



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

**“Cambios químicos e histológicos en raíces de frijol
(*Phaseolus vulgaris*) parasitado por el nematodo falso
nodulador *Nacobbus aberrans* (Nematoda: Pratylenchidae) ”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
M A E S T R O E N C I E N C I A S
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A :

BIOL. Ricardo Martínez Fuentes

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MA. CRISTINA PÉREZ AMADOR Y BARRÓN

MÉXICO D.F.

SEPTIEMBRE 2007



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.

RECONOCIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme dado la oportunidad de superarme académicamente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a través de él al pueblo de México por proporcionarme la beca con número de registro 189748, con la cual pude sostenerme económicamente durante el tiempo que duraron mis estudios; indudablemente sin su ayuda no hubiera sido posible la presente obra.

A la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional (SIP-IPN) por haber financiado el proyecto 20070929 titulado Nematodos Fitoparasitos Agalladores: histopatología, patogenicidad y control a cargo del Dr. Alejandro Tovar Soto, y del cual el presente trabajo forma parte.

A los miembros de mi Comité Tutorial:

Dra. María Cristina Pérez Amador y Barrón

Dra. Gladys Iliana Cassab López

Dra. Alicia Brechu Franco

Quiénes con su profundo conocimiento científico supieron criticar, sugerir y conducir el desarrollo experimental y escrito del presente trabajo que hoy llega a su culminación.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Cristina Pérez Amador y Barrón quién además de brindarme su amistad y consejo, puso a mi disposición su conocimiento y las instalaciones y materiales del Laboratorio de Química a su cargo.

A la Dra. Gladis Iliana Cassab López por sus acertadas críticas a la obra.

A la Dra. Alicia Brechu Franco por su apoyo en el reconocimiento de las estructuras tisulares observadas durante el estudio de los aspectos histológicos.

Al Dr. Guillermo Laguna Hernández por sus oportunas sugerencias y aportaciones al escrito final.

Al Dr. César Domínguez Pérez Tejada por sus críticas observaciones que enriquecieron el presente trabajo.

Al Dr. Alejandro Tovar Soto, jefe del Laboratorio de Nematología Agrícola del Departamento de Parasitología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (ENCB-IPN), quien sugirió el tema de investigación y facilitó los materiales con que se elaboró la mayor parte del desarrollo experimental; por la amistad que me has dispensado en estos años, mil gracias

A la QBP Esther Uria Galicia del Laboratorio de Histología del Departamento de Morfología de la ENCB-IPN por haberme facilitado y asesorado en el manejo del crióstato a su cargo.

A la Q.A. Verónica Muñoz Ocotero, técnica del Laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias – UNAM, por su generosidad al compartir parte de su tiempo y conocimiento durante la realización del estudio químico.

A mis entrañables amigos y Profesores: Dr. Fernando de la Jara Alcocer, QBP Filiberto Zerón Bravo y Biol. Rolando Torres Coronel por el compañerismo, calidez y confianza que me han mostrado en todos estos años y por haber despertado en mi la pasión por la Nematología Agrícola.

Finalmente deseo agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México la oportunidad de superarme académicamente.

DEDICATORIA

A mi madre (q.e.p.d.) por la inolvidable calidez y amor con que me crió.

A mi padre por sus enseñanzas.

A mi compañera y amantísima esposa Sofía, por ser el aliento que me impulsa y el apoyo donde descanso.

A mi hijo Adrián porque ha mostrado ser un ejemplo de responsabilidad y confianza.

A mi hija Sandra Atzimba por su alegría, constancia y fortaleza.

A mi hija Erika Itzel por su firmeza, dedicación, espontaneidad y perseverancia.

A mis hermanos, como una inspiración que los lleve a materializar sus sueños.

A mis sobrinos, que sea un estímulo a sus deseos de superación.

*Le viene bien al hombre un poco de oposición,
que las cometas se levantan contra el viento,
no a favor de él.*

Cervantes

ÍNDICE	Página
ÍNDICE DE CUADROS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
RESUMEN.....	XIII
SUMMARY.....	XV
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
2.1. EL PARÁSITO.....	4
2.1.1. HISTORIOGRAFÍA DE <i>N. aberrans</i> (Thorne, 1935) Thorne and Allen, 1944	4
2.1.2. MORFOLOGIA Y ANATOMIA.....	4
2.1.3. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.....	6
2.1.4. CICLO DE VIDA.....	6
2.1.5. TAXONOMÍA.....	8
2.1.6. HOSPEDEROS.....	9
2.1.7. VARIABILIDAD.....	10
2.2. EL HUÉSPED.....	13
2.2.1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE <i>Phaseolus vulgaris</i> L ...	13
2.2.2. VARIABILIDAD.....	14
2.2.3. TAXONOMÍA.....	16
2.2.4. PRODUCCIÓN Y CULTIVO.....	16
2.2.5. IMPORTANCIA Y VALOR NUTRITIVO.....	18
2.2.6. PATÓGENOS Y FUENTES DE RESISTENCIA.....	19
2.3. EFECTO DE <i>Nacobbus aberrans</i> EN LAS PLANTAS.....	21
2.3.1. ALTERACIONES EN LA FISILOGIA.....	21
2.3.2. EFECTOS SOBRE LA PRODUCTIVIDAD DEL FRIJOL.....	22
2.3.3. ALTERACIONES HISTOLÓGICAS.....	25

2.3.4. ALTERACIONES FITOQUÍMICAS.....	29
2.4. RESISTENCIA CONTRA NEMATODOS FITOPARÁSITOS.....	33
III. MATERIAL Y MÉTODO.....	38
3.1. ORIGEN DEL MATERIAL BIOLÓGICO.....	38
3.1.1. El nematodo.....	38
3.1.2. El huésped.....	38
3.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	39
3.3. OBTENCIÓN DE INÓCULO E INOCULACIÓN.....	39
3.4. <u>Experimento 1.</u> CAMBIOS HISTOLÓGICOS EN RAÍCES DE DOS CULTIVARES DE FRIJOL PARASITADO POR DOS POBLACIONES DE <i>N. aberrans</i>	41
3.5. <u>Experimento 2.</u> CAMBIOS QUÍMICOS EN RAÍCES DE DOS CULTIVARES DE FRIJOL INOCULADO CON <i>N. aberrans</i> POBLACIÓN CHAPINGO.....	43
3.6. <u>Experimento 3.</u> CAMBIOS QUÍMICOS EN RAÍCES DE DOS CULTIVARES DE FRIJOL INOCULADO CON <i>N. aberrans</i> POBLACIÓN TECAMACHALCO.....	45
3.7. <u>Experimento 4.</u> REPRODUCCIÓN DE <i>N. aberrans</i> POBLACIÓN CHAPINGO EN DIVERSOS CULTIVARES DE FRIJOL.....	46
3.8. <u>Experimento 5.</u> REPRODUCCIÓN DE <i>N. aberrans</i> POBLACIÓN TECAMACHALCO EN DOS CULTIVARES DE FRIJOL.....	48
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
4.1. <u>Experimento 1.</u> CAMBIOS HISTOLÓGICOS EN RAÍCES DE DOS CULTIVARES DE FRIJOL PARASITADO POR DOS POBLACIONES DE <i>N. aberrans</i>	49
a) Anatomía de la raíz de frijol	49
b) Alteraciones histológicas por <i>N. aberrans</i> en frijol a 15, 45 y 90 días después de inoculado (ddi).....	52

c) Histología de raíces de frijol a 2 y 3 días después de inoculados (ddi) con <i>N. aberrans</i>	60
d) Histología de agallas a 105 días después de inoculadas (ddi)	62
4.2. Experimento 2. CAMBIOS QUÍMICOS EN RAÍCES DE DOS CULTIVARES DE FRIJOL INOCULADO CON <i>N. aberrans</i> POBLACIÓN CHAPINGO.....	70
a) Análisis cromatográfico de los extractos hexánicos.....	70
b) Análisis cromatográfico de los extractos de acetato de etilo.....	75
c) Análisis cromatográfico de los extractos de metanol	79
4.3. Experimento 3. CAMBIOS QUÍMICOS EN RAÍCES DE DOS CULTIVARES DE FRIJOL INOCULADO CON <i>N. aberrans</i> POBLACIÓN TECAMACHALCO.....	88
a) Análisis cromatográfico de los extractos hexánicos.....	88
b) Análisis cromatográfico de los extractos de acetato de etilo.....	92
c) Análisis cromatográfico de los extractos de metanol	96
4.4. Experimento 4. REPRODUCCIÓN DE <i>N. aberrans</i> POBLACIÓN CHAPINGO EN SEIS CULTIVARES DE FRIJOL.....	105
4.5. Experimento 5. REPRODUCCIÓN DE <i>N. aberrans</i> POBLACIÓN TECAMACHALCO EN DOS CULTIVARES DE FRIJOL.....	113
V. DISCUSIÓN GENERAL.....	117
VI. CONCLUSIONES.....	120
VII. CONCLUSIÓN GENERAL.....	122
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	123
IX. APÉNDICE.....	143

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Reportes de agallamiento y reproducción en diversos cultivares de frijol confrontados natural o experimentalmente con poblaciones de <i>N. aberrans</i> de diferente origen geográfico.....	22
Cuadro 2. Principales características del sincicio de <i>N. aberrans</i> en cultivos de importancia económica.	27
Cuadro 3. Efecto de algunos metabolitos sobre la plagas y enfermedades de las plantas.....	30
Cuadro 4. Presencia de bandas con sus respectivos Rf's en el perfil cromatográfico del extracto hexánico de raíces de frijol cv Negro Querétaro inoculado con 2000 juveniles de <i>N. aberrans</i> población Chapingo evaluado a 15, 30, 60 ddi.....	70
Cuadro 5. Presencia de bandas con sus respectivos Rf's en el perfil cromatográfico del extracto hexánico de raíces de frijol cv Azufrado inoculado con 2000 juveniles de <i>N. aberrans</i> población Chapingo evaluado a 15, 30, 60 ddi.....	73
Cuadro 6. Presencia de bandas con sus respectivos Rf's en el perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de raíces de frijol cv Negro Querétaro inoculado con 2000 juveniles de <i>N. aberrans</i> población Chapingo evaluado a 15, 30, 60 ddi.....	75
Cuadro 7. Presencia de bandas con sus respectivos Rf's en el perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de raíces de frijol cv Azufrado inoculado con 2000 juveniles de <i>N. aberrans</i> población Chapingo evaluado a 15, 30, 60 ddi.....	77
Cuadro 8. Presencia de bandas con sus respectivos Rf's en el perfil cromatográfico del extracto de metanol de raíces de frijol cv Negro Querétaro inoculado con 2000 juveniles de <i>N. aberrans</i> población Chapingo evaluado a 15, 30, 60 ddi.....	80
Cuadro 9. Presencia de bandas con sus respectivos Rf's en el perfil cromatográfico del extracto de metanol de raíces de frijol cv Azufrado inoculado con 2000 juveniles de <i>N. aberrans</i> población Chapingo evaluado a	

15, 30, 60 ddi.....	82
Cuadro 10. Número total de cambios por efecto del nematodo en la intensidad de las bandas del perfil cromatográfico de tres extractos de raíz de los cultivares de frijol Negro Querétaro y Azufrado inoculados con <i>N. aberrans</i> población Chapingo.....	84
Cuadro 11. Presencia de bandas con sus respectivos Rf's en el perfil cromatográfico del extracto hexánico de raíces de frijol cv Negro Querétaro inoculado con 15000 huevecillos de <i>N. aberrans</i> población Tecamachalco evaluado a 15, 45, 90 ddi.....	88
Cuadro 12. Presencia de bandas con sus respectivos Rf's en el perfil cromatográfico del extracto hexánico de raíces de frijol cv Canario) inoculado con 15000 huevecillos de <i>N. aberrans</i> población Tecamachalco evaluado a 15, 45, 90 ddi.....	90
Cuadro 13. Presencia de bandas con sus respectivos Rf's en el perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de raíces de frijol cv Negro Querétaro inoculado con 15000 huevecillos de <i>N. aberrans</i> población Tecamachalco evaluado a 15, 45, 90 ddi.....	92
Cuadro 14. Presencia de bandas con sus respectivos Rf's en el perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de raíces de frijol cv Canario inoculado con 15000 huevecillos de <i>N. aberrans</i> población Tecamachalco evaluado a 15, 45, 90 ddi.....	94
Cuadro 15. Presencia de bandas con sus respectivos Rf's en el perfil cromatográfico del extracto de metanol de raíces de frijol cv Negro Querétaro inoculado con 15000 huevecillos de <i>N. aberrans</i> población Tecamachalco evaluado a 15, 45, 90 ddi.....	96
Cuadro 16. Presencia de bandas con sus respectivos Rf's en el perfil cromatográfico del extracto de metanol de raíces de frijol cv Canario inoculado con 15000 huevecillos de <i>N. aberrans</i> población Tecamachalco evaluado a 15, 45, 90 ddi.....	99
Cuadro 17. Número total de cambios por efecto del nematodo en la intensidad de las bandas del perfil cromatográfico de tres extractos de raíz de los cultivares de frijol Negro Querétaro y Canario inoculados con <i>N. aberrans</i> población Tecamachalco.....	101

Cuadro 18. Estadísticos básicos del número de juveniles presentes a 105 días después de inoculados con 4000 huevecillos de <i>N. aberrans</i> población Chapingo en seis cultivares de frijol (<i>P. vulgaris</i>).	105
Cuadro 19. Estadísticos básicos del número de juveniles (J_2) de <i>N. aberrans</i> población Chapingo en diversos cultivares de frijol (<i>P. vulgaris</i>) a dos y tres días después de inoculados con 2000 juveniles.....	107
Cuadro 20. Número promedio de juveniles (J_2) de <i>N. aberrans</i> población Chapingo en diversos cultivares de frijol (<i>P. vulgaris</i>) a dos y tres días después de inoculados con 2000 juveniles.....	109
Cuadro 21. Estadísticos básicos del número de juveniles presentes a 105 días después de inoculados con 15000 huevecillos de <i>N. aberrans</i> población Tecamachalco en dos cultivares de frijol (<i>P. vulgaris</i>).....	114

