

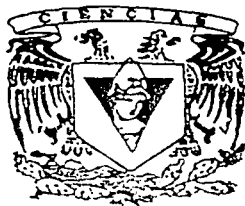


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"ALTERACIONES HISTOLOGICAS E HISTOQUIMICAS
PRODUCIDAS POR *Meloidogyne* spp. EN TRES
VARIETADES DE VID (*Vitis vinifera*) SOMETIDAS A
TRATAMIENTOS PREVIOS EN CABORCA SONORA,
MEXICO".

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
YUMI ELENA NAKAZAWA UEJI



facultad de
ciencias
UNAM

DIRECTOR: DR. MARCCS RAFAEL LAMOTHE y ARGUMEDO
CODIRECTORA: DRA. ELIZABETH CARDENAS SORIANO

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito: " Alteraciones histológicas e histoquímicas producidas por Meloidogyne spp. en tres variedades de vid (Vitis vinifera) sometidas a tratamientos previos, en Caborca Sonora, México " realizado por Yumi Elena Nakazawa Ueji.

con número de cuenta 9650455-4 , quién cubrió los créditos de la carrera de: Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Marco Rafael Lamothe y Argumedo.

Propietario

Dra. Elizabeth Cárdenas Soriano.

Propietario

Dr. Nahúm Marbán Mendoza.

Suplente

M. en C. Aurora Zlotnik Espinosa.

Suplente

M. en C. María Cristina Julia Pérez Reyes.

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rafael Lamothe Argumedo por su apoyo incondicional durante la realización de este trabajo, por su amistad, sus valiosos consejos, su tiempo y su comprensión en todo momento.

A la Dra. Elizabeth Cárdenas por su amistad, apoyo y por ayudarme a concluir esta etapa.

Al Dr. Nahúm Marbán Mendoza por sus acertados consejos y por compartir conmigo los conocimientos que la experiencia le ha dado.

A la M. en C. Aurora Zlotnik Espinoza por su amistad y apoyo en los momentos más difíciles.

A la M. en C. Cristina Pérez por su amistad y comprensión.

A mi familia por todo el apoyo y el cariño que me han dado.

A Rosalba del Valle Gardida por su amistad, en las buenas y en las malas.

A Alberto Uc Vázquez por los mejores momentos de mi vida.

A todos aquellos con quienes conviví todo este tiempo en la Facultad de Ciencias y en el Colegio de Postgraduados.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO por todo.

MUCHAS GRACIAS A TODOS!!!!

TABLA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Cortes longitudinales y transversales de raíces de vid de la variedad "Thompson seedless" sin nematocida.</i>	29
<i>Figura 2. Cortes transversales y longitudinales de la variedad "Flame seedless" sin nematocida.</i>	33
<i>Figura 3. Cortes transversales y longitudinales de la variedad "Superior seedless" sin nematocida.</i>	37
<i>Figura 4. Cortes longitudinales y transversales de raíces de vid de la variedad "Thompson seedless" tratadas con Ditera.</i>	41
<i>Figura 5. Cortes longitudinales y transversales de raíces de vid de la variedad "Flame seedless" tratadas con Defense.</i>	44
<i>Figura 6. Cortes longitudinales y transversales de raíces de vid de la variedad "Superior seedless" tratadas con Defense.</i>	47
<i>Figura 7. Cortes longitudinales y transversales de raíces de vid de la variedad "Superior seedless" tratadas con Rugby.</i>	50
<i>Figura 8. Pruebas histoquímicas para la detección de peroxidasas activas en raíz de vid (Vitis vinifera) infectadas con Meloidogyne sp.</i>	55

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Hidrolasas identificadas en raíces infectadas con Meloidogyne y Pratylenchus (Giebel, 1974).</i>	20
<i>Tabla 2. Cuadro comparativo de las alteraciones en cada uno de los tratamientos.</i>	51
<i>Tabla 3. Cuadro comparativo de las características de las células gigantes de cada uno de los tratamientos.</i>	52

CONTENIDO

TABLA DE FIGURAS	2
ÍNDICE DE TABLAS.....	2
RESUMEN.....	5
I. INTRODUCCIÓN	6
II. OBJETIVOS.....	8
III. ANTECEDENTES	8
IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....	9
4.1 El cultivo de la vid	9
4.2 Enfermedades de la vid.....	9
4.2.1 Hongos	9
4.2.2 Bacterias.....	10
4.2.3 Virus	10
4.2.4 Plantas parásitas	10
4.2.5 Nematodos	10
4.2.5.1 Nematodos en la vid	13
4.2.5.1.1 <i>Meloidogyne</i> sp. Goeldi 1887	13
4.2.5.1.2 <i>Xiphinema</i> spp.....	15
4.2.5.1.3 <i>Pratylenchus</i> spp. Filipjev 1936.....	15
4.3 Alteraciones estructurales.....	16
4.3.1.1 <i>Meloidogyne</i> sp.	17
4.3.2 Cambios bioquímicos (Histoquímica).....	19
4.3.2.1 <i>Meloidogyne</i> sp.	21
4.4 Control de nematodos.....	21
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1 Características de la localidad.....	22

	4
5.2 Variedades de vid utilizadas	23
5.3 Procesamiento de las muestras	23
5.4 Fijación e inclusión	23
5.5 Cortes histológicos, tinción y montaje.....	24
5.6 Histoquímica.....	25
VI. RESULTADOS	26
6.1 Histopatología	26
a) Variedad "Thompson seedless", Testigo (sin tratamiento)	26
b) Variedad "Flame seedless", Testigo (sin tratamiento)	30
c) Variedad "Superior seedless" Testigo (sin tratamiento)	34
d) Variedad "Thompson seedless", tratamiento Ditera.....	38
e) Variedad "Flame seedless" Defense	42
f) Variedad "Superior seedless" tratamiento Defense.....	45
g) Variedad "Superior seedless" tratamiento Rugby	48
6.2 Histoquímica.....	53
a) Variedad "Flame seedless" tratamiento Rugby (testigo)	53
b) Variedad "Flame seedless" tratamiento Defense.....	53
c) Variedad "Flame seedless" tratamiento Rugby	53
d) Variedad "Thompson seedless" tratamiento Ditera	53
VII. DISCUSIÓN.....	57
ALTERACIONES HISTOLÓGICAS	57
ALTERACIONES HISTOQUÍMICAS	60
VIII. CONCLUSIONES.....	62
IX. LITERATURA CITADA.....	63
APÉNDICE	67

RESUMEN

Los nematodos fitoparásitos son importantes debido a que tienen como hospedantes plantas cultivadas. Una de ellas es la vid (*Vitis vinifera* L.), cuya producción se ve disminuida de manera significativa por la presencia de *Meloidogyne* sp. Los nematodos sedentarios agalladores provocan pérdidas grandes en la producción de los viñedos cuando la población alcanza altas densidades. Al introducirse y establecerse dentro de la raíz inducen la formación de agallas mediante modificaciones en la anatomía y fisiología de la raíz y, como consecuencia, de la planta. Dentro de las alteraciones anatómicas se encuentran la formación de peridermis, hiperplasia de parénquima y tejidos vasculares, hipertrofia de células parenquimatosas, acumulación de lignina, suberina y los cambios en la cantidad de almidón y polifenoles dentro de las células del parénquima cortical y del floema. La raíz tiene ciertos mecanismos de defensa contra los patógenos, los cuales varían dependiendo de la susceptibilidad o resistencia de cada planta, así como también de la aplicación de productos químicos. De esta manera al aplicar Ditera, Defense o Rugby, la cantidad de agallas y nematodos en las raíces se ve alterada. Uno de los mecanismos de defensa es la actividad de las peroxidases cuyos cofactores son los polifenoles, y participan en la defensa local de las plantas favoreciendo la síntesis de lignina. Estas características pueden ser diferentes entre variedades y también al aplicar productos para disminuir o controlar las poblaciones de nematodos. El objetivo de este trabajo fue describir el daño que *Meloidogyne* sp. induce en raíces de tres variedades de vid, entender los cambios en la actividad de las peroxidases que se presentan durante esta interacción, y dar a conocer las diferencias en la respuesta de la planta para cada uno de los tratamientos. Para lograr este objetivo se realizaron cortes de raíces incluidas en parafina con un grosor de 10 μm , los cuales fueron teñidos mediante la técnica Cuádruple de Johansen; y para la localización de peroxidases activas, las raíces frescas se cortaron en un micrótomos de congelación con un grosor de 30-40 μm y se siguió la técnica utilizada por Giebel y colaboradores en 1971. Las alteraciones histológicas observadas en todos los tratamientos fueron la formación de células gigantes, hiperplasia de parénquima y tejido vascular, acumulación de lignina en las paredes celulares y en xilema, necrosis, desorganización celular y el cambio en la composición de los polifenoles. La actividad de las peroxidases se observó solamente en el interior de las células del floema al nivel del nematodo tanto en cortes transversales como en longitudinales. En las raíces tratadas con Defense el tejido vascular presentó mayor desorganización y mayor actividad de peroxidasa. Se concluyó que la mayoría de las alteraciones son constantes en todos los tratamientos, y la única diferencia consiste en la presencia de almidón cerca del nematodo en los tratamientos "Superior seedless" con Rugby y Defense. El grado de hiperplasia del tejido vascular en raíces de las variedades "Flama seedless" y "Superior seedless" tratadas con Defense fue mayor que en los demás tratamientos. De la misma manera una mayor actividad de peroxidases en el floema en raíces de plantas de la variedad "Flama seedless" que fueron tratadas con Defense fue evidente. El papel que las peroxidases juegan y su relación con el cambio en el tipo de polifenoles es importante para comprender mejor la fisiología de la interacción planta-nematodo.

I. INTRODUCCIÓN

La vid es un frutal ampliamente cultivado en el mundo, que cubre un área de 10 millones de hectáreas; crece en regiones con clima templado-tropical, pero generalmente es cultivado en regiones templadas (Pearson y Goheen, 1994). En 1999 la superficie de vid cosechada a nivel mundial fue de 7,426,000 ha, con un rendimiento de 8,172 kg/ha y una producción de 60,687,000 toneladas métricas. En este mismo año, México tuvo una superficie cosechada de 43,000 ha con un rendimiento de 11,058 kg/ha y una producción de 476,000 toneladas métricas (FAO, 1999). En 1998 la superficie total sembrada de uva fue 40,083, la superficie total cosechada fue de 39,135 ha y la producción total fue 478,047 Ton. En 1998 la superficie cosechada de uva fresca en la República Mexicana fue de 17,167 ha de las cuales Sonora presentó 11,024 ha ocupando el primer lugar. La producción total fue de 161,683 Ton de la cual Sonora obtuvo una producción de 109,002 Ton, ocupando también el primer lugar en la República Mexicana (Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos, 1998).

Este cultivo tiene gran importancia debido a que se utiliza de muchas maneras, el fruto es fermentado para producir vino o brandy, se puede ingerir en fresco, al secarlo se obtienen pasas, se consume también en forma de jugo no fermentado y en conservas (Pearson y Goheen, 1994).

La viticultura en Sonora está enfocada a la producción de uva industrial y para mesa. Sin embargo, en este frutal se presentan problemas que limitan su cultivo y producción como son manejo de agua, fallas en la brotación, salinidad y compactación del suelo, maleza, plagas y enfermedades (Raya *et al.*, 1981). Las enfermedades que se presentan en este cultivo pueden producir grandes pérdidas que van desde un 5% hasta el 20% a 80% de la producción si las condiciones son favorables para el desarrollo de la enfermedad. En la mayoría de los casos las enfermedades son el resultado de la interacción entre un hospedante susceptible y un patógeno, dentro de los cuales podemos encontrar a los hongos, bacterias, virus y nematodos, conocidos como factores bióticos. Existen otras enfermedades que a diferencia de las anteriores son producidas por agentes abióticos como el estrés ambiental, desbalance de nutrimentos o toxicidad química (Pearson y Goheen, 1994).

Uno de los grupos de organismos que ocasionan pérdidas en los viñedos son los nematodos, siendo los más importantes algunas especies del género *Meloidogyne* Goeldi 1887 como *M. incognita* y *M. javanica*; los del género *Xiphinema* también con dos especies: *X. index* Thorne y Allen 1950 y *X. americanum* Cobb 1913; *Pratylenchus* Filipjev 1936 con una especie *P. vulnus*, y *Criconemoides* también con una especie *C. xenoplax*. Estos provocan tanto daño directo a la planta al alimentarse como daño indirecto al participar como vectores de virus (Nickle, 1984; Barthels, *et al.*, 1997; Pearson y Goheen, 1997). En México las variedades de vid establecidas corresponden a *Vitis vinifera*, que son susceptibles al ataque de nematodos del género *Meloidogyne*; por ejemplo, el rendimiento de vid se reduce en un 22% por el ataque de *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood (Ramírez, *et al.*, 1995a). Los nematodos se consideran un problema potencial, ya que se encuentran en niveles altos y presentan una distribución amplia (Ramírez y Nieto, 1995). Estos nematodos se encuentran presentes en la región de Caborca

Sonora y se ha observado que cada uno independientemente provoca daños a su hospedante (Veech y Endo, 1969).

Los nematodos endoparásitos son parásitos obligados de plantas, habitan las raíces de sus hospedantes y requieren de un sitio de alimentación que les provea de nutrimentos durante toda su vida y les permita desarrollarse y completar su ciclo de vida. Durante la infección se llevan al cabo cambios químicos y estructurales que alteran tanto la cantidad como la calidad del producto, ya que afectan los tejidos vasculares que proveen a la planta los nutrimentos necesarios. Dentro de estos cambios encontramos la formación de agallas debido a la hiperplasia o proliferación celular excesiva y la hipertrofia que tiene como resultado la formación de sincicios y células gigantes. En algunos casos se pueden observar zonas necróticas debidas a la ruptura de paredes celulares durante la entrada del parásito al hospedante y desorganización de los tejidos como el xilema, el floema y el parénquima cortical en raíz. Dentro de los cambios químicos se puede presentar un aumento en la actividad enzimática en el sitio de alimentación del nematodo, que puede ser atribuida a la prueba que el nematodo realiza por medio de su estilete en las células, o a los productos de secreción del nematodo mediante el estilete dentro del sincicio. Algunas veces el aumento en la actividad enzimática también es responsable de la resistencia que algunas de las plantas presentan a ciertos nematodos. La localización histoquímica de factores específicos que inducen o inhiben esta respuesta sería útil para entender la fisiología de la interacción planta-nematodo (Veech y Endo, 1969).

Existen variaciones en cuanto a la interacción que se establece entre el parásito y las diferentes variedades del hospedante, siendo así algunas resistentes, tolerantes o susceptibles, dependiendo de la manera en que reaccionan a la infección, por lo que es posible que haya diferencias en la estructura y función de los sitios de alimentación que estos nematodos forman. Debido a que la enfermedad es el resultado de la interacción entre el hospedante y el patógeno, es importante entender de qué manera se establece. Para lo cual se plantearon los siguientes objetivos:

II. OBJETIVOS

Objetivo general

- Describir en tres variedades de vid las alteraciones morfológicas y químicas producidas durante la infección por *Meloidogyne* spp. mediante estudios histoquímicos e histopatológicos para poder entender la relación entre el nematodo y su hospedante.

Objetivos particulares

- Describir las alteraciones histológicas inducidas por *Meloidogyne* sp. en raíces de tres variedades de vid: "Thompson seedless", "Flame seedless" y "Superior seedless", sometidas a los tratamientos Defense, Ditera y Rugby respectivamente.
- Describir las alteraciones en la actividad de las peroxididasas en raíces infectadas en cada uno de los tratamientos.

III. ANTECEDENTES

En México se han realizado tres trabajos de nematodos parásitos de vid, todos con material proveniente de Hermosillo, Sonora. En uno de ellos se evaluaron los efectos de los nematicidas en las poblaciones de nematodos, observando el efecto de tres nematicidas en poblaciones de *Meloidogyne*, *Xiphinema* y *Pratylenchus*. Al aplicar fenamifos, aldicarb y carbofuran a dosis de 5, 4.5 y 5 kg ia/ha respectivamente, los resultados obtenidos fueron una disminución en la población de *Xiphinema* y larvas de *Meloidogyne* en el tratamiento con aldicarb y un decremento en la población de *Pratylenchus* al aplicar aldicarb y carbofuran (Ramírez y Nieto, 1995).

En otro trabajo se estudiaron las especies y razas de *Meloidogyne* presentes en Hermosillo y se describieron además los cambios histológicos causados por *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. Las especies y razas identificadas fueron *M. incognita* (Kofoid y White) Chitwood raza 1; *M. arenaria* (Neal) Chitwood raza 1 y *M. javanica*. Los cambios histológicos ocasionados por *M. javanica* consistieron en células gigantes en el floema y xilema, con paredes gruesas, citoplasma denso y varios núcleos; rodeadas de tejido parenquimatoso con hiperplasia (Ramírez *et al.*, 1995b).

Posteriormente se observaron los cambios que *M. javanica* provocó al establecerse en células de floema y xilema, que consistieron en una desorganización de los tejidos conductores, los cuales aparecían curvados debido a la presencia de células hipertrofiadas que proporcionan alimento al nematodo; estas células muestran un mayor tamaño, pared gruesa, citoplasma denso y son multinucleadas. El grupo de células gigantes varió de 4 a 7 en cada sitio de alimentación. En el cultivar Carignane se tuvieron grupos hasta de siete células y en el portainjerto Hoppenehim, que resultó susceptible a *M. javanica*, se encontraron grupos de cinco células hipertrofiadas. La hiperplasia e hipertrofia que se observó histológicamente coincide con un estudio realizado anteriormente con *M. incognita* y la variedad "Thompson seedless" (Ramírez *et al.*, 1995b).

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 El cultivo de la vid

La vid (*Vitis vinifera* L.) pertenece a la familia Vitaceae, la cual incluye 14 géneros vivos y dos extintos, y más de mil especies (Pearson y Goheen, 1994). Todas las especies cultivadas en el viejo mundo pertenecen a *Vitis vinifera*; sin embargo, existen otras especies que se han cultivado en América, todas del género *Vitis*. Dentro de este género se encuentran dos secciones: Muscadinia y Euvitis, ambas presentan grandes diferencias anatómicas y morfológicas; siendo las pertenecientes a la primera sección *V. rotundifolia*, *V. munsoniana* y *V. popenoi*; y son cultivadas en Estados Unidos y México; y aquellas pertenecientes a la segunda sección se cultivan en zonas templadas, cálidas y tropicales del hemisferio boreal y se dividen en americanas y europeas asiáticas. Las primeras a su vez se subdividen en tres series, oriental (*V. labrusca*, *V. aestivalis* y *V. lincecumii*), central (*V. riparia*, *V. rupestris*, *V. berlandieri*, *V. cordifolia*, *V. candicans*, *V. cinerea*, *V. moticola* y *V. rubra*) y occidental (*V. californica* y *V. Arizonica*). Dentro de las europeas está *V. vinifera*, y de las asiáticas *V. amurensis* y *V. cignetiae* (Martínez de Toda, 1991).

La especie *Vitis vinifera* es la más cultivada en el mundo desde hace mucho tiempo debido a la calidad de sus frutos y otros productos derivados de los mismos. El número de variedades pertenecientes a esta especie sobrepasa varios millones. Estas se han clasificado por sus orígenes, por sus caracteres ampelográficos y por su distribución geográfica (Hidalgo, 1993).

4.2 Enfermedades de la vid

Las enfermedades en estos cultivos han tenido gran importancia desde el inicio de la viticultura, ya que afectan la producción, almacenamiento, procesamiento y consumo de la uva. Reducen el cultivo aumentando los costos de producción (Pearson y Goheen, 1994).

