México. Contraste de fases 40x.

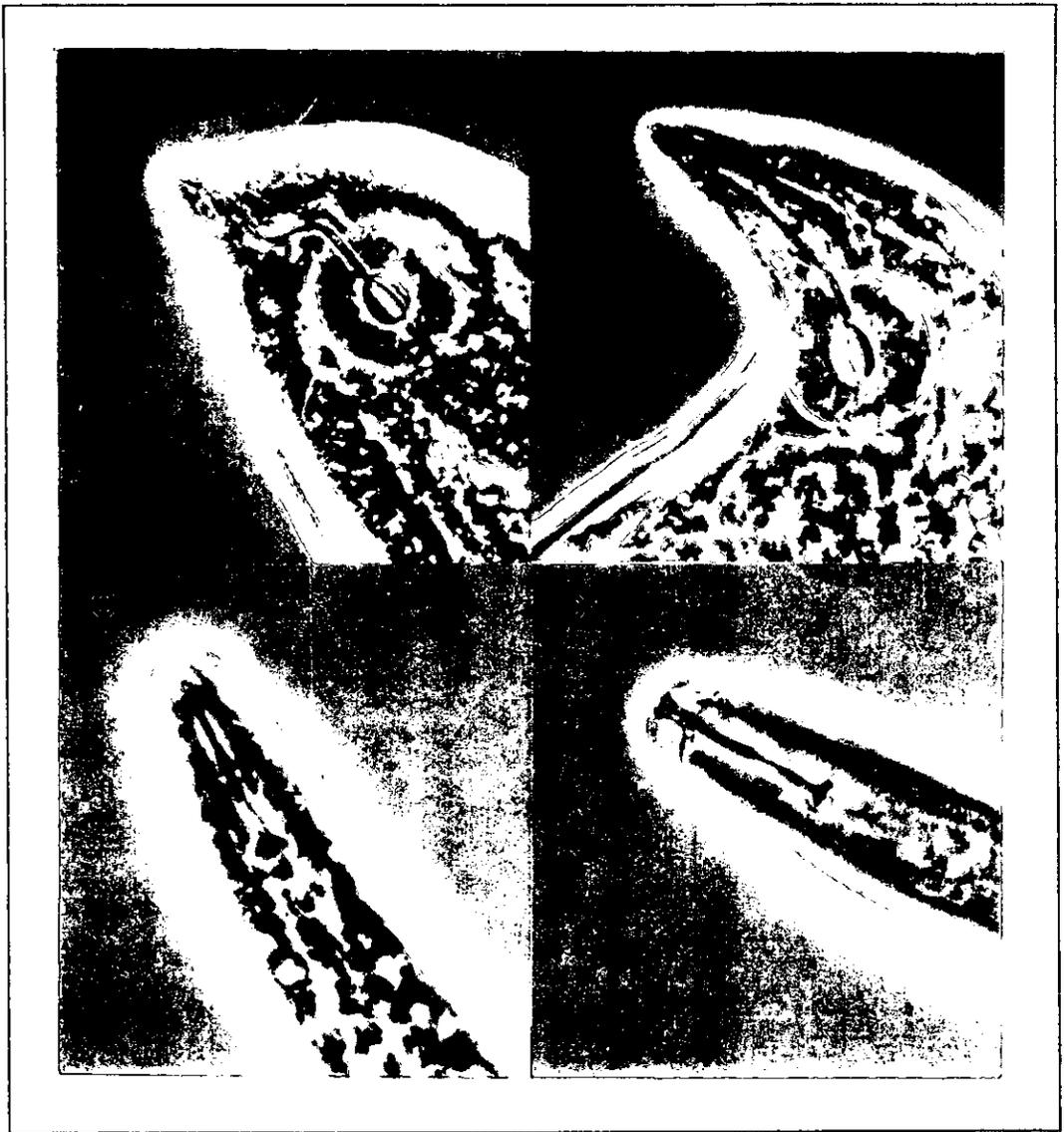


Fig. 4.8. *Meloidogyne incognita*, población Iguala, Gro. A, cuello de una hembra; C, región anterior de un macho. *Meloidogyne arenaria*, población Putla, Oax. B, cuello de una hembra y D, región anterior de un macho. Contraste de fases 100x.

4.2. Localidades y cultivos asociados a *Meloidogyne*

En el cuadro 4.1 se listan las especies que se identificaron, así como los cultivos con los que se asocian estas especies; las especies de *Meloidogyne* reportadas en este trabajo se encontraron en siete localidades de seis estados de la República.

CUADRO 4.1 Especies y localidades de los cultivos asociados a este género

CULTIVO	ESPECIE	ESTADO	MUNICIPIO	LOCALIDAD
Vid <i>Vitis vinifera</i>	<i>M. javanica</i>	Sonora	Hermosillo	Campo experimental CIANO
Café <i>Coffea arabiga</i>	<i>M. incognita</i>	Veracruz	Córdoba	Finca San Antonio
Sandia <i>Citrus Vulgaris</i>	<i>M. arenaria</i>	Oaxaca	Mesones Hidalgo	Mesones Hidalgo
Piña <i>Ananas Comusus</i>	<i>M. arenaria</i>	Oaxaca	Loma Bonita	Ejido Tierra Alta
Platano macho <i>Musa spp.</i>	<i>M. Incognita</i>	Chiapas	Pueblo Nuevo Comaltitlán	Ejido Villa Comaltitlán
Margaritón <i>C. Maximun</i>	<i>M. hapla</i>	Estado de México	Villa Guerrero	San Jose de los Ranchos
Ocra <i>Abelmoschus Esculentus</i>	<i>M. incognita</i>	Guerrero	Iguala de la Independencia	Valle de Iguala.

4.3. Distribución de especies de *Meloidogyne*

En el cuadro 4.2 se aprecia la distribución de *M. incognita*, localizada en un rango de altitudes muy amplio, desde los 61 msnm hasta 1281 msnm. Esto nos señala la capacidad de adaptación de esta especie a diversos climas, por consiguiente cuenta con una amplia gama de hospederos.

Meloidogyne arenaria se colectó en dos localidades, encontrándose desde los 92 msnm hasta 458 msnm. Cabe mencionar que la diferencia en cuanto a las condiciones en las que se desarrolla ésta especie es muy variable, incluyendo clima, tipo de suelo, pH y alta variabilidad en cuanto a la textura de suelo, a pesar de que las dos poblaciones se colectaron en Oaxaca.

Las condiciones ambientales que requiere *M. javanica*, son más específicas, por lo cual su distribución es más restringida.