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Cortes histológicos transversales en diferentes zonas de la raíz de frijol <i>P. vulgaris</i> que muestran los cambios graduales que ocurren a nivel histológico del cilindro vascular a lo largo de una raíz desde el meristemo hasta la región madura.....	51
Figura 2. Juveniles recuperados de lesiones en las raíces de frijol común (<i>P. vulgaris</i>) inoculadas con huevecillos de <i>N. aberrans</i>	53
Figura 3. Alteraciones histológicas causadas por <i>N. aberrans</i> en frijol.....	55
Figura 4. Serie completa de secciones transversales de una raíz de frijol cultivar (cv) Canario 45 días después de inoculadas (ddi) con <i>N. aberrans</i> población Tecamachalco.....	57
Figura 5. Alteraciones histológicas en raíces de frijol cv Canario a 45 ddi con <i>N. aberrans</i> población Tecamachalco visualizadas por la técnica de Johansen.....	59
Figura 6. Juveniles segundo estadio de <i>Nacobbus aberrans</i> atravesando la interfase entre la zona de proliferación celular y la zona de elongación a 3 ddi.....	61

Figura 7. Cortes histológicos de agallas de <i>N. aberrans</i> población Tecamachalco en frijol cv Canario a 105 ddi.....	63
Figura 8. Sincicios de <i>N. aberrans</i> población Tecamachalco en frijol cv Canario a 105 ddi teñidos con la técnica de Zielh-Nielsen.....	65
Figura 9. Sincicios de <i>N. aberrans</i> población Tecamachalco en frijol cv Canario a 105 ddi teñidos con la técnica de Johansen.....	66
Figura 10. Variaciones en la intensidad de bandas del perfil cromatográfico del extracto hexánico de raíces de frijol cv Negro Querétaro inoculado con <i>N. aberrans</i> población Chapingo observado con luz ultravioleta (254 y 365 nm) y revelado con Sulfato Cérico.....	72
Figura 11. Variaciones en la intensidad de bandas del perfil cromatográfico del extracto hexánico de raíces de frijol cv Azufrado inoculado con <i>N. aberrans</i> población Chapingo observado con luz ultravioleta (254 y 365 nm) y revelado con Sulfato Cérico.....	74
Figura 12. Variaciones en la intensidad de bandas del perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de raíces de frijol cv Negro Querétaro inoculado con <i>N. aberrans</i> población Chapingo observado con luz ultravioleta (254 y 365 nm) y revelado con Sulfato Cérico.....	76
Figura 13. Variaciones en la intensidad de bandas del perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de raíces de frijol cv Azufrado inoculado con <i>N. aberrans</i> población Chapingo observado con luz ultravioleta (254 y 365 nm) y revelado con Sulfato Cérico.....	78
Figura 14. Variaciones en la intensidad de bandas del perfil cromatográfico del extracto de metanol de raíces de frijol cv Negro Querétaro inoculado con <i>N. aberrans</i> población Chapingo observado con luz ultravioleta (254 y 365 nm) y revelado con Sulfato Cérico.....	81
Figura 15. Variaciones en la intensidad de bandas del perfil cromatográfico del extracto de metanol de raíces de frijol cv Azufrado inoculado con <i>N. aberrans</i> población Chapingo observado con luz ultravioleta (254 y 365 nm) y revelado con Sulfato Cérico.....	83
Figura 16. Variaciones en la intensidad de bandas del perfil cromatográfico del extracto hexánico de raíces de frijol cv Negro Querétaro inoculado con <i>N. aberrans</i> población Tecamachalco observado con luz ultravioleta (254 y 365 nm) y revelado con Sulfato Cérico	89
Figura 17. Variaciones en la intensidad de bandas del perfil cromatográfico del extracto hexánico de raíces de frijol cv Canario inoculado con <i>N. aberrans</i> población Tecamachalco observado con luz ultravioleta (254 y 365 nm) y	

revelado con Sulfato Cérico.....	91
Figura 18. Variaciones en la intensidad de bandas del perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de raíces de frijol cv Negro Querétaro inoculado con <i>N. aberrans</i> población Tecamachalco observado con luz ultravioleta (254 y 365 nm) y revelado con Sulfato Cérico.....	93
Figura 19. Variaciones en la intensidad de bandas del perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de raíces de frijol cv Canario inoculado con <i>N. aberrans</i> población Tecamachalco observado con luz ultravioleta (254 y 365 nm) y revelado con Sulfato Cérico.....	95
Figura 20. Variaciones en la intensidad de bandas del perfil cromatográfico del extracto de metanol de raíces de frijol cv Negro Querétaro inoculado con <i>N. aberrans</i> población Tecamachalco observado con luz ultravioleta (254 y 365 nm) y revelado con Sulfato Cérico.....	97
Figura 21. Variaciones en la intensidad de bandas del perfil cromatográfico del extracto de metanol de raíces de frijol cv Canario inoculado con <i>N. aberrans</i> población Tecamachalco observado con luz ultravioleta (254 y 365 nm) y revelado con Sulfato Cérico.....	100
Figura 22. Número de nematodos presentes por sistema de raíz en cultivares de frijol inoculados con 4000 huevecillos de <i>N. aberrans</i> población Chapingo a 105 días después de la inoculación.....	106
Figura 23. Número de nematodos presentes por sistema de raíz en cultivares de frijol inoculados con 2000 juveniles (J ₂) de <i>N. aberrans</i> población Chapingo a (A) 2 y (B) 3 días después de la inoculación.....	108
Figura 24. Presencia de <i>N. aberrans</i> población Chapingo (A) y población Tecamachalco (B) en raíces de frijol cv Querétaro Negro a 105 ddi; (C) juveniles segundo estadio (J ₂) de <i>N. aberrans</i> población Chapingo a 3 ddi en cv Negro Querétaro; (D) sitios de lesión de <i>N. aberrans</i> población Chapingo en raíces de frijol cv Negro Querétaro a 105 ddi; (E) raíces de frijol cv Canario mostrando agallas y sitios de lesión de <i>N. aberrans</i> población Tecamachalco a 105 ddi;	112
Figura 25. Número de nematodos presentes por sistema de raíz en cultivares de frijol inoculados con 15000 huevecillos de <i>N. aberrans</i> población Tecamachalco a 105 días después de la inoculación.....	114

RESUMEN

Se estudiaron las alteraciones histológicas que dos poblaciones del nematodo falso nodulador de la raíz *N. aberrans* (Tecamachalco, Puebla y Chapingo, Edo. de México) provocan en los cultivares (cvs) Negro Querétaro y Canario a 15, 45 y 90 días después de inoculados (ddi); y de manera preliminar las posibles alteraciones fitoquímicas que induce en las raíces de los cvs Negro Querétaro y Azufrado a 15, 30 y 60 ddi con la población Chapingo y en los cvs Negro Querétaro y Canario a 15, 45 y 90 ddi con la población Tecamachalco. Además, se confirmó la reproducción de la población Chapingo en diversos cultivares de frijol a 105 ddi, así como de la población Tecamachalco en los cvs Canario y Negro Querétaro en el mismo lapso.

Los estudios histológicos se realizaron por la técnica de Fucsina Básica-Verde Rápido de Zielh-Nielsen, encontrándose que los nematodos de ambas poblaciones no alcanzaban el estado adulto y que como juveniles se ubicaban en el córtex, encerrados en cavidades rodeadas por células modificadas.

Los estudios fotoquímicos se realizaron por cromatografía en capa fina de extractos de la raíz. Las placas cromatográficas mostraron bandas con diferentes intensidades que señalaban diferencias en la concentración de compuestos como resultado del efecto del nematodo sobre el metabolismo de la raíz.

No hubo agallas ni reproducción en todos los cultivares de frijol inoculados con la población Chapingo y en el cv Negro Querétaro con la población Tecamachalco mientras que en el cv Canario esta misma población indujo un número reducido de agallas con hembras reproductivas. El análisis histológico de estas agallas mostró la presencia de un sincicio bien desarrollado.

Se concluye que ambas poblaciones de *N. aberrans* afectaron de manera diferente el metabolismo del frijol, existiendo en los cultivares examinados mecanismos de incompatibilidad postinfectivos que inhibieron el desarrollo de los nematodos, encerrándolos en cavidades en el córtex de la raíz y evitando que llegaran a madurar y reproducirse. La población Tecamachalco presentó algunos individuos que escaparon al efecto de estos mecanismos e indujeron la formación de agallas y de sincicios bien desarrollados que alteraron la organización del cilindro vascular, y que se reprodujeron a más de 105 días después de inoculados.

ABSTRACT

It is investigated the histological alterations that two populations of *N. aberrans* (collected in Tecamachalco, Puebla and Chapingo, Edo. of Mexico) to induce in common beans cultivars (cvs) Negro Querétaro and Canario to 15, 45 and 90 days after inoculation (dai) and a study preliminary is carried out to detect possible phytochemical alterations induced by population Chapingo in the cultivars Negro Querétaro and Azufrado to 15, 30 and 60 dai and by the population Tecamachalco in the cvs Negro Querétaro and Canario to 15, 45 and 90 dai. Also, is confirmed the reproduction of population Chapingo in several cultivars to 105 dai, and of the population Tecamachalco in the cultivars Canario and Negro Querétaro in the same time.

The histological studies was carried out for the technique of Fucine Basic-Fast Green of Zielh-Nielsen. The histological studies did not show adults nematodes, only juvenils is located in the cortical tissue in cavities delimited by modified cells.

The phytochemical studies were carried out by thin layer cromatography of extracts of both inoculated and not inoculated roots. The chromatographics plates showed spots with different intensities that pointed out differences in the concentration of compound as a result of the effect of the nematode on the metabolism of the root.

No had root-knot neither reproduction in all bean cultivars inoculated with population Chapingo and in cultivar Negro Querétaro with population Tecamachalco while in cultivar Canario this same population induced few root-knot and reproductive females. Histological analyses of this galls show a syncytia well development.

The conclusion is that the metabolism of the bean is affected in a different way by populations of *N. aberrans*, existing in the cultivars examined mechanisms of incompatibility postinfectives that inhibited the development of the nematodes, locking them in cavities in the cortical root tissue, avoiding that they ended up maturing and to reproduce. In the population Tecamachalco some individuals that escaped to the effect of these mechanisms presented and they induced the formation of root-knot and of well developed syncytias that altered the organization of vascular cylinder, and that they reproduced to more than 105 days after inoculation.

I. INTRODUCCIÓN

Nacobbus aberrans es un nematodo originario de Sudamérica que actualmente está presente en varios estados de nuestro país, con poblaciones que han mostrado diferencias en cuanto a características morfométricas, enzimáticas y posiblemente fisiológicas, por lo que se sospecha de la existencia de razas en las poblaciones actualmente descritas para México (Jatala, 1985; Cid del Prado-Vera, 1986 y 1992; Toledo 1989; Olvera *et al.*, 1995).

El nematodo pseudoagallador o falso nodulador, como también se conoce a *Nacobbus aberrans*, se encuentra como endoparásito de raíces de innumerables cultivos, algunos de importancia agrícola y económica. Actualmente se sabe que algunas poblaciones de este nematodo son capaces de parasitar frijol y disminuir en más de 30% la producción de este cultivo (Inserra *et al.*, 1985; Otazú *et al.*, 1985; Zamudio, 1987 Silva-Jaramillo, 1989; García-Camargo y Trejo, 1995).

Las plantas parasitadas por nematodos endoparásitos generalmente muestran grados variables de marchitamiento y clorosis, así como una disminución en su crecimiento y desarrollo que conducen a una pérdida o disminución en la cantidad y calidad de los productos que de ellas pudieran obtenerse (Taylor y Sasser, 1983; Sasser y Carter, 1985).

Además de los síntomas arriba mencionados, *N. aberrans* induce en las raíces de las plantas que parasita, una serie de nódulos o agallas dentro de las cuales se encuentra presente un sitio de alimentación llamado sincicio (masa celular multinucleada) que altera la organización tisular de la raíz (Endo, 1981, 1987b; Tovar – Soto, 1999).

La magnitud del daño causado por los nematodos puede estudiarse a nivel de la planta completa o a nivel tisular, celular, químico y molecular. Estos conocimientos sirven como parámetros para evaluar el grado de resistencia o susceptibilidad de una planta a un nematodo en particular.

Para *N. aberrans* los estudios histopatológicos se han realizado en hospedantes tales como papa (*Solanum tuberosum* L.), chile (*Capsicum annuum* L.), remolacha (*Beta vulgaris* L.), espinaca (*Spinacea oleracea*) y jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Lordello *et al.*, 1961; Castillo y Marbán-Mendoza, 1984; Inserra *et al.*, 1985;

Caballero y Muñoz, 1987; Tovar *et al.*, 1990). Estudios de este tipo aún no se realizan en frijol

Se desconoce el mecanismo por el cual el nematodo induce las alteraciones que conducen a la formación de la agalla y del sitio de alimentación, aunque se sugiere que son resultado de complejas interacciones entre productos del metabolismo de la planta y del nematodo que afectan a ambas partes y que definen si una interacción es o no exitosa (Davis *et al.*, 2004).

El aislamiento y naturaleza de los productos presentes durante el inicio, establecimiento y duración de una interacción planta - nematodo ha sido poco estudiado. Lo realizado sobre estos aspectos fitoquímicos implica a interacciones con especies de *Meloidogyne* y *Heterodera* y ha sido enfocado principalmente al estudio de los mecanismos de defensa que las plantas tienen contra estas especies (Veech, 1981; Huang, 1985b; Kaplan y Davis, 1987; Carpentieri-Pípolo *et al.*, 2005). Para el sistema frijol – *Nacobbus aberrans* el desconocimiento de este aspecto es total.

Una manera de disminuir el efecto de los nematodos en la producción de los cultivos es mediante el uso de genotipos o cultivares resistentes, lo que implica realizar la búsqueda de la resistencia en el germoplasma disponible del cultivo en cuestión, que en el caso del frijol ha mostrado una gran reserva genética disponible para el mejoramiento genético de la especie (Roberts, 1992; Acosta-Gallegos, 1993).

En el caso de la interacción *Nacobbus aberrans* – frijol, la detección de genotipos o cultivares resistentes ha sido muy lenta debido principalmente a que no se ha definido si las poblaciones del nematodo que son capaces de crecer en frijol constituyen una raza fisiológica propiamente dicha.

Se ha reportado que las poblaciones procedentes de Puebla (Cholula, Tecamachalco) y Zacatecas (Pánuco, Pozo de Gamboa, Villa de Cos) crecen y se reproducen en frijol (Silva-Jaramillo, 1989; Hernández, 2001) mientras que las procedentes de Actopan, Hidalgo; Cuautla, Morelos y Chapingo, Estado de México son incapaces de hacerlo (Toledo 1990).