Dentro de las principales enfermedades que se encuentran en la vid están aquellas producidas por hongos, bacterias, virus, nematodos y plantas parásitas.

4.2.1 Hongos

Existe una gran variedad de hongos que parasitan los viñedos por lo que solamente se mencionarán algunos. Los hongos infectan a las plantas penetrando por heridas o mediante aberturas naturales como hidátodos, estomas y lenticelas, dentro de estos se encuentran los mildiús *Uncinula necator* (Schw.) Burr. y *Plasmopora viticola* (Berk. y Curt.) Berl. y de Toni, *Botryotinia cinerea* Pers. (Pearson y Goheen, 1994; Coelho y Montero, 2000), *Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala y Ravaz; la fosis del tallo y la mancha foliar cuyo agente causal es *Phomopsis viticola* (Pearson y Goheen, 1994); la antracnosis producida por *Elsinoë ampelina* (de Bary) Shear (Pearson y Goheen, 1994; Coelho y Montero, 2000), que se encuentran en las hojas. En los frutos podemos encontrar a *Alternaria alternata*

(Fr.) Keissl., *Cladosporium herbarum* (Pers.:Fr.) , *Aspergillus niger* van Tiegh, *Rhizopus arrhizus* Teshler y *Fussarium moniliforme* Sheldon, entre otros. Por último, también encontramos hongos en la madera y en las raíces, por ejemplo: *Eutypa lata* (Pers.:Fr.) Tul y C. Tul, *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers. y *Phellinus igniarius* (L.:Fr.) Quél, *Botryosphaeria stevensii* Shoem., *Armillaria mellea* (Vahl:Fr.) Kummer, *Phymatotrichum omnivorum* (Shear) Duggar, *Verticillium dahliae* Kleb., y *Rosellinia necatrix* Prill entre otros (Pearson y Goheen, 1994).

4.2.2 Bacterias

Las bacterias parásitas de vid entran a la planta por aberturas naturales, son transmitidas por injerto o por vectores. Dentro de las enfermedades en vid producidas por bacterias están el agallamiento de la corona cuyo agente causal es *Agrobacterium tumefaciens* (E.F. Smith y Townsend) Conn y se caracteriza por la formación de agallas en la parte inferior del tronco, la roya bacteriana ocasionada por *Xanthomonas ampelina* Panagopoulos 1969 que ataca al tejido vascular produciendo roya y canchros, así como también manchas foliares; por último la enfermedad de Pierce producida por *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* que produce manchas cloróticas en las láminas foliares que se van extendiendo hasta que la hoja se cae (Pearson y Goheen, 1994).

4.2.3 Virus

Los virus son transmitidos por vectores (nematodos o insectos) así como también por contacto mecánico con plantas infectadas, al ser podadas con material contaminado, por utilizar polen o semilla infectada, o por injerto. Los virus que se han señalado en vid son el "grapevine fanleaf virus" (GFLV), transmitido por *Xiphinema index* y *X. italiae*; el "tomato ringspot virus" (TomRSV) transmitido por *X. americanum*, *X. californicum* y *X. riversi*; el "tobacco ringspot virus" (TRSV) transmitido por *X. americanum* y *X. riversi*; el "peach roset mosaic virus" (PRMV) cuyos vectores son *X. americanum* y *Longidorus diversicaudatum* Eveleigh y Allen (Pearson y Goheen, 1994). Existen otros virus que son transmitidos por injerto como el virus del enrollamiento de la hoja o "grapevine leafroll virus" (Coelho y Montero, 2000).

4.2.4 Plantas parásitas

Las plantas parásitas pertenecen a las familias Convolvulaceae, Orobanchaceae y Santalaceae, pero no ocasionan graves problemas (Pearson y Goheen, 1994).

4.2.5 Nematodos

La mayoría de los nematodos no son parásitos, muchos de ellos se alimentan de hongos, bacterias, son depredadores u omnívoros que viven en una gran variedad de ambientes tanto marinos, como terrestres y dulceacuícolas. Una pequeña parte de ellos tienen hábitos parasíticos viviendo en asociación con las plantas o animales, afectando a sus hospedantes y provocando pérdidas significativas en la producción. Los nematodos parásitos de plantas han evolucionado generando diversas estrategias

parasíticas y una relación de alimentación con sus hospedantes para obtener los nutrimentos que necesitan para su desarrollo y reproducción. La mayoría se encuentran en el suelo, alimentándose de las raíces de las plantas, ya sea de células modificadas o no, mediante un estilete, con el cual penetran la pared celular e inyectan secreciones glandulares dentro del citoplasma, para obtener los nutrimentos necesarios del citoplasma de las células vegetales (Davis *et al.*, 2000).

Los nematodos parásitos de plantas han sido estudiados en Europa desde finales del siglo XIX. Sin embargo, no fue hasta el descubrimiento de los fumigantes del suelo, la mezcla del dicloropropano y dicloropropeno (DD), que los científicos fueron capaces de demostrar empíricamente los daños que éstos causaban en los cultivos, y por lo tanto los beneficios que se pueden obtener al utilizar métodos para su regulación (Sharma *et al.*, 1997).

Hasta ahora se conocen 24 géneros de nematodos fitoparásitos que incluyen especies económicamente importantes en cultivos. Aproximadamente el 10% de los cultivos a nivel mundial se han perdido a causa de la presencia de estos organismos (Whitehead, 1997).

Todos los nematodos fitoparásitos presentan un estilete (Figura 6G) que utilizan para perforar las rígidas paredes de las células de las plantas y alimentarse (Sijmons, 1993; Whitehead, 1997), pasan al menos parte de su vida en el suelo, como huevos, larvas, adultos o cualquier combinación de estas etapas. La mayoría son vermiformes y varían en longitud desde 0.2 a 5 mm de longitud, dependiendo de la especie y la etapa del ciclo de vida. Las hembras de algunos nematodos sedentarios parásitos de las raíces, son apenas visibles a simple vista pero la mayoría son transparentes y pequeños, por lo que no es posible distinguirlos en suelo o tejido vegetal sin ayuda de un microscopio (Whitehead, 1997). Estos nematodos comienzan su vida como organismos de vida libre en el suelo; pero necesitan encontrar una planta hospedera y establecer una relación nutricional adecuada para poder completar su ciclo de vida (Keen y Roberts, 1998).

La mayoría atacan tejidos que se encuentran debajo del suelo, otros prefieren tallos, hojas, flores, semillas o combinaciones. Pueden alimentarse ecto-, semi endo- o endo-parasíticamente (Whitehead, 1997). En general pertenecen a dos órdenes: Tylenchida y Dorilaimida. Los tilénquidos muestran una gran cantidad de adaptaciones y comprenden tanto los ectoparásitos migratorios y sedentarios como los endoparásitos (Barthels, *et al.* 1997). El orden Tylenchida se caracteriza por poseer un estilete hueco con nódulos basales, movido por músculos que le permiten introducirlo dentro de la célula vegetal (Whitehead, 1997). Los nematodos parásitos de raíces se dividen en dos grupos: el primero incluye los nematodos migratorios como *Rotylenchus* y *Pratylenchus*, que toman la mayor parte del contenido celular antes de cambiar su sitio de alimentación y el segundo grupo está constituido por nematodos sedentarios como *Globodera* y *Heterodera* conocidos como formadores de quistes, los nematodos agalladores donde encontramos al género *Meloidogyne* y los falsos agalladores como *Nacobbus*; ambos grupos provocan grandes pérdidas en los cultivos (Sijmons, 1993).

Los nematodos sedentarios infectan una amplia variedad de cultivos económicamente importantes causando grandes pérdidas en la agricultura que pueden alcanzar cantidades de hasta 100,000 millones de dólares por año a nivel mundial (Opperman y Bird, 1998). Como su nombre lo indica

este tipo de nematodos no se desplazan durante su alimentación, por lo que requieren estructuras altamente especializadas dentro de las raíces de sus hospedantes (Sijmons, 1993). Para encontrar el sitio del cual se van a alimentar, prueban las células vegetales mediante el estilete tomando el contenido celular, otros se establecen dentro de sus hospedantes e inducen sitios de alimentación especiales dentro de las raíces (células gigantes o sincicios), los cuales les proporcionan alimento suficiente para su crecimiento y reproducción. Para esto, secretan enzimas digestivas en la base del esófago que son bombeadas hacia el bulbo medio muscular (Figura 6G) del esófago, pasan a través del estilete y son inyectadas dentro de la célula vegetal. El contenido celular predigerido es introducido a través del esófago dentro del intestino (Whitehead, 1997). De esta manera inducen una división y alargamiento anormal de las células, formando células gigantes o sincicios en la planta hospedera para su beneficio. Las hembras ya establecidas deben evitar matar a la célula con el fin de asegurar el alimento requerido posteriormente (Keen y Roberts, 1998).

Los nematodos pueden también clasificarse de acuerdo con sus hábitos alimenticios en nematodos ectoparásitos, endoparásitos migratorios y endoparásitos sedentarios (Hussey, 1989). Existen nematodos agalladores de semillas y hojas como: *Anguina* y *Aphelenchoides*; nematodos de troncos y tallos tales como: *Bursaphelenchus*, *Rhadinaphelenchus* y *Ditylenchus*; los nematodos parásitos de raíces se dividen en ectoparásitos como *Crictonemella*, *Hoplolaimus*, *Xiphinema*, *Longidorus*, *Trichodorus*, *Belonolaimus*, *Paratrichodorus* y *Tylenchorhynchus*; semi endoparásitos *Helicotylenchus*, *Rotylenchus* y *Tylenchulus*; endoparásitos migratorios *Hirschmaniella*, *Pratylenchus*, *Radopholus* y *Scutellonema*; y endoparásitos sedentarios *Globodera*, *Heterodera*, *Meloidogyne* y *Nacobbus* (Whitehead, 1997).

Las especies que pertenecen al orden Dorylaimida tienen un estilete diferente, por lo que deben alimentarse de células cuyo contenido celular esté predigerido y utilizan el estilete para raspar (Whitehead, 1997). Comprende los nematodos ectoparásitos migratorios, algunos de estos pueden alimentarse en un sitio particular durante largos periodos de tiempo como *Xiphinema* spp en lugar de buscar a lo largo de la raíz. Estas especies ectoparásitas tienen gran importancia económica debido a su capacidad para transmitir virus y provocar daño mecánico a la raíz (Taylor y Brown, 1981).

Los síntomas que producen son variados y a menudo de naturaleza no específica, ya que pueden confundirse con deficiencias nutrimentales o con daños provocados por otras plagas y enfermedades (Whitehead, 1997). Producen síntomas tanto en raíz como en los órganos aéreos de las plantas. Cuando los nematodos parasitan las raíces, en éstas se pueden observar nudos, agallas o lesiones necróticas, proliferación y pudrición de raíces; y en las partes aéreas algunas veces se presenta menor crecimiento, síntomas de deficiencias nutrimentales como la clorosis, marchitamiento, menor producción de follaje y frutos. Cuando los nematodos parasitan las partes aéreas de la planta los síntomas característicos son agallas, pudriciones y lesiones necróticas, enrollamiento o deformación de hojas y tallos, y desarrollo anormal de las partes florales. Algunos pueden encontrarse en las semillas de las gramíneas formando agallas (Agrios, 1991).

4.2.5.1 Nematodos en la vid

Los primeros registros de nematodos parásitos de la vid en Estados Unidos fueron realizados por Neal en 1889, quien describió el nematodo agallador *Anguillula* sp. afectando a muchas plantas cultivadas y no cultivadas en Florida, incluyendo varias especies de *Vitis*. Posteriormente otros investigadores contribuyeron al conocimiento de los nematodos asociados a la vid, registrándose también *Xiphinema americanum*, *X. index*, *Pratylenchus vulnus*, *Criconemella xenoplax*, *Paratylenchus hamatus*, *Trichodorus* spp. y *Tylenchulus semipenetrans* (Nickle, 1984).

En Colombia se realizó un estudio de identificación de nematodos en vid y se encontraron seis géneros asociados con este cultivo con una gran importancia de acuerdo a porcentajes de frecuencia en suelo y raíces: *Rotylenchulus*, *Helicotylenchus*, *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Xiphinema* y *Criconemella*. Siendo *Meloidogyne* quien presentó las poblaciones más altas con un máximo de 16, 424 individuos por gramo de raíces secas y 65 por 100 cm³ de suelo, seguido por *Rotylenchulus* con 692 y 734 en raíces y suelo, respectivamente. Se observaron en algunas fincas agallas o nudosidades en raíces producidas por *Meloidogyne* (Rubiano y Varón de Agudelo, 1994).

Otro género de importancia es *Pratylenchus* y las especies que se han encontrado en vid son *P. vulnus*, *P. neglectus*, *P. brachyurus* y *P. thornei*. Los síntomas que presentan las raíces de plantas de vid infectadas con este nematodo son: las lesiones necróticas que varían en tamaño y color. Estas lesiones aparecen inicialmente como manchas color pardo claro, y después se toman oscuras, se alargan y posteriormente rodean la raíz. También puede presentarse una proliferación radical y daño severo en la punta de las raíces (Nickle, 1984).

Además se ha señalado en este cultivo a *Criconemoides xenoplax*. Este nematodo es menos importante que los anteriores debido a que es ectoparásito y por lo tanto los síntomas que las plantas presentan sólo consisten en manchas necróticas en la raíz (Nickle, 1984).

4.2.5.1.1 *Meloidogyne* sp. Goeldi 1887

Uno de los mayores obstáculos para la adecuada producción de alimentos es el daño producido por nematodos fitoparásitos, especialmente el grupo de los nematodos agalladores como *Meloidogyne* spp., los cuales afectan grandemente los cultivos y reducen de manera significativa la calidad de la producción (Sasser, 1980). Los daños que producen en las raíces ocasionan una disminución en la absorción de nutrimentos de la planta, que dan como resultado deficiencias nutricionales que afectan de manera significativa la productividad y pueden llegar a matar a la planta (Melakeberhan y Ferris, 1989; Cohelo y Montero, 2000). Al parecer, solamente cuatro de las 60 especies de *Meloidogyne* conocidas provocan un daño económico significativo: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla* (Barker, et al., 1998).

Este género comprende el grupo de nematodos conocidos comúnmente como agalladores, ampliamente distribuido en todo el mundo (Nickle, 1984), y es el principal causante de la mayor parte de las pérdidas en los cultivos (Opperman, et al., 1994). Pertenece a la familia Heteroderidae y a la

subfamilia Heteroderinae (Chitwood, 1949; Mai y Lyon, 1975), tienen dimorfismo sexual marcado, siendo los machos vermiformes y las hembras en forma de pera a esféricas con un cuello alargado. Los machos tienen una cabeza con dos mejillas y pueden presentar uno o dos testículos. El cuerpo de la hembra es blando, la cutícula presenta ligeras estrías transversales que dan la apariencia de una huella digital en la región perineal y nunca forma un quiste, la vulva es subterminal con dos labios hemisféricos. El ano está situado en el borde del labio posterior de la vulva. Los huevos no son retenidos dentro de la hembra, sino depositados en una matriz gelatinosa. Las larvas que emergen del huevo, J2 tienen un estilete de 10 μ m (Chitwood, 1949).

Los miembros de este género son extremadamente adaptables y sus caracteres morfológicos muestran una variación considerable, es difícil encontrar dos ejemplares iguales. Sin embargo, las series de patrones generales son similares, al igual que otras estructuras, y las progenies de una sola hembra son parecidos en cuanto a morfología y hospedantes que parasitan (Chitwood, 1949).

Los patrones perineales en la hembra adulta son la característica más importante para la identificación de las especies de este género, otras características que deben tomarse en cuenta son la morfología de la cabeza y el estilete para lo cual se mide su tamaño, la forma y tamaño de sus nódulos, y la distancia entre éstos y la desembocadura de la glándula esofágica dorsal (Eisenback, *et al.*, 1980). Por otra parte, la morfología y morfometría de la cabeza y estilete de los machos (Eisenback y Hirschmann, 1981) y de la larva J2 debe ser tomada en cuenta (Eisenback, 1982).

Dentro de este género hay tres especies que tienen importancia en vid: *M. incognita* Kofoid y White, 1919, *M. javanica* Treub, 1885 y *M. arenaria* Neal, 1889. Los síntomas se presentan en manchones o áreas definidas, pero se sabe que dañan toda la plantación. Las plantas presentan generalmente una apariencia clorótica y menor producción de frutos. En la mayoría de los casos durante la infección por nematodos agalladores se forman hinchamientos o agallas en la raíz. Cuando se encuentra solo un nematodo las agallas son pequeñas, pero cuando se encuentran seis o más, se presentan hinchamientos mucho mayores. Esto es también característico de infecciones avanzadas (Nickle, 1984). También se puede observar un pobre crecimiento de la planta, uvas descoloridas y campos reducidos. Las malformaciones tisulares no se pueden observar en las partes aéreas, pero las raíces secundarias presentan severas deformaciones debido a la formación de agallas por la presencia del nematodo invasor, lo cual reduce la toma de nutrimentos y agua por parte de la planta, resultando en una reducción del crecimiento y por lo tanto de la producción. Los síntomas en las partes aéreas son más marcadas en plantas que se encuentran en suelos arenosos, ya que las deficiencias nutritivas son más evidentes (Barker, 1998).

Las hembras depositan más de 1,500 huevos dentro de una matriz gelatinosa, que generalmente se encuentra fuera de la raíz, aunque también pueden encontrarse rodeados de tejido radical. Los estadios larvales dentro del huevo mudan una vez, emergiendo del huevo el segundo estadio móvil, los que localizan su sitio de alimentación e invaden las raíces (Pearson y Goheen, 1994), penetrando la corteza de la punta de las nuevas raíces, quedando la cabeza en contacto con el sistema vascular. Dentro de su hospedante el nematodo muda tres veces y crece hasta convertirse en una hembra adulta

piriforme (Nickle, 1984; Pearson y Goheen, 1994). El ciclo completo tiene una duración de 25 días a una temperatura de 27°C (Pearson y Goheen, 1994).

4.2.5.1.2 *Xiphinema* spp.

Otro género importante es *Xiphinema*, que cuenta con 12 especies descritas, de las cuales solamente dos tienen importancia debido al daño que provocan en vid: *X. index* y *X. americanum* Cobb 1913, esta última se encuentra en todas las áreas cultivadas con vid en California (Nickle, 1984). Ambas especies tienen importancia debido a que dañan la planta al alimentarse de ella y además son transmisores de virus como el grape fanleaf virus o GFLV (Pearson y Goheen, 1994), lo cual aumenta las pérdidas en la producción de vid (Southey, 1960; Nickle, 1984; Whitehead, 1997).

La especie con distribución más amplia es *X. americanum*, la cual se encuentra en todas las áreas cultivadas con vid en California. Los síntomas que se presentan son hinchamientos terminales en las raíces, cese de alargamiento de raíces y necrosis extensiva de las raíces principales dando apariencia de escoba de bruja debido a la proliferación radical, hinchamientos desiguales en la raíz, produciendo una curvatura de 45 a 90° o más. Se presentan agallas en las puntas de las raíces, las cuales son inducidas por la alimentación de las larvas y las hembras (Nickle, 1984).