En lo que respecta a *M. hapla*, ésta se encuentra distribuida en altitudes aproximadas a los 2 379 msnm. Como se menciona en la revisión de literatura, es una especie que se adapta a climas templados como el que se tiene en Villa Guerrero, Edo. Méx (Cuadro 4.2)

CUADRO 4.2 Ubicación geográfica de los sitios de muestreo

LOCALIDAD	LATITUD	LONGITUD	ALTITUD (msnm)
Campo experimental CIANO Sonora	28 ° 45' 15"	111 ° 27' 24"	58
Finca San Antonio Veracruz	18 ° 59' 15"	96 ° 48' 29"	884
Mesones Hidalgo Oaxaca	16 ° 54' 29"	97 ° 58' 05"	458
Ejido Tierra Alta Oaxaca	18 ° 06' 46"	95 ° 56' 57"	92
Ejido Villa Comaltitlán Chiapas	15 ° 08' 32"	92 ° 37' 34"	61
San Jose de los Ranchos Edo. de México	19 ° 00' 17"	99 ° 39' 56"	2 379
Valle de Iguala Guerrero	20 ° 36' 39"	98 ° 49' 54"	1 281

4.4 Morfología y morfometría de espículas

Otro caracter de importancia taxonómica son las espículas de los machos. Sus características sirvieron de apoyo para la identificación de especies. Se consideraron la forma y dimensión del manubrio, el calamus y la

lámina (Fig. 4.9). Se examinaron 12 espículas por especie, las medidas que se presentan son el promedio de las dimensiones de las estructuras mencionadas. Todas las observaciones se hicieron en el lado lateral externo.

Meloidogyne incognita presenta un manubrio en forma de trapecio, la parte más ancha se observa en el lado ventral, el manubrio mide de largo en la parte central 2.1 μ y de ancho 3.2 μ . El calamus mide 5.3 μ de largo. El primer tercio de la lámina, después del calamus es recta y en las dos terceras partes siguientes se observan dos curvaturas; la longitud de la lámina es de 20 μ y la parte terminal es redondeada (Fig 4.10 A).

Meloidogyne arenaria tiene un manubrio con una proyección ventral, la altura del manubrio en la parte media es de 3.5 μ y de ancho 3.0 μ . El calamus mide 6.5 μ ; la lámina en la parte anterior es recta, posteriormente presenta dos curvaturas, la primera curvatura es más pronunciada que la segunda. El ancho de la lámina va disminuyendo a lo largo de la espícula, la terminación de la lámina es cónica redonda y mide 19.0 μ (Fig. 4.10 B).

Meloidogyne javanica, en el manubrio presenta una proyección en el lado dorsal, mide de ancho 3.8 μ y de largo 3.2 μ . El calamus mide 5.2 μ de largo y la lámina 17.5 μ , en la parte anterior en un 50 % presenta una curvatura pronunciada en la parte dorsal, en la parte posterior presenta una ligera curvatura dando la apariencia de una recta, la terminación de la lámina es truncada (Fig. 4.10 C).

Meloidogyne hapla muestra una proyección ventral en el manubrio, de

ancho mide 3.5 μ y de largo 3.0 μ . El calamus mide 5.0 μ ; en la lámina se observa una curvatura en forma de ala en la parte dorsal, el segundo tercio es recto y en el tercer tercio se observa una ligera curva con la parte cóncava hacia el lado dorsal terminando antes de la punta, su terminación es truncada y mide 22.0 μ de largo (Fig. 4.10 D).

CUADRO 4.3 Medidas promedio de las partes que componen la espícula en μ

ESPECIE	MANUBRIO		CALAMUS		LAMINA		TAMAÑO DE ESPÍCULA	
	\bar{X}	St (\pm)	\bar{X}	St (\pm)	\bar{X}	St (\pm)	\bar{X}	St (\pm)
<i>M. incognita</i>	2.1	0.5	5.3	0.4	20.0	1.3	28.1	1.2
<i>M. arenaria</i>	3.0	0.5	6.5	0.8	19.0	1.1	28.8	1.4
<i>M. javanica</i>	3.2	0.6	5.2	0.6	17.5 *	1.3	25.6	1.2
<i>M. hapla</i>	3.0	0.8	5.0	0.6	22.0 *	1.6	26.8	1.6

Nota: Las diferencias morfométricas que se tomaron en cuenta para las medidas de las espículas se obtuvieron con el apoyo de la escala que presenta el paquete de computación en el programa Micrografx Designer 4.0.

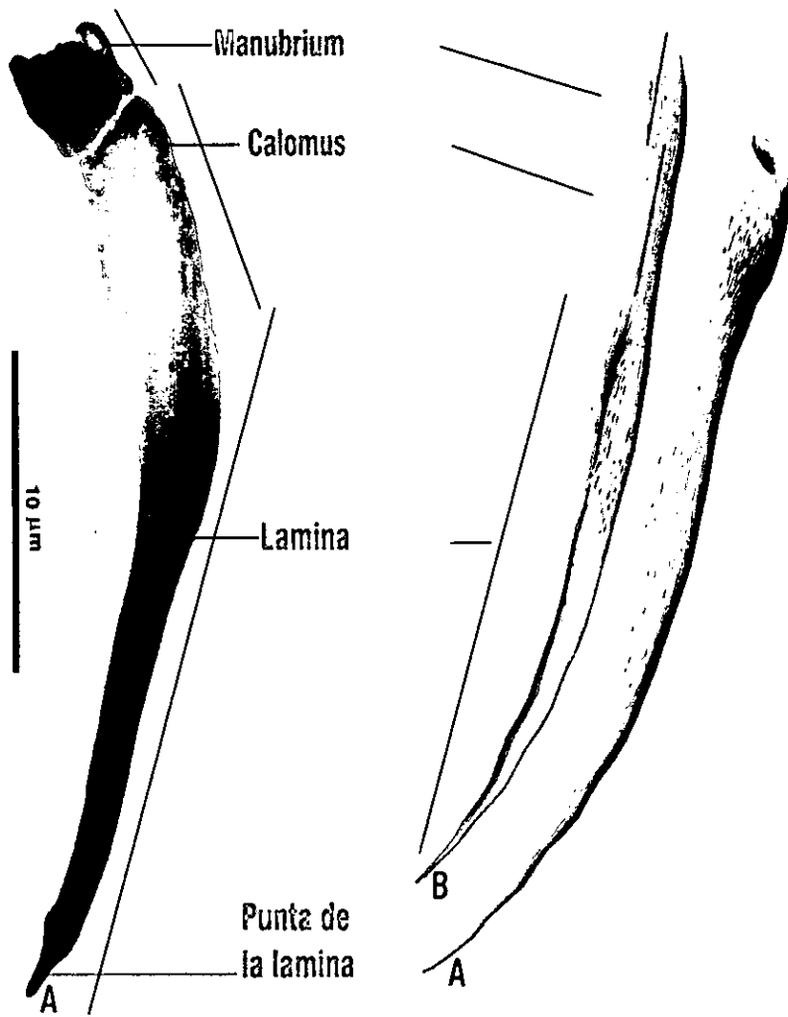


Fig. 4.9. Partes que componen una espícula, A lado lateral externo; B, lado lateral interno.