Hay controversia en cuanto a si la población de Tecamachalco puede reproducirse en frijol (Hernández, 2001). Silva-Jaramillo, (1989); y Toledo (1990) han encontrado que se reproduce bien en los cultivares Canario y Negro Querétaro, e

incluso Toledo *et al* (1993) proponen a este último cultivar como parte de un juego de diferenciales para la separación de razas

Considerando que hay un vacío de información en muchos de los aspectos sobre la interacción parasítica *N. aberrans* – frijol, sobretodo de aquellos que consideran la reproducción del nematodo en frijol y la magnitud del daño causado por el parásito en la planta a nivel tisular, citológico y químico, se realizó el presente estudio con el siguiente:

OBJETIVO GENERAL

Conocer las alteraciones histológicas y químicas que la infección por *N. aberrans* provoca en la raíz de frijol.

OBJETIVOS PARTICULARES

1) Describir las alteraciones histológicas provocadas en raíces de frijol cv Canario y Negro Querétaro infectadas separadamente con las poblaciones Chapingo y Tecamachalco de *N. aberrans*.

2) Detectar de manera preliminar las alteraciones químicas que el parásito induce en la planta mediante la evaluación de los perfiles cromatográficos de los metabolitos secundarios de raíces de frijol cv Azufrado y cv Negro Querétaro infectados con la población Chapingo de *N. aberrans*, y de cv Canario y cv Negro Querétaro con la población Tecamachalco del nematodo.

3) Confirmar la reproducción de las poblaciones de *Nacobbus aberrans* procedentes de Chapingo, Estado de México en los cultivares de frijol Azufrado, Canario, Ejotero, Flor de Mayo, Negro Jamapa y Negro Querétaro, y de la población de Tecamachalco, Puebla en los cultivares Canario y Negro Querétaro.

II. ANTECEDENTES

2.1. EL PARÁSITO

2.1.1. HISTORIOGRAFÍA DE *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne and Allen, 1944

Las primeras observaciones de *Nacobbus* fueron realizadas por Cobb en 1918 (citado por Manzanilla *et al.*, 2002) quién lo identificó como *Heterodera schactii*; posteriormente Thorne (1935) encontró en *Atriplex confertifolia* (Torr. and Frém) S. Wats una nueva especie que describió como *Anguillulina aberrans*, a la cual Filipjev (1936) consideró como perteneciente al género *Pratylenchus*, resultando el binomio *P. aberrans*.

Thorne y Allen (1944) describieron a la especie *Nacobbus dorsalis* y consideraron a *A. aberrans* como perteneciente al género, nominándola como *N. aberrans*; Thorne y Schuster (1956) describieron, en remolacha azucarera (*Beta vulgaris*, L), a *N. batatiformis*. Más tarde, Franklin (1959) hizo la descripción de *N. serendipiticus* en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) cultivado en invernadero en Inglaterra; esta misma especie fue encontrada parasitando papa (*Solanum tuberosum* L.) en Sudamérica por Lordello *et al.* (1961), quienes la consideraron como subespecie *N. serendipiticus bolivianus*.

Sher (1970) hizo una revisión del género, y ubicó a *N. batatiformis*, *N. serendipiticus* y *N. serendipiticus bolivianus* como sinónimos de *N. aberrans* ya que consideró que no existían diferencias morfológicas consistentes entre ellas como para considerarlas especies separadas, de tal manera que el grupo quedó reducido a *N. aberrans* y *N. dorsalis*, esta última como la especie tipo. Más tarde, los prestigiosos nematólogos Luc (1987) y Siddiqi (2000) aceptaron la sinonimia como válida.

2.1.2. MORFOLOGÍA Y ANATOMÍA

El género *Nacobbus* agrupa a dos especies (Sher, 1970): *N. aberrans* y *N. dorsalis*.

Filiformes en la fase preparásitica y comienzos de la parasítica de su ciclo de vida, los miembros del género *Nacobbus* alcanzan 1 - 2 mm de longitud y 10 – 20 µm de diámetro. En los estadios juveniles, la región cefálica está débilmente esclerotizada, con una región labial constituida por cuatro o cinco anillos. La boca se encuentra sobre una placa oral hexagonal u octagonal rodeada por cuatro a seis rebordes cuticulares o labios, que

continúa con un estoma donde se encuentra un estilete bien desarrollado con tres nódulos basales presentes en ambos sexos.

Posteriormente al estoma se encuentra un esófago musculoso que presenta un bulbo medio redondeado con una válvula muy prominente y un bulbo basal que se diferencia en glándulas elongadas que se sobreponen dorsalmente al intestino el cual se proyecta hacia la parte posterior del cuerpo y termina en una abertura anal que se ubica a 10 – 17 anillos del extremo posterior en *Nacobbus aberrans* y a 10 – 18 en *Nacobbus dorsalis*. El extremo posterior termina en una cola redondeada o ligeramente lobada que gradualmente se adelgaza. Los fasmidios, órganos sensoriales de función quimiorreceptora, se encuentran en la porción anterior de la cola. A diferencia de otros nematodos no presentan deiridios.

La totalidad de las hembras maduras son sésiles y globosas o en forma de huso, con un cuello que varía en tamaño; el extremo posterior del cuerpo es cónico, no elongado y de término redondeado (Cid del Prado-Vera, 1986, 1992).

Las hembras presentan un solo ovario, que cuando inmaduro es corto, mientras que en hembras maduras se distinguen una zona germinativa, una zona de crecimiento y una zona de maduración de oocitos. El oviducto es largo y en hembras maduras presenta los oocitos en estado de sinapsis, con cromosomas apareados, lo que sugiere que el modo de reproducción es anfimítico aunque no se descarta la partenogénesis de tipo meiótico (Martínez *et al.*, 1995). Algunos autores señalan la presencia de una espermateca en la que incluso se han encontrado espermatozoides (Doucet, 1989; Martínez *et al.*, 1995), aunque Sher (1970) no menciona la presencia de este órgano. El útero es tubular y en las hembras maduras alcanza grados altos de distensión, se abre al exterior en las hembras filiformes inmaduras en una vulva que se ubica a 91 o 97% de la longitud del cuerpo, a 8 o 14 anillos del ano en *N. dorsalis* y a 0.8 o 2.3 en *N. dorsalis* (Sher, 1970). En las hembras maduras la vulva es posterior. La abertura anal es poriforme y los fasmidios son puntiformes.

Los machos son vermiformes en todas sus etapas, y muestran algunas características más acentuadas que las hembras, como son el disco labial y el tamaño del estilete. Los campos laterales muestran cuatro incisuras con areolas distribuidas regularmente. Se presenta un solo testículo y las espículas, en posición ventral,

ligeramente curvadas. El extremo posterior del cuerpo es acuminado, y presenta una bursa de tipo peloderan (Manzanilla-López *et al.*, 2002).

2.1.3. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

N. aberrans es originario de la región andina (Jatala, 1985) y actualmente se halla en varios países del mundo. Se ha registrado en material cultivado en invernadero en Inglaterra, Finlandia, Holanda, Rusia, China e India sin que haya reportes que lo ubiquen en condiciones de campo (Manzanilla-López *et al.*, 2002).

En América se distribuye en el suroeste de los Estados Unidos, México, Perú, Bolivia y norte de Argentina y Chile (Brunner de Magar, 1967; Gómez-Tovar, 1973; Jatala *et al.*, 1977a, b; Doucet, 1989; Doucet *et al.*, 1994).

En México, Brunner de Magar (1967) lo reportó por primera vez en campos de cultivo de chile (*Capsicum annum*, L) en Chapingo, Estado de México, y desde entonces se ha detectado parasitando diversos cultivos, en los estados de Coahuila, Guanajuato, Hidalgo, Morelos, Oaxaca, Sn. Luis Potosí, Tlaxcala y Zacatecas (Rodríguez, 1974; Cid del Prado, 1986; Cruz, 1987; Silva-Jaramillo, 1989; Toledo, 1990; De la Jara, *et al.*, 1990; Velásquez y González 1991 citados por Velásquez-Valle, 2001; Cid del Prado-Vera, 1992; Toledo *et al.*, 1993; Torres *et al.*, 1994; García-Camargo y Trejo, 1995).

2.1.4. CICLO DE VIDA

El ciclo de vida de la mayoría de los nematodos fitoparásitos es muy semejante entre sí con particularidades en cada especie (Agrios, 1985).

En términos generales el primer estadio juvenil o J₁ de *N. aberrans* ocurre en el huevo, donde experimenta una primera muda a J₂ que eclosiona del huevecillo y penetra la raíz donde se mueve intracelularmente hasta que selecciona un sitio donde se establece; se cree que el nematodo puede entrar y salir varias veces de la raíz y alcanzar el siguiente estadio o J₃ en la raíz o en el suelo, en este estadio tanto machos como hembras muestran una notable reducción en la longitud de la glándula esofágica, su cuerpo tiende a adoptar una forma de “C” y generalmente las hembras son más cortas que los machos (Thorne y Schuster, 1956; Clark, 1967)

La presencia del estadio J₄ en suelo o dentro de la raíz sugiere que el J₃ también puede emigrar de la raíz o bien mantenerse en ella y experimentar la tercer muda, independientemente de donde se encuentre, para alcanzar el estadio J₄ (Quimí, 1979 citado por Manzanilla-López *et al.*, 2002). La última muda da paso al estado adulto y se cree que puede ocurrir en la raíz o en el suelo; se ha informado que las hembras adultas inmaduras son activas y tienen la capacidad de abandonar la raíz y penetrar otras raíces diferentes, moverse hacia el sistema vascular e inducir el sincicio y la agalla antes de desarrollarse en endoparásito sedentario mientras que los machos por su parte, abandonan la raíz y buscan a las hembras, con las que se cruzan dentro de la raíz (Clark, 1967).

Después de la fecundación, la hembra aumenta de tamaño, se torna globosa y deposita de 37 a 833 huevecillos en una matriz gelatinosa (Inserra, 1985; González *et al.*, 1989, Costilla 1985 citado por Manzanilla-López *et al.*, 2002).

Los estudios anteriores parecen confirmar el punto de vista de Manzanilla-López *et al.* (2002) quienes consideran que *N. aberrans* tiene dos estrategias para desarrollarse a estado adulto: 1) después de la penetración a las raíces por el J₂, el desarrollo puede ocurrir dentro o fuera de la raíz con repetidas penetraciones y emigraciones hasta que obtiene el estado adulto, 2) después de la penetración por el J₂, el desarrollo procede dentro de la raíz hasta alcanzar el estado adulto.

La temperatura afecta el desarrollo del nematodo, en remolacha a 25 °C el ciclo de huevo a huevo se completa a los 48 días, ocurriendo el desarrollo embriológico y la eclosión del J₂ en los 10 primeros días; los J₃ y J₄ aparecen a los 11 y 16 días respectivamente mientras que las agallas y las hembras maduras a los 30 días; las hembras con masas de huevecillos aparecen a los 38 días después de la penetración en la raíz (Inserra *et al.*, 1983). En raíces fragmentadas de tomate se ha observado que a 15°C no hay producción de huevecillos, mientras que a 20 y 30°C el ciclo de huevo a huevo se completa a los 43 días y a 25°C a los 36 días después de la inoculación. Las agallas aparecen a los 71, 36, 19 y 29 días a 15, 20, 25 y 30°C respectivamente. También la proporción machos: hembras se ve afectada por la temperatura, a 30°C es de 8 machos a una hembra. (Prasad y Webster, 1967)

En los nematodos se manifiestan estrategias fisiológicas que permiten detener su desarrollo bajo condiciones ambientales adversas. Este fenómeno se conoce como quiescencia cuando es debido a la acción de un factor estresante que al desaparecer

reactiva el desarrollo del nematodo, o bien, puede implicar a factores endógenos que detienen el desarrollo del nematodo sin importar que las condiciones ambientales sean las correctas, lo que implica que es temporalmente irreversible, esta condición es conocida como diapausa (Jones *et al.*, 1998 citado por Manzanilla-López *et al.*, 2002). Varios autores han reportado que estos fenómenos se manifiestan en *Nacobbus aberrans* (Clark, 1967; Inserra *et al.*, 1983).

Cristóbal-Alejo *et al.*, (2001a), implementaron un experimento de 12 meses de duración en microparcels con diversos estadios biológicos de *N. aberrans* (huevecillos libres, huevecillos contenidos en la matriz gelatinosa, J₂, J₃ y J₄, raíces agalladas fragmentadas con todos los estadios del nematodo) bajo condiciones de campo donde concluyen que los J₃ y los J₄ pueden sobrevivir durante ese lapso sin perder su infectividad al ser inoculados en raíces de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.).

La inducción y longitud de la diapausa en *N. aberrans* puede ser condicionada por el fotoperiodo (Womersley *et al.*, 1998 citados por Manzanilla-López *et al.*, 2002). Estudios sobre el comportamiento de los estados de desarrollo del nematodo bajo condiciones óptimas y subóptimas de fotoperiódodo han demostrado que en los J₃ hay un intervalo de tiempo pasado el cual las condiciones subóptimas no tienen efecto en la continuación del desarrollo mientras que los J₄ se mantienen en quiescencia y no mudan al estado posterior bajo esas mismas condiciones (Souza y Baldwin, 2000).

Los estudios anteriores sugieren que la duración del ciclo de vida se ve afectado por diversos factores ambientales (principalmente la temperatura), origen geográfico del nematodo y especie huésped.

2.1.5. TAXONOMÍA

Aun cuando hay incertidumbre a cerca de las relaciones filogenéticas de *N. aberrans*, actualmente se le clasifica en la familia Pratylenchidae con quienes comparte la forma globosa de las hembras, el solapamiento de las glándulas esofágicas, la cercanía de los fasmidios al ano. Estas características son consideradas como convergentes dentro de los Tylenchida y según Baldwin y Cap (1992) no son suficientes para elevar la clasificación del género. A continuación se resume la clasificación taxonómica de la especie:

PHYLLUM:	Nematoda
CLASE:	Secernentea
SUBCLASE:	Diplogasteria
ORDEN:	Tylenchida
SUBORDEN:	Tylenchina
SUPERFAMILIA:	Tylenchoidea
FAMILIA:	Pratylenchidae
SUBFAMILIA:	Nacobbinae
GENERO:	<i>Nacobbus</i>
ESPECIE:	<i>Nacobbus aberrans</i>

La especie tipo del género es *N. dorsalis*, la cual tiene una importancia económica menor debido a su limitada distribución geográfica.