El daño que produce *X. americanum* es principalmente la inhibición de crecimiento de raíces de alimentación y algunas veces se presenta distorsión, pero la necrosis y las malformaciones no se presentan como en aquellas plantas infectadas con *X. index*. Generalmente hay crecimiento pobre del sistema radicular. Las células cercanas al sitio de alimentación presentan hipertrofia, que da como resultado la formación de agallas o hinchamientos. Se desarrollan células gigantes multinucleadas y células hipertrofiadas mononucleadas en los sitios de alimentación. También se puede observar una separación o ruptura incompleta de paredes y una formación irregular de las mismas en las células gigantes. Algunas veces las paredes celulares se rompen vaciando el citoplasma. Se ha observado también necrosis a varias profundidades de la corteza con tejido fundamental de felógeno. En general las plantas atacadas por *X. index* producen pocas raíces (Nickle, 1984).

Como ya se mencionó anteriormente, las especies de este género también tienen una gran importancia debido a que son vectores de virus, transmitiéndolos a sus plantas hospederas, un ejemplo es el GFLV, el cual tiene una gran importancia, ya que puede acabar con el cultivo, estas plantas pueden sobrevivir pero no producen fruto de una manera eficiente. *X. diversicaudatum* y *X. italiae* también pueden actuar como vectores de virus (Nickle, 1984). Ambos son vectores del GFLV y *X. americanum* transmite el tomato ringspot virus o TomRSV y el tobacco ringspot virus o TRSV (Southey, 1960; Pearson y Goheen, 1994).

4.2.5.1.3 *Pratylenchus* spp. Filipjev 1936

Las especies de este género que se han encontrado en vid son *P. vulnus*, *P. neglectus*, *P. brachyurus* y *P. thomei* (Nickle, 1984).

Los síntomas que presentan las raíces de plantas de vid infectadas con este nematodo son las lesiones necróticas que varían en tamaño y color. Estas lesiones aparecen inicialmente como manchas color pardo claro que después se toman oscuras, se alargan y posteriormente rodean la raíz. También puede presentarse una proliferación radical y daño severo en la punta de las raíces (Nickle, 1984).

4.2.5.1.4 *Tylenchulus semipenetrans* Cobb

El primer registro de este nematodo en vid fue realizado en 1956 en California y en este mismo año se encontró también en Australia. A partir de ese momento se registró en viñedos de India, Egipto y Filipinas. Posteriormente se encontró con mayor frecuencia, principalmente en los viñedos, donde anteriormente había cítricos. Es considerada una de las especies de nematodos más patógenas en vid. Reduce de manera significativa el vigor de la planta, reduciendo inevitablemente y de manera gradual el cultivo, provocando graves pérdidas económicas (Pearson y Goheen, 1994).

4.3 Alteraciones estructurales

Varios géneros de nematodos fitoparásitos de la familia Heteroderidae y algunos de la familia Tylenchidae (Jones, 1981b), han evolucionado íntimamente con sus hospedantes, desarrollando sitios de alimentación especializados dentro de los tejidos vegetales. La naturaleza de la interacción entre los nematodos y las células de alimentación ha llevado en la mayoría de los casos a una pérdida en la movilidad, las hembras adultas se han vuelto endoparásitas sedentarias (Jones, 1981a), y se consideran parásitos verdaderos porque establecen una interacción duradera con sus hospedantes, induciendo alteraciones profundas en la morfología de las células de sus hospedantes (Sijmons, 1993).

La formación del sincicio es una parte integral de la relación parásito-hospedante en los nematodos pertenecientes a la familia Heteroderidae. Todos los miembros de esta familia son endoparásitos sésiles, inducen la formación de sitios de alimentación especializados con alta actividad metabólica del cual dependen para la obtención de sus nutrimentos y deben regular sus demandas de manera que las células hospederas permanezcan con vida (Zuckerman, *et al.*, 1971; Jones, 1981a). La actividad incluye la síntesis de proteínas y actividad enzimática (Zuckerman, *et al.*, 1971). Durante la alimentación los nematodos secretan ciertas sustancias metabólicamente activas que inducen un aumento en la densidad citoplásmica de las células del hospedante, pérdida de una vacuolación normal, proliferación de organelos celulares y alargamiento de núcleos y nucléolos. Estas estructuras pueden clasificarse en cuatro diferentes tipos: células discretas no hipertrofiadas, células gigantes solitarias uninucleadas, sincicios y células gigantes multinucleadas (Sijmons *et al.*, 1994).

En 1887 Treub observó por primera vez células multinucleadas adyacentes a la región de los labios en los nematodos (Zuckerman, *et al.*, 1971). Al formar estructuras de alimentación se asegura un suplemento de nutrimentos adecuado para el desarrollo rápido del parásito. En el caso de los nematodos formadores de quistes el sitio de alimentación se conoce como sincicio y en el caso de los nematodos agalladores se conocen como células gigantes (Sijmons, 1993). Debido a esto los nematodos

sedentarios han sido de gran interés y se ha tratado de estudiar la interacción que dichos organismos establecen con sus hospedantes (Barthels, *et al.*, 1997).

Los mecanismos por medio de los cuales las células hospedadoras son modificadas varían, pero en términos funcionales los resultados finales son similares, estas células son capaces de tomar nutrimentos del sistema vascular de las plantas hospedadoras, y estos son ingeridos por los nematodos (Jones, 1981b). En uno de los procesos de modificación, las células vecinas se fusionan debido a la degradación y el rompimiento de las paredes, dando como resultado los sincicios; y aquellos en los cuales la degradación de las paredes y la fusión celular no son evidentes se conocen como células gigantes. Ambas se comportan de manera similar en cuanto a que proporcionan nutrimentos para el desarrollo de los nematodos (Jones, 1981a).

A diferencia de los tilénquidos, los doriláimidos ectoparásitos se alimentan en diferentes sitios, principalmente en las puntas de las raíces, las cuales aumentan de tamaño desarrollándose agallas terminales. Con sus estiletes en forma de flecha, estos nematodos perforan una columna de células epidérmicas, inyectando secreciones para predigerir el contenido celular. Posteriormente se rodean de células meristemáticas las cuales son responsables de la formación de las agalla (Barthels, *et al.*, 1997).

4.3.1.1 *Meloidogyne* sp.

El proceso de infección se inicia una vez que la forma joven (J2) se encuentra dentro de la raíz, detrás de la zona de alargamiento, se orientan hacia la punta de la raíz y migran intra o intercelularmente entre las células corticales hacia el cilindro vascular (Jones y Northcote, 1972) hasta la punta de la raíz. Esto probablemente acompañado de una combinación de ligeros empujones del estilete y secreciones glandulares. Cuando alcanzan el meristemo radical dan vuelta, provocando un gran daño celular y migrando hacia arriba dentro del cilindro vascular que está diferenciándose hasta que llegan a la zona del protoxilema (Sijmons *et al.*, 1991; Wyss *et al.*, 1992b). En esta etapa las células parenquimatosas específicas del xilema son seleccionadas y forman un sistema de células gigantes (Sijmons *et al.*, 1991; Wyss *et al.*, 1992b). Cada célula gigante comienza a formarse mediante la inyección de secreciones salivales que se originan en la glándula esofágica dorsal del nematodo (Hussey, 1989; Almeida *et al.* 1999) y son de una naturaleza diferente a aquellas secretadas durante la migración. Las secreciones también inducen respuestas celulares como divisiones nucleares sin citocinesis, invaginación de las paredes celulares e hipertrofia (Jones, 1981a; Jones, 1981b). El agallamiento del tejido cortical que rodea las estructuras de alimentación y el crecimiento del nematodo acompaña este proceso. Debido a la reducción del área del xilema, el flujo de agua es restringido (Dorhout *et al.*, 1988).

La infección con nematodos agalladores estimula la formación de un gran número de células gigantes (entre 2 y 12) en los tejidos hospedantes (Jones, 1981b). Al principio se pensaba que el sitio de alimentación se formaba a partir de la disolución de las paredes de las células no diferenciadas cercanas al cilindro central, seguido de una combinación de mitosis sin citocinesis y posteriormente un rompimiento de paredes, hasta llegar a una condición multinucleada, induciendo a la formación de las células gigantes; pero ahora se sabe que se desarrollan a partir de mitosis repetidas sin citocinesis (Huang y

Maggenti, 1969; Hansen, *et al.*, 1996) y ciclos de endoreduplicación (Jones y Payne, 1978; Wiggers, *et al.*, 1990). La hipertrofia nuclear y celular tienen lugar aparentemente al mismo tiempo que el depósito de paredes celulares que forman invaginaciones a lo largo del xilema para facilitar el transporte de solutos. Se han observado un citoplasma denso con un aumento en el número de organelos, proteínas y numerosas vacuolas pequeñas (Almeida, *et al.*, 1999).

Durante las primeras 24-48 horas después de la infección, los núcleos de las células hipertrofiadas se localizan en el citoplasma periférico. Los núcleos y nucléolos de las células gigantes iniciales se alargan, y por seis días los núcleos asumen un perfil ameboide. A menudo encontramos más de un nucleolo por núcleo. La mayor parte del alargamiento de las células gigantes inducidas a lo largo de las puntas de las raíces se da durante los primeros 3-4 días mientras las células están vacuoladas. Conforme el contenido citoplásmico aumenta, las células se expanden lateralmente. La división de las células que las rodean (hiperplasia) permite la expansión sin romper otras células radicales. Entre los 3 y 6 días después de la inducción, el xilema y los elementos cribosos comienzan a diferenciarse en varios sitios alrededor de las células gigantes (Zuckerman y Rohde, 1981).

Conforme el nematodo se desarrolla y la demanda de nutrientes aumenta por el depósito de huevos, el citoplasma de las células gigantes muestra signos de intensa actividad metabólica. Los núcleos se observan altamente lobados y heterocromáticos con poros nucleares prominentes y numerosos, indicando un rápido intercambio núcleo-citoplasma. Los granos de almidón se pierden y las vacuolas secundarias se vuelven más numerosas y pequeñas. Finalmente, el citoplasma se extrae conforme la célula gigante se hace más vieja, dejando algunos organelos rodeados por un poco de citoplasma (Zuckerman y Rohde, 1981). La hembra se establece entre las células modificadas y utiliza su estilete para alimentarse absorbiendo el contenido celular sin matar a la célula (Keen y Roberts, 1998). Dentro de las células gigantes, los engrosamientos de las paredes son depositados en las paredes adyacentes a los elementos vasculares. Algunas veces los engrosamientos son irregulares y dan la apariencia de perforaciones (Zuckerman y Rohde, 1981).

La función de las células modificadas es proveer al nematodo de todos los nutrientes que necesita para su crecimiento y reproducción. Estos nutrientes son obtenidos por medio del estilete hueco el cual es insertado directamente dentro del citoplasma y provienen de las estructuras modificadas y las células que las rodean. El que las células posean invaginaciones de las paredes implica que hay un aumento en el transporte de solutos a corta distancia entre el apoplasto (compartimiento de la pared celular) y el simplasto (compartimiento citoplásmico). de transferencia no son las únicas células especialmente modificadas para un transporte rápido, el transporte también se realiza mediante los plasmodesmos dentro del simplasto. Los sincicios y células gigantes producidas por *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera* y *Rotylenchulus macronatus* presentan invaginaciones de la pared, a diferencia de los sincicios inducidos por *Rotylenchulus reniformis* o *Nacobbus* spp. La presencia de estas invaginaciones aumenta la superficie de la membrana 10-15 veces y parece que su presencia está relacionada con la carencia de un gran número de plasmodesmos entre las paredes de las células modificadas y sus vecinas; de la misma manera, cuando no se presentan invaginaciones de la pared

existe un mayor número de plasmodios (Jones, 1981b). Las células de la raíz que rodean a las células gigantes se dividen repetidamente dando origen a una agalla (Almeida, *et al.*, 1999).

La capacidad de los nematodos para vivir en las plantas hospedadoras se debe a una gran cantidad de genes del parasitismo. La mayoría de éstos produce adaptaciones morfológicas de los nematodos para el parasitismo en plantas. Varios genes involucrados en este proceso han sido estudiados por varios investigadores (Davis, *et al.*, 2000). También se han estudiado algunos genes involucrados en la respuesta de las plantas al parasitismo por estos organismos (Dasgupta y Ganguly, 1975; Wyss y Grundler, 1992a; Sijmons, 1993; Niebel, *et al.*, 1993; Opperman y Taylor, 1994; Hansen, *et al.*, 1996; Barthels, 1997; Cai, *et al.*, 1997; Keen y Roberts, 1998; Almeida, *et al.*, 1999).

4.3.2 Cambios bioquímicos (Histoquímica)

Las paredes celulares están compuestas principalmente por celulosa y pectina, lo que las hace resistentes al ataque de patógenos y solamente pueden ser degradadas por organismos productores de una mezcla de enzimas activas (Popeijus, *et al.*, 2000).

Los nematodos parásitos de tejidos vegetales provocan daño mecánico con sus estiletes, secretando enzimas hidrolíticas provenientes de sus glándulas esofágicas, que disuelvan las paredes celulares y pueden moverse entre las células, también actúan como enzimas digestivas. Se han encontrado una gran cantidad de hidrolasas. Las más comunes son las celulasas, proteasas y amilasas. Las enzimas pectolíticas y celulolíticas de los nematodos destruyen las endohidrolasas de las plantas. Algo importante es que al parecer las oxidoreductasas están involucradas en la respuesta de resistencia o susceptibilidad del hospedante, ellas son capaces de modificar cualquier componente celular fisiológicamente activo: fenoles, auxinas y aminoácidos. Al parecer los compuestos que los nematodos excretan, ácidos orgánicos, aminas, aminoácidos, etcétera; juegan un papel importante en el inicio de la interacción de la planta hospedadora como los nematodos (Giebel, 1974).

Tabla 1. Hidrolasas identificadas en raíces infectadas con *Meloidogyne* y *Pratylenchus* (Giebel, 1974).

HIDROLASAS	NEMATODO
Esterasas no específicas	<i>M. javanica</i> y <i>M. Hapla</i>
Fosfatasa alcalina	<i>Meloidogyne</i> spp.
Amilasa	<i>M. javanica</i>
Celulasa	<i>M. incognita</i> y <i>M. arenaria</i> , <i>P. penetrans</i> y <i>P. zeae</i>
Poligalacturonasa	<i>P. zeae</i>
Invertasa	<i>M. arenaria</i>
β -glucosidasa	<i>P. penetrans</i>
Pectinasa	<i>M. arenaria</i> , <i>M. hapla</i> y <i>P. penetrans</i>
Proteinasa	<i>P. redivivus</i>

Las enzimas pectolíticas y celolíticas que destruyen las células del hospedante pueden activar las endohidrolasas de las plantas. De esta manera, la actividad hidrolítica total en los sitios de alimentación puede aumentar. Actualmente la actividad de las enzimas pectolíticas y celolíticas incluye la oxidorreducción (Endo y Veech, 1969; Giebel, 1970; Veech y Endo, 1970). Las oxidoreductasas parecen tener relación con la respuesta de los tejidos vegetales; son capaces de modificar fisiológicamente los componentes activos de las células del hospedante, como los fenoles, auxinas y aminoácidos (Giebel, 1974). Se ha observado que las células modificadas presentan una mayor actividad enzimática comparada con la que presentan las células normales (Veech y Endo, 1969).

Por otro lado, los compuestos fenólicos juegan un papel importante durante la invasión por nematodos, ya que influyen en la actividad del ácido indolacético (AIA) y son precursores de la lignina. Ésta actividad de los fenoles sobre el AIA está estrictamente relacionada con la presencia de algunas enzimas en las raíces de su hospedante. Las peroxidasas por ejemplo, a través de los compuestos fenólicos pueden descomponer el AIA. Las tirosinasas pueden actuar como un agente oxidativo de los fenoles alterando su actividad como cofactores de la peroxidasa; las β -glucosidasas pueden liberar fenoles libres y estos pueden en cambio modificar la actividad de la AIA-oxidasa o peroxidasa (Giebel, *et al.*, 1971). Al parecer los cambios inducidos por los nematodos en las células de un hospedante susceptible son similares a aquellos producidos por el AIA exógeno (Fan y Machlachlan, 1967). El ácido indolacético y sus derivados son algunos de los compuestos que estimulan el desarrollo y la reproducción de los nematodos. La resistencia de las plantas a los nematodos se basa en la carencia de la atracción y en ella intervienen diferentes compuestos secretados por las plantas, los cuales pueden ser neutrales o atrayentes en las diferentes especies de nematodos. La resistencias depende también de la hipersensibilidad de los tejidos a la infección por estos organismos. La interacción parásito-hospedante estimula en el hospedante definitivo reacciones bioquímicas que provocan cambios histológicos como la necrosis, matando al nematodo. La respuesta de las plantas al parásito depende no solamente de la

composición química de las plantas o tejidos afectados, sino también de la composición cuantitativa y cualitativa de la secreción y excreción del nematodo (Giebel, 1974).

Cuando el hospedante es susceptible a la invasión, se presenta primero un daño celular debido a la penetración, solamente pocas células son dañadas, presentando lesiones conspicuas, necrosis o decoloraciones; agallas, se forman sincicios multinucleados o células gigantes, varios grados de hipertrofia e hiperplasia, y disminuye la actividad meristemática (Viglierchio, 1971). Los fenoles son los mejores factores conocidos involucrados en la respuesta susceptible resistente. Existe una correlación distinta entre el grado de resistencia de las plantas y los fenoles presentes en el tejido vegetal (Giebel, 1970).

Los fenoles son los principales causantes de cuatro tipos de respuesta del hospedante durante una infección: oscurecimiento y una lenta formación de necrosis en plantas susceptibles a nematodos migratorios; rápido oscurecimiento y formación de necrosis que se extiende en plantas resistentes a nematodos migratorios; inhibición de la AIA-oxidasa cuando puede favorecer la acumulación de las auxinas y consecuentemente formación de células gigantes, agallas, etcétera en plantas susceptibles a nematodos endoparásitos sedentarios; estimulación de la AIA-oxidasa que favorece la descomposición de las auxinas y la necrosis en las plantas resistentes a nematodos sedentarios endoparásitos (Giebel, 1974).

Los productos indólicos están formados en los nematodos como productos finales en el metabolismo y son excretados por los nematodos endoparásitos dentro de los tejidos vegetales o por los ectoparásitos en la región de la raíz (Giebel, 1974).

4.3.2.1 *Meloidogyne* sp.

La matriz gelatinosa producida por *Meloidogyne* sp. tiene también actividad celulítica permitiendo el depósito de los huevos por parte de la hembra hasta alcanzar la superficie de la agalla. Esto es esencial en el proceso de diseminación, ya que permite a las formas jóvenes poco activas, migrar en el suelo y encontrar un nuevo hospedante inmediatamente después de la eclosión. En agallas grandes, la cavidad en la cual las masas de huevos están localizadas se forman también por la actividad lítica de la matriz gelatinosa. Se han realizado pruebas histoquímicas para las enzimas polifenol oxidasa y fosfatasa que pueden estar asociados con el proceso de lisis celular, encontrándose positivas (Bird y Rogers, 1965).

4.4 Control de nematodos

Su objetivo es prevenir las pérdidas significativas y la calidad en los cultivos de plantas susceptibles (Whitehead, 1997).

Los químicos que paralizan o matan a los nematodos se conocen de manera colectiva como nematicidas. Los nematicidas fumigantes tienen grandes presiones de vapor y se difunden rápidamente a través de la red de poros del suelo en fase de vapor. Matan a los nematodos difundiéndose lentamente mediante las películas de agua del suelo que rodea al nematodo. Todos los nematicidas son fitotóxicos y para prevenir el daño a las plantas debe ser aplicado en el suelo días, semanas o meses antes de la

siembra, de acuerdo al compuesto y a la temperatura del suelo durante la fumigación. Los compuestos más comúnmente utilizados son los hidrocarburos alifáticos halogenados o los compuestos precursores del metil isotiocianato o mezclas. Las semillas pueden ser desinfectadas algunas veces de manera exitosa con metil bromuro (Whitehead, 1997).