Fig. 4.10 Diferencias morfológicas de espículas en:
A, *Meloidogyne incognita*; B, *Meloidogyne arenaria*;
C, *Meloidogyne javanica* y D, *Meloidogyne hapla*.

Clave dicotómica para la identificación de las cuatro especies más importantes *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* y *M. hapla* con características morfológicas de las espículas.

1. Manubrio multidentado2
- 1' Manubrio monodentado 3
2. Parte media de la lámina curvada hacia la parte ventral y punta de la lámina con terminación roma
..... *Meloidogyne incognita*
3. Parte dorsal de la lámina recta, punta de la lámina aguda
..... *Meloidogyne arenaria*
4. Calamus con proyección anterior dorsal y ligera proyección en su parte anterior ventral 6
5. Calamus con ligera proyección anterior en su vista dorsal pronunciada
..... 7
6. Calamus con moderada anchura en su parte posterior anterior a la lámina; punta de la espícula con terminación truncada
..... *Meloidogyne javanica*
7. Calamus con pronunciada anchura en su región posterior y anterior a la lámina; punta de la espícula moderadamente truncada.....
..... *Meloidogyne hapla*

V. DISCUSION

La información obtenida corresponde a la identificación de especies asociadas a cultivos de importancia económica en diferentes Estados de la República, con el fin de puntualizar la importancia que representa éste nematodo en la agricultura de nuestro país.

Se identificó: *Meloidogyne incognita* en el cultivos de café en Córdoba, Ver., anteriormente reportado por (García y colaboradores 1997); oca en Iguala, Gro. y plátano en Villa Comaltitlan, Chis. *M. arenaria* se encontró parasitando sandía en Putla, y piña en Loma Bonita, Oax. *M. javanica* se vio asociada a vid en la Costa de Hermosillo, Son., reportado por (Ramírez, 1991) y *M. hapla* en Margaritón en Villa Guerrero, Estado de México. Los resultados obtenidos coinciden con lo que reporta Cid del Prado (1996) en la colecta nacional de *Meloidogyne*, menciona que la especie de mayor incidencia en México es *M. incognita*, con un 60.7 %, *M. arenaria* con 21.4 %, *M. javanica* 12.5% y *M. hapla* con 5.3%. Por lo que se aprecia que las cuatro especies de mayor incidencia en nuestro país son las que se mencionan.

Esto señala el amplio número de hospedantes que tiene este género, ya que parasita tanto hortalizas, como plantas ornamentales y frutales. Sin embargo las especies que se citan en este trabajo no son las únicas que se reportan para nuestro país, existen otras que ya estan reportadas pero que su incidencia es más restringida, las cuales no se identificaron en este trabajo.

La identificación de especies se realizó mediante la clave de Eisenback, traducida por (Sosa Moss, 1983) realizando una comparación de las ilustraciones que presenta y las características observadas en los ejemplares colectados, los caracteres morfológicos que se consideraron son el patrón perineal, cuello de las hembras y región cefálica de machos. La morfología y morfometría de espículas, fué apoyada por asesorías del Dr. Ignacio Cid del Prado, con su amplio conocimiento en el área nos sugirió algunos aspectos importantes para tomarlos en consideración y llegar a una identificación certera

mediante estas estructuras.

Eisenback (1983), menciona que un modelo perineal típico de *M. incognita* tiene un arco dorsal alto, cuadrado, con estrias onduladas, muy marcadas. Los resultados que se presentan, coinciden con lo que menciona este autor, a excepción de dos poblaciones en que se aprecian diferencias en el patrón perineal; como en la población de Chiapas donde se observó que las estrias son medianamente marcadas y el arco dorsal no es alto, mientras que en la población de Córdoba, Ver., el arco dorsal es muy alto, las estrias son marcadas, predominando una forma redonda en todo el patrón. Posiblemente estas diferencias se deban a las diversas condiciones ambientales y a las características del hospedero. En el caso de la población Iguala, Gro., coincide completamente con lo que este autor describe (Fig. 4.1).

Meloidogyne arenaria presentó el patrón perineal con pliegues en los costados laterales, como lo menciona Eisenback, (1983) sin embargo en las poblaciones estudiadas hay la inferencia de que no son muy evidentes porque las estrias son finamente marcadas (Fig. 4.2).

En *M. javanica* y *M. hapla* las características que se mencionan en las claves coincidieron completamente con los ejemplares colectados (Fig. 4.3 y 4.4).

Otros caracteres complementarios que se emplearon para apoyar la identificación de especies, fueron el estilete de la hembra, la región cefálica, estilete y la morfología de espículas de los machos.

En lo referente a la altitud y longitud se puede observar en el cuadro 5.2 que *M. incognita* fue localizada desde los 61 msnm hasta 1 281 msnm y la longitud esta entre los 92° 37' 34" y 98° 49' 54"; *M. arenaria* de 92 a 458 msnm, en longitudes de 95° 56' 57" a 97° 58' 05"; *M. javanica* en 58 msnm a una longitud de 111° 27' 24" y *M. hapla* a 2 379 msnm en los 99° 39' 56".

Esto indica que *M. incognita* por su amplia distribución y adaptación puede estar localizada en longitudes y altitudes muy variables, lo cual indica que se desarrolla en condiciones climáticas diferentes, posiblemente esto

influye en la rápida adaptación y diferenciación de razas puesto que es la especie que tiene 4 razas. Las otras especies requieren condiciones ambientales más específicas para su desarrollo, pero no por eso dejan de ser de importancia para la agricultura, puesto que si se encuentran en condiciones favorables causan grandes daños a los cultivos.

En cuanto a temperatura Marbán y Thomason (1985) mencionan que *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*, se desarrollan en zonas con una temperatura media anual de 15 °C a 33 °C. Los sitios de muestreo en los que se colectaron estas especies, se reportan temperaturas de 20 °C a 27 °C, lo cual está dentro del rango de temperaturas que se citan en la literatura. *M. hapla* presenta más restricciones en cuanto a su adaptación, ya que se encontró en sitios con una temperatura media anual de 14 °C, coincidiendo con lo reportado por estos autores

Se logró hacer una identificación de especies mediante el estudio morfológico y morfométrico de espículas de machos de *Meloidogyne*, con la metodología de extracción de estiletes desarrollada por (Eisenback, 1981), esta técnica fue modificada por (Cid del Prado y Rowe, 1996). Se realizaron extracciones de 12 espículas por especie, fueron observadas en diferentes costados, la sección que más nos proporcionó información fue el lado lateral externo, el cual se observó en 12 ejemplares que se seleccionaron de un promedio de 20 espículas que fueron procesadas para observarlas en el microscopio electrónico de rastreo (MER).