2.1.6. HOSPEDEROS

Nacobbus aberrans tiene una amplia gama de hospederos que incluye a plantas pertenecientes a 18 familias botánicas entre las que se encuentran Amaranthaceae, Cactaceae, Chenopodiaceae, Poaceae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Solanaceae (Cornejo, 1977; Inserra *et al.*, 1985; Zamudio *et al.*, 1990; Canto-Sáenz, 1992 y Brodie *et al.*, 1993 citados por Manzanilla, 2002).

Dentro de las plantas que parasitan se hallan cultivos de gran importancia agrícola como frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), chile (*Capsicum Ann.um* L.) y papa (*Solanum tuberosum* L.), además de las especies hortícolas col (*Brassica oleracea* L.), lechuga (*Lactuca sativa* C.), calabaza (*Cucúrbita pepo* L.), verdolaga (*Portulaca oleracea* L.), e innumerables especies silvestres (Montes, 1979; Jatala, 1985; De la Jara *et al.*, 1990; Velásquez-Valle, 2001; Manzanilla *et al.*, 2002).

El rango de hospederos ha sido estudiado por Zamudio *et al.* (1990), Hernández (1992), Toledo (1990), Toledo *et al.* (1993), Tapia y Cid del Prado (1991, citados por Hernández, 2001) y Arcigas (1995 citado por Velásquez-Valle, 2001) con poblaciones del

nematodo de diferente origen geográfico. Estos trabajos tuvieron a siete hospedantes en común de un total de dieciséis, los cuales fueron: rábano (*Raphanus sativus* L), chile (*Capsicum annuum* L), zanahoria (*Daucus carota*, L), calabacita (*Cucurbita pepo* L), frijol (*Phaseolus vulgaris* L) y papa (*Solanum tuberosum* L.).

2.1.7. VARIABILIDAD

Se ha sugerido la posibilidad de que *N. aberrans* sea un complejo de especies dada las amplias diferencias morfológicas y morfométricas que existen entre poblaciones, misma que se ha constatado con microscopía óptica, y electrónica de barrido (Jatala y Golden, 1977; Doucet, 1989; Doucet y DiRenzo, 1991; Cid del Prado, 1992; Jatala, 1993; Arciga, 1995 citado por Hernández, 2001; Canto-Sáenz *et al.*, 1996; Doucet, 1996; Manzanilla-López *et al.*, 1999; Johnson, 1971 y Quimí, 1979 citados por Manzanilla López *et al.*, 2002). Otros autores consideran que es un complejo naciente de especies (Reid *et al.*, 2003)

Los análisis isoenzimáticos han mostrado variabilidad genética dentro de sus poblaciones. Incluso en individuos parásitos de un mismo huésped se ha detectado más variación que la que se encuentra entre poblaciones de diferentes áreas geográficas (Doucet y Gardenal, 1992, Olvera *et al.*, 1995).

La aplicación de las técnicas de enfocamiento isoeléctrico y de RAPD-PCR han definido tres posibles grupos para *N. aberrans*: dos Sudamericanos y uno mexicano con cierta afinidad con poblaciones de Argentina (Ibrahim *et al.*, 1997; Manzanilla-López *et al.*, 1999).

Por su parte los resultados de las técnicas citogenéticas aplicadas a poblaciones de *N. aberrans* no han sido concluyentes aunque se sospecha que existe variación entre poblaciones en cuanto a los números cromosómicos (Jatala y Boluarte, 1993; Martínez *et al.*, 1995; Canto-Sáenz *et al.*, 1996).

Diversos estudios han mostrado que algunas poblaciones de *N. aberrans* muestran variación en la preferencia de hospederos, lo que sugiere la presencia de razas fisiológicas o patotipos (Toledo, 1990; Costilla, 1990a b, 1992 y 1996; Jatala y Boluarte, 1993; Toledo *et al.*, 1993; Cid del Prado *et al.*, 1997), aunque esto aún no ha sido confirmado. Una raza fisiológica se define como un grupo de individuos que tienen las mismas preferencias en

hospederos y otras características biológicas en común (Taylor y Sasser, 1983). Bajo esta consideración Inserra *et al.* (1985) distingue tres razas de *N. aberrans*:

- 1) Raza remolachera, que se reproduce en remolacha pero no en papa
- 2) Raza papera, la cual se reproduce en remolacha y papa
- 3) Raza chilera, que se reproduce en chile pero no en papa

Manzanilla-López *et al.* (2002) las consideran como grupos, y mencionan que la primera se halla presente en los Estados Unidos, Argentina y probablemente Ecuador; mientras que la segunda está presente en México y en las tierras altas de las regiones andinas de Argentina, Bolivia y Chile. La tercer raza la ubica como del grupo del frijol, ya que puede crecer en esta planta y en chile pero no en remolacha, y sólo se encuentra en México.

La definición fisiológica de raza anteriormente mencionada implica la existencia de un grupo de hospederos diferenciales que permitan su separación. Para algunas especies de nematodos esta serie de hospederos está bien establecida (Sasser, 1972); sin embargo, para *Nacobbus aberrans* esto no ha sido realizado

Estudios importantes que tratan de establecer los hospederos diferenciales y las razas de *Nacobbus*, han sido realizados por algunos autores.

Brunner de Magar (1967) probó 90 especies y variantes de chile contra el nematodo y encontró que todos los cultivares de *Capsicum annuum* fueron susceptibles al nematodo y sólo *C. baccatum* mostró alguna resistencia

Toledo (1990) y Toledo *et al.* (1993) confrontaron a cinco poblaciones mexicanas del nematodo de diferente origen geográfico, contra 10 especies de plantas anuales entre las que se encontraban tomate, frijol y acelga, y en sus resultados concluyen que existen tres razas:

Na-1, que crece en tomate y acelga, pero no en frijol. Involucra a poblaciones procedentes de Cuautla (Morelos), Actopan (Hidalgo) y Chapingo (Estado de México).

Na-2, que crece en los tres hospederos e implica a la población procedente de Cholula (Puebla).

Na-3, procedente de Ocampo, Guanajuato, crece en en frijol y acelga pero no en tomate.

Los cultivares de las especies consideradas por estos investigadores como diferenciales fueron jitomate cv Rutgers, frijol cv Negro Querétaro y acelga (*Beta vulgaris* L.) cv Ford Hook Giant; los otros hospederos probados fueron chile, verdolaga (*Portulaca oleracea* L.), remolacha, pepino (*Cucumis sativus* L.), rábano (*Raphanus sativus* L.), calabacita y papa.

Por su parte, Cid del Prado-Vera (1993) estudio el comportamiento patogénico de poblaciones procedentes de Puebla, Estado de México e Hidalgo, y estableció como hospederos diferenciales a espinaca (*Spinacea oleracea* L.), rábano, chile y papa.

En las poblaciones sudamericanas también se ha detectado variación fisiológica; Costilla (1990a, b) evaluó tres poblaciones del nematodo en jitomate, pimiento y papa; sus resultados indicaron que sólo las dos primeras especies de plantas son hospederos eficientes.

Boluarte y Jatala (1993, citados por Hernández, 2001) utilizaron como plantas diferenciales a jitomate, papa, remolacha, quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) y chile en la evaluación de 25 poblaciones de diferente origen geográfico y con ellas determinaron la existencia de 5 razas fisiológicas, 2 de ellas con una variante. Los nematodos eran procedentes de Estados Unidos, México, Perú, Ecuador, Bolivia y Argentina.

Como se puede observar en el esquema de razas de Toledo *et al* (1993) no todas las poblaciones de *N. aberrans* pueden reproducirse en frijol, particularmente las consideradas como pertenecientes a la raza 1, mientras que las poblaciones de Zacatecas y Tecamachalco sí lo hacen, aunque hay controversia con respecto a esta última (Silva-Jaramillo, 1989; Hernández, 2001).

De éstos y otros estudios similares se concluye que:

a) Diferentes cultivares de la misma especie de hospedero pueden reaccionar diferencialmente a una sola población del nematodo

b) Poblaciones del nematodo de diferentes áreas geográficas pueden compartir especies hospederas, aunque ataquen diferentes cultivares dentro de una misma especie de planta.

c) Poblaciones del nematodo de un mismo país o región geográfica pueden diferir en hospederos o cultivares preferenciales (Manzanilla-López *et al.*, 2002).

2.2. EL HUÉSPED

2.2.1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE *Phaseolus vulgaris* L.

Actualmente el frijol común se cultiva en los trópicos y en las zonas templadas de América, y en algunos lugares de Asia y África, esta considerado una de las principales fuentes de proteína vegetal para esas regiones (Muñoz-Orozco *et al.*, 1995)

La especie fue considerada por Linneo como de origen asiático, particularmente de la India, mientras que DeCandolle, quien primero la consideraba asiática, ubica su origen en América del Sur. Más tarde, Vavilov (1951) arguyó, al estudiar las colecciones de frijol procedentes de México, Guatemala, Colombia, Perú, Chile y Bolivia, que el sitio de origen debe buscarse en el área México-Guatemala. Estudios posteriores que contemplaron aspectos botánicos, arqueológicos, históricos y lingüísticos han concluido de manera incuestionable en un origen americano para *Phaseolus vulgaris* (Gepts y Debouck, 1991). Los restos más antiguos de frijol común se encuentran en Callejón de Huaylas en Perú. En México, se encuentran en el Valle de Tehuacán, Puebla. Estos restos consisten de semillas, fragmentos de vainas y de plantas semicompletas y posiblemente representan restos de plantas completamente domesticadas aparentemente muy similares a los frijoles que actualmente se cultivan en esas regiones, lo que señala que su domesticación debió de haber ocurrido mucho antes de las fechas señaladas (Miranda, 1967; Miranda, 1991; Gepts y Debouck, 1991).

Los estudios botánicos han mostrado la existencia de formas silvestres de *Phaseolus vulgaris* que se distribuyen desde el norte de México hasta el norte de Argentina. Esta extensa área de distribución implica la presencia de diferentes condiciones ecológicas que han contribuido a que haya una gran diferenciación morfológica en las formas silvestres del frijol común, esta riqueza puede visualizarse en las más de 550 colectas que existen en los bancos de germoplasma del INIFAP y del CIAT (Cárdenas *et al.*, 1991; Muruaga-Martínez *et al.*, 1995).

En México, Miranda (1967) realizó exploraciones botánicas y encontró una gran variación de formas silvestres de *Phaseolus vulgaris*, lo que confirma que la especie procede de la parte occidental de la región propuesta por Vavilov. Las formas silvestres presentes en esta área son anuales, con un hábito de crecimiento principalmente

indeterminado, con variabilidad en el color de flor, número, tamaño y color de vaina (Miranda, 1991).

En cuanto al centro de origen del frijol común en América, diversos estudios han demostrado la existencia de diferencias morfológicas entre las formas silvestres de Mesoamérica y Argentina; los estudios de Gepts en 1988 basados en la proteína faseolina entre frijoles mesoamericanos y sudamericanos, tanto silvestres como cultivados (citados por Muruaga-Martínez *et al.*, 1995 y por Gepts y Debuck, 1991), sugieren dos regiones de domesticación para la especie a partir de distintas poblaciones silvestres, uno en Mesoamérica (México y Centroamérica), donde se presenta la faseolina tipo S en semillas, y otro en los Andes con faseolina tipo T en semillas grandes.

2.2.2. VARIABILIDAD

Como ya se mencionó con anterioridad, las formas silvestres de *Phaseolus vulgaris* presentan una alta variabilidad morfológica y bioquímica resultado de la acción de los procesos evolutivos de mutación, migración, selección y deriva genética, procesos que sin duda han actuado sobre las formas cultivadas, las cuales además han experimentado la acción del proceso de domesticación que, aunado a los miles de años de cultivo, ha dado como resultado una gran diferenciación de numerosas características, muchas de ellas de importancia para el hombre (Miranda, 1979; Gepts, 1991; Gepts y Debouck, 1991).

Las características seleccionadas durante la domesticación de *Phaseolus* fueron: 1) aumento en el tamaño de la semilla; 2) aumento en la permeabilidad de la semilla; 3) reducción del espesor del tejido de desecación diferencial de la vaina, lo que modificó su mecanismo natural de diseminación; 4) cambio de hábito perenne a anual a través de la eliminación de la formación de raíces tuberosas. Esto trajo como resultado: un mayor aumento en la producción de semilla, facilitó todas las fases culturales, permitió una homogénea sincronización desde la germinación hasta la cosecha y amplió sus límites ecológicos (Souza y Delgado, 1991; Miranda, 1991).

Las exigencias de los diferentes grupos humanos también han jugado un papel importante en la diversidad que existe entre las formas cultivadas de frijol común, ya que de una región agrícola a otra no sólo cambian los cultivos, sino también los cultivares de una misma especie y los nombres con que son conocidos. Hernández-Xolocotzi (1985) dio una larga lista de los nombres con que son conocidas muchas variantes de frijol común en

las diversas regiones agrícolas del país y que han sido consideradas por los grupos étnicos en función de su precocidad, adaptación a humedad y fertilidad del suelo, uso para el cual están destinados, composición química del grano y valor ceremonial.

La gran variación debida a lo anteriormente señalado ha obligado a clasificar al frijol de acuerdo a su hábito de crecimiento determinado o indeterminado, la longitud de sus entrenudos, la altura de la planta, número de nudos, capacidad para trepar, tipo de ramificación y características de grano, en cinco tipos básicos (Ortiz-Valdéz, 1998):

Tipo I. Determinado y erecto. Plantas erectas, de 5 a 10 nudos cortos, de 9 a 22 ramas y una altura de 16 a 50 cm; la etapa de floración es corta y la maduración de todas las vainas ocurre al mismo tiempo.

Tipo II. Indeterminado, guía corta, erecto. Plantas erecta, de 16 a 23 nudos, de 11 a 15 ramas, guía corta sin capacidad para trepar (las ramas no producen guías), y altura de 52 a 76 cm.

Tipo III. Indeterminado, guía corta, postrado. Plantas postrada, de 15 a 26 nudos, de 8 a 20 ramas, de 62 a 98 cm y guía sin capacidad de trepar.

Tipo IV. Indeterminado, guía intermedia, semivoluble. De 25 a 35 nudos, de 15 a 32 ramas, de 100 a 200 cm y guías con capacidad para trepar.

Tipo V. Indeterminado, guía muy desarrollada y trepador. Planta con bastante capacidad para trepar, de 5 a 43 nudos, de 28 a 56 ramas, de 260 a 400 cm de altura.