Una gran cantidad de nematicidas no fumigantes, no fitotóxicos han sido utilizados para controlar los nematodos parásitos de plantas. Los más ampliamente efectivos de estos son los organofosfatos y carbamatos, especialmente oximecarbamatos (Whitehead, 1997).

Para el control de los nematodos agalladores se utilizan los siguientes tratamientos químicos, por ejemplo 1,2-dibromo-3-cloropropano (DBCP), descubierto en 1950, funciona como fumigante y es efectivo al aplicarlo como una emulsión en agua de riego; aunque no es recomendable debido a que es persistente y permanece en el agua del suelo. Se recomiendan también algunos nematicidas no sistémicos, organofosfatos o carbamatos granulares solubles en agua. Las desventajas que presentan son la movilidad restringida en ciertos suelos y los residuos que permanecen en los frutos, así como los elevados costos del tratamiento. Otro tratamiento de los cultivos infectados con este tipo de nematodos es la replantación y la aplicación de metilbromuro y 1,3-dicloropropeno para fumigar el suelo, seguido de la colocación de plantas certificadas libres de nematodos (Pearson y Goheen, 1994).

Desgraciadamente, el tratamiento con nematicidas algunas veces es costoso y rebasa la cantidad de ganancias, además de la posibilidad de contaminación, por lo que se recomienda utilizar variedades resistentes o no hospederas, y manejo integrado, con el fin de disminuir la población de una manera más económica y sin riesgos de contaminación (Whitehead, 1997).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Características de la localidad

CABORCA SONORA

En 1966 se estableció el primer viñedo con miras comerciales en Caborca Sonora. Esta región agrícola se localiza en la parte Norte del Estado de Sonora y está situada entre los paralelos 30°15' y 31°10' de latitud norte y los meridianos 111°30' y 113°10' al oeste de Greenwich. Comprende los municipios de Caborca, Altar y Pitiquito, mismos que disponen de una superficie de riego de 1'000,000 ha. La mayor parte del área cultivada se encuentra el municipio de Caborca (Flores, *et al.*, 1975).

El clima según la clasificación de Köppen, modificada por Enriqueta García, es de tipo BW_h(x')e, que corresponde al seco semicálido, con lluvias en verano e invierno y extremoso (Flores, *et al.*, 1975). La temperatura media anual es de 21.1°C. Los meses que tienen las temperaturas medias más elevadas son de mayo a septiembre, y oscilan entre 22 y 30.8°C. Las temperaturas medias más bajas son de 12.1 a 14.3°C y se presentan en los meses de diciembre, enero y febrero. La máxima temperatura observada es de 44.3°C, en el mes de junio y la mínima de -4.0°C en el mes de enero (Flores, *et al.*, 1975).

5.2 Variedades de vid utilizadas

Se utilizaron las variedades "Thompson seedless", "Flame seedless" y "Superior seedless".

La variedad "Thompson seedless" es la principal uva de mesa consumida en el mundo, se siembran 20.000 ha en la India, 21.877 ha en Chile y 15.670 ha en EUA por su calidad (Cohello y Montero, 2000).

La variedad "Superior seedless" se conoce también como Sugraone o Festival y tiene excelentes características comerciales. Los racimos son medios, con un peso promedio de 300 g, generalmente cónicos y sus bayas son elípticas, llegando a medir 23 mm de diámetro con la aplicación de reguladores de crecimiento. Presentan una coloración verde con textura crujiente y un sabor especial. Debido a su éxito en el mercado de exportación es considerada la más importante de las variedades sin semilla (Cohello y Montero, 2000).

La variedad "Flame seedless" es el resultado de la cruce entre las variedades Cardenal, Sultanina, Red Malaga, Tifafih Ahmer y Moscatel de Alexandria. Son plantas vigorosas, con maduración precoz. Los racimos son compactos y cónicos, de tamaño mediano, con un peso promedio de 300 g. Las bayas son redondas y pequeñas, con una cáscara delgada y textura crujiente, coloración roja y sabor neutro con un endulzado especial. Es importante en Chile, Estados Unidos y Brasil (Cohello y Montero, 2000).

5.3 Procesamiento de las muestras

El presente trabajo se realizó con material proveniente de campos infectados con nematodos de la región de Caborca Sonora, los cuales fueron sometidos a diferentes tratamientos para el control de estos organismos: Rugby, Ditera y Defense. La variedad "Thompson seedless" fue tratada con Ditera, las variedades "Flame seedless" y "Superior seedless" fueron sometidas a tratamientos con Defense y Rugby. Para cada uno se utilizó un testigo proveniente de las mismas localidades, pero sin tratamiento.

Se realizó una sola aplicación en los cultivos, con las siguientes dosis: Ditera 20 L/ha, Rugby 12 L/ha y Defense 20 L/ha. La colecta de raíces se realizó a los 68 días después de la aplicación. Las raíces se colocaron en bolsas de plástico con suelo para transportarlas al laboratorio, donde se mantuvieron en refrigeración.

Para el estudio histoquímico e histopatológico, de cada una de las variedades se tomaron raíces secundarias agalladas y un testigo sin tratamiento. Como testigos absolutos se utilizaron trozos de las mismas raíces eligiendo zonas que no estuvieran afectadas por nematodos.

Las muestras se procesaron en el laboratorio de Histopatología Vegetal del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados como se describe a continuación.

5.4 Fijación e inclusión

Las raíces se lavaron con agua de la llave, se cortaron en pedazos de 1 cm aproximadamente, inmediatamente después se colocaron en frascos con CRAF III (ver apéndice) durante un tiempo mínimo

de 24 horas. Las raíces fijadas se envolvieron con tela tricot o tul, se colocaron en el cambiador automático de tejidos, C.O. Sakura finetechnical Mod. 4640-B, pasando por etanol (50%, 70%, 80%, 96% y 100%), una mezcla de etanol al 100% y xilol (1:1), seguido de dos cambios de xilol y dos cambios graduales en parafina, programándolo de manera que las muestras permanecieron en cada solución durante una hora y media. Una vez finalizado este proceso se colocaron uno o dos pedazos de raíz en cajas de papel de un tamaño aproximado de 1 cm x 0.5 cm con parafina fundida, tratando de eliminar las burbujas, con una aguja de disección caliente. Una vez que la parafina se solidificó completamente se retiró el papel, se montaron las muestras en bloques de madera y se cortaron los bordes de la parafina haciendo una pirámide, cuidando que los lados quedaran de un mismo tamaño para posteriormente realizar los cortes.

5.5 Cortes histológicos, tinción y montaje

Los cortes de 10 μm de grosor se realizaron en un micrótopo rotatorio modelo Spencer 820. Se colocaron en un baño de flotación con agua y un poco de grenetina a una temperatura de 60 °C para su montaje en el portaobjetos. Una vez escurridas las preparaciones, se colocaron en una estufa a una temperatura de 55°C para fundir la parafina e iniciar la desparafinación y tinción. Después de 24 horas se inició el proceso de tinción, para la cual se siguió la técnica de tinción cuádruple de Johansen con algunas modificaciones.

Esta técnica inicia con dos cambios de xilol seguidos de un cambio de xilol-etanol (1:1), etanol al 96% y etanol al 70%, cada uno de 5 minutos. Después del último cambio de alcohol, las preparaciones se transfirieron a safranina al 1 % (ver apéndice) donde permanecieron durante 25 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se enjuagaron las preparaciones una por una con agua destilada y se colocaron en cristal violeta al 0.5% durante 2 minutos, se enjuagaron de nuevo con agua destilada y después se pasaron por dos cambios de butanol, dos minutos en cada uno, para posteriormente continuar con la tinción con verde rápido al 1%, verde rápido-naranja G 1 y verde rápido-naranja G 2 donde permanecieron durante 20 minutos en cada uno. Por último se tiñeron con naranja G al 0.5% durante dos horas con la finalidad de que penetrara bien el colorante. Las preparaciones se enjuagaron una por una con butanol, tratando de enjuagarlas bien sin retirar demasiado colorante, ya que este se pierde fácilmente. Por último se sometieron a dos cambios de xilol, 5 minutos en cada uno de ellos y se montaron¹ (Johansen, 1940). El montaje se realizó utilizando resina sintética diluida en toluol al 60% y se colocaron las preparaciones en una estufa a 60°C para acelerar el secado.

Las observaciones se realizaron en un microscopio compuesto Carl Zeiss modelo K4 a 10X y 40X, para describir el daño producido en cada tratamiento, para lo cual se compararon con el testigo de cada una de las variedades. Las fotografías se tomaron en un microscopio óptico Carl Zeiss Ultraphot II con los objetivos de 10X, 40X y 100X.

5.6 Histoquímica

Se realizaron pruebas para la localización de la actividad de peroxidasas debido a la importancia que estas tienen durante la respuesta de la planta hospedera al nematodo.

Se utilizaron muestras de las siguientes variedades. "Thompson seedless" y "Flame seedless" sometidas a tratamientos con Ditera, Defense y Rugby. El testigo consistió en raíces no agalladas de vid de la variedad "Flame seedless" sometidas a un tratamiento con Rugby.

Las muestras de raíces frescas de vid infectadas con *Meloidogyne* sp. se cortaron en un micrótomo de congelación modelo 880. Se hicieron cortes de aproximadamente 30 μm -40 μm , los cuales se colocaron en un substrato que contenía de 1 mL de una solución saturada de cloruro de amonio, 1 mL de una solución de ácido etilendiamina tetra acético (EDTA) al 5%, 9 mL de una solución saturada de benzidina y una gota de peróxido de hidrógeno al 3%. En presencia de peroxidasas se observa una coloración azul (Giebel *et al.*, 1971).

Los cortes se montaron en glicerina para su observación y se tomaron fotografías bajo el microscopio óptico Carl Zeiss Ultraphot II.

VI. RESULTADOS

6.1 Histopatología

a) Variedad "Thompson seedless", Testigo (sin tratamiento)

Raíz sana

Corte longitudinal. De la parte exterior al interior se observó el felem constituido por tres hileras de células aplanadas y una capa de células parenquimatosas o felodermis, seguida del parénquima cortical cuyas células eran redondas y almacenaban tanto almidón como polifenoles. La mayoría de los polifenoles que se encontraron dentro de las células eran de color rojo o pardo oscuro, y grandes. Solamente en algunas células hubo polifenoles pequeños en forma de gránulos, pero eran escasos. Hacia adentro después del parénquima se observó el floema constituido por células alargadas y delgadas, cuyo parénquima también presentó polifenoles del mismo tipo que los que se encontraron en el parénquima cortical. Inmediatamente después se observó el cámbium vascular constituido por pocas hileras de células pequeñas de color azulado. El floema consistió en células alargadas o tubos con polifenoles en su interior y células de parénquima con granos de almidón y polifenoles. El tejido más interno fue el xilema que contiene células con paredes lignificadas: fibras y miembros de vaso (Figura 1A).

Corte transversal. Se pudieron observar de nuevo los tejidos antes mencionados, desde el exterior al interior fueron la peridermis o capa más externa de la cual se pudieron distinguir dos tejidos, el felem y la felodermis; y luego el parénquima cortical que consistió en células redondas y grandes con polifenoles oscuros y granos de almidón. Hacia el centro se tiene el tejido vascular: floema en la parte exterior, el cual presentó también polifenoles oscuros en parénquima y el xilema en el centro, el cual estaba formado por células con paredes gruesas con diámetro grande y células de esclerénquima o fibras que le dan soporte a la planta. Justo en el centro se encuentra un grupo de células de parénquima con paredes delgadas lignificadas (Figura 1B).

Raíz infectada

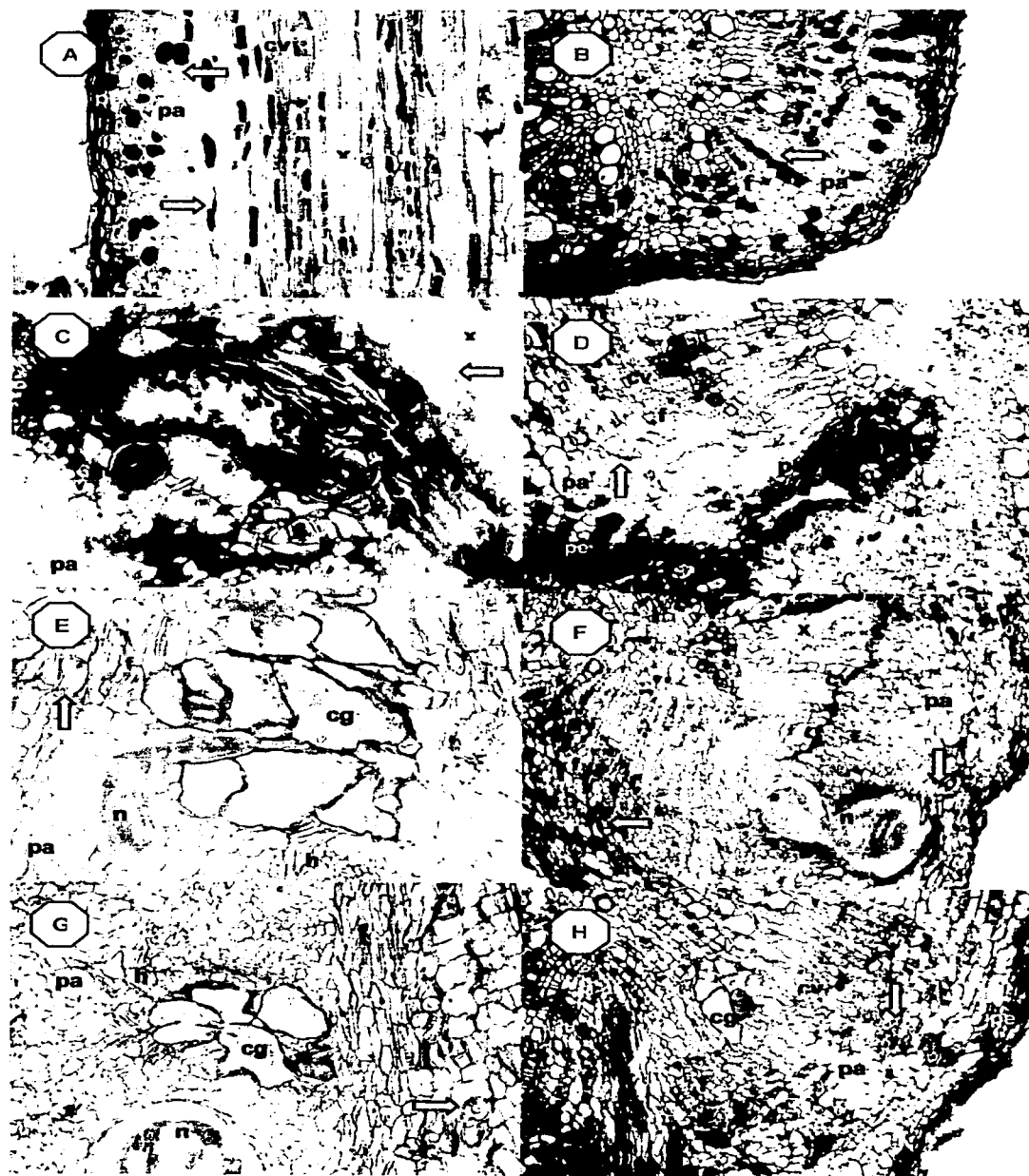
Corte longitudinal. En un trozo de raíz de aproximadamente 1 cm de longitud se observaron hasta nueve sitios de alimentación. Se observaron diferentes tipos de polifenoles en las raíces, los cuales se distinguieron por ser de color rojo, pardo o rosa y pueden ser grandes o pequeños, de forma irregular o regular, granulares, de una sola pieza, rectangulares, circulares, cuadrados o esféricos. Se observaron dentro de los haces vasculares: xilema y floema, y de las células del parénquima, algunas células completamente llenas de polifenoles. En las zonas cercanas al nematodo o en el floema cerca del nivel del sitio de alimentación fueron más delgadas, pequeños y transparentes, y la mayoría tuvieron forma irregular y de color amarillo, rojo o rosa. Alrededor del nematodo se observaron zonas color rojo brillante, lo cual indica la presencia de depósitos de lignina en las paredes y dentro de las células durante la

infección (Figura 1C). Estos depósitos también se localizaron en las paredes de las células del xilema (vasos), las cuales se observaron más gruesas y con un color más intenso que de lo normal. También en las células del xilema de esta zona se depositó suberina, por lo que se observaron células con un contenido color morado oscuro brillante. Estas zonas dañadas por la presencia del nematodo, consistieron en células necróticas rodeadas por peridermis. Hacia el interior, entre el xilema y el floema y abarcando también parte del parénquima cortical, encontramos algunas células con una coloración oscura, morado-negro, y polifenoles en su interior y paredes color rojo o amarillo refringente (Figura 1C). Pasando estas zonas oscuras se encontró el nematodo rodeado por células lignificadas. El parénquima cercano presentó hiperplasia, la cual se observó claramente como células más pequeñas que las demás con núcleos activos. El tejido vascular, tanto xilema como floema también presentó hiperplasia, lo que provocó desorganización de estos tejidos alrededor del nematodo (Figura 1E y G). Las células gigantes se pudieron observar en el tejido vascular entre el xilema y el floema, cerca de la cabeza del nematodo. Estas células gigantes presentaron un gran número de núcleos ovalados o redondos, color morado claro con nucléolos activos color rojo. Las paredes de estas células eran más gruesas que las que generalmente tienen las células del parénquima no hipertrofiadas y el citoplasma granular color verde-morado claro. Alrededor del sitio de alimentación, hubo hiperplasia en células del parénquima, los haces vasculares se desviaron. La cantidad de almidón en la raíz disminuyó hasta casi desaparecer en la zona cercana al nematodo y al sitio de alimentación.

Corte transversal. Se observó hiperplasia, representada por una mayor cantidad de células del parénquima que le dan forma a la agalla. Hubo acumulación de polifenoles pequeños y transparentes en parénquima cortical, xilema y floema a la altura del nematodo (Figura 1H). Las células de xilema más cercanas al nematodo presentaron un contenido morado y/o rojo brillante. Hubo formación de peridermis (Figura 1D) rodeando una zona necrótica. Se observaron de 2-3 sitios de alimentación, cada uno con 2-4 células gigantes (Figura 1F y H). También se pudo encontrar desorganización de los tejidos e interrupción de los haces vasculares debido a la presencia del nematodo (Figura 1D). Las células gigantes multinucleadas tuvieron paredes engrosadas color verde, núcleos color morado claro y nucléolos color morado oscuro o rojo. La cantidad de almidón almacenado en las células del parénquima cortical fue menor cerca del nematodo y al nivel en que se encontró este dentro de la raíz. Se observó gran cantidad de polifenoles grandes y opacos de color rojo en distintas tonalidades tanto en parénquima como en tejido vascular.