Jepson (1987) realizó observaciones de espículas de *M. javanica*, señalando que es difícil identificar especies por medio de la morfología y morfometría por que tienen un cierto grado de dificultad para realizar mediciones de estas estructuras. Los resultados que se apreciaron no coinciden con lo señalado por Jepson, ya que con la técnica modificada por (Cid del Prado y Rowe, 1996); se logró observar en MER espículas de las cuatro especies identificadas, lo cual permitió observar las diferencias morfológicas entre especies, asimismo, para medir con exactitud cada una de

las secciones de la espícula, se sometieron al programa de computación Micrografx Designer 4.0.

De ésta manera se observó que las especies tienen diferencias en cuanto a la morfología y morfometría de las espículas, las variaciones se presentan en forma y tamaño del manubrio, el calamus y la lámina. En *M. incognita* se observó que el manubrio es más pequeño que en las otras especies, no presenta proyección a diferencia de *M. arenaria* que presenta una proyección en el lado ventral. En *M. javanica* la proyección del manubrio es dorsal muy conspicua, en *M. hapla* la proyección se observa en el lado ventral. En cuanto al calamus, no hay diferencia entre las cuatro especies. En lo referente a la lámina se observó que *M. javanica* es la de menor longitud, mientras que *M. hapla* es la más grande.

La diferencia más notoria, para separar *M. incognita* y *M. arenaria* de *M. javanica* y *M. hapla* fué la terminación de la lámina, las dos primeras terminan redondeadas y las dos últimas presentan una terminación truncada, se partió de esta característica para la primera separación de especies, posteriormente se observó la posición y número de proyecciones del manubrio así como la longitud de la lámina, esto permitió identificar cada una de las especies.

En lo que respecta a las medidas obtenidas hay diferencias en cuanto al tamaño del manubrio, el calamus y la lámina, de este modo se pueden tomar como características complementarias para determinar de que especie se trata.

Considerando las características que se observaron en las espículas de las cuatro especies, es posible que sea de utilidad cuando se tiene dificultad para determinar de que especie se trata y no son suficientes los caracteres que se citan en las claves en este trabajo se propone una clave dicotómica con características complementarias, que apoyen en la identificación de especies.

Esta investigación contribuye con información básica y específica para llevar a cabo un diagnóstico preciso de nemátodos, no solo en lo referente a *Meloidogyne*, ya que parte de la metodología que se cita es de utilidad para el

diagnóstico de otros géneros, que con la ayuda de las claves apropiadas se puede llegar a una identificación confiable.

En lo referente a la etapa de campo la información obtenida en los muestreos realizados en los diferentes sitios de muestreo fue de mucha importancia, la especie de mayor incidencia fue *M. incognita* encontrándose en Córdoba, Ver., siendo una de las zonas productoras importantes de café, el cual presentó síntomas en la parte aérea amarillamiento del follaje y defoliación, que finalmente provoca la muerte de la planta, en las raíces las agallas son muy evidentes a pesar de la gran cantidad de corcho que se genera como respuesta al ataque de *Fusarium oxisporum*, y *M. incognita* por ello es recomendable coleccionar las raíces más finas puesto que tienen una consistencia muy leñosa y dura que no permita realizar adecuadamente la fase de laboratorio. En el cultivo de plátano también se identificó esta especie causando el marchitamiento de la planta hasta la muerte total, en la huerta estudiada se observaron plantas enfermas en regiones localizadas, en esta plantación no se detectó la asociación de *Radophulus similis* con *Meloidogyne* pero en la localidad es muy común encontrar estas dos especies en la misma planta, en cuanto a las raíces estas son blancas y suaves cuando son jóvenes, amarillas y ligeramente duras cuando envejecen, las raíces primarias emiten abundantes raíces secundarias de unos milímetros de diámetro y su penetración en el suelo puede llegar hasta 75 cm, sin embargo, la mayor cantidad de raíces se encuentra en los primeros 15 cm de profundidad (Gómez, 1996), en estas raíces se observan las pequeñas agallas, de las cuales se coleccionaron las muestras para la identificación, en las raíces más maduras por su diámetro, forma y color es más difícil observar las agallas. La oca también se encontró parasitada por *M. incognita* los síntomas aéreos se observan en manchones de plantas cloróticas con apariencia de deficiencia nutricional, de porte bajo en comparación con plantas no infestadas, en las raíces se observaron las agallas muy evidentes, algunas de estas coalescen en grupos de más de tres agallas, lo que da un aspecto de un sistema radicular

compacto.

M. arenaria se colectó en sandía y piña, esta última presentó síntomas aéreos como porte pequeño en relación a plantas sanas con aspecto clorótico, en algunos casos la planta estaba a punto de secarse completamente se observaron dos o tres plantas juntas con el mismo síntoma en las raíces fué difícil observar las agallas por la forma de la raíz, que es de borde muy irregular, por lo que fué conveniente observar cuidadosamente y detectar los pequeños abultamientos en los cuales se localizaban las agallas cubiertas por la gruesa epidermis que cubre la raíz.

En vid se identificó *M. javanica* la cual produce síntomas de marchitez, hasta que la planta se seca totalmente, en las raíces no es fácil observar las agallas, puesto que son de consistencia leñosa muy dura, es recomendable coleccionar las raíces más delgadas para un mejor manejo de las muestras en el laboratorio, es importante ocupar herramienta adecuada, puesto que las raíces se desarrollan a una profundidad de tres o cuatro metros.

El tamaño y la forma de las agallas, dependen de la especie involucrada y el número de nematodos y la edad del cultivo, ocasionalmente las agallas son muy pequeñas y en algunos casos éstas no son visibles. Los síntomas causados por *M. hapla* en margaritón son agallas más o menos esféricas, pequeñas no coalescen entre ellas.

Al identificarse las especies permite desarrollar las diferentes estrategias de manejo de poblaciones, entre ellas pueden citarse la rotación de cultivos, con variedades resistentes o especies tolerantes al ataque de *Meloidogyne*, tal es el caso del tomate Hawaii que presenta resistencia a *M. javanica*, en Australia Giles y Halton, 1971, citado por (González, 1980).