El frijol también puede clasificarse de acuerdo al tamaño y color de grano. Hernández-Xolocotzi *et al.* (1991) separan a las formas silvestres y cultivadas en dos grupos, quedando dividido el grupo de los cultivados a su vez en tres subgrupos: el subgrupo A que comprende a la raza 1 que son frijoles blancos y negros chicos; el subgrupo B que agrupa a las razas 2, 3 y 4 que involucra a los frijoles de colores, negro arribeño y negro tropical respectivamente; y finalmente al subgrupo C que considera a la raza 5 (bayo grande o Bayo rata), la raza 6 (canario), la raza 7 o de frijoles arriñonados y la raza 8 de frijoles esféricos.

2.2.3. TAXONOMÍA

La clasificación de los frijoles cultivados hace énfasis en el color, forma y tamaño de las semillas en las formas cultivadas, mientras que en las silvestres se basa en las estructuras florales (Souza y Delgado, 1979).

Actualmente la clasificación taxonómica del frijol es la siguiente (Strasburger *et al.* 1974; Debouck, 1991; Ortiz-Valdéz, 1998; Judd *et al.*, 1999):

DIVISIÓN: Tracheophyta
 CLASE: Angiospermae
 SUBCLASE: Dicotyledoneae
 ORDEN: Fabales
 FAMILIA : Leguminosae (=Fabaceae)
 SUBTRIBU : Papilionoideae (=Faboideae)
 GENERO : *Phaseolus*
 ESPECIE : *Phaseolus vulgaris*

El frijol común es considerado la especie tipo del género.

Como género, *Phaseolus* agrupa a 55 especies (Debouck, 1991) aunque algunos autores mencionan un mayor número (Muñoz-Orozco *et al.*, 1995), con sólo cuatro especies cultivadas además del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) las cuales son *P. coccineus* L. (frijol ayocote), *P. acutifolius* A. (frijol tepari), *P. lunatus* L. (frijol lima), *P. polyanthus* (frijol botil) de gran importancia en áreas que no ofrecen condiciones ecológicas óptimas para el desarrollo del frijol común (Debouck, 1991, 2005).

2.2.4. PRODUCCIÓN Y CULTIVO

A nivel mundial, los principales productores de frijol para el periodo 1994-2003 fueron: Brasil, India, China, Myanmar (Birmania), México y Estados Unidos, contribuyendo en conjunto con el 63% de la producción mundial que en el año de 1995 fue de aproximadamente 17.9 millones de toneladas. En ese periodo la producción promedio anual de México fue de 1.22 millones de toneladas que representan el 7% de la

producción mundial que lo colocan como uno de los principales productores en el mundo; sin embargo, no alcanza la autosuficiencia y tiene que importar frijol de otros países, principalmente de los Estados Unidos (SIAP.SAGARPA, 2005).

En México, el frijol es un cultivo tradicional, cultivado en todas las zonas agrícolas del país, se produce durante los ciclos agrícolas de primavera-verano y otoño-invierno; en el primer caso se produce en los meses de agosto o septiembre a enero siendo los principales estados productores Zacatecas, Durango, Chihuahua, San Luis Potosí y Guanajuato, mientras que en el ciclo otoño-invierno ocurre de enero o febrero a junio, siendo Sinaloa y Nayarit los principales estados productores.

En ambos ciclos agrícolas la producción se realiza en condiciones de riego o de temporal, siendo esta última la más practicada (92% en temporal y 8% en riego en el ciclo primavera-verano, contra 52% en temporal y 48% en riego en el ciclo otoño-invierno). Zacatecas y Sinaloa fueron los estados con mayores rendimientos en condiciones de riego, mientras que a Nayarit le correspondieron los mayores rendimientos en temporal. Zacatecas en 1996 fue el estado con la mayor superficie destinada al cultivo con 697 mil hectáreas con rendimientos promedio de 1780 kg/ha en riego y 511 kg/ha en temporal (Ortiz-Valdéz, 1998).

Las variedades cultivadas dependen de las preferencias de los consumidores en cada región; por ejemplo en las regiones del trópico húmedo se prefieren los frijoles negros pequeños y opacos mientras que en las del Pacífico norte se prefieren los tipos peruano; en el estado de Zacatecas los principales tipos cultivados son Flor de Mayo y Flor de Junio en riego y los negros criollos, pintos, Bayos, garbancillos, Flor de Mayo y Flor de Junio en temporal (Serrano-Covarrubias, 2004).

No obstante que en algunas áreas del altiplano del centro-norte del país se ha convertido en un cultivo, en muchas regiones del país se cultiva asociado a otras especies, principalmente maíz (*Zea mays* L.). Es muy posible que esta práctica haya surgido después de la domesticación de la especie, y generalmente es mencionada como una agricultura tradicional o de subsistencia que genera valores, más que ganancias comerciales, de uso indispensables en la economía familiar. Se ha estimado que aproximadamente 600 000 ha en la parte central y sur del país en los estados de Jalisco, Michoacán, México, Puebla, Chiapas y Yucatán practican este sistema de producción (Acosta-Gallegos, 1993).

2.2.5. IMPORTANCIA Y VALOR NUTRITIVO

Desde un punto de vista histórico el frijol tuvo un papel importante en el desarrollo de los pueblos prehispánicos pues junto con el maíz y la calabaza formó la base sobre la que descansaba la alimentación de esos pueblos (De la Torre-Almaraz, 1995). Actualmente su importancia no ha disminuido, pues son numerosos los países de África, Asia y América Latina donde su consumo implica la principal, y en ocasiones la única fuente de alimento de muchas personas. Se ha estimado que el consumo *per cápita* en nuestro país es de 15.1 kg al año, aunque esto varía de acuerdo a precio, disponibilidad, precio de otros alimentos e ingreso familiar (Ortiz-Valdéz, 1998).

Al menos en nuestro país, el frijol no sólo es el segundo cultivo en importancia después del maíz, tanto por la superficie que se siembra (2 millones 200 has) como por la producción promedio anual que alcanza (1.22 toneladas por ha), sino también es uno de los cultivos que más empleo genera en el campo, se ha calculado que existen 500 mil agricultores, y que el número de jornaleros que se emplean en el cultivo de esta planta es de más de 380 mil. (SIAP-SAGARPA, 2005; Serrano-Covarrubias, 2004).

Otra característica que hace del frijol un producto de primerísima importancia es su valor nutritivo. Ortega *et al.* (1976) realizaron el análisis químico de las semillas crudas de 68 genotipos de frijol (58 de *P. vulgaris* y 10 de *P. coccineus*) con énfasis en el contenido de proteína y encontraron que existe variación para el contenido de proteínas así como una fuerte correlación positiva entre este carácter y el peso de grano.

Se menciona que el grupo Blancos de *P. vulgaris* tiene mayor contenido de triptofano que el grupo Ayocote de *P. coccineus*, y ambos presentan un alto contenido de lisina; igualmente la comparación entre el grupo Ayocote y el cultivar Chis. 34 del grupo Canario mostró ser muy contrastante, ya que este último tiene la cantidad de aminoácidos suficiente para cubrir las necesidades diarias de la dieta, mientras que el frijol Ayocote mostró deficiencias en fenilalanina, triptofano y metionina Ortega (1991).

Generalmente los cultivares con mayor demanda no son precisamente los más nutritivos, ya que no existe una relación directa entre la calidad proteínica y las preferencias de consumo, pues la elección se basa en el gusto o la costumbre, y varía de una región a otra; por ejemplo, los cultivares que se consumen en la región del Pacífico son del tipo Azufrado, en el Bajío los tipos Flor de Mayo, Rosita, Cacahuate y Ojo de Cabra; en el norte, el Pinto o el Bayo, y los tipos negro en los trópicos. Dentro de los

criterios de consumo se encuentran el color, sabor, aspecto culinario, dureza y textura de la semilla después de la cocción, cantidad y textura del hollejo, y espesor del caldo (Carrillo, 1998).

2.2.6. PATÓGENOS Y FUENTES DE RESISTENCIA

Dentro de los factores que limitan la producción y productividad del frijol se encuentran la presencia de enfermedades causadas por más de 200 patógenos bacterianos, fungales y virales (Lépiz, 1986; Aceves-Rodríguez, 1988; Delgadillo-Sánchez, 1988a; Garrido-Ramírez, 1995; Lépiz-Ildefonso, 1999).

Dentro de las enfermedades causadas por hongos se encuentran la antracnosis causada

por *Colletotrichum lindemuthianum*, la mancha angular (*Isariopsis griseola*), la mancha foliar (*Ascochyta boltshauseri* y *A. phaseolorum*), la mancha redonda (*Chaetoseptoria wellmanii*) y la roya o chahuixtle (*Uromyces phaseoli*) que afectan todas ellas a las hojas principalmente, aunque también se manifiesta en tallos, ramas y peciolo y en infecciones graves en vainas y semillas. Las raíces también se ven afectadas por pudriciones causadas por *Rhizoctonia solani* (= *Thanatephorus cucumeris*), *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotium rolfsii*.

Para México, las enfermedades bacterianas más importantes son el tizón común y el tizón de halo causados por *Xanthomonas phaseoli* y *Pseudomonas phaseolicola* respectivamente. Ambas afectan las partes aéreas de la planta.

Por su parte, los virus también causan enfermedades que abaten la producción del frijol; los dos más comunes son el virus del mosaico del frijol (BCMV) y el virus del mosaico dorado (BGMV) que causan pérdidas de 35 a 98% de la producción (Delgadillo-Sánchez, 1988b).

Los nematodos pertenecientes a las especies *Meloidogyne incognita* y *Nacobbus aberrans* parasitan las raíces del frijol y son causa de grandes pérdidas; actualmente se sabe que los nematodos fitoparásitos pertenecientes al género *Meloidogyne* disminuyen de 35 – 50 % la producción de frijol (Ngundo y Taylor, 1974; Aceves, 1988; Abawi y Varón de Agudelo, 1989 citados por Ortega y Jaime, 1990; Mullin *et al.*, 1991, García-Camargo y Trejo, 1995; Velásquez-Valle, 2001).

Los insectos son una plaga importante para el frijol; en nuestro país los más importantes son según Reyes (1985): la conchuela (*Epilachna varivestis*), el barrenador del tallo (*Centrinapis* sp), la mosquita blanca (*Trialeurodes vaporarium*), la chicharrita (*Empoasca fabal*), el minador de la hoja (*Xenochalepus signaticollis*), el picudo del ejote (*Apion godmani*), diversas especies de chapulines (*Brachystola* spp., *Sphenerium* spp. y *Melanoplus* spp.), la doradilla (*Diabrotica balteata*), el minador (*Liriomyza* spp.) la mosca de las semillas (*Hylemya alirura*) y diversas especies de trips (*Hercotrips phaseoli*, *Frankliniella fortísima* y *F. occidentalis*)

La magnitud del daño causado por estos agentes etiológicos en la planta depende de la interacción de la raza o genotipo del parásito con el cultivar o genotipo del hospedero y de las condiciones ambientales en la que se da la interacción, además de otros factores como son la edad y condición fisiológica de la planta, la densidad de inóculo, densidad de siembra, área del cultivo y estación de crecimiento (Lepiz, 1986; Bell, 1991; Jenkins, 1991; Sasser, 1991).

Dentro del germoplasma existente de frijol se ha encontrado resistencia contra sus principales plagas y enfermedades que ha sido incorporada a través de los métodos de selección e hibridación proporcionados por el mejoramiento genético a muchos cultivares de frijol común (Wyatt, 1980; Brauer, 1983; Martínez-Alemán, 1988a, b; Acosta-Gallegos 1993; Guzmán-Plazola *et al.*, 1995; Sing, 1995; Solano-Vidal, 1995; Lépiz-Ildefonso, 1999).

2.3. EFECTO DE *N. aberrans* EN LAS PLANTAS

2.3.1. ALTERACIONES EN LA FISIOLÓGÍA

El efecto de los nematodos fitoparásitos se manifiesta en la fisiología y bioquímica de la planta, aspectos que han sido muy bien estudiados en plantas atacadas por los nematodos agalladores *Meloidogyne* spp. (Taylor y Sasser, 1983; Wilcox-Lee y Loria, 1987; Wallace, 1987)

Actualmente, el cuadro general que se tiene de la infección de plantas con *Meloidogyne* sugiere que las raíces agalladas cambian su metabolismo en el sentido de una mayor producción de proteínas y un menor transporte de reguladores de crecimiento y otros compuestos al resto de la planta.

A la fecha son muy pocos los estudios que se han realizado sobre los efectos que *N. aberrans* tiene en la fisiología de las plantas que parasita, algunos de los cuales son: mayor déficit de agua, reducción de la conductancia estomática, incremento de la temperatura de la hoja y disminución de la fotosíntesis (Rojas *et al.*, 1993)

Se ha encontrado que las hojas de plantas de Chile infectadas con *N. aberrans* tienen una fotosíntesis neta mayor que las plantas sanas; sin embargo, muestran una reducción significativa de su biomasa de Chile que sugiere que la tasa de fotosíntesis total de la planta infectada es menor que la de plantas no infectadas. (Zavaleta-Mejía *et al.*, 1995)

En plantas de Chile se han reportado incrementos en los niveles de fenilalanina, prolina, galactosa y proteínas después de la inoculación con el nematodo (Hernández (1990).

La inoculación de *N. aberrans* en jitomate produce una disminución en los contenidos de N, P y Ca en hojas y raíces así como reducciones en los contenidos de Mg, B, Cu, Fe, Mn y Zn en las hojas; la disminución de potasio fue la más significativa (Cristóbal-Alejo *et al.*, 2001b).

Los síntomas externos al ataque de *N. aberrans* en frijol son similares a los descritos en otros huéspedes, los cuales muestran una reducción del crecimiento apical, hojas cloróticas con márgenes enrollados, marchitamiento y disminución de la producción de frutos y o semillas (Manzanilla-López *et al.*, 2002).

2.3.2. EFECTOS SOBRE LA PRODUCTIVIDAD DEL FRIJOL

Los datos que se tienen sobre el efecto de *N. aberrans* sobre la producción de frijol han sido estimados de resultados de estudios enfocados sobre la determinación de la gama de hospederos (Zamudio *et al.*, 1990), de muestreos realizados en campos agrícolas con frijol donde se han detectado plantas agalladas con *N. aberrans* (Velásquez-Valle, 2001), de evaluación de daño (Toledo, 1990 y Hernández, 2001).

En el cuadro 1 se señalan los cultivares en los que se ha reportado la presencia natural o experimental de *N. aberrans*, y donde se observa que sólo 15 cultivares han sido confrontados o hallados con nematodos procedentes de 8 regiones geográficas, siendo la población de Tecamachalco, Puebla y la de tres municipios de Zacatecas, las más estudiadas.