Figura 1. Cortes longitudinales y transversales de raíces de vid de la variedad "Thompson seedless" sin tratamiento 10X. **A:** Corte longitudinal de raíz sana. **B:** Corte transversal de raíz sana. **C:** Corte longitudinal donde se observa coloración roja en las células alrededor del nematodo. **D:** Corte transversal de raíz infectada, se distingue la formación de peridermis, hiperplasia y lignificación de células. **E:** Corte transversal de raíz infectada que muestra un sitio de alimentación formado por células gigantes multinucleadas, el corte del nematodo, hiperplasia y los polifenoles en floema y parénquima cortical. **F:** Corte transversal de raíz infectada, el nematodo se encuentra en el parénquima cortical. **G:** Corte longitudinal de una agalla, se observa el sitio de alimentación rodeado de floema que presenta hiperplasia, el parénquima cortical y vascular presenta de polifenoles pequeños, transparentes y de color claro en comparación con el testigo. **H:** Corte transversal donde se observa un sitio de alimentación localizado entre el xilema y el floema, los miembros de vaso con paredes lignificadas y las células de parénquima con polifenoles más pequeños que en el testigo. **cg:** célula gigante, **cv:** cámbium vascular, **f:** floema, **h:** hiperplasia, **l:** lignina, **n:** nematodo, **pa:** parénquima cortical, **pe:** peridermis, **x:** xilema. Los polifenoles y los granos de almidón están señalados con flechas amarillas y morado claro, respectivamente.

Figura 1. Cortes longitudinales y transversales de raíces de vid de la variedad "Thompson seedless" sin nematicida.



b) Variedad "Flame seedless", Testigo (sin tratamiento)**Raíz sana**

Corte longitudinal. Se distinguieron también los diferentes tejidos, comenzando por el más externo, la peridermis que consistió de cuatro capas de células aplanadas, el felem, del mismo tamaño y paredes teñidas de color morado debido a que contienen suberina; inmediatamente debajo de esta capa se encontró una capa de células pequeñas y aplanadas, la felodermis, con polifenoles pequeños en su interior. A un lado de ella se observó el parénquima cortical, en algunas de estas células hubo polifenoles gruesos y grandes de color rojo oscuro. El siguiente tejido fue el floema, el cual consistió en células de parénquima, fibras y tubos cribosos, también con polifenoles semejantes a los del parénquima cortical. El tejido que se tiñó de color verde azulado fue el cámbium vascular y se localizó entre el floema y el xilema. Este último constituido por células de paredes lignificadas, también con polifenoles en su interior; y formado por miembros de vaso, esclerénquima y parénquima (Figura 2A).

Corte transversal. Se pudieron observar perfectamente los tejidos de la raíz. En la parte externa se encontró la peridermis constituida por cuatro capas de células aplanadas felem, seguidas de dos capas de células pequeñas con polifenoles en su interior o felodermis. Posteriormente se encontró el parénquima que está formado por células redondas con paredes delgadas y algunas con polifenoles en su interior. Estos polifenoles fueron de diferentes tamaños y formas, pero siempre oscuros y con distribución es azarosa. Algunas veces también hubo acumulación de almidón en células parenquimatosas. Después se observó el sistema vascular, donde pudimos ver células del floema que también presentaron gran cantidad de polifenoles, después el xilema formado por parénquima y miembros de vaso; y entre estos dos tejidos el cámbium vascular que se distingue por sus paredes de color azul, a diferencia del xilema cuyas paredes celulares se tiñen de color rosa por la lignina que contienen y las paredes del floema son de color verde. En el xilema podemos encontrar tres tejidos diferentes: parénquima, fibras y miembros de miembros de vaso (Figura 2B).

Raíz infectada

Corte longitudinal. Se observaron las cuatro capas de felem y la felodermis, seguidas de células del parénquima cortical que presentaron escasa acumulación de almidón; sin embargo, éste solamente se observó en las células cercanas a la peridermis. Los polifenoles que se observaron tanto en parénquima como en floema fueron de color rojo, la mayoría pequeños y transparentes, delgados y esféricos; sin embargo, también los pudimos encontrar de color rojo oscuro. Principalmente alrededor de los sitios de alimentación es donde se observaron polifenoles pequeños y más delgados (Figura 2G). En el xilema también fue posible observarlos de color rojo o pardo, y fueron pequeños transparentes o de tamaño medio y oscuros. En xilema se pudieron observar células de color rojo o morado oscuro con paredes color rojo brillante y más gruesas (Figura 2E), y presentaron en su interior polifenoles esféricos. Alrededor de cada uno de los sitios de alimentación se observaron células de xilema con contenido color rojo y/o morado brillante, con peridermis alrededor y otras células grandes con un contenido oscuro y

polifenoles pequeños de color rojo brillante. Además se observaron hasta 8 sitios de alimentación formados por 2-4 células gigantes (Figura 2E).

Corte transversal. Dentro de los daños o alteraciones debidas a la presencia del nematodo se pudieron observar hiperplasia, desorganización celular, formación de peridermis, hipertrofia, colapso y necrosis celular. En las células del parénquima que rodeaban al nematodo hubo mucho almidón, aunque éste disminuyó en tejidos lejanos a este; es decir, en las capas de células más cercanas al nematodo se almacena una gran cantidad de almidón, pero en las demás células del parénquima fue escaso. La hiperplasia se pudo observar en floema y parénquima. El parénquima cercano a la zona afectada presentó grandes cantidades de polifenoles delgados, al igual que en el floema. La hipertrofia consistió en células gigantes multinucleadas con paredes gruesas, agrupadas en dos, lo que indicó la presencia de dos nematodos cercanos; cada uno de estos sitios de alimentación tiene 3-4 células gigantes (Figura 2F). Alrededor del nematodo las células más cercanas tuvieron polifenoles rojos transparentes agrupados, a diferencia aquellos observados en las células externas, donde eran opacos, pequeños y esféricos. La concentración de almidón cambió conforme se avanzó en el corte, siendo menor cerca del sitio de alimentación y del nematodo, donde llegó a ausentarse. El daño en xilema por la presencia del nematodo consistió en unas células con paredes anaranjadas gruesas refringentes con un contenido oscuro, casi negro; así como también algunos miembros de vaso con depósitos de material color morado y/o rojo brillante (Figura 2H). Se observó también peridermis rodeando los tejidos dañados (Figura 2D).

Figura 2. Cortes longitudinales y transversales de raíces de la variedad "Flame seedless" sin tratamiento 10X. **A y B:** Cortes longitudinal y transversal de raíz sana, respectivamente. **C:** Corte longitudinal donde se observa el sitio de alimentación cerca del nematodo, localizado en el xilema, hay también hiperplasia de parénquima vascular y por lo tanto desorganización celular. **D:** Corte longitudinal de raíz que muestra la zona cercana al nematodo, el cual está rodeado por peridermis y células con lignina, en parénquima la acumulación de polifenoles pequeños y transparentes se ve claramente. **E:** Corte longitudinal de una agalla, el xilema tiene lignificación, hay desorganización celular en el centro debido a la hiperplasia del parénquima vascular, y se pueden ver polifenoles pequeños en el parénquima cortical y en las células que rodean al nematodo. **F:** Corte transversal que muestra un sitio de alimentación como resultado de la hipertrofia de células del parénquima vascular, los polifenoles en floema y parénquima cercano al sitio de alimentación son pequeños, cerca de la peridermis se observan polifenoles grandes y oscuros. **G:** Corte longitudinal donde se distingue de izquierda a derecha, el xilema con lignificación, el floema cuyas células contienen polifenoles de distintos tipos, el parénquima cortical con polifenoles en su mayoría esféricos y la peridermis. **H:** Corte transversal que muestra unas células con contenido verde-gris oscuro con paredes gruesas rodeadas de células lignificadas y células de parénquima con gran cantidad de polifenoles. **cg:** célula gigante, **cv:** cámbium vascular, **f:** floema, **l:** lignina, **n:** nematodo, **pa:** parénquima cortical, **pe:** peridermis, **pv:** parénquima vascular, **x:** xilema. Los polifenoles están señalados con flechas amarillas y los granos de almidón con flechas morado claro.

Figura 2. Cortes transversales y longitudinales de la variedad "Flame seedless" sin nematocida.



c) Variedad "Superior seedless" Testigo (sin tratamiento)

Raíz sana

Corte longitudinal. Se distinguieron los mismos tejidos que en las demás variedades: peridermis, parénquima, floema y xilema. De la peridermis se pudieron observar el felem y la felodermis. El felem o corcho, compuesto por tres o cuatro capas de células muertas con suberina en sus paredes. La felodermis formada por células vivas de parénquima y el cámbium suberígeno o felógeno. En el parénquima hubo acumulación de almidón y polifenoles en algunas células. Su distribución fue azarosa y algunos de estos fueron pequeños. En las células que constituyeron el floema se observaron también polifenoles grandes y de un color mucho más oscuro que aquellos observados en el parénquima, o pequeños y transparentes de color pardo o rojo. El xilema formado por fibras, miembros de vaso y células de parénquima, también contenía polifenoles de color oscuro (Figura 3A).

Corte transversal. En el corte transversal se pudo observar la peridermis, el felem con cinco capas de células de las características antes mencionadas, la cual estuvo separada del parénquima por la felodermis que contenía polifenoles y almidón en el citoplasma. En las células más externas del parénquima se encontraron granos de almidón almacenados. Los polifenoles también fueron evidentes, y su tamaño varió abarcando casi todo el citoplasma de la célula o en agrupaciones de pequeñas esferas, pero su color fue siempre oscuro. El floema constituido por células parenquimatosas y tubos cribosos presentó polifenoles de menor tamaño y redondos. En el xilema se pudieron distinguir fibras y miembros de vaso además de células del parénquima, dentro de algunas células se pudieron observar polifenoles de distintos tipos, al igual que en el floema. Entre el floema y el xilema se observaron tres capas de células pequeñas aplanadas que correspondieron al cámbium vascular (Figura 3B).

Raíz infectada

Cortes longitudinales. Se pudieron apreciar las siguientes alteraciones: hiperplasia, hipertrofia, colapso, necrosis, acumulación de sustancias color morado o rojo en los miembros de vaso del xilema, y cambios en los polifenoles de las células cercanas. La hiperplasia se dio en células del parénquima, xilema y floema, lo que provocó una desorganización de estos tejidos y dio como resultado la formación de una agalla (Figura 3E). La hipertrofia consistió en células gigantes multinucleadas ubicadas en el cilindro vascular, que abarcaron el xilema, el floema y el cámbium (Figura 3C). El colapso y la muerte celular se observaron en los tejidos que rodearon al nematodo, principalmente en xilema, donde posteriormente se llevó a cabo un depósito de lignina o suberina (Figura 3G). En el floema que rodeó a las células gigantes se encontraron polifenoles pequeños y más o menos esféricos. En el parénquima, las células tuvieron polifenoles de color rojo y transparentes con formas irregulares, grandes o pequeños (Figura 3E).

Cortes transversales. Se distinguió bien la hiperplasia en el floema (Figura 3D), ya que se observó cerca del nematodo una zona con numerosas células pequeñas pertenecientes a este tejido. Los haces vasculares se interrumpieron debido a la presencia del nematodo, el cual se estableció en el floema, y cerca de su cabeza se observaron las células gigantes (Figura 3D). Hubo hasta tres sitios de

alimentación en un mismo corte, los cuales estuvieron formados de dos a tres células gigantes por cada uno. Los polifenoles alrededor se observaron como unas membranas de color rojo, delgadas, algunos granulares y acumulados en cantidades grandes, otros esféricos y pequeños también acumulados con una disposición heterogénea dentro de la célula (Figura 3F).

Figura 3. Cortes longitudinales y transversales de raíces de la variedad "Superior seedless" sin tratamiento 10X. **A y B:** Cortes longitudinal y transversal de raíces sanas, respectivamente. **C:** Corte longitudinal de raíz enferma, se observa claramente la cabeza del nematodo cerca de la célula gigante, localizada en floema. El parénquima cortical tiene polifenoles pequeños. **D:** Corte transversal de raíz que ilustra un sitio de alimentación formado por células gigantes en el tejido vascular, que como consecuencia presenta hiperplasia y desorganización celular; alrededor de este, las células de floema y parénquima cortical tienen polifenoles delgados y en menor cantidad que el testigo; las células de xilema tienen paredes más gruesas que las del testigo. **E:** Corte longitudinal donde el xilema tiene células lignificadas, el floema presenta polifenoles pequeños en el interior de las células que lo componen, al igual que el parénquima cortical. **F:** Corte transversal de raíz dañada, hay una gran cantidad de polifenoles pequeños, aunque oscuros, y se observa la formación de peridermis. **G:** Corte longitudinal donde encontramos el nematodo en el floema en esta región son muy gruesas por la lignificación, y en su interior tienen un contenido oscuro; el floema presenta hiperplasia. **cg:** célula gigante, **cv:** cámbium vascular, **f:** floema, **l:** lignina, **n:** nematodo, **pa:** parénquima cortical, **pe:** peridermis, **x:** xilema. Los polifenoles están señalados con flechas amarillas y el almidón con flechas color morado claro.

Figura 3. Cortes transversales y longitudinales de la variedad "Superior seedless" sin nematocida.



d) Variedad "Thompson seedless", tratamiento Ditera

Raíz sana

Corte longitudinal. La peridermis estuvo constituida por tres o cuatro capas celulares de felem, una capa de células de felógeno, y por último la felodermis. Debajo de ésta se encontró el parénquima con granos de almidón en gran cantidad en casi todas las células, y en otras polifenoles de color naranja-pardo o rojo oscuro. El floema consistió en células alargadas y delgadas con polifenoles en su interior, hacia el interior le siguió el cámbium vascular y por último el xilema cuyas células parenquimatosas presentaron polifenoles de distintos tamaños (Figura 4A).

Corte transversal. Se observaron los mismo tejidos. La peridermis en la parte más externa, células del parénquima redondas con polifenoles de distintos tipos y granos de almidón en la mayoría de las células. El floema consistió en células de diámetro mucho menor que las del parénquima cortical, con polifenoles y en algunas también hubo almidón. El cámbium vascular se encontró separando el xilema y el floema, y las células fueron de diámetro pequeño con paredes de color azul. En el xilema se distinguieron los miembros de vaso, el parénquima y las fibras, estas últimas son aquellas células pequeñas pero con paredes gruesas. Los miembros de vaso fueron los de diámetro mayor con paredes lignificadas (teñidas de color rosa) y las células de parénquima cuadradas o rectangulares y con paredes delgadas (Figura 4B).

Raíz infectada

Corte longitudinal. Las principales alteraciones que se pudieron distinguir fueron hiperplasia, hipertrofia y desorganización celular tanto en parénquima como en haces vasculares. La hiperplasia se reconoció porque hubo gran cantidad de células pequeñas y alargadas en uno de los lados de las células gigantes. Conforme se avanzó en los cortes se pudo ver que la acumulación de polifenoles en la raíz aumentó al alejarse del nematodo y del sitio de alimentación. La desorganización celular fue marcada ya que donde estaba el nematodo no fue posible distinguir cada uno de los tejidos. Las paredes del xilema cercano al nematodo adquirieron una coloración rojo brillante y su contenido fue granular de color rojo o morado. Al igual que en la muestra anterior hubo células con contenido oscuro, casi negro. El número de sitios de alimentación que se encontraron fue de tres en un solo corte. Las células gigantes se encontraron dentro del xilema y fueron largas, multinucleadas con nucléolos activos (Figura 4C).

Corte transversal. Se pudo observar desorganización de tejidos por la presencia de células parenquimatosas dentro del tejido vascular. Además se observaron cinco células gigantes multinucleadas con paredes gruesas, que se localizaron dentro del xilema y el floema (Figura 4D). Se observó mucho almidón en las células del parénquima cerca de la peridermis, y no se observó alrededor del sitio de alimentación. En cambio, los polifenoles se presentaron en altas cantidades dentro de las células del parénquima y floema. Conforme se avanzó en los cortes, se pudo ver que hay en cierto nivel células muertas totalmente cubiertas por lignina rodeadas de peridermis (Figura 4E). Éstas se

encontraron dentro de tejido parenquimatoso con hiperplasia. Se observó solamente un sitio de alimentación, y estuvo formado por cinco células gigantes (Figura 4D).

Figura 4. Cortes longitudinales y transversales de raíces de la variedad "Thompson seedless" tratadas con Ditera 10X. **A y B:** Cortes longitudinal y transversal de raíces sanas, las células del parénquima cortical tiene mucho almidón y polifenoles oscuros y grandes. **C:** Corte longitudinal de un sitio de alimentación, las células gigantes son muy largas y multinucleadas, se localizan en el tejido vascular y las células que lo rodean son vasos lignificados. **D:** Corte transversal donde se observan células gigantes con paredes engrosadas, localizadas entre el xilema y floema; las células del parénquima cortical y del floema contienen polifenoles pequeños y transparentes. **E:** Corte longitudinal de la región que rodea al nematodo y al sitio de alimentación, formado por peridermis que rodea unas células lignificadas con un contenido gris oscuro y granuloso; las células parenquimatosas que la rodean tienen polifenoles pequeños, al igual que el floema cercano. **cg:** célula gigante, **cv:** cámbium vascular, **f:** floema, **l:** lignina, **pa:** parénquima cortical, **pe:** peridermis, **x:** xilema. Los polifenoles están señalados con flechas amarillas y el almidón con flechas color morado claro.

Figura 4. Cortes longitudinales y transversales de raíces de vid de la variedad "Thompson seedless" tratadas con Ditera.



e) Variedad "Flame seedless" Defense

Raíz sana

Corte longitudinal. Se observó la peridermis seguida de células de parénquima con polifenoles pequeños en su interior (felodermis) y posteriormente células más grandes o parénquima cortical, el cual abarcó un tercio del grosor total de la raíz y presentó polifenoles de distintos tipos; a diferencia de los tratamientos anteriores no se encontró almidón. Inmediatamente después se observó el floema que consistió en células alargadas algunas con polifenoles que abarcaron casi toda la célula y algunos pequeños de forma irregular. El siguiente tejido fue el xilema, constituido por células largas con paredes ornamentadas y lignificadas, también con polifenoles en el interior de algunas de las células que lo conforman (Figura 5A).

Corte transversal. Se distinguieron los mismo tejidos, peridermis, parénquima cortical con polifenoles en su interior y sin almidón, floema también con polifenoles grandes dentro de las células, el cámbium vascular y el xilema (Figura 5B).

Raíz infectada

Corte longitudinal. Se pudieron ver los tejidos vasculares desorganizados. El xilema y el floema estuvieron interrumpidos por un conjunto de células parenquimatosas. El xilema y el cámbium, al igual que el floema presentaron hiperplasia. En el centro estuvieron las células del parénquima con hiperplasia rodeando a un tejido necrótico que al parecer es una extensión del xilema (Figura 5G). En un corte posterior se observó el nematodo en el parénquima, seguido de el floema con polifenoles grandes, pero delgados y transparentes, así como algunos pequeños esféricos (Figura 5C). Estos últimos también se encontraron en las células parenquimatosas que rodeaban al nematodo. Después del floema se encontró el xilema también con polifenoles esféricos y pequeños. El nematodo estuvo rodeado también de células de parénquima y peridermis, además de algunas células de color oscuro con un contenido espeso y granuloso rodeadas por células lignificadas. En xilema se pudo observar también acumulación de una sustancia refringente color rojo y/o morado en células cercanas. Las células gigantes observadas fueron grandes y anchas, con muchos núcleos pequeños y redondos u ovalados con un nucleolo pequeño redondo de color oscuro o rojo (Figura 5E y F). Presentaron una pared gruesa y las células a su alrededor tienen polifenoles pequeños de color rojo, los cuales fueron abundantes. El xilema, floema y parénquima estuvieron desorganizados y la hiperplasia fue notoria (Figura 5E).