Good, 1972 citado por (González, 1980), recomienda que antes de decidir el tipo de control, debe conocerse el número de especies presentes en el área de estudio, ya que si se considera solamente a la especie dominante, las otras pueden rápidamente establecer dominancia y causar daños serios al cultivo. La rotación con cacahuate puede dar resultado, si la especie del

nematodo presente en el suelo no es *M. hapla* o la raza 1 de *M. arenaria*. Las rotaciones de cultivo tienen éxito cuando los cultivos seleccionados para la rotación son resistentes (Pacheco, 1986).

Fassuliotis, citado por (Taylor y Sasser, 1985) clasificó variedades de *Lycopersicum esculentum* resistentes al nódulo de la raíz, de la manera siguiente: Nematex y VNF-8 resistentes a *Meloidogyne arenaria*; P1 270935 *Lycopersicum peruvianum*, resistentes a *M. hapla*; Nematex, Gawanher (Giza)-1, Atkinson, Helani, Kalchi, FVN-8 y Anahu resistentes a *M. javanica* y más de 20 variedades son resistentes a *M. incognita*. Bost y Triantaphyllou (1982) mencionan que el tomate Small Fry presenta un gene completamente dominante resistente a *M. incognita*.

Torres, 1979 citado por (Pacheco, 1986) investigó el efecto de 3 especies de *Meloidogyne* en 2 variedades de tomate, concluyendo que: Homestead 61 es resistente no tolerante a *M. hapla*, susceptible tolerante a *M. arenaria* y susceptible no tolerante a *M. incognita*. Asimismo, encontró que Rossol es susceptible no tolerante a *M. arenaria* y resistente no tolerante a *M. incognita* y *M. hapla*.

Mucho se ha mencionado de la poca aplicación que tiene la taxonomía de nematodos en los problemas del campo, como se menciona en los párrafos anteriores es de gran importancia conocer las especies que se pretendan controlar porque si se aplica un diagnóstico erróneo puede causar pérdidas considerables a los productores. No es suficiente con visualizar los síntomas aéreos y de raíces, como en los demás grupos de patógenos que causan enfermedades a las plantas, en el caso de los nematodos también es indispensable que se identifique la especie para saber cual es el hábito parasítico, los síntomas que ocasiona y de este modo formarse un criterio adecuado para la elaboración de estrategias de control.

V. CONCLUSION

1. Las especies identificadas fueron *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* y *M. hapla*, la de mayor distribución fué *M. incognita*, se encontró asociada a los cultivos de plátano, café y oca; *M. arenaria* a sandía y piña; *M. javanica* en vid y *M. hapla* en margaritón.
2. *M. incognita* es la especie de mayor distribución geográfica, generalmente se colecta en altitudes desde nivel del mar hasta 1 300 msnm; *M. arenaria* se localizó en lugares desde 92 msnm hasta 460 msnm. *M. javanica* tiene requerimientos ambientales más específicos ya que su distribución es restringida a los 60 msnm; *M. hapla* solamente se colectó en zonas templadas con altitudes de más de 2 000 msnm.
3. Las espículas de los machos son estructuras importantes para la identificación de especies de acuerdo a la morfología y morfometría que presentan. Se observarán diferencias muy notorias en la forma del manubrio, calamus y lámina, así como las dimensiones que presentan.
4. Es importante identificar las especies de *Meloidogyne* antes de elaborar estrategias de manejo, puesto que cada una de las especies tiene diferentes requerimientos climáticos, así como diversos hospederos. Tomando esto como antecedente existe la posibilidad de tener eficiencia en cuanto al manejo de poblaciones y disminuir las pérdidas económicas.

VII. LITERATURA CITADA

Acosta, L. L. y De la Isla, M. L. 1958. Plagas importantes de la fresa en el Bajío y su combate. Boletín. Secretaría de Ganadería. Instituto de Investigaciones Agrícolas. Dirección General de Agricultura. 29 pp.

Ayoub, S. M. 1980. Plant nematology an agricultural training aid. Ed. Nemaïd publication, Sacramento, California, USA. 195 pp.

Baird R. E., Davis, R. F., Mullinix, B. J. and Padgett, G. B. 1996. Frequency and geographical distribution of plant parasitic nematodes on cotton in Georgia. *Supl Jour of Nematology*. Vol. 28 (4) 661-667

Barker, K. R. 1978. Determining nematode population responses to control agents. In methods for evaluating plant fungicides, nematicides and bactericides (E. Zehr Ed). *Phytopathol. Soc., Sr. St. Paul Minnessota*, 114 -125

Barker, K. R. 1985. Sampling nematode communities. In Barker, K. R., Carter, C. C. and Sasser N. J. *An advanced treatise on Meloidogyne. Metodology*. Vol. II pp 3-15. Printed by North Carolina State University Graphics. Raleigh, North Carolina. U.S.A.

Barker, K. R. 1985. Nematode extraction and bioassays. In Barker, K. R., Carter, C. C. and Sasser N. J. *An advanced treatise on Meloidogyne. Metodology*. Vol. II pp 19-35. Printed by North Carolina State University Graphics. Raleigh, North Carolina. U.S.A.

Barker, K. R., and C. L., Campbell. 1981. Sampling Nematode populations. In Zukerman, B., and R. A. Rohde. *Plant parasitic nematodes*. Academia Press, London, pp 451-474.

Bridge, J. 1991. Symptoms of nematode damage. Commonwealth Agricultural Bureau, Tropical Plant Nematology. St. Albans England 1-2 pp

Christie, J. R. 1991. Nematodos de los vegetales su ecología y control. Vol II Edit. Noriega Limusa. 78 pp

Cid Del Prado, V. I. 1995. Apuntes de práctica del curso de nematología. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Méx.

Cid Del Prado, V. I. 1995. Clave de nematodos del Orden Tylenchida Subordenes Tylenchina y Aphelenchina. Edit. Colegio de Postgraduados, Programa de Fitopatología Montecillos México. 67 pp

Cid Del Prado, V. I. 1979. Practica de microscopia y camara clara. Edit. Laboratorio de nematologia, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados. Montecillos México. 4 pp

Davis, E. L., et. al., 1996. Greenhouse evaluation of selected soybean germ-plasm for resistance to North Carolina. Populations of *H. glycines*, *R. reniformis* and *Meloidogyne* species. Supplement to the Journal of Nematology. Vol. 28:4: 590-598.

Dela Jara, A. F. y Zeron B. F. 1988. Manual de Practicas de nematologia agricola, Departamento de Parasitologia Escuela Nacional de Ciencias Biologicas. IPN México. 113pp

Di vito, M. et. al. 1992. Yield of susceptible and resistant pepper in microplots infested with *Meloidogyne incognita*. Nematropical. Vol. 22. 1-6 p.