Cuadro 1. Reportes de agallamiento y reproducción en diversos cultivares de frijol confrontados natural o experimentalmente con poblaciones de *N. aberrans* de diferente origen geográfico

Cultivar	Origen del nematodo	A	R	Referencia
Amarillo Calpan (criollo)	Tecamachalco (Puebla)	+	+	Silva-Jaramillo, 1989
	“ “	-	-	Hernández, 2001
	Zacatecas*			“ “ “
Bayo INIFAP	Tecamachalco (Puebla)	-	-	Hernández, 2001
	Zacatecas	+	+	“ “ “
Bayo Macentral	Tecamachalco (Puebla)	-	-	Hernández, 2001
	Zacatecas	-	-	“ “ “
Bayo (criollo)	Ixmiquilpan (Hidalgo)	+	+	Hernández, 1992
Black Valentine	Tecamachalco (Puebla)	+	+	Zamudio <i>et al.</i> , 1993
Canario 107	Tecamachalco (Puebla)	+	+	Silva-Jaramillo, 1989
Canario 1087 II	Tecamachalco (Puebla)	+	+	Silva-Jaramillo, 1989
Flor de Mayo (criollo)	Tecamachalco (Puebla)	-	-	Hernández, 2001
	Zacatecas	+	+	García-Camargo y Trejo, 1995 ; Velásquez-Valle, 2001;
				Hernández, 2001
Flor de Mayo M38	Tecamachalco (Puebla)	-	-	Hernández, 2001
	Zacatecas	+	+	“ “ “

Flor de Junio (criollo)	Tecamachalco (Puebla)	-	-	Hernández, 2001
	Zacatecas	+	+	“ “ “ García-Camargo y Trejo, 1995
Negro Puebla (criollo)	Tecamachalco (Puebla)	-	-	Hernández, 2001
	Tecamachalco (Puebla)	+	+	Silva-Jaramillo, 1989
	Zacatecas	+	+	Hernández, 2001
Negro San Luis (criollo)	Tecamachalco (Puebla)	-	-	Hernández, 2001
	Zacatecas	-	-	“ “ “
Negro Jamapa	Ixmiquilpan (Hidalgo)	-	-	Hernández, 1992
Negro Querétaro (criollo)	Actopan (Hidalgo)	-	-	Toledo, 1990, Toledo <i>et al.</i> , 1993
	Cuautla (Morelos)	-	-	“ “ “
	Chapingo (Edo. México)	-	-	“ “ “
	Cholula (Puebla)	+	+	“ “ “
	M. Ocampo (Guanajuato)	+	+	“ “ “
	Tecamachalco (Puebla)	+	+	Toledo, 1990
	“ “ Zacatecas	- +	- +	Hernández, 2001 “ “ “
Puebla 458	Tecamachalco (Puebla)	+	+	Silva-Jaramillo, 1989
Rio Grande (criollo)	Tecamachalco (Puebla)	-	-	Hernández, 2001
	Zacatecas	-	-	García-Camargo y Trejo, 1995 Hernández, 2001

•Comprende los municipios de Villa de Cos, Pánuco y Pozo de Gamboa, la cita de Velásquez-Valle involucra a los municipios de Calera y Enrique Estrada; A = Agallamiento, R = Reproducción del nematodo

Negro Querétaro fue el cultivar que más veces se ha confrontado con poblaciones de nematodos y ha mostrado ser huésped para las poblaciones de Cholula Puebla, y Melchor Ocampo, Guanajuato (Toledo, 1990), así como para las procedentes de Pánuco, Pozo de Gamboa y Villa de Cos, Zacatecas (Hernández, 2001). Es de hacer notar que esta variedad fue considerada por Toledo (1990) y Toledo *et al.* (1993) como parte del “juego de hospederos diferenciales de Chapingo para determinar razas de *Nacobbus aberrans*”.

De los estudios anteriormente mencionados se desprende que hay variación en la respuesta de diversos cultivares del frijol al nematodo, encontrándose genotipos resistentes que pueden ser utilizados en programas de mejoramiento genético, así como variación en el nematodo para parasitar al frijol, reforzando la hipótesis de la existencia de razas fisiológicas (Toledo *et al.*, 1993; Hernández, 2001).

La disminución en la producción por *N. aberrans* en frijol fue cuantificada por Silva-Jaramillo (1989) en 18 a 32% en el cv Negro Puebla y de 18 a 36% en el cv Canario en campos infestados en Tecamachalco, Puebla, mientras que en condiciones de invernadero pudo detectar diferencias estadísticas entre cultivares, pero no con los testigos para peso seco foliar y radicular, así como diferencias significativas entre algunos cultivares para índice de agallamiento y población final de nematodos.

Por su parte, Toledo (1990) realizó la caracterización patogénica de cinco poblaciones de *N. aberrans* utilizando un grupo de 10 especies de plantas como diferenciales y con las que distinguió 3 posibles razas fisiológicas del nematodo: la Na-1 que crece en tomate y acelga pero no en frijol; la Na-2 que crece en los tres hospederos y la Na-3 que crece en frijol y acelga pero no en tomate; el estudio para evaluar el nivel de daño de *N. aberrans* raza Na-3 usando seis distintos niveles de inóculo mostró que el índice de reproducción del nematodo disminuyó progresivamente a medida que se incremento el nivel de inóculo inicial, mientras que el peso seco de follaje guardó una relación inversamente proporcional a la densidad de inóculo, y el índice de agallamiento fue proporcional con el nivel de inóculo.

Zamudio *et al.* (1990) evaluaron el daño de *N. aberrans* en el frijol ejotero c.v. Black Valentine y otras hortalizas comerciales y encontraron que en las plantas inoculadas había una reducción significativa en la altura, peso fresco de follaje y peso fresco de raíz con respecto a los testigos.

García-Camargo y Trejo (1995) evaluaron el daño causado por *N. aberrans* en los cultivares de frijol Flor de Junio, Flor de Mayo criollo y Negro Zacatecas en dos fechas de siembra una con suelo naturalmente infestado y otra con suelo esterilizado e inoculado con el nematodo y observaron que en el primer caso había una reducción de diversos parámetros del rendimiento, siendo el cultivar Flor de Mayo criollo el más afectado.

Hernández (2001) estudió la respuesta de 10 genotipos de frijol a las poblaciones Tecamachalco y Zacatecas de *N. aberrans* con diversos niveles de inóculo. En los

cultivares confrontados con la población Tecamachalco no encontró crecimiento ni reproducción del nematodo, por lo que consideró que esta población no tiene como hospedero preferente al frijol, mientras que en los confrontados con poblaciones de Zacatecas encontró agallamiento y reproducción diferencial del nematodo que le permitió clasificar a 4 cultivares como resistentes (Bayo Macentral, Amarillo Calpan, Negro Sn. Luis, y Río Grande), uno tolerante (cv Flor de Mayo M-38), y 5 susceptibles (Negro Querétaro, Bayo INIFAP, Flor de Junio criollo, Negro Puebla y Flor de Mayo criollo); en todos los cultivares susceptibles el factor de reproducción estuvo directamente relacionado con el nivel de inóculo inicial, con efecto del nematodo en el rendimiento, altura de la planta, volúmen de raíz, peso seco y número de vainas.

2.3.3. ALTERACIONES HISTOLÓGICAS

N. aberrans forma un sincicio (estructura celular multinucleada) como sitio de alimentación, e induce la formación de una agalla en las raíces que parasita; la ontogenia de estas estructuras se ha estudiado en algunas especies de plantas, tanto de cultivos mayores como remolacha, papa, jitomate y chile (Schuster y Thorne, 1956; Schuster y Sullivan, 1960; Lordello *et al.*, 1961; Schuster *et al.*, 1965; Prasad y Webster, 1967; Jones y Payne, 1977; Castillo, 1982; Inserra *et al.*, 1983; Castillo y Marbán-Mendoza, 1984; Jatala, 1985; Finetti, 1990; Jatala y Haddad, 1992) como en cultivos menores y herbáceas silvestres (Santa-Cruz y Marbán-Mendoza, 1986; Doucet, 1989; Caballero y Muñoz, 1987; Quími, 1981a; Tovar *et al.*, 1990; Aguilar, 1994) utilizando diversas técnicas y considerando varios aspectos (Jatala y Haddad, 1992; Jones y Payne, 1977; Manzanilla-López, 1999).

Algunos de los estudios realizados han permitido establecer que el segundo estadio juvenil (J_2) del nematodo penetra por los ápices de crecimiento de las raíces, e invade el córtex intracelularmente cuando rompe las paredes y pasa a través de las células, abriendo cavidades que en remolacha, se extienden desde el parénquima cortical hasta cerca del cilindro vascular (Inserra *et al.*, 1983) donde establecen el sitio de alimentación. Quimí (1981a) por su parte ha observado que las cavidades están ocupadas por los estadios J_3 y J_4 del nematodo y usualmente se encuentran limitados por necrosis. Castillo (1982) y Castillo y Marbán-Mendoza (1984) indican que estas mismas cavidades se hallan presentes en raíces de chile a 10 días después de penetradas por el nematodo y se hallan

bordeadas por células que muestran lisis, hipertrofia, necrosis, vacuolización y un citoplasma denso con gránulos de almidón y núcleos gigantes y deformes.

Se desconoce la manera como *N. aberrans* selecciona a las células que van a servir como sitio de alimentación, pero se ha observado que 65 días después de la inoculación de la planta, las hembras se encuentran en la región cortical y vascular originando la formación del sincicio (Clark, 1967 y Quimí, 1981a).

El desarrollo del sincicio ocurre dentro del estele por digestión de paredes en los campos punteados y por fusión de protoplastos vecinos. Una estimulación de células mitóticas (hiperplasia) ocurre antes de la incorporación celular dentro del sincicio; hileras de células en algunas regiones indican una activa división de células cambiales (Dropkin, 1969; Jones, 1981; Endo, 1987a, b).

La condición multinucleada del sincicio, es alcanzada por amitosis, ya que se observan nucleólos empaquetados concomitantemente con invaginaciones del núcleo (Schuster *et al.*, 1965). En los sincicitios inducidos por *Nacobbus* en *Opuntia tortispina* Nutt y *Kochia scoparia* L. se encontraron núcleos empaquetados que sugieren que la condición multinucleada surge por amitosis más que por polarización del núcleo (Schuster *et al.*, 1965). Finetti (1990) en papa y Doucet *et al.* (1994) en *Spergula arvensis* L. encontraron algunas células multinucleadas junto a las células sinciciales.

El sincicio está bien demarcado y aunque la identidad celular es mantenida, los contenidos citoplásmicos se mueven entre las células del sincicio a través de orificios y perforaciones en las paredes. En el área del sincicio ocurre diferenciación de elementos vasculares. Los elementos del xilema se desarrollan dentro de la masa de las pequeñas capas de células, lejos del sincicio y también adyacentes a las células sinciciales. Igualmente las células floemáticas (semejantes a las venas menores en hojas) se encuentran fuera del sincicio, aunque en ocasiones adyacentes a él. Numerosas células de la agalla se diferencian en elementos tipo criba, y numerosos plasmodesmos se encuentran en los campos de las punteaduras de los elementos criba y las células sinciciales.

Las características del sincicio de *N. aberrans* en algunos cultivos se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Principales características del sincicio de *N. aberrans* en cultivos de importancia económica

CULTIVAR	CARACTERÍSTICAS	AUTOR
Chile	De forma cordada, mayor a 7 mm de longitud, desorganiza los vasos conductores; células con núcleos grandes e irregulares. Con gránulos de almidón. Es inducido por hembras del cuarto estadio juvenil o J ₄ a los 30 días después de la penetración	Castillo, 1982; Castillo y Marbán-Mendoza, 1984.
Espinaca	De forma de medio sol su tamaño dependió del cultivar parasitado. Muestra hiperplasia e hipertrofia de células con citoplasma denso y núcleos y nucleólos grandes y formación de gránulos de almidón.	Caballero y Muñoz, 1987
Papa	Fusiforme, cordado o irregular; de 2 a 8 mm, altera fuertemente la organización del estele (cilindro central); la continuidad es retenida por el xilema y el floema. Hay depositación de sílice en las células del endodermo cercano a las células sinciciales	Finetti, 1990; Jatala y Hadad, 1993.
Remolacha	Dentro del córtex; limitado por la endodermis o por los elementos del xilema. Inducido por la hembra vermiforme inmadura. Se forma por disolución gradual de paredes celulares y fusión de protoplastos. Hay formación de gránulos de almidón dentro y fuera del sincicio	Schuster <i>et al.</i> , 1964. Inserra <i>et al.</i> , 1983.
Tomate	En tomate el sincicio es fusiforme con numerosas mitocondrias y aparatos de Golgi. Células hipertróficas con paredes engrosadas y núcleos y nucleólos prominentes.	Aguilar, 1994; Jones y Payne, 1977; Ponce de León y Doucet, 1989; Prasad y Webster, 1967

Hay similitud entre los sincicios inducidos por *Nacobbus aberrans* y los inducidos por *Heterodera* spp.; sin embargo, los engrosamientos internos de la pared celular (típicas de células transfer) ocurre en células transformadas por *Heterodera* y en las células gigantes inducidas por *Melodogyne*, pero no en los sincicios inducidos por *Nacobbus aberrans* y *Rotylenchulus* sp. (Jones y Payne, 1977). La degradación de las paredes es causada por enzimas de origen desconocido; no se sabe si son de la planta o del nematodo, ni qué controla o regula su producción, estimulación y dirección, ni la extensión en que otras partes de la pared son afectadas. Para quísticos y nematodos agalladores, las enzimas

responsables del desarrollo de los crecimientos de la pared son de origen vegetal (Goellner *et al.*, 2001).

Paralelamente a la formación del sitio de alimentación, se forma la agalla. Las agallas producidas por *Nacobbus aberrans* en papa, se distribuyen a lo largo del eje de la raíz con lo cual adquiere la apariencia de un rosario y generalmente contienen una sola hembra.

Los tubérculos de papas parasitados no muestran síntomas visibles pero al ser cosechados muestran una consistencia esponjosa con algunas partes aplanadas y suberizadas (Otazú *et al.*, 1985, Canto-Sáenz, 1992 citados por Manzanilla-López, 2002).

En Chile y tomate las agallas son más elongadas y tienen más de una hembra y los productos de las plantas son más pequeños.

Schuster y Sullivan (1960) y Schuster *et al.* (1965) reportaron que en la remolacha, la agalla se forma por hipertrofia pero no por hiperplasia, y es estimulada por los juveniles.