Corte transversal. Las alteraciones en los cortes transversales consistieron en una desorganización de tejidos marcada, debido a la hiperplasia de células de parénquima, xilema y floema (Figura 5D y 5F). También se pudo observar una acumulación de lignina y suberina en células de parénquima y xilema (Figura 5F y H). La forma y tamaño de los polifenoles cambió, observándose pequeños y transparentes sobre todo en el parénquima cerca del nematodo o rodeándolo (Figura 5D). Hubo formación de 3-5 células gigantes por sitio de alimentación, las cuales consistieron en células multinucleadas con citoplasma denso. Careció de almidón.

Figura 5. Cortes longitudinales y transversales de raíces de vid de la variedad "Flame seedless" tratadas con Defense 10X. **A y B:** Cortes longitudinal y transversal de raíces sanas, respectivamente. **C:** Corte longitudinal donde se puede observar el cambio en los polifenoles del parénquima cortical, floema y xilema, así como también la lignificación de las células xilemáticas. **D:** Corte transversal, el nematodo se encuentra en el tejido vascular, el cual presenta hiperplasia y un aumento en la cantidad de lignina de las paredes celulares; el parénquima cortical con gran cantidad de polifenoles de distintos tipos, pero en las células más cercanas al nematodo estos son más pequeños. **E:** Corte longitudinal de raíz, en el centro se observan células gigantes multinucleadas rodeadas por células del floema y xilema que tienen gran desorganización celular, y del lado izquierdo se puede observar que las células del floema tienen polifenoles pequeños en su interior. **F:** Corte transversal de raíz que muestra acumulación de lignina y suberina en las células que rodean al nematodo, así como una desorganización celular y la presencia de polifenoles pequeños. **G:** Corte longitudinal donde se observa un sitio de alimentación en las células del floema, este tiene hiperplasia y contiene polifenoles pequeños de color rojo, el xilema cercano presenta necrosis y lignificación celular. **H:** Corte longitudinal de raíz, el nematodo se encuentra rodeado por células de xilema lignificadas, y del lado derecho en el parénquima cortical se observa el mismo daño, necrosis y lignificación. **cg:** célula gigante, **cv:** cámbium vascular, **f:** floema, **h:** hiperplasia, **l:** lignina, **n:** nematodo, **pa:** parénquima cortical, **pe:** peridermis, **x:** xilema. Los polifenoles están señalados por flechas amarillas.

Figura 5. Cortes longitudinales y transversales de raíces de vid de la variedad "Flame seedless" tratadas con Defensa.



f) Variedad "Superior seedless" tratamiento Defense**Raíz sana**

Corte longitudinal. Los tejidos que se observaron fueron los mismos: peridermis, parénquima cortical con polifenoles de distintas formas y tamaños. En el floema las células fueron alargadas y con polifenoles, al igual que los miembros de vaso del xilema. El cámbium consistió en células delgadas de color azul (Figura 6A).

Corte transversal. El felem fue grueso, la felodermis con polifenoles y almidón, el parénquima presentó almidón en las células más externas, y polifenoles pequeños y grandes oscuros. En el floema casi todas las células tuvieron polifenoles, el cámbium vascular estaba formado por células delgadas color azul y el xilema por células de parénquima, esclerénquima y miembros de vaso (Figura 6B).

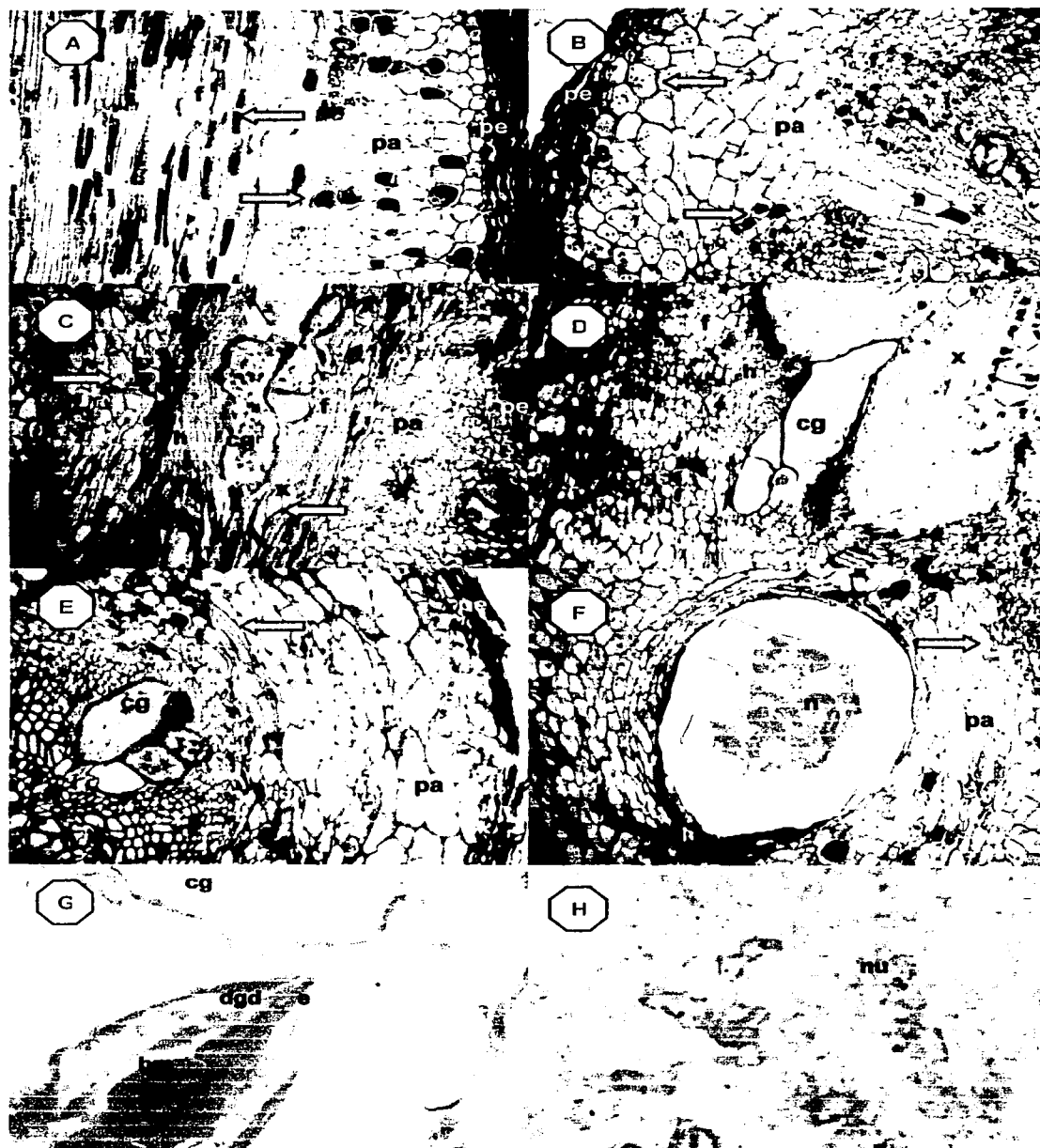
Raíz infectada

Corte longitudinal. Se observaron las siguientes alteraciones: presencia de polifenoles rojos y delgados en parénquima y floema, hiperplasia del floema alrededor del sitio de alimentación, formación de peridermis y lignificación de algunas células. Alrededor del nematodo pudimos observar células parenquimatosas lignificadas y polifenoles delgados. Se pudo observar la cabeza del nematodo con células gigantes cerca. Rodeándolos se encontró el xilema, el cámbium vascular y el floema con hiperplasia. Las células parenquimatosas cercanas tuvieron mucho almidón (Figura 6C).

Corte transversal. El número de células por cada nematodo varió de dos a nueve, pero pudieron encontrarse hasta cuatro grupos de células gigantes en un mismo corte. Las células gigantes fueron grandes, con núcleos grandes (Figura 6H) y las paredes varían en grosor, unas fueron gruesas y otras no tanto (Figura 6D y E). También hubo hiperplasia notoria a su alrededor (Figura 6D). Las células del parénquima tuvieron en su interior polifenoles rojos y pardos en distintas tonalidades (Figura 6F), al igual que el floema. El almidón siguió encontrándose en el parénquima.

Figura 6. Cortes longitudinales y transversales de raíces de la variedad "Superior seedless" tratadas con Defense. **A y B:** Cortes longitudinal y transversal de raíz sana 10X. **C:** Corte longitudinal de una agalla, se observa un sitio de alimentación con células gigantes multinucleadas con paredes gruesas, rodeadas por floema con hiperplasia y polifenoles delgados y pequeños en su interior, al igual que el parénquima cortical que también presenta polifenoles pequeños y transparentes. **D:** Corte transversal, en el centro un sitio de alimentación formado por células gigantes muy grandes localizadas en el floema y xilema, ambos con hiperplasia y en el parénquima cortical las células contienen polifenoles pequeños en gran cantidad 10X. **E:** Corte transversal, se observan células gigantes con paredes más gruesas y localizadas en el xilema, este último formado por células con paredes gruesas por lignificación; el parénquima cortical y floema cercano al sitio de alimentación presenta hiperplasia y tiene polifenoles pequeños y transparentes 10X. **F:** Corte transversal de un nematodo, rodeado por células de parénquima cortical, algunas de ellas lignificadas, y otras con polifenoles transparentes, pequeños y color rojo 10X. **G:** Corte longitudinal que muestra la cabeza del nematodo, donde se observa el estilete con sus nódulos, el bulbo medio y la desembocadura de la glándula dorsal 40X. **H:** Corte longitudinal que muestra el citoplasma de una célula gigante con varios núcleos, y dentro de estos un nucleolo activo 100X. **bm:** bulbo medio, **cg:** célula gigante, **cv:** cámbium vascular, **dgd:** desembocadura de la glándula dorsal, **e:** estilete, **f:** floema, **h:** hiperplasia, **l:** lignina, **n:** nematodo, **nu:** núcleo, **pa:** parénquima cortical, **pe:** peridermis, **x:** xilema. Los polifenoles están señalados con flechas amarillas y los granos de almidón con flechas color morado claro.

Figura 6. Cortes longitudinales y transversales de raíces de vid de la variedad "Superior seedless" tratadas con Defensa.



g) Variedad "Superior seedless" tratamiento Rugby

Raíz sana

Corte longitudinal. Presentó una peridermis formada por seis capas de células seguida de una hilera de células más o menos de forma regular (felodermis) con polifenoles y granos de almidón en su interior. La distribución del almidón en el parénquima fue azarosa, al igual que la de los polifenoles. Hubo diferentes tipos de polifenoles dentro de las células, algunos fueron grandes y lisos, otros granulares y otros pequeños y redondos, estos últimos se encontraron principalmente en el floema, el cual también tuvo granos de almidón (Figura 7A).

Corte transversal. La distribución de los tejidos fue la misma. El felem consistió en cuatro capas de células, le sigue la felodermis y luego el parénquima. El almidón estuvo distribuido en diferentes partes del parénquima, pocos polifenoles de forma regular o irregular, y de diferentes tonalidades de rojos desde un rojo pálido hasta un pardo. Lo mismo sucedió con los polifenoles en el floema, fueron grandes y lisos de colores oscuros, la mayoría gruesos, otros pequeños y delgados color pardo o rojo (Figura 7B).

Raíz infectada

Corte longitudinal. Los miembros de vaso del xilema tuvieron acumulación de suberina y lignina, al igual que pequeños polifenoles (Figura 7C). El floema se interrumpió debido a la presencia del nematodo y la formación de un sitio de alimentación (Figura 7C). La hiperplasia se observó solo en células del parénquima y un poco en el floema. En las células parenquimatosas cercanas se pudieron observar polifenoles en su mayoría delgados y por lo tanto de un color más claro, aunque fue posible encontrarlos de color oscuro y grandes (Figura 7G).

Corte transversal. La peridermis también pareció estar formada por cuatro capas celulares, pero no se pudieron observar claramente. El parénquima estaba lleno de polifenoles rojos pequeños (Figura 7D, F y H), al igual que el floema, donde se observaron algunos delgados y con forma irregular. En el parénquima hubo mucho almidón pequeño y delgado, el floema cercano a las células gigantes y al nematodo presentó hiperplasia, al igual que el xilema (Figura 7D). Se encontraron de dos a 4 sitios de alimentación diferentes en cada corte de raíz. Y el número de células gigantes por cada uno varió desde 3 hasta 7. Las paredes de las células del xilema tuvieron paredes gruesas. La infección por *Meloidogyne* indujo también la formación de peridermis.

Figura 7. Cortes longitudinales y transversales de raíces de vid de la variedad "Superior seedless" tratadas con Rugby 10X. **A y B:** Cortes longitudinal y transversal de raíces sanas. **C:** Corte longitudinal donde se observa una célula gigantes ubicada en el floema, que presenta hiperplasia, el xilema con poca acumulación de lignina y el parénquima cortical con polifenoles pequeños de color rojo en su interior; el nematodo está en el parénquima y floema. **D:** Corte transversal, se observa el nematodo cerca de las células gigantes y alrededor células pequeñas de floema como resultado de la hiperplasia del parénquima que contiene, algunas de ellas con lignina en sus paredes, hay desorganización celular y en las células de parénquima cortical los polifenoles son rojos y pequeños. **E:** Corte transversal donde se observan tres sitios de alimentación con células gigantes grandes, multinucleadas, localizadas entre xilema y floema, las células del parénquima del floema presentan hiperplasia y desorganización celular, los polifenoles en células de parénquima cortical son transparentes, rojos y pequeños. **F:** Corte transversal de raíz que nos muestra la desorganización celular en la parte externa del sitio de alimentación, y una parte del nematodo; las células del floema tienen hiperplasia y en el parénquima cortical y floema se observan polifenoles pequeños color rojo. **G y H:** Cortes longitudinal y transversal donde se puede apreciar el cambio en los polifenoles de floema y parénquima cortical con respecto al testigo. **cg:** célula gigante, **cv:** cámbium vascular, **f:** floema, **h:** hiperplasia, **l:** lignina, **n:** nematodo, **pa:** parénquima cortical, **pe:** peridermis, **x:** xilema. Los polifenoles están señalados por flechas amarillas y los granos de almidón por flechas de color morado claro.

Figura 7. Cortes longitudinales y transversales de raíces de vid de la variedad "Superior seedless" tratadas con Rugby.



Tabla 2. Cuadro comparativo de las alteraciones en cada uno de los tratamientos.

	# N	# cg/SA	# núcleos/cg	HIPERPLASIA	DESORGANIZACION
TT	2-7	4-6	12-47	P, X y F	SI
TD	1-2	2-4	25-36	P, X y F	SI
FT	2-5	3-7	30-44	P, X y F	SI
FD	2-8	3-5	15-60	P, X y F (NOTORIA)	NOTORIA
ST	5	1-5	37-42	P, X y F	SI
SD	4	3-5	21-23	P, X y F (NOTORIA)	NOTORIA
SR	4	1-3	39-68	P, X y F	SI

TT: "Thompson seedless" sin nematicida; TD: "Thompson seedless" tratamiento Ditera; FT: "Flame seedless" sin nematicida; FD: "Flame seedless" tratamiento Defense; SR: "Superior seedless" sin nematicida; SD: "Superior seedless" tratamiento Defense; SR: "Superior seedless" tratamiento Rugby. N: nematodo, SA: sitio de alimentación, cg: células gigantes, F: floema, P: parénquima, X: xilema, XF: entre xilema y floema.

Como se puede observar en la tabla 2, los sitios de alimentación se encontraban establecidos en el tejido vascular, en general se pudieron observar entre el xilema y el floema, aunque algunas veces también se localizaron sólo en floema o xilema. El número de nematodos dentro de la raíz fue mayor en el testigo de la variedad "Thompson seedless" al igual que en la variedad "Superior seedless", pero en la variedad "Flame seedless" no fue así, hubo mayor número de nematodos en aquella tratada que en la planta sin tratamiento. El número de células gigantes varió, en las primeras variedades ("Thompson seedless" y "Flame seedless") este fue mayor en las raíces de plantas sin tratamiento, mientras que en la variedad "Superior seedless" el número de células gigantes fue mayor en raíces tratadas con Defense que en los demás, aunque sí se pudo ver que el número fue menor en las raíces de plantas sometidas a tratamiento con Rugby que en el testigo. La hiperplasia como se puede observar en el cuadro, se observó tanto en parénquima como xilema y floema en todos los tratamientos, pero fue mayor en las raíces tratadas con Defense, al igual que la desorganización. El cambio en la forma y tamaño de los polifenoles de parénquima, xilema y floema se observó en todos los tratamientos.

La necrosis en las zonas que rodearon al nematodo y los sitios de alimentación se observó en todos los tratamientos.

Tabla 3. Cuadro comparativo de las características de las células gigantes de cada uno de los tratamientos.

TRATAMIENTO	No. NÚCLEOS P/CÉLULA GIGANTE	No. NUCLEÓLOS P/NÚCLEO	FORMA NÚCLEOS
TT	12-47	1-2	Redondo-ovalado
TD	23-36	1-2	Ovalados
FT	19-44	1	Redondos
FD	15-60	1-2	Ovalados
SR	20-68	1-4	Ovalados
SD	21-46	1-2	Ovalados
ST	37-42	1-2	Redondo-ovalado

TT: "Thompson seedless" sin nematicida; TD: "Thompson seedless" tratamiento Ditera; FT: "Flame seedless" sin nematicida; FD: "Flame seedless" tratamiento Defense; SR: "Superior seedless" sin nematicida; SD: "Superior seedless" tratamiento Defense; ST: "Superior seedless" tratamiento Rugby.

En la tabla 3 podemos observar que el número de núcleos por célula gigante es variable, y no se observa una relación entre tratamientos, ni tampoco diferencias de éstos con respecto a las raíces no tratadas. La forma y tamaño de los núcleos también fueron diferentes, pero no se observó relación con ningún tratamiento. En las raíces de "Thompson seedless" y "Flame seedless" sin tratamiento los nucléolos fueron pequeños a diferencia de los que se observaron en las células gigantes de las raíces tratadas, pero en la variedad "Superior seedless" todos los nucléolos fueron pequeños. Esto probablemente este relacionado con la variedad y el tratamiento.