Eisenback, J. D.; Hirschmann, T. H., Sasser H. J. and Triantaphyllou, C. A. 1983. Guía para la identificación de las cuatro especies más comunes del nematodo agallador (*Meloidogyne* especies), con una clave pictórica. International *Meloidogyne* Projec. Raleigh, North Carolina, U.S.A. Traducido por Sosa Moss.

Evans, K. 1993. Plant parasitic nematodes in temperate agriculture. Edit. CAB International 18-19 pp

Fortnum, B. A. et. al. 1988. Host suitability of grain sorghum cultivars to *Meloidogyne* spp. Suplement to the journal of nematology. Vol 2: 61-64.

French, E. R. y Hebert, T. T. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. Primera reimpression. Edit. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica : 263 - 275.

García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F. 175 pp

García, P. P.; Cid del Prado V. I.; Téliz, O. D.; Zavaleta, M. E.; Martínez, G. A. 1996. Etiología y alternativas de manejo de la corchosis del café. Tesis de M. C. del Colegio de Postgraduados, Montecillo, México 89 pp

González, C. V. 1980. Efecto de las rotaciones de cultivo, tomate-arroz (*Lycopersicum esculentum-Oryza sativa*) y Tomate-Soya (*Lycopersicum esculentum- Glycine max*), sobre las poblaciones de nematodos fitoparásitos en el Valle de Culiacán, Sin. Tesis. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 54 pp

Guevara, L.J.; Sosa, M.C.; Osada, K.S.; Zavaleta, M. M. y Cardenas, S.E. 1989.

Reacción de cinco variedades de papa a la interacción *Globodera rostochiensis*- *Meloidogyne chitwoodi*. Tesis de M. C. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 100 pp

Hooper, D. J. 1986. Extraction of free-living stages of soil. In laboratory methods for work with plant and soil nematodes (J.F. Southey Ed.). ministry of agriculture fisheries and food. Reference book 402. London: Her majesty's stationery office. 5-30

Hooper, D. J. 1986. Extraction of nematodes from plant material in laboratory methods for work with plant and soil nematodes (J.F. Southey Ed.), pp 50-58. Ministry of agriculture, fisheries and food. Reference book 402. London: Her majesty's stationary office.

Hunt, D. J. and J. Bridge, 1991. Nematology techniques. Fifth international training course on identification of plant nematodes of economic importance. International Institute of Parasitology, St. Albans, England, 17 pp

Kinloch, R. A. 1987. Evaluation of soybean cultivar for production in *Meloidogyne incognita* infested soil. Supplement to the journal of nematology. Vol. 1:32-34.

Jepson, S. B. 1987. Identificación of root - knot nematodes (*Meloidogyne* spp). Wallinaford, U. K. Commonwealth agricultural bureau international, 265 pp

Lamberti, F. y Taylor, C.E. 1979. Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* spp). Edit. Acadeics press INC. (London) LTD. 477 pp

López, H. R. y Cid del Prado V. 1980. Estudio de la interacción nematodo nodulador y hongos fitopatógenos del suelo, en el cultivo de tomate del estado de Morelos. Tesis. Universidad Autónoma de Chapingo, Méx. 46 pp

Marbán, M. N. y Thomason, J. I. 1985. Fitonematología avanzada I. Colegio de Postgraduados. 347 pp

Montes, B. R. 1989. Avances de nematología agrícola en México. Edit. Colegio Superior de Agricultura Tropical SARH. México. 89 pp

Montes, B. R. 1988. Nematología vegetal en México. Sociedad Mexicana de Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Méx. 158 pp

Nelson, S. C. 1989. Resistances to *Meloidogyne arenaria* in *Arachis* spp germplasm. Supplement to the Journal of Nematology. Vol. 21: 654-660.

Nickle, W. R. 1984. Plant and insect nematodes. Edit. Marcel Dekker, Inc, New York. U.S.A 925 pp

Nickle, W. R. 1991 Manual of agricultural nematology. Edit. Nickle W. R. Beltsville agricultural research center, agricultural research service, United States Department of Agriculture Beltsville, Maryland. Marcel Dekker Inc. New York, U.S.A. 1035 p

Pacheco, G. R. 1986. Nematodos asociados al cultivo de jitomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) en Tenextepango, Mor. Tesis. Universidad Autónoma de México. 58 pp

Philippi, L. y Budge A. 1992. Efectos de *Meloidogyne hapla* en plantas jóvenes de kiwi. Nematropical. Vol. 22: 47-54.

Ramírez, A. J. A.; I. Cid del Prado V.; D. Téliz, O. y E. Zavaleta, M. 1991. Respuesta de portainjertos de vid a *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. Tesis M. C. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Méx. 67 pp

S.A.G. A. R. 1995. Tomo II. Anuario estadístico de la producción agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. Subsecretaría de planeación. Dirección General de Estadística.

Sasser, J. N. and Carter, C. C. 1985. An advanced treatise on *Meloidogyne*. Vol. I Biology and control. A cooperative publication of the Department of Plant Pathology and the United States Agency for International Development. 422pp

Sipes, B. S. y Schmitt, D. P. 1994. Evaluation of pineapple *Ananas comusus* for host-plant resistance and tolerance to *Rotylenchulus reniformies* and *Meloidogyne javanica*. Nematropical Vol. 24:2:113-121.

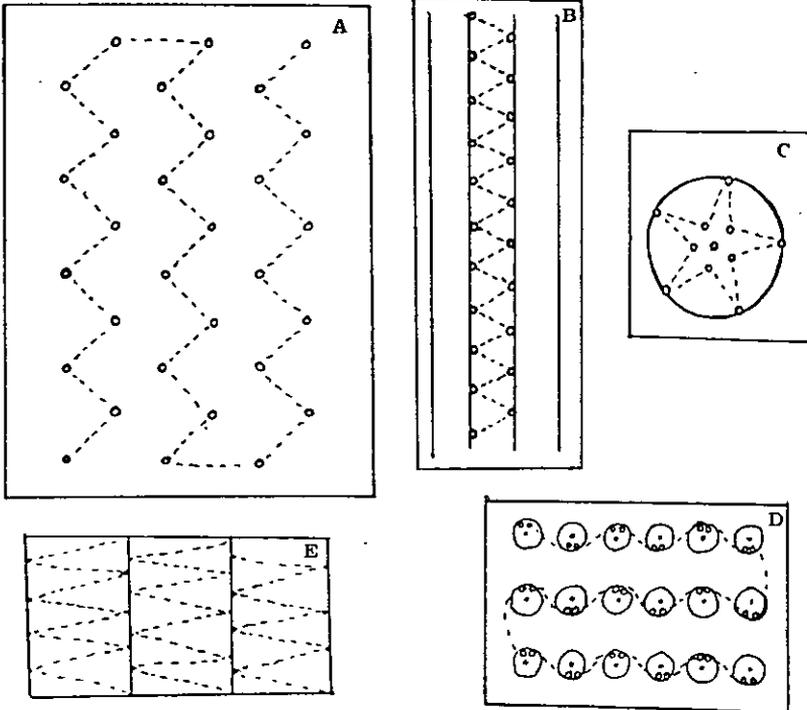
Society of nematologists crop loss assement committae. 1987. United states doe to plant - parasitic nematodes. Bibliography of estimated crop losses in the Unites States doe to plant - parasitic. nematodes. Suplement to the Journal Nematology. Vol. 1: 6-12.