Castillo (1982) por su parte señala que en Chile hay hipertrofia e hiperplasia del periciclo y la endodermis, así como daño al sistema vascular asociado a las hembras del estadio J₄. Manzanilla-López *et al.* (2002) señalaron que el establecimiento del nematodo estimulaba la mitosis del periciclo y la formación de raíces laterales en áreas agalladas.

Citológicamente, en remolacha, Chile y papa, las células muestran un citoplasma denso, núcleos y paredes hipertrofiados, hay formación de gránulos de almidón y lisis celular (Schuster y Thorne, 1956; Schuster *et al.*, 1965; Inserra *et al.*, 1983; Castillo y Marbán-Mendoza, 1984; Jatala y Haddad, 1993b), cambios muy parecidos ocurren en jitomate, *Malva parviflora* L., *Chaenopodium murale* L. y *Portulaca oleracea* L. (Aguilar, 1994).

La microscopía de barrido de la agalla ha mostrado que los espacios entre las células del parénquima en el córtex de la agalla son muy grandes, lo que facilita el intercambio de gases evitando así una condición anaerobia. Lordello *et al.* (1961) mencionan que en las agallas de *N. aberrans* en papa, hay una parcial desorganización del cilindro central de tal manera que el cambium producía parénquima en vez de elementos conductores y se presentaban grupos aislados de paquetes vasculares que surgían del cambium adventicio. Estos mismos autores encontraron que los grupos de células

parenquimatosas hipertrofiadas (re llenas de citoplasma) carecían de vacuolas pero tenían grandes núcleos.

Se ha logrado determinar que existen diferencias entre sincicios y agallas formadas por *Nacobbus aberrans* en las especies de plantas parasitadas, así como en la magnitud del daño y de las lesiones que, por otra parte, están relacionados con el estado de desarrollo del nematodo así como con el tipo de sustrato donde crecía la planta durante la infección.

2.3.4. ALTERACIONES FITOQUÍMICAS

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos de bajo peso molecular y alta complejidad y diversidad estructural que intervienen en infinidad de interacciones ecológicas así como en los mecanismos de defensa de las plantas contra herbívoros y patógenos (Anaya-Lang, 2003).

Se conocen más de 20,000 metabolitos secundarios que por sus características estructurales pueden agruparse en nitrogenados como son los alcaloides, aminoácidos no protéicos, aminas, glucósidos cianogénicos, glucosinalatos, lectinas, y los no nitrogenados donde se encuentran los terpenoides o isoprenoides, poliacetilenos, policétidos, fenilpropanoides, flavonoides, isoflavonoides, taninos, stilbenos, furocoumarinas, antracenos y saponinas. Dentro de cada uno de estos grupos hay compuestos que tienen efecto tóxico, inhibidor o deterrente sobre plagas y patógenos de las planta, algunos de ellos se muestran en el cuadro 3.

Las leguminosas contienen muchos tipos de metabolitos secundarios que tienen la capacidad de actuar como aleloquímicos; la simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno ha sido explotado en la producción de metabolitos secundarios por las leguminosas, particularmente en la subfamilia Papilionoideae, lo que les ha permitido utilizar compuestos nitrogenados como alcaloides y aminoácidos no protéicos como metabolitos bioactivos y valiosos en la defensa, sobre todo contra insectos y vertebrados herbívoros. Otros compuestos que requieren de la existencia de las rutas sintéticas de aminoácidos, aun cuando no incorporan nitrógeno en su estructura son los flavonoides y los isoflavonoides (Waterman, 1994).

Cuadro 3. Efectos de algunos metabolitos sobre plagas y enfermedades de las plantas

GRUPO	COMPUESTO	EFECTO
-------	-----------	--------

Alcaloides	N-metilcitisina, anagirina, citisina	Antiematodo
	Nicotina, berberina, palmatina, sanguinarina	Insecticida
	Lupanina, angustifolina, 13 hidroxilupanina, gramina	Bactericidas
Fenilpropanoides	Acidos clorogénico, ferúlico y ceféico	Antifúngicos
	Naringenina	Bactericidas
	Derivados (lignina, suberina, cutina)	Reforzamiento de pared celular
Isoflavonoides	Faseolina, faseolidina, faseolinisoflavano, coumestrol, kievitona	Antifúngicos
Terpenoides	Mentol, risitina, lubimina, capsidiol	Antimicrobiano
	Casbeno	Antifúngico
	Cucurbitacina B	Antinematodo
	Citronela, poligodiol, piretrinaa	Insecticida

Las leguminosas presentan diversos grupos de compuestos y son una de las fuentes más prolíficas de flavonoides, y aunque algunos de ellos tienen efectos antimicrobianos y antialimentarios para insectos, la mayoría tiene papeles ecológicos diferentes a la defensa, contrariamente a algunas isoflavonas que en su carácter de fitoalexinas brindan protección contra algunos patógenos (Harborne, 1984; Waterman, 1994; Besby *et al*, 2002).

Las fitoalexinas incluyen una amplia variedad de compuestos naturales que involucran, además de los isoflavonoides ya mencionados a flavonoides, dihidroxifenentrenos, estilbenos, coumarinas, terpenoides, furanoacetilenos, poliacetilenos, polienos (Bell, 1981) y generalmente son definidas como compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular que son acumulados en la planta después de su exposición a los microorganismos (Darvill y Albersheim, 1984) y han sido ampliamente estudiados en diversos sistemas planta- patógeno (Ebel, 1986; Dixon, 1986; Kuc', 1995, Hammerschmidt, 1999).

En frijol se han aislado 15 isoflavonoides diferentes y no todos tienen propiedades antibióticas, aunque algunos son antifúngicos y por lo tanto considerados como fitoalexinas (Cuadro 3).

En cultivares mexicanos de frijol se ha encontrado que la faseolina alcanza niveles significativos después de 48 horas de la inoculación con el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* raza kappa en cultivares resistentes al hongo, lo que no ocurrió en los cultivares susceptibles, mientras que la acumulación de faseolidina se observó desde las primeras seis horas en ambos casos. (Soriano y Medina, 1989)

Para el caso de interacciones involucrando a nematodos, también se ha observado la síntesis de fitoalexinas y de otros metabolitos secundarios durante el establecimiento de la interacción, tanto en plantas resistentes como en susceptibles, particularmente las que involucran a soya con especies de *Meloidogyne* o *Heterodera glycines* (Kaplan *et al.* (1980a, b; Huang y Baker, 1991; Liu *et al.*, 1992).

En soya se han encontrado diferencias en la concentración promedio de seis isoflavonoides (daidzina, genistina, malonil-daidzina, malonil-genistina, daidzeína y genisteína) asociados con la respuesta incompatible a la raza 3 de *Meloidogyne incognita* en tres fechas distintas de evaluación, detectándose variaciones entre fechas y cultivares, con diferencias significativas entre tratamientos hasta la tercer fecha que eran 10 días después de la inoculación. En el cultivar susceptible no hubo mayor producción de isoflavonoides que en el resistente, el cual mostró mayor incorporación de daidzeína y genisteína a través de las tres fechas de estudio, lo que sugiere la posibilidad de usar la acumulación de estos isoflavonoides como marcadores en el proceso de selección de genotipos de soya resistentes a *Meloidogyne incognita* (Carpentieri-Pípolo *et al.*, 2005).

Los compuestos fenólicos son otros compuestos que aparecen y se acumulan en los tejidos vegetales como una respuesta a la infección; muchos de ellos son considerados por sus características antibióticas, como fitoalexinas, mientras que otros están implicados en la formación de sustancias de reforzamiento de la pared celular, así como interventores en los estados iniciales de la respuesta hipersensible (Kosuge, 1969; Rohde, 1972; Nicholson y Hammerschmidt, 1992).

Algunos autores sostienen que muchos compuestos fenólicos se hallan presentes en los tejidos vegetales en forma de glicósidos con baja actividad fisiológica y bioquímica

que cuando son degradados por glicosidasas, como las presentes en la saliva de los nematodos, pueden dar origen a fenoles libres fisiológicamente activos (Huang, 1985b).

Se han encontrado diferencias en la concentración promedio de compuestos fenólicos entre cultivares de tomate susceptibles y resistentes a *Meloidogyne incognita* (Hung y Rohde, 1973; Singh y Choudhury, 1973) así como de aumentos en la actividad de la fenilalanina amonio liasa, enzima implicada en su síntesis (Huang, 1985b).

Los ejemplos citados, consideran la síntesis y acumulación de metabolitos en la planta después del establecimiento de la interacción con el nematodo; sin embargo, también existen otros que son sintetizados antes del establecimiento de la interacción ya que tienen efectos nemostáticos, evitan la orientación o repelen a los juveniles, e impiden la eclosión de los huevecillos, algunos ejemplos son los tertienilos de *Tagetes* spp. que son tóxicos contra varias especies de nematodos en ensayos *in vitro*, las cucurbitacinas del pepino que actúan como repelentes de nematodos de *Meloidogyne incognita*, o algunos poliacetilenos isoméricos de *Carthamus tinctorius* con efecto nematicida contra *Aphelenchoides besseyi*, y de otros más que ha hecho considerar que los compuestos con efectos antinematodos están muy extendidos en el mundo vegetal y que tienen muchas posibilidades de ser utilizados en las estrategias de control de estos parásitos (Chitwood, 2002).

2.4. RESISTENCIA CONTRA NEMATODOS FITOPARÁSITOS

En Nematología Agrícola, la resistencia se define como la capacidad de una planta para retrasar, inhibir o evitar el desarrollo y reproducción del nematodo (Rhode, 1972; Huang, 1985b), mientras que para Veech (1981) la resistencia es la ausencia o inhibición del desarrollo de enfermedad cuando la planta es confrontada con un agente patógeno. La primera definición se basa en términos reproductivos del nematodo y no considera la magnitud del daño causado por el nematodo en la producción de la planta. Para este último aspecto se ha acuñado el término de tolerancia, que define a una planta capaz de soportar grandes poblaciones del nematodo en sus raíces sin decremento en su productividad; este concepto se considera como independiente de la resistencia (Cook, 1974; Trudgill, 1991).

Dropkin (1989) y Canto-Sáenz (1985) consideran que la interacción planta parásito es un sistema que debe tomar en cuenta la reproducción del nematodo y el daño causado a la planta medido en disminución de la producción en términos estadísticamente significativos.

Dropkin (1989) propone usar los términos:

Resistencia: cuando la planta deprime la reproducción del nematodo y se mantiene saludable.

Susceptibilidad: cuando la planta no evita la reproducción del nematodo y además experimenta daño.

Tolerancia: cuando hay una buena reproducción del nematodo con poco daño a la planta.

Intolerancia: cuando las plantas no apoyan la reproducción del nematodo y además sufren daño.

Canto-Sáenz (1985) maneja el término hipersusceptible en vez de intolerante, mientras que Trudgill (1991) menciona que usualmente la resistencia a nematodos no protege a las plantas de daño, es decir hay muchos genotipos resistentes que son intolerantes; por ello este autor menciona que los términos que deben utilizarse son: tolerante/no resistente, tolerante/resistente, intolerante/no resistente e intolerante/resistente.

Se considera que a nivel tisular o celular también se da una respuesta de la planta, donde ni la reproducción del nematodo ni el daño provocado en la producción de la planta es medido; en tales casos es más conveniente hablar de compatibilidad e incompatibilidad que de susceptibilidad y resistencia respectivamente (Canto-Sáenz, 1985).

El término incompatible designa interacciones deletéreas al desarrollo del nematodo que ocurren en plantas resistentes, y el término compatible identifica interacciones favorables al desarrollo del nematodo en plantas susceptibles Kaplan y Davis (1987). Dentro de las respuestas que se manifiestan en la incompatibilidad, la más extrema es la reacción hipersensible que implica la rápida muerte de las células que rodean al patógeno y su aislamiento por la depositación de lignina o suberina en las células adyacentes. En esta reacción, el flujo de nutrientes cesa y se manifiesta la síntesis de productos de diversa naturaleza, muchos de ellos tóxicos, que conducen a la muerte del patógeno.

Como ya se estableció con anterioridad (sección 2.3.4) algunos de los productos del metabolismo secundario de las plantas tienen efectos antinematodo y actúan en los mecanismos de resistencia los cuales se clasifican, de acuerdo al momento en que actúan en el desarrollo de la interacción planta-nematodo, en preinfectivos y postinfectivos (Veech, 1981).

Los mecanismos de resistencia preinfectivos pueden disminuir la eclosión de los huevecillos, alterar la percepción y movimiento del nematodo, su penetración en las raíces; los mecanismos postinfectivos por su parte, no sólo tienen efectos nematostáticos o nematocidas sino que también pueden afectar el desarrollo del sitio de alimentación y con ello el desarrollo del nematodo, y generalmente se asume que son más efectivos que los preinfectivos ya que se ha encontrado que las plantas resistentes son penetradas por los nematodos al igual que las plantas susceptibles.

Herman *et al.* (1991) midieron la penetración de los J₂ de *Meloidogyne incognita* en cultivares de soya altamente resistentes, muy resistentes, resistentes y susceptibles al nematodo; encontraron que a 4 ddi las raíces de los cultivares altamente resistentes tenían un menor número de J₂ que los otros cultivares y que en días posteriores disminuía en 72% como resultado de la salida de los nematodos los cuales perdían la capacidad de infectar nuevas raíces; en las plantas muy resistentes,

resistentes y susceptibles los porcentajes de abandono fueron de 63, 54 y 4 % respectivamente, sin pérdida de la capacidad infectiva de los juveniles recuperados. A los 6 ddi se inició el desarrollo de los juveniles en todos los cultivares de soya probados, principalmente en el cv susceptible. A 16 ddi las raíces del cultivar altamente resistente tenían 87, 74, 53% menos nematodos desarrollados que las de los cultivares susceptible, resistente y muy resistente respectivamente.

Mojtahedi *et al.* (1995) estudiaron la penetración y desarrollo de *Meloidogyne chitwoodi* en clones de un híbrido somático interespecífico de papa y sus parentales (*Solanum bulbocastearum*, resistente y *S. tuberosum*, susceptible al nematodo). Una semana después de inoculados, sólo 0.04, 0.4 y 2 % del inóculo inicial había penetrado al híbrido somático y a los parentales resistente y susceptible; después de ocho semanas el número de nematodos presentes en las raíces del híbrido, del clon resistente y del susceptible había aumentado a 0.3, 1.5 y 21 % respectivamente. Los nematodos en las raíces de los clones resistentes mostraron un retraso del desarrollo, una reducción en el número de sitios de alimentación formados (sólo 50 % los nematodos infectivos establecieron sitios de alimentación) y una menor reproducción con respecto a los ubicados en el parental susceptible, además que la tinción de las raíces con fucsina ácida reveló una reacción necrótica alrededor de los nematodos en el clon resistente y el híbrido, que no se manifestó en *S. tuberosum*.