6.2 Histoquímica

La actividad de la peroxidasa en la prueba histoquímica realizada se observó como una reacción de color azul en el floema.

a) Variedad "Flame seedless" tratamiento Rugby (testigo)

En los cortes longitudinales (Figura 8A) y transversales (Figura 8B) se observó poca actividad enzimática, presentándose ésta de manera irregular en pequeñas cantidades en pocas de las células del floema.

b) Variedad "Flame seedless" tratamiento Defense

En los cortes longitudinales y transversales se pudo observar que el sitio de alimentación estaba rodeado por floema y a esa altura este presentó una gran actividad enzimática, siendo ésta mayor a nivel del sitio de alimentación y disminuyó conforme se aleja de este. La actividad también se observó en floema a ese nivel a pesar de que este no estuviera cerca del sitio de alimentación (Figura 8C). La coloración se dio en todo el floema del corte, aunque fue más intensa alrededor de las células gigantes, lo que indicó mucha actividad en el floema que rodea al sitio de alimentación (Figura 8D).

c) Variedad "Flame seedless" tratamiento Rugby

En los cortes longitudinales y transversales se encontró actividad en el floema alrededor del sitio de alimentación (Figura 8E). Se observó actividad enzimática en floema de la región cercana al sitio de alimentación, rodeando la cabeza del nematodo, entre este y las células gigantes. También se pudo observar actividad en el floema lejano a las células gigantes, pero que se encuentran a ese nivel, aumentando la actividad en el floema cercano al nematodo y al sitio de alimentación (Figura 8F).

d) Variedad "Thompson seedless" tratamiento Ditera

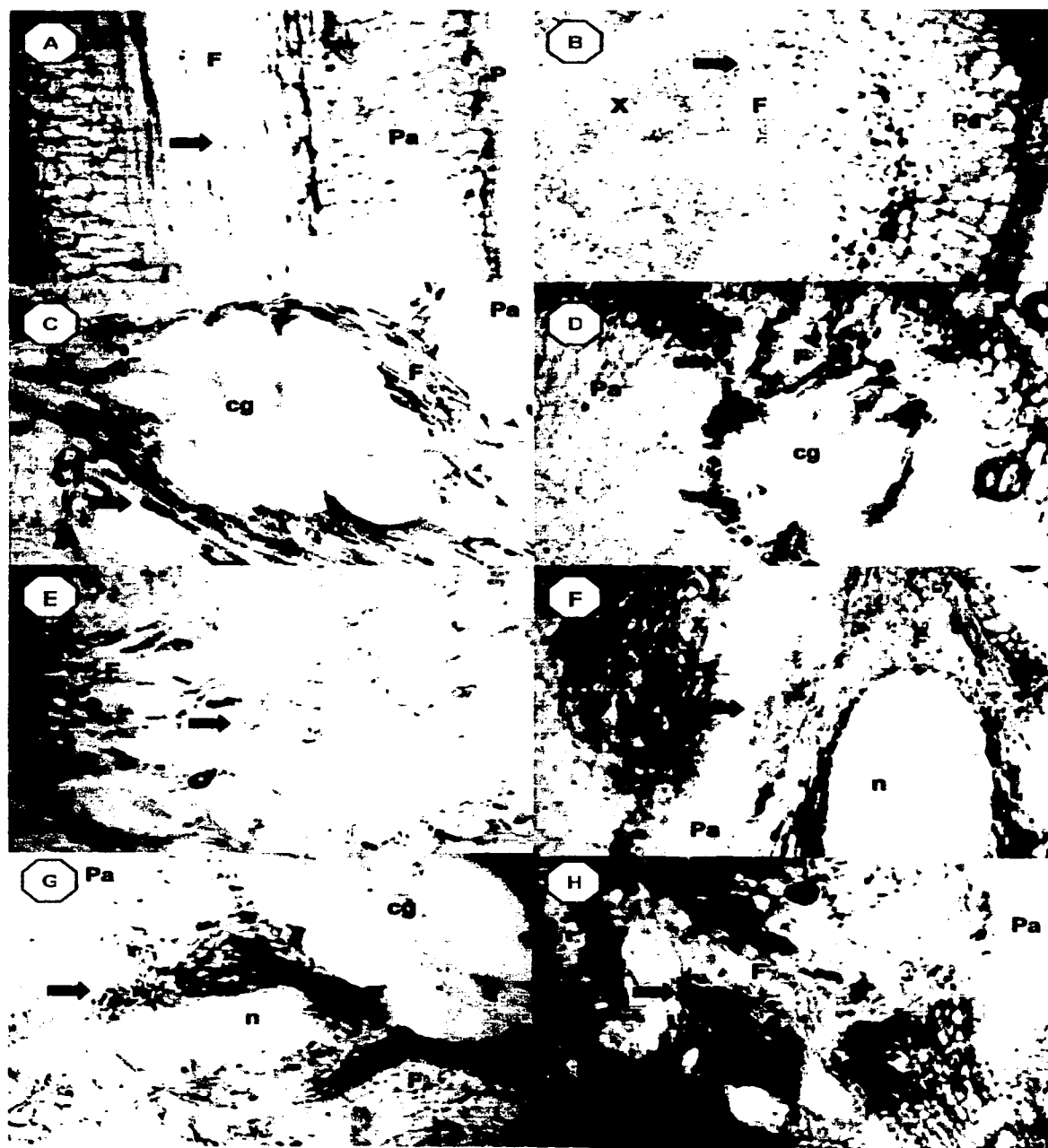
En los cortes longitudinales se observó coloración solamente alrededor del sitio de alimentación, y no del nematodo (Figura 8G). En los cortes transversales se observó mayor actividad cerca del sitio de alimentación del nematodo y en floema cercano (Figura 8H).

En la Figura 8A se muestra un corte longitudinal de una raíz sin nematodo (testigo), se puede apreciar poca actividad de esta enzima, ya que solamente se presenta en algunas células del floema y la actividad no es intensa. En el corte transversal de la misma raíz (Figura 8B), se obtuvieron los mismos resultados, observándose coloración en pocas células y de la misma manera esta actividad es débil. Al realizar la prueba en cortes de agallas con nematodos, se pudo observar una gran actividad (8C, 8E y 8G 8D, 8F y 8H). En los cortes de raíces de plantas de la variedad "Flame seedless" sometidas a un tratamiento con el nematicida Defense, en las zonas que rodean al sitio de alimentación, el floema presentó una coloración azul oscuro indicando que contiene gran cantidad de peroxidosas activas (Figura

8C), la cual también se observó en los cortes longitudinales como una coloración en las células que rodean el sitio de alimentación (Figura 8D). En las raíces de plantas de la misma variedad pero sometidas a un tratamiento con Rugby se encontraron los mismos resultados, el floema tanto en cortes transversales como longitudinales presentó actividad enzimática. De la misma manera, las plantas infectadas de la variedad "Thompson seedless" tratadas con *Ditera* presentaron actividad en el floema cercano al sitio de alimentación en los cortes longitudinales (Figura 8G), y en los cortes transversales se observó también actividad intensa en células del floema que rodea al sitio de alimentación. En todos los casos, en los cortes transversales, todo el floema de presentó actividad al nivel del sitio de alimentación y en los cortes longitudinales conforme los tejidos están más lejos de las células gigantes, la actividad fue disminuyendo.

Figura 8. Pruebas histoquímicas para la detección de peroxidasas activas en raíz de vid (*Vitis vinifera*) infectadas con *Meloidogyne* sp 10X. **A** Testigo Corte longitudinal de raíz sin nematodo. **B** Testigo. Corte transversal de raíz sin nematodo. **C** Corte longitudinal de raíz de planta enferma de la variedad "Flame seedless" tratada con Defense. **D** Corte transversal de una raíz infectada de la variedad "Flame seedless" tratada con Defense. **E** Corte longitudinal de raíz infectada de la variedad "Flame seedless" tratada con Rugby. **F** Corte transversal de raíz infectada de la variedad "Flame seedless" tratada con Rugby. **G** Corte longitudinal de raíz infectada de la variedad "Thompson seedless" tratada con Ditera. **H** Corte transversal de raíz infectada de la variedad "Thompson seedless" tratada con Ditera. **P:** peridermis, **Pa:** parénquima, **X:** xilema, **F:** floema, **cg:** células gigantes, **n:** nematodo. Las flechas indican actividad enzimática.

Figura 8. Pruebas histoquímicas para la detección de peroxidasas activas en raíz de vid (*Vitis vinifera*) infectadas con *Meloidogyne* sp.



VII. DISCUSIÓN

ALTERACIONES HISTOLÓGICAS

Las células gigantes inducidas en las raíces con cada uno de los tratamientos varió tanto en número, forma, tamaño, número de núcleos por sitio de alimentación. El número de núcleos podría considerarse una diferencia entre variedades y tratamientos; sin embargo, también depende de la madurez o el tiempo que cada sitio de alimentación tiene. Debido a que las muestras provinieron del campo, no fue posible determinar con exactitud el momento en que las raíces fueron infectadas ni cuánto tiempo ha pasado desde que el nematodo se estableció, por lo tanto el número de núcleos no se consideró una variable a evaluar. Sin embargo se observó que el número de núcleos varió, al igual que su forma, tamaño y número de nucléolos que contienen (Tabla 3). Estas características aparentemente no tuvo relación con el tratamiento, es decir, su variación no dependió del tratamiento o la variedad. Lo más probable es que como ya se mencionó anteriormente se debió al tiempo que el nematodo lleva establecido. Ramírez Arredondo y colaboradores en 1995 encontraron diferencias en el número de células gigantes inducidas por *M. javanica* en vid, y encontró que independientemente del cultivar que se tratara, siempre el sitio de alimentación se encontró entre el xilema y el floema, lo que varió dependiendo del cultivar fue el número y el tamaño de las células gigantes, las cuales estuvieron ausentes en uno de ellos. En este trabajo se observó también variación en el tamaño de las células gigantes. Sin embargo, de los resultados obtenidos por Ramírez Arredondo y colaboradores se concluyó que el tamaño de las células gigantes dependió no solo de la especie de nematodo que las forme, sino que dentro de una misma especie, la respuesta varía dependiendo del cultivar. Esto es un motivo más que indica que en este trabajo, al utilizar raíces de tres variedades diferentes, con tres especies de nematodos presentes en el suelo y además los tratamientos a los que las plantas fueron sometidas; no es posible realizar una comparación válida. Es decir, el tamaño de las células gigantes, es una variable dependiente de las características de la planta hospedera y debido a que no se controlaron todas las variables, no es posible llegar a una conclusión de que las diferencias en la morfología se debieron a los tratamientos o a las variedades, también pudieron deberse a la interacción de la especie de *Meloidogyne* que se tratara y la respuesta de la variedad de vid en la que se encontraba.

Las diferencias en estas características dependieron también de la susceptibilidad de las plantas, ya que algunas variedades se consideran más resistentes que otras a la infección. Las alteraciones que fueron constantes independientemente de la variedad y/o tratamiento fueron: el desarrollo de peridermis cerca del nematodo, la presencia de polifenoles pequeños tanto en floema como en parénquima, la formación de sitios de alimentación en el xilema, la lignificación y suberización de células del xilema posterior a la necrosis de las mismas y la desorganización de tejidos. La respuesta de la planta durante una infección se vio afectada por el tratamiento al cual esta fue sometida y por la variedad de la cual se trató. En las variedades "Thompson seedless" y "Flame seedless" el tratamiento disminuyó el número de células gigantes por sitio de alimentación, pero en la variedad "Superior seedless" no fue así, lo que indicó diferencias entre las variedades. Por otro lado, las dos variedades que fueron tratadas con

Defense, presentaron mayor hiperplasia de tejido vascular y por lo tanto mayor desorganización, y esto se debe al tratamiento, ya que en raíces de las mismas variedades con otros tratamientos no se observó tanta desorganización (Tabla 2).

Sijmons en 1993 describió la reacción de las plantas a la invasión por nematodos agalladores. Unos de los resultados de esta invasión fueron la necrosis y la destrucción celular, la cual se realiza directamente cuando se trata de nematodos endoparásitos, marcando la ruta que este siguió hasta establecerse; y algunas veces se observó en zonas que rodean el sitio de alimentación (Sijmons, 1993). Posteriormente Sijmons y colaboradores en 1994 describieron las diferentes respuestas que las plantas tienen para defenderse y las dividieron en dos grupos, locales y sistémicos. Dentro de las defensas locales inducibles se encuentran las vías de biosíntesis de fitoalexinas. Por ejemplo, el depósito de lignina como barrera estructural y la necrosis. Dichas respuestas pueden ser inducidas por secreciones o componentes de la cutícula de los nematodos (Sijmons, *et al.*, 1994). Los resultados obtenidos en este trabajo coincidieron con los mecanismos de defensa locales descritos por Sijmons en 1993 y Sijmons, *et al.* en 1994, las zonas necróticas consistieron en células con paredes de color rojo brillante por la lignificación, con un contenido oscuro y granuloso, tanto en xilema como en parénquima, rodeando al nematodo y las células gigantes. En xilema la acumulación de lignina y suberina provoca el taponamiento de los miembros de vaso afectando el crecimiento y desarrollo óptimo de la planta. De esta manera las plantas desarrollan los síntomas que podemos apreciar en las partes aéreas como son achaparramiento, clorosis y hasta la muerte cuando encontramos altas densidades de población de nematodos, ya que la fisiología de la planta hospedera se ve afectada de manera significativa (Melakeberhan y Ferris, 1989). Estos síntomas de necrosis, desorganización celular o tisular y acumulación de suberina y lignina en miembros de vaso de xilema cercanos a las células gigantes se observaron en todos los tratamientos y variedades evaluadas.

Aunque en todos los tratamientos se observó hiperplasia y desorganización de tejidos, hubo diferencias en cuanto al grado de hiperplasia de los tejidos vasculares. En todos se observó hiperplasia en parénquima cortical y en tejido vascular. Sin embargo, en las variedades "Flame seedless" y "Superior seedless" tratadas con el nematicida Defense se encontró una desorganización de tejidos evidente debido a la hiperplasia de los mismos (Figuras 5e y 6c).

La cantidad de almidón almacenado en las células del parénquima cortical varió dependiendo de la parte de la raíz que se haya cortado, siendo así mayor en las zonas cercanas al meristemo radical. Solamente en los tratamientos "Thompson seedless" con Ditera, "Superior seedless" con Rugby y "Superior seedless" con Defense se encontró almidón. De estas tres muestras sólo en la segunda el almidón se encontró almacenado cerca del nematodo, en las otras dos estaba en células del parénquima y en el último se vio que las células que son resultado de la hiperplasia carecen de él. También dependió de la presencia o ausencia del nematodo, ya que en un segmento donde se observó mucha acumulación de almidón en parénquima, cerca de donde se encuentra el nematodo disminuyó y a veces hasta desapareció. De esta manera se puede explicar que en las raíces la variedad "Thompson seedless" al observar los cortes transversales, se pudo encontrar almidón en zonas anteriores y posteriores al

nematodo y cuando observamos cortes en el lugar de la infección, la cantidad de granos de almidón fue mucho menor hasta ausentarse completamente. Esto se puede apreciar de la misma manera en los cortes longitudinales. Lo mismo se observó en las demás variedades, y en algunas ocasiones este se pudo observar en las células de parénquima que rodean al nematodo.

Otra diferencia fue el tamaño de las células gigantes, el cual fue evidente en los cortes longitudinales. En las raíces de plantas de la variedad "Thompson seedless" tratadas con Ditera, las células gigantes tuvieron un tamaño de aproximadamente dos veces el tamaño de las células gigantes de otros tratamientos (Figura 4c). También en raíces de la variedad "Superior seedless" tratadas con Defense, las células gigantes en corte longitudinal fueron más grandes que en los otros tratamientos; pero más pequeñas que en la variedad antes descrita (Figura 6C). El tamaño de las células gigantes puede disminuir cuando la planta hospedera es resistente (Giebel, 1974). Estudios que se han realizado han revelado que en algunas plantas susceptibles a los nematodos las células del parénquima del xilema resisten la incorporación dentro del sincicio, de esta manera los elementos traqueales no se ven afectados (Sijmons, 1993). Esto no se observó en las raíces utilizadas, ya que en todas las muestras las células gigantes afectan también al xilema.

El grosor de las paredes no fue constante, varió dentro de un mismo tratamiento. En algunos de los cortes transversales de los tratamientos "Flame seedless" con Defense, "Thompson seedless" con Ditera y "Superior seedless" con Defense se encontraron células gigantes con paredes celulares gruesas. Sin embargo, en otro corte transversal de raíz de la variedad "Superior seedless" sometida al tratamiento con Defense se observaron células gigantes más grandes y con paredes celulares más delgadas. En un corte transversal de raíz de este mismo tratamiento las células gigantes que se observaron también presentaron paredes gruesas. Tomando en cuenta que la presencia de paredes gruesas no fue constante, no se presentó en raíces de una sola variedad o de un mismo tratamiento, se puede decir que el grosor de la pared no estuvo relacionado con ninguna de estas dos cosas, y que la diferencia que observamos se debió a la especie de *Meloidogyne* que se encontró afectando a la planta, ya que aunque una de ellas *M. incognita* fue la que predominó en la zona de estudio no fue la única encontrada.

La mayoría de las veces cuando se realizan trabajos de histopatología de nematodos agalladores, solamente se describen las características de las células gigantes, pero no se menciona si hay aumento o disminución de la cantidad de almidón, el tipo de polifenoles que se encuentran, y esto es importante conocerlo porque podría darnos una idea de la fisiología de la interacción planta-nematodo, y esto a su vez nos permitiría entender mejor los cambios morfológicos que se llevan a cabo durante esta interacción. Los polifenoles y otros compuestos de naturaleza enzimática determinan la susceptibilidad de las plantas al igual que la resistencia de las mismas a la infección. En este trabajo se encontró un cambio en la forma y tamaño de los polifenoles en las células, tanto en parénquima como en los tejidos vasculares. Los compuestos fenólicos al igual que las auxinas y los aminoácidos tienen relación con la respuesta de susceptibilidad o resistencia de los tejidos vegetales. Según Giebel los compuestos fenólicos se encuentran en los tejidos vegetales como glucósidos de baja actividad fisiológica y metabólica y su activación requiere de su descomposición en fenoles libres. Durante la infección por

nematodos esto es posible mediante la secreción de β -glucosidasas en el tejido del hospedante. En las plantas resistentes a la invasión por nematodos endoparásitos los compuestos fenólicos estimulan la IAA-oxidasa, favoreciendo la descomposición y formación de necrosis en sus tejidos. Y en plantas susceptibles inhiben a esta misma enzima favoreciendo la formación de células gigantes y agallas en las plantas susceptibles (Giebel, 1974). De acuerdo a lo anterior, en las variedades resistentes la presencia de fenoles en las raíces propicia la necrosis de los tejidos, lo cual evita el establecimiento exitoso del nematodo y su desarrollo. En la Universidad de Riverside California Anwar y McKenry realizaron un trabajo donde describen la respuesta de dos variedades de vid resistentes a *M. arenaria*, y encontraron que la necrosis de tejido cortical interrumpe o demora la entrada de los J2 a la raíz y la necrosis vascular impide el establecimiento exitoso de sitios de alimentación, alterando su desarrollo y por lo tanto la reproducción (Anwar y McKenry, 2000).

La forma y tamaño de los polifenoles que se encontraron en los tejidos se debe a que en presencia del nematodo estos son utilizados, coincidiendo en el floema las zonas con polifenoles pequeños y aquellas en las cuales hay actividad de las peroxidasas.

ALTERACIONES HISTOQUÍMICAS

Se encontró diferencia en la presencia de peroxidasas activas en cortes sanos y enfermos. La actividad tanto en tejido sano como en tejido enfermo se encontró solamente en floema. En las raíces de plantas enfermas se observó principalmente en floema que rodea a las células gigantes en cortes longitudinales, y en cortes transversales en todo el floema al nivel del sitio de alimentación. Estos resultados difieren de aquellos observados por Veech y Endo en 1969 quienes realizaron un estudio de localización de enzimas en raíces de soya infectadas con *Meloidogyne incognita acrita*. Estos autores observaron que la endodermis y el parénquima vascular de plantas no inoculadas presentaron alta actividad enzimática y que generalmente los sitios donde ésta se presentó son las paredes celulares. La actividad enzimática en las raíces de plantas infectadas se observó en el citoplasma de las células infectadas. También se observó actividad, aunque en menor grado, en algunas células del parénquima. Tanto las raíces inoculadas como aquellas no inoculadas presentaron actividad enzimática, lo cual no se observó en este trabajo. En todos los cortes sometidos a éste análisis se encontró actividad en las células del floema y solamente cerca del sitio de alimentación de los nematodos. En las raíces sanas se encontró actividad en algunas células del floema, pero ésta no fue frecuente ni intensa.