Wallace, H.R. 1973. Nematodo ecology and plant disease Edit. Edward Arnold. Hill Street, London W1X8LL. 228 pp

Wehner, T. C. et. al., 1991. Resistance to root-knot nematodes in Cucumber and horned Cucumber. Suplement to journal of nematology. Vol. 24:4: 611-614.

VII. APENDICE

1. Esquemas de patrones de distribución (Tomados de Barker, 1978)



A. Patrón recomendado para muestreo de un mínimo de 20 a 30 muestras. B. Patrón para coleccionar las muestras de dos surcos centrales, en una parcela de cuatro surcos. C. Procedimiento para muestreo de una parcela con una sola planta. D. Patrón para muestreo de cultivos perennes. E. Patrón para muestrear áreas grandes divididas en subareas.

2. Cédula de datos de campo

Fecha de muestreo:

Nombre del colector:

Nombre del productor: _____

Dirección del productor: _____

Localización de la parcela. Lat. _____ Long. _____ Alt. _____

Cultivo anterior _____ Cultivo en pie _____

Etapa fenológica del cultivo _____ Textura de suelo _____

Parcela de riego _____ Parcela de temporal _____

Muestra de suelo _____ Muestra de raíz _____

Trabajo de laboratorio

3. Técnica de extracción, tamizado - centrifugado

Material

Tamices de 20, 50, 100, 200, 325 y 500 mallas

Tubos de centrifuga de 50 ml

Tres vasos de precipitados

2 cubetas

Cajas contadoras

Gradillas para tubos

Una centrifuga

Espátula

Solución azucarada (460 g/l. agua destilada) o $MgSO_4$ 1.2 g/ml

Procedimiento

1. Mezclar la muestra de suelo y eliminar materia orgánica y piedras
2. Tomar 200 ml de suelo colocarlos en una cubeta y agregar dos cuartas partes de agua fría
3. Agitar la mezcla y pasarla por los tamices de 20 y 50 mallas con la manguera lavar los tamices y recibir el agua en otra cubeta.
4. Deje transcurrir un minuto y proceda a pasar la suspensión por un tamiz de 100 mallas lave suavemente de arriba hacia abajo la superficie del tamiz con ayuda de una piceta; coloque el contenido del tamiz en un frasco y reciba el agua en otra cubeta.
5. El contenido de la cubeta, una vez más resuspendido páselo a través de un tamiz de 200 mallas colecte el contenido y reciba el agua en otra cubeta.
6. Repita la operación en un tamiz de 325 mallas.
7. El total de material colectado en los tamices de 100, 200 y 325 mallas distribuido, en los tubos de centrifuga en proporciones de cantidades y peso equivalente agregando 1 gramo de caolín a cada tubo, homogenice y centrifugue a 2500 r.p.m. durante 5 minutos.

8. Descarte el sobrenadante remueva el sedimento y agregue la solución azucarada o de $MgSO_4$ y centrifugue a 2500 r.p.m. durante 1 minuto.
9. Colecte el sobrenadante en un tamiz de 325 o 500 mallas y agregue agua para eliminar el azúcar y evitar que los nemátodos sufran daños por plasmólisis.

4. Técnica de tinción de raíces

Material

Raíces con agallas previamente lavadas.

Hipoclorito de sodio

Fuccina ácida para teñir raíces

Tamiz de 200 mallas

Agitador eléctrico

Glicerina

Horno de microondas

Procedimiento

1. Lavar las raíces y cortarlas en pedazos de 1 a 2 cm. de longitud.
2. Mezclarlas y pesar 1 g. y colocarlas en un vaso de precipitado.
3. Agregar 20 ml de hipoclorito de sodio y aforar hasta 50 ml de agua de la llave
4. Agitar continuamente durante 4 min
5. Transferirlas a un tamiz de 200 mallas y enjuagar, durante 30 seg.
6. Volver a colocarlas en el vaso de precipitado y agregar agua no excediendo los 50 ml. y agregar 1 ml de solución colorante de fuccina (esta solución contiene: 3.5 g de fuccina ácida, 250 ml. de ácido acético y 750 ml de agua destilada)
7. Poner a hervir en el horno de microondas y dejar enfriar a temperatura ambiente
8. Transferir las raíces al tamiz de 200 mallas y enjuagar el exceso de colorante con agua de la llave.

9. Con pinzas o espátula colocar las raíces en frasco de 30 ml, con glicerina y etiquetar.

5. Técnicas de muerte, fijación y deshidratación

Material

Mechero Bunsen

Frascos de 10 ml

Microsiringas

Campana deshidratadora

Pescadores

Alcohol del 96%

Cloruro de calcio

Microscopio estereoscópico

Etiquetas para pegar

Mezclas fijadoras

Soluciones deshidratantes

Muestras procesadas de nematodos

Procedimiento de muerte de nematodos

1. Concentrar a los nemátodos en 4 ml. de agua en un frasco de 20 ml, páselo por la flama o colóquelo en baño maría.

Procedimiento de fijación

2. Después de la muerte se le agrega, formól al 8%, en proporciones iguales

Procedimiento de deshidratación

3. Traslade los nemátodos después de 10 días a un siringa en una campana deshidratadora que contenga alcohol y manténgalos a temperatura de medio ambiente durante 24 hrs.

4. Se elimina el exeso del fijador del siringa, en el momento que perciba un fuerte olor a alcohol, unicamente se dejan 2 o 3 ml y se llena el resto con solución de glicerina A (20 ml de alcohol al 96%, 1 ml de glicerina, 79 ml de

agua destilada), se tapa, manteniendolo dentro de una caja de petri a temperatura ambiente, reviselo durante el tiempo de evaporación, manteniendo un mínimo de 1 ml en el siracuce.

5. En el momento en que se tenga poca solución A, se agregará la glicerina B (93 ml de

alcohol al 96% y 7 ml de glicerina), se tapa el siracuce y se revisa constantemente hasta que casi se halla evaporado.