Potenza *et al.* (1996) estudiaron el comportamiento de los J₂ de *M. incognita* y la respuesta de plántulas de 10 días de geminadas de un cultivar resistente y otro susceptible de alfalfa. Encontraron que en ambos casos los nematodos penetraban en igual magnitud pero 72 horas después los juveniles se encontraban en gran número en el cilindro vascular del cultivar susceptible mientras que en el resistente no penetraban a esta región y se mantenían agrupados en el ápice de la raíz. En el cultivar susceptible el desarrollo del nematodo fue normal, mientras que en el resistente los J₂ desarrollados aparecieron hasta 7 días después.

La electroforesis 2D en SDS-PAGE de productos traducidos *in vitro* de ARN aislado de las raíces de alfalfa susceptibles y resistentes mostraron diferencias altas entre los patrones de bandas de plantas inoculadas y no inoculadas del cultivar susceptible a 72 horas después de la inoculación; algunas bandas aparecieron por primera vez en las raíces inoculadas, mientras que otras aumentaron o disminuyeron su intensidad a 24 horas después de la inoculación. Las plantas resistentes mostraron

pocas diferencias entre tratamientos; la comparación de los perfiles electroforéticos entre productos de raíces de ambos cultivares mostró similitud a las 72 horas habiendo un producto de 45 KDa presente en ambos cultivares aunque en mayor concentración en el cultivar resistente; esta parte de su investigación también fue realizada comparando las raíces de plantas heridas mecánicamente con raíces de plantas inoculadas y los resultados mostraron productos específicos que aumentaron en plantas infectadas (Potenza *et al.*, 1996).

Pedrosa *et al.* (1996b) estudiaron la penetración, desarrollo postinfectivo, reproducción y fecundidad de las razas 1 y 2 de *Meloidogyne arenaria* en plántulas de soya susceptibles (cv CNS), parcialmente resistentes (cv Jackson) y altamente resistentes (PI 200538 y PI 230977); a 10 ddi se encontró que 56 y 99 – 100% de los J₂ de la raza 1 presentes en las raíces eran vermiformes o sexualmente indiferenciados en el cultivar CNS y en los genotipos resistentes respectivamente; en contraste, sólo 2, 42, 44 y 62% de juveniles de raza 2 no habían iniciado el desarrollo en CNS, Jackson, PI200538 y PI 230977 respectivamente. A 20 ddi de 88 a 100% de nematodos de la raza 2 en las raíces de todos los genotipos eran hembras mientras que 25 y 1% de raza 1 eran hembras en CNS y los genotipos resistentes. En los cuatro genotipos la raza 1 produjo de 85 a 96% menos huevecillos por sistema de raíz a 45 ddi que la raza 2, no obstante que esta raza produjo más huevecillos en CNS que en otros genotipos.

Omwega *et al.* (1988) y Omwega y Roberts (1992) estudiaron la base genética de la resistencia a especies de *Meloidogyne* en frijol común, y encontraron la existencia de dos sistemas genéticos distintos. El sistema genético 1 confiere resistencia contra las razas 2, 3 y 4 y algunas poblaciones de la raza 1 de *Meloidogyne incognita* y es controlada por la interacción de dos o más genes recesivos independientes (presente en el cv Nemasnap) o por un gen dominante y un recesivo (presente en la introducción PI 165426); el sistema genético 2 se encontró en las introducciones mexicanas G2618 y G1805, y confiere resistencia contra la raza 1 de *M. incognita*, *M. javanica* y las razas 1 y 2 de *M. arenaria*. La resistencia en este sistema es controlado por un solo gen dominante.

Sydenham *et al.* (1996) estudiaron el efecto de los sistemas genéticos mencionados anteriormente en el estado de desarrollo de *Meloidogyne* spp. cuantificando el número de vermiformes, vermiformes engrosados, hembras globosas y hembras ponedoras de huevecillos por sistema de raíz de *M. incognita* raza 2 y *M.*

arenaria raza 1 utilizando a plántulas de cv Nemasnap, G 1805 y al cv Black Valentine como control susceptible. Para el sistema genético 1 se encontraron que a más de 7 ddi no hubo diferencias significativas en el número de J₂ que penetraron las raíces de Black Valentine y Nemasnap; sin embargo, estas diferencias se hicieron evidentes tiempo más tarde en el cultivar susceptible; el nivel de desarrollo de *M. incognita* fue mayor en el cv susceptible con un tiempo de desarrollo más rápido que en el resistente; el número de huevecillos producidos fue significativamente menor en el cultivar resistente.

Para el sistema genético 2 encontraron que el número total de nematodos de *M. arenaria* fue mayor en Black Valentine que en G1805 a partir de 14 ddi, con estados de desarrollo más avanzados que aparecieron más pronto y en mayor número en el cultivar susceptible que en el resistente, el número de nematodos que alcanzaron el estado adulto en G1805 fue significativamente menor que en el cultivar susceptible, igualmente sucedió con la producción de huevecillos. Los autores concluyen que la resistencia contra *M. incognita* raza 2 y *M. arenaria* raza 2 en germoplasma de frijol que contienen los sistemas genéticos 1 y 2 respectivamente se manifiesta como un decaimiento en el desarrollo del nematodo más que por penetración diferencial comparada con las plantas susceptibles.

Pedrosa *et al.* (1996 A) observaron la respuesta celular de dos genotipos resistentes (cv Jackson y PI 200538) y un susceptible (CNS) de soya infectados con *M. arenaria* razas 1 y 2. Pruebas de campo previas demostraron que ambas razas crecen bien en el cultivar CNS y en menor extensión sobre Jackson y PI 200538. El estudio celular fue realizado en raíces de plántulas inoculadas con 2000 J₂ y preparadas para cortes histológicos a 20 ddi en donde encontraron una mayor diferencia en el desarrollo de las células gigantes entre razas que entre genotipos. *M. arenaria* raza 1 estimuló la formación de células más pequeñas y poco desarrolladas en contraste con las formadas por la raza 2 que fueron bien desarrolladas, con paredes engrosadas y multinucleadas. El número de núcleos por célula gigante fue menor en las células gigantes inducidas por la raza 1. Las diferencias observadas en las células gigantes estuvieron relacionadas con las reportadas para crecimiento y maduración de *M. arenaria* raza 1 y 2 infectando esos mismos genotipos. Los autores consideraron la posibilidad de que el pequeño tamaño de los sitios de alimentación inducidos por la raza 1 disminuye la cantidad y/o calidad de nutrientes que el patógeno pudiera obtener, lo que resulta en un decremento en la tasa de desarrollo y potencial reproductivo de la raza 1 en estos genotipos de soya

III. MATERIAL Y MÉTODO

3.1. ORIGEN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. El nematodo

El inóculo de *N. aberrans* fue proporcionado por el Laboratorio de Nematología Agrícola del Departamento de Parasitología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (ENCB-IPN), donde se mantienen desde hace varios años, diversas poblaciones del nematodo procedentes de diferentes regiones geográficas; estas poblaciones se mantienen creciendo en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Río Grande) y *Chenopodium* sp. en condiciones de invernadero.

Los orígenes geográficos de las poblaciones utilizadas fueron Chapingo, Edo. México y Tecamachalco, Puebla. A la primera población se le incorporó material fresco procedente de su lugar de origen mientras que la población Tecamachalco no fue posible ubicarla en los lugares donde se colectó por primera vez.

Las poblaciones fueron seleccionadas de acuerdo a referencias bibliográficas que señalan que la población Chapingo no puede reproducirse en frijol (Toledo, 1990, Toledo *et al*, 1993) mientras que la población Tecamachalco sí lo hace (Silva-Jaramillo, 1989) aunque algunos autores señalan que esta población no tiene como hospedante al frijol.

3.1.2. El huésped.

Se consideraron los cultivares Azufrado, Flor de Mayo, Negro Jamapa, Negro Ejotero, Negro Querétaro y Canario; los tres primeros fueron semillas certificadas proporcionadas por la PRONASE y las restantes, compradas a productores o distribuidores. A excepción del cv Negro Ejotero, el tipo de crecimiento al que pertenecen los demás cultivares es de tipo III.

La elección de los cultivares se realizó en base a sus antecedentes en confrontaciones con las poblaciones de *N. aberrans* empleadas en este estudio (ver cuadro 1) que indican que el cv Canario es susceptible a la población Tecamachalco contrariamente al cv Negro Querétaro que no es atacado por ninguna de las dos poblaciones.

3.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Por razones técnicas de espacio, tiempo, disponibilidad de semilla, manejo y tipo de inóculo, el estudio propuesto se realizó a través de experimentos independientes, cada uno con su propio diseño experimental y de acuerdo a cada uno de los objetivos planteados. Los estudios experimentales fueron:

1.- Cambios histológicos en las raíces de dos cultivares de frijol (cv Canario y cv Negro Querétaro) inoculados con dos poblaciones de *N. aberrans* (poblaciones Tecamachalco y Chapingo).

2.- Cambios químicos en las raíces de dos cultivares de frijol (cv Azufrado y Negro Querétaro) inoculados con la población Chapingo de *N. aberrans*.

3.- Cambios químicos en las raíces de dos cultivares de frijol (cv Canario y Negro Querétaro) inoculados con *N. aberrans* población Tecamachalco.

También se midió, con la finalidad de confirmar el comportamiento de los materiales seleccionados para este estudio la:

4.- Reproducción y penetración de *N. aberrans* población Chapingo en seis cultivares de frijol (cv Azufrado, cv Canario, cv Ejotero, cv Flor de Mayo, cv Negro Jamapa y cv Negro Querétaro).

5.- Reproducción de *N. aberrans* población Tecamachalco en dos cultivares de frijol (cv Canario y cv Negro Querétaro)

3.3. OBTENCIÓN DE INÓCULO E INOCULACIÓN

En los diversos experimentos se emplearon dos tipos de inóculo: huevecillos o juveniles segundo estadio (J_2).

La obtención de los huevecillos se realizó mediante la técnica de McClure (Apéndice 1) aplicada a raíces de plantas de jitomate y/o quenopodio infectadas y mantenidas en el invernadero, preparándose posteriormente las dosis a usar.

Para la obtención de juveniles se procedió de la siguiente manera: tamices de 50 mallas cubiertas con tela pellón o papel facial fueron colocados sobre charolas conteniendo agua hasta el tope, cuidando que el nivel del agua cubriera en más de un centímetro al papel facial y a una temperatura de 22-25 °C. Los huevecillos fueron

colocados sobre el papel y los juveniles recién eclosionados fueron recuperados en la charola. Por diez días se hizo la recolección de los juveniles hasta obtener el número requerido en las dosis empleadas.

Los huevecillos fueron inoculados inmediatamente después de obtenidos, en cambio los juveniles se mantuvieron en refrigeración hasta completar el número fijado para las dosis empleadas; este procedimiento fue empleado por Hernández (2001) y se desconoce sus efectos sobre la capacidad infectiva del nematodo.

El inóculo fue depositado en un surco de un centímetro de profundidad que se abrió en el suelo, alrededor de la base del tallo de la planta. Las plantas fueron mantenidas en el invernadero del laboratorio de Nematología Agrícola del Depto. de Parasitología de la ENCB-IPN bajo la supervisión del Dr. Alejandro Tovar Soto.

Excepto el experimento 2 y la parte de penetración del experimento 4, donde se emplearon juveniles segundo estadio como inóculo, los experimentos restantes usaron huevecillos como inóculo. La razón que se prefiriera usar este tipo de inóculo se debió principalmente a los bajos índices de eclosión de los huevecillos y a las altas cantidades de inóculo que se requiere para la realización de estos estudios, aunado al desconocimiento que se tiene de muchos aspectos de las condiciones ambientales que afectan el ciclo de vida del nematodo y que lo obligan a detener su desarrollo.

3.4. Experimento 1

CAMBIOS HISTOLÓGICOS EN RAÍCES DE DOS CULTIVARES DE FRIJOL PARASITADOS POR DOS POBLACIONES DE *N. aberrans*

Estas determinaciones se realizaron sobre los cultivares Canario y Negro Querétaro confrontados separadamente con las poblaciones Chapingo y Tecamachalco de *N. aberrans*.

Nueve plantas de cada cultivar de veinticinco días de germinadas fueron inoculadas con 15 mil huevecillos por separado de cada población del nematodo, un número igual de plantas estuvieron libre de inóculo y sirvieron como controles. Las plantas fueron mantenidas en invernadero a 25-30 °C. El montaje experimental duró de Mayo a Agosto de 2006, periodo en el que se realizaron trabajos continuos de riego y control de plagas cada tercer día. Tres plantas de cada tratamiento y sus controles fueron desenterradas a los 15, 45 y 90 días después de la inoculación (ddi). Las raíces fueron separadas del tallo, lavadas con abundante agua corriente, fijadas en formol: ácido acético: alcohol etílico 96% (FAA) y enviadas al laboratorio para el estudio histológico.

La preparación para corte histológico se realizó sobre estos materiales y de manera adicional y complementaria en raíces y agallas del cv Canario provenientes del estudio de reproducción (experimento 5) procediéndose de la siguiente manera:

Las raíces se sacaron del fijador y se lavaron profusamente con agua corriente por mínimo una hora. Una parte de las raíces de las plantas experimentales fueron teñidas con fucsina ácida (Apéndice 2) con el fin de detectar a los nematodos en su interior; las raíces de las plantas control no pasaron por este proceso de tinción.

De raíces infectadas se disectaron nematodos para la observación de su estado de desarrollo en cada fecha, y se montaron en glicerina según procedimiento de Senhorst, 1959 y De la Jara *et al.*, 1994 (Apéndice 4).

Las raíces parasitadas con el nematodo fueron separadas y cortadas en trozos de 1-2 mm de longitud que contenían al nematodo, y fueron embebidas en Tissue-Tek o.c.t (10.24% w/w de alcohol polivinílico, 4.26% w/w de polietilen glicol y 85.50% w/w de ingredientes no reactivos), para lo cual se colocó sobre una hoja de papel aluminio dos pequeñas escuadras rectas del mismo material de 2 x 1 cm de longitud de cada lado, de tal manera que formaran una pequeña caja dentro