En 1971 Giebel y colaboradores realizaron otro estudio similar, donde compararon la actividad enzimática de las raíces de papa (*Solanum tuberosum* L.) susceptibles y resistentes a *Heterodera rostochiensis*. En los cortes transversales de variedades resistentes encontró alta actividad enzimática en el periciclo, mientras que en otras partes del estele se observó baja actividad y sólo se observó alta actividad en las células del parénquima. La actividad es mayor en las plantas resistentes que en las susceptibles. En las raíces de plantas susceptibles de papa, las células gigantes cercanas al nematodo no presentaron actividad, pero si se encontró en células cercanas al nematodo. En ningún otro tejido del estele hubo reacción, lo cual atribuyeron a la actividad inhibitoria de las células gigantes hacia los tejidos

cercanos. Estos resultados coincidieron en parte con los que se obtuvieron en este estudio, ya que tampoco se encontró actividad en las células gigantes formadas por *Meloidogyne* spp.; pero difieren de los que Giebel y colaboradores encontraron en que se observó alta actividad en células de floema cercanas a las células gigantes y como se mencionó anteriormente ellos no encontraron actividad. Otra diferencia fue que también encontraron que las células con necrosis y del parénquima reaccionaron a esta prueba, y en este trabajo no se observó reacción ni en parénquima ni en células necróticas. La presencia de actividad enzimática en papa indica que juega un papel importante en la formación de las condiciones que favorecen la síntesis de lignina en las áreas necróticas. Los resultados que se obtuvieron in vivo no concuerdan con esta afirmación. En los cortes histológicos se pudo observar que alrededor de las células gigantes hay depósitos de lignina, sin embargo, la actividad solamente se observó en el floema. Lo que se pudo observar en el floema son polifenoles pequeños en el interior de las células del floema, y su presencia podría estar entonces relacionada con la actividad de las peroxidasas en ese sitio.

Los cambios en las peroxidasas también pueden darse localmente después de la invasión por el nematodo y así es como inician la respuesta de defensa, tales como la peroxidación de lípidos y la liberación de fitoalexinas. Las peroxidasas juegan un papel complejo en la reparación de heridas, lignificación, inducción de suberina y la unión de proteínas con grupos fenólicos (Sijmons, *et al.*, 1994). Las peroxidasas están involucradas en la síntesis de lignina, y esta última tiene un papel importante en la protección de la planta contra patógenos (Salisbury y Ross, 1994), por lo que también las peroxidasas son parte importante del mecanismo de defensa vegetal. Como se observó en los cortes histológicos, la lignina en tejido sano se encuentra como parte de los constituyentes de la pared celular de las células del xilema; pero en el tejido dañado aumenta su depósito, encontrándose alrededor del sitio de alimentación, el nematodo y dentro de las células del xilema. También las peroxidasas pueden alterar la actividad del AIA (Giebel, *et al.*, 1971), el cual se sintetiza en las raíces de manera normal, principalmente en las jóvenes, donde su concentración es mayor (Salisbury y Ross, 1994). Los cambios provocados por algunos nematodos, tales como hiperplasia, hipertrofia, división nuclear sin citocinesis y ruptura de paredes, son también inducidos por el AIA, (Giebel, 1974), la presencia del nematodo debe estar relacionado con el aumento en la actividad del AIA. Las peroxidasas mediante compuestos fenólicos pueden descomponer el AIA (Giebel *et al.*, 1971), los polifenoles actúan como cofactores de las peroxidasas (Veech y Endo, 1969). Esto explica que los polifenoles del floema y parénquima en la zona de las agallas sean más pequeños.

VIII. CONCLUSIONES

- Hubo diferencias notorias en cuanto a la hiperplasia celular en el tejido vascular, presentándose con mayor abundancia en raíces de plantas de las variedades "Flame seedless" y Superior seedless" tratadas con Defense.
- El almacenamiento de almidón en parénquima se observó solamente en raíces de las variedades "Thompson seedless" con Ditera, "Superior seedless" con Rugby y Defense; y sólo en la segunda se acumula almidón en las células que rodean al nematodo. Generalmente disminuye al nivel de éste y puede llegar a desaparecer.
- En todos los tratamientos se observó formación de peridermis, acumulación de suberina y lignina en células rodeando al nematodo y al sitio de alimentación.
- Siempre se observó cambio en la forma, tamaño y color de los polifenoles del parénquima cortical, floema y xilema, siendo éstos importantes durante el proceso de defensa de la planta.
- El número de células gigantes varió al igual que su forma y número de núcleos.
- Debido a los diferentes tipos de células gigantes observadas en relación al grosor de sus paredes y al aspecto de su citoplasma, no se trató de una sola especie de nematodo presente en esta localidad.
- La respuesta de la planta ante una infección por *Meloidogyne* spp. se vió afectada tanto por la variedad como por el tratamiento.
- De los tratamientos sometidos a la prueba histoquímica para peroxidasas todos reaccionaron, pero la variedad "Flame seedless" con Defense presentó actividad enzimática en mayor intensidad.

IX. LITERATURA CITADA

- AGRIOS G. 1991. *Fitopatología*. Limusa. México, 756 p.
- ALMEIDA E.J.; DE VLEESSCHAUWER V.; BURSSSENS S.; CELENZA J.L.; INÉS D.; VAN MONTAGU M.; ENGLER G. y G. GHEYSEN. 1999. Molecular Markers and cell cycle inhibitors show the importance of cell cycle progresión in nematode-induced galls and syncytia. *Plant Cell*. **11**:793-807.
- Anuario estadístico de la producción agrícola de los Estados Unidos Mexicanos**. 1998. Secretaría de Agricultura, Ganadería y desarrollo rural. Centro de estadística agropecuaria. 753 p.
- ANWAR S.A. y M.V. McKENRY. 2000. Penetration, development and reproduction of *Meloidogyne arenaria* on two new resistant *Vitis* sp. *Nematropica*. **30**(1): 9-17.
- BARKER, K.R., PEDERSON, G.A. y G.L. WINDHAM. 1998. **Plant and Nematode Interactions**. American Society of Agronomy. Crop science society of America., Soil Science Society of America., Madison, Wisconsin, USA Publishers. 686-687.
- BARTHEL N., VAN DER LEE F.M., Klap J., GODDIJN O.J.M., KARIMI M., PUZZIIO P., GRUNDLER F.M.W., OHL S.A., LINDSEY K., ROBERTSON L., ROBERTSON W.M., VAN MONTAGU M., GHEYSEN G., y P.C. SIJMONS. 1997. Regulatory sequences of *Arabidopsis* drive reporter gene expression in nematode feeding structures. *The Plant Cell*. **9**: 2119-2134.
- BIRD A.F. y G.E. ROGERS. 1965. Ultrastructure and histochemical studies of cell producing gelatinous matrix in *Meloidogyne*. *Nematologica*. **11**:231-238.
- CAI D.; KLEINE M.; KIFLE S.; HARLOFF H.J.; SANDAL N.N.; MARCKER K.A.; KLEIN-LANKHORST R.M.; SALENTIJJN E.M.J.; LANGE W.; STIEKEMA W.J. y WYSS U.; GRUNDLER F.M.W.; JUNG C. 1997. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science*. **275**: 832-834.
- COELHO SLP. y J.S. MONTERO. 2000. **A viticulturano semiárido brasileiro**. Petrolina-PE. Brasil. 368p.
- CHITWOOD B.G. 1949. "Root-Knot Nematodes"-Part I. A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*. **16**(2): 90-104.
- DASGUPTA D.R. y A.K. GANGULY. 1975. Isolation, purification and characterization of a trypsin-like protease from the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Nematologica*. **21**: 370-384.
- DAVIS E.L., HUSSEY R.S., BAUM T.J., BAKKER J., SCHOTS A., ROSSO M.N. y P. ABAD. 2000. Nematode Parasitism Genes. *Annual Review of Phytopathology*. **38**: 365-396.
- DORHOUT, R.; KOLLOFFEL, C. y F.J. GOMMERS. 1988. Transport of an apoplastic fluorescent dye to feeding sites induced in tomato roots by *Meloidogyne incognita*. *Phytopathology*. **78**: 1421-1424.
- EISENBACK J.D. 1982. Morphological comparison of head shape and stylet morphology of second-stage juveniles of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology*. **14**:339-343.
- EISENBACK J.D. y H. HIRSCHMANN. 1981. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of head shape and stylet morphology of the male. *Journal of Nematology*. **13**:513-521.

- EISENBACK J.D., HIRSCHMANN H. y A.C. TRIANTAPHYLLOU. 1980. Morphological comparison of *Meloidogyne* female head structures, perineal patterns and stylets. *Journal of Nematology*. **12**:300-313.
- ENDO B.Y. y J.A. VEECH. 1969. The histochemical localization of oxido-reductive enzymes of soybeans infected with root knot nematode *Meloidogyne incognita acrita*. *Phytopathology*. **59**:418-425.
- FAN D. y G.A. MACHLACHLAN. 1967. Massive synthesis of ribonucleic acid and cellulase in the pea epicotyl in response to indolacetic acid, with and without concurrent cell division. *Plant Physiology*. **42**:1114-1122.
- FAO. 1999. **FAO production yearbook**. Vol. 53. 251 p.
- FLORES C.J., DÍAZ A.J. y M. DEL CASTILLO. 1975. Situación actual del cultivo de la vid en la región de Caborca Sonora. FIRA. México. 29 p.
- GIEBEL, J. 1970. Phenolic content in roots of some Solanaceae and its influence on IAA-oxidase activity as indicator of resistance to *Heterodera rostochiensis*. *Nematologica*. **16**:22-32.
- GIEBEL J. 1974. Biochemical mechanisms of plant resistance to nematodes: A review. *Journal of Nematology*. **6**(4): 175184.
- GIEBEL J., KRENZ J. y A. WILSKI. 1971. Localization of some enzymes in roots of susceptible and resistant potatoes infected with *Heterodera rostochiensis*. *Nematologica*. **17**: 29-33.
- HANSEN E., HARPER G., MC PHERSON M.J. y J. ATKINSON. 1996. Differential expression patterns of the wound-inducible transgene *wun1-uidA* in potato roots following infection with either cyst or root knot nematodes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **48**: 161-170.
- HIDALGO L. 1993. **Tratado de viticultura**. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 983pp.
- HUANG C.S., y A.R. MAGGENTI. 1969. Mitotic aberrations and nuclear changes of developing giant cells in *Vicia faba* caused by root knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Phytopathology*. **44**:447-455.
- HUSSEY R.S. 1989. Disease-inducing secretions of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*. **27**:123-141.
- JOHANSEN D.A. 1940. **Plant Microtechnique**. Mc Graw.Hill Company. U.S.A. 533 p.
- JONES, M.G.K. 1981a. The development and function of Plant Cells Modified by Endoparasitic Nematodes. In: **Plant Parasitic Nematodes**. Zuckerman B.M. y R. A. Rhode. Academic Press. U.S.A. 255-279.
- JONES, M.G.K. 1981b. Host cell responses to endoparasitic nematode attack: structure and function of giant cells and syncytia. *Annals of Applied Biology*. **97**:353-372.
- JONES M.G.K. y H.L. PAYNE. 1978. Early stages of nematode-induced giant-cell formation in roots of *Impatiens balsamia*. *Journal of Nematology*. **10**: 70-84.
- JONES M.G.K. y D.H. NORTHCOTE. 1972. Nematode-induced syncytium-A multinucleated transfer cell. *Journal of Cell Science*. **10**:789-809.
- KEEN, N.T. y P.A. ROBERTS. 1998. Plant parasitic Nematodes: Digesting a page from the microbe book. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **95**: 4789-4790.

- MAI W.F. y H.H. LYON. 1975. **Pictorial key to genera of plant parasitic nematodes.** Comstock Publishing Associates. Reino Unido. 219p.
- MARTÍNEZ DE TODA F.F. 1991. **Biología de la vid. Fundamentos biológicos de la viticultura.** Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 346p.
- MELAKEBERHAN H. y H. FERRIS. 1989. Impact of *Meloidogyne incognita* on physiological efficiency of *Vitis vinifera*. *Journal of Nematology*. 21(1):74-80.
- NICKLE, W.R. 1984. **Plant and Insect Nematodes.** Marcel Dekker, Inc. U.S.A. 458-478.
- NIEBEL, A., ALMEIDA ENGLER J., TIRÉ C., ENGLER G., VAN MONTAGU M. y G. GHEYSEN. 1993. Induction patterns of an extensin gene in tobacco upon nematode infection. *The Plant Cell*. 5: 1697-1710.
- OPPERMAN C.H. y D.M. BIRD. 1998. The soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*: A genetic model system for the study of plant parasitic nematodes. *Current. Opinion in Plant Biology*. 1: 342-346.
- OPPERMAN C.H., TAYLOR C.G. y M.A. CONKLING. 1994. Root-knot nematode-directed expression of plant root-specific gene. *Science*. 263:221-223.
- PEARSON R.C. y A.C. GOHEEN. 1994. Compendium of grape diseases. APS Press. U.S.A. 93 p.p.
- POPEIJUS, H., OVERMARS H., JONES J., BLOCK V., GOVERSE A., HELDER J., SCHOTS A., BAKKER J., y G. SMANT. 2000. Degradation of plant cell walls by nematode. *Nature*. 406:36-37.
- RAMÍREZ-ARREDONDO J.A. y D. NIETO-ÁNGEL. 1995. Fluctuaciones de poblaciones de nematodos en vid y su reducción con nematicidas en la costa de Hermosillo, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 13: 37-40.
- RAMÍREZ-ARREDONDO J.A., CID DEL PRADO-VERA I., TÉLIZ-ORTIZ D. y E. ZAVALA-MEJÍA. 1995a. Progreso epidémico del desarrollo y reproducción de *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood en vid basado en grados día. *Agricultura Técnica en México*. 21(2):117-129.
- RAMÍREZ-ARREDONDO J.A., CID DEL PRADO-VERA I., TÉLIZ-ORTIZ D. y E. ZAVALA-MEJÍA. 1995b. Especies y Razas de *Meloidogyne* predominantes en la Costa de Hermosillo y cambios histológicos causados por *M. javanica* (Treub) Chitwood en vid. *Agricultura Técnica en México*. 21(2): 107-115.
- RAYA S.A. ORTÍZ M.J., HERRERA G.R., CONTRERAS DE LA CRUZ E., GONZÁLEZ V.F., GUERRERO R.J.C. y M. JIMÉNEZ. 1981. Vid para la Costa de Hermosillo. SARH. Centro de Investigaciones Agrícolas del Noroeste. 39 p.
- RUBIANO J.A. y F. VARÓN DE AGUDELO. 1994. Identificación y parasitismo de nematodos en vid *Vitis* spp. *Fitopatología Colombiana*. 19(2): 27-35.
- SALISBURY F.B. y C.W. ROSS. 1994. **Fisiología Vegetal.** Grupo Editorial Iberoamérica. México, D.F. 759 p.
- SASSER, J.N. 1980. Root knot nematodes. A global menace to crop production. *Plant Disease*. 64(1):36-41.

- SHARMA S.B., PRICE N.S. y J. BRIDGE. 1997. The past, present and future of plant nematology in International Agricultural Research Centers. *Nematological abstracts*. 66(3):119-142.
- SIJMONS P.C. 1993. Plant nematode interactions. *Plant Molecular Biology*. 23: 917-931.
- SIJMONS P.C., ATKINSON H.J. y U. WYSS. 1994. Parasitic strategies of root nematodes and associated host cell responses. *Annual Review of Phytopathology*. 32:235-259.
- SIJMONS, P.C., GRUNDLER F.M.W., VON MENDE N, BURROWS P.R. y U. WYSS. 1991. *Arabidopsis thaliana* as a new model host for plant parasitic nematodes. *Plant Journal*. 1:245-254.
- SOUTHEY, J. 1960. **Plant Nematology**. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. London. 440 p.
- TAYLOR C.E., y D.J.F. BROWN. 1981. Nematode-virus interactions. In **Plant parasitic Nematodes**. Vol. 3. B.M. Zuckerman y R.A. Rohde, eds. New York Academic Press. pp. 281-301.
- VEECH J.A. y B.Y. ENDO. 1969. The histochemical localization of several enzymes of soybeans infected with the root-knot nematode *Meloidogyne incognita acrita*. *Journal Nematology*. 1(3): 265-276.
- VIGLIERCHIO, D.R. 1971. Nematodes and other pathogens in auxin-related plant-growth disorders. *Botanical Review*. 37:1-21.
- WHITEHEAD, A.G. 1997. **Plant nematode control**. CAB International. UK. 384 p.
- WIGGERS, R.J., STARR, J.L. y H.J. PRICE. 1990. DNA content and variation in chromosome number in plant cells affected by *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. *Phytopathology*. 80: 1391-1395.
- WYSS U. y M.W. GRUNDLER. 1992a Seminar: *Heterodera schachtii* and *Arabidopsis thaliana* a model host-parasite interaction. *Nematologica*. 38: 488-493.
- WYSS U., GRUNDLER F.M.W. y A. MUNICH. 1992b The parasitic behavior of 2nd stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Nematologica*. 38: 98-111.
- ZUCKERMAN B.M., MAI W.F., y R.A. ROHDE. 1971. **Plant Parasitic Nematodes**. Volumen II. Academic Press. U.S.A. 347 p.
- ZUCKERMAN B.M. y R.A. ROHDE. 1981. **Plant Parasitic Nematodes**. Academic Press. U.S.A. 508 p.

APÉNDICE

FIJADOR CRAF III

Solución A

Ácido crómico	60 mL
Ácido acético	40 mL
Agua destilada	900 mL

Solución B

Formaldehído	228 mL
Agua destilada	782 mL

Mezclar soluciones A y B (1:1) al usar.

TINCIÓN CUÁDRUPLE DE JOHANSEN

REACTIVO	TIEMPO
Xilol 1	5 minutos
Xilol 2	5 minutos
Xilol – etanol	5 minutos
Etanol 96%	5 minutos
Etanol 70%	5 minutos
Safranina	25 minutos
Agua destilada	Enjuagar
Cristal violeta	2 minutos
Agua destilada	Enjuagar
Butanol	2 minutos
Butanol	2 minutos
Verde rápido	20 minutos
Verde rápido – Naranja G 1	20 minutos
Verde rápido – Naranja G 2	20 minutos
Naranja G	2 horas
Butanol	Enjuagar
Xilol 3	5 minutos
Xilol 4	5 minutos

PREPARACIÓN DE COLORANTES**1. Safranina 1%**

Safranina 1g
Alcohol etílico 50% 100 mL

2. Cristal violeta 0.5%

Cristal violeta 0.5g
Agua destilada 100 mL

3. Naranja G 0.5%

Naranja G 0.5 g
Esencia de clavo 100 mL

4. Verde rápido 1%

Verde rápido SIGMA 1 g
Alcohol butílico absoluto 100 mL

5. Verde rápido – Naranja G 1

Verde rápido 1% 145mL
Naranja G 2 mL

6. Verde rápido – Naranja G 2

Verde rápido 1% 148mL
Naranja G 2 mL

ESTRUCTURA	COLOR
Cromatina en división	Rojo
Resto de la cromatina	Púrpura
Nucleoplasma	Verdoso
Paredes celulares lignificadas	Rojo brillante
Paredes celulares cutinizadas	Rojo-púrpura
Paredes suberizadas	Rojas
Paredes de celulosa	Verde-anaranjado
Citoplasma	Anaranjado brillante
Lámina media	Verde
Granos de almidón	Púrpura
Calosa	Rojo

DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS PEROXIDASAS (Giebel, *et al.*, 1971)

- 1mL solución saturada de NH_4Cl
- 1mL solución de ácido etilendiamina tetra acético (EDTA) al 5%
- 9 mL solución saturada de benzidina
- 1 gota de H_2O_2 al 3%

* Peroxidasas activas tiñen de azul