6. Debe agregarse 2.5 ml de glicerina pura deshidratada y coloque el siracuce tapado en la campana deshidratadora que contenga cloruro de calcio, aquí puede permanecer en tiempo indefinido. Posteriormente se procede a el montaje permanente de nematodos.

6. Cortes perineales

Material

1 caja de porta objetos

3 Geringas

100 ml de Glicerina

100 ml de Glicerina desidratada

100 ml de Acido lactico

1 Caja de petri

1 Microciracusa

Procedimiento

1. Se toma una parte de raices teñidas y con agallas.

2. Se desgarrar el tejido de las raices para extraer las hembras con mucho cuidado.

3. Procedemos a colocar las hembras en un siracusa con agua. (aquí se almacenan)

4. En un porta objetos se coloca una gota de glicerina dentro de esta se coloca una hembra y se divide en dos partes con la ayuda de una geringa.

5. La parte de la cabeza se deja en la glicerina; la otra parte se coloca en

otro porta objeto con una gota de ácido láctico, la cual nos sirve para limpiar el interior de esta parte.

6. Ya limpia la parte anterior se inicia a cortar poco a poco la cutícula hasta formar un cuadro donde se encuentra, el ano, la vulva y fasmidios.

7. El corte junto con la parte anterior se trasladan a un porta objetos dentro de una gota de glicerina deshidratada y posteriormente se procede al montaje en anillo de cera.

7. Preparaciones permanentes con anillo de cera

Material

1 Caja de cobre objetos cuadrados

1 Caja de cobre objetos redondos

2 Pescadores

1 Tubo de cobre 1/2" con mango

Cera

1 Mechero de alcohol

100ml Glicerina deshidratada

Laminas de Copp

Calsas de carton

1 Plancha

250ml Alcohol

1 geringa

Fibra de vidrio

Procedimiento

1. En una pequeña gota de glicerina deshidratada se coloca en un porta objetos. (cubre objetos cuadrado de 24 x 24 mm)

2. Dentro de esta gota se colocan los ejemplares o cortes

3. Se acomodan tres partes de fibras de vidrio alrededor del espécimen

4. En la periferia de la gota se forma un círculo de cera, con el tubo de cobre

5. A continuación se pone el cubre objetos redondo de 18 mm encima de la cera
6. Trasladamos el porta objetos a una plancha a una temperatura de 60°C, hasta que se derrita la cera
7. Ya derretida la cera se retira de la plancha la preparación
8. Se acomoda en la lamina de Coob, se calza de cada lado
9. Los cuadritos de cartulina ilustración se colocan a los lados y se ocupan para etiquetar la preparación.

8. Técnica de extracción de espículas y estiletes

Material

Material vivo, hembras y machos

Verde de malaquita

Acido láctico al 45%

Formalina al 2%

Calzas de vidrio o pelo de angel

Pescadores de pelo de camello o pincel fino

Pescador de un removedor de nervios dental

Doble scotch tape

Ether

Cubreobjetos redondos de 13 mm

Portaobjetos normales

Procedimiento

1. Todo el material vivo debe estar en agua corriente y mantenerse en refrigeración si no se ocupa todo el material
2. Poner una gota de verde malaquita (agua destilada, verde malaquita, glicerina y ácido láctico), en un portaobjetos colocar los especímenes durante 2 hrs.
3. En un portaobjetos con una gota de ácido láctico 45% colocar los machos y cortar la parte posterior, dejar por lo menos 10 min.

4. Con el pescador extender el ácido a la orilla y sedimentar bien la cola a manera de que no flote
5. Con el pescador dental presionar un extremo para que salga el tejido junto con las espículas, una vez que las espículas están afuera, se remueven con el pescador de pincel para eliminar el tejido que se tiñó de verde, hasta que se separen las espículas.
6. En un portamuestras para Microscopía Electrónica se pega un cuadrito de cinta conductiva de carbón, se etiqueta perfectamente con un plumón indeleble.
7. Posteriormente se colocan las espículas ya separadas.

9. Iluminación Köhler.

1. Subir completamente el condensador
2. Enfocar la preparación con el objetivo 10
3. Cerrar el diafragma de campo luminoso
4. Bajar cuidadosamente el condensador, hasta obtener la máxima nitidez de la imagen del diafragma
5. Centrar el diafragma de campo luminoso en el campo visual, recurriendo a los dos tornillos del condensador
6. Abrir el diafragma de campo luminoso hasta, el límite del campo visual
7. Regular el contraste de la imagen con ayuda del diafragma del condensador
8. Comprobación: A) Quite el ocular y mire la abertura visible del objetivo; debe estar iluminada unas 3/4 partes
9. Regule la luminosidad de la imagen con filtros o bien mediante el control del voltaje de la fuente de luz
10. Al cambiar de objetivo, solo adapte el diafragma de campo luminoso al tamaño del campo visual y el diafragma del condensador a la abertura del campo

10. Calibración de microscópio y camara clara

Material

- 1 Ocular micrometrico
- 1 Objetivo micrometrico
- 1 Microscopio

Procedimiento

1. Se coloca en la platina el objetivo micrométrico
2. Sustituimos, el ocular normal por el ocular micrométrico
3. Enfoque ambas escalas, de tal forma que queden sobrepuestas
4. Coincida los ceros de cada escala
5. Busque los puntos donde coincidan las escalas después del cero
6. Tome en cuenta, el punto mas distante del cero (entre más distante este del cero más exacto es la calibración)
7. Cuente las divisiones de cada escala hasta donde coinciden y que sea el valor que va a ocupar
8. Ya con estos datos se procede a calcular el coeficiente micrométrico con la siguiente fórmula

$$\frac{\text{No. de divisiones del objetivo micrométrico} \times 10}{\text{No. de divisiones del ocular micrométrico}}$$

Camara clara

Material

- 1 Microscopio
- 1 Camara clara
- 1 Mesa de dibujo
- Hojas blancas
- 1 Lapiz
- 1 Regla de 30cm
- 1 Objetivo micrométrico

Procedimiento

1. Coloque en la platina el objetivo micrométrico
2. En la mesa de dibujo se coloca la regla de 30cm
3. Enfocar las escalas que se vean nitidamente, quedando paralelas las escalas
4. Haga coincidir el cero de la reglilla, con el de la regla
5. Busque a su derecha la división en que coincidan
6. Cuento las divisiones de cada escala
7. Para obtener las magnificaciones se realizan las siguientes operaciones

$$\frac{\text{No. de divisiones de la regla}}{\text{No. de divisiones del objetivo micrométrico}} \times 10$$

8. Para conocer el valor de las medidas se aplica la siguiente formula

$$\text{Micras} = \frac{\text{Medidas en mm} \times 1000}{\text{Magnificaciones}}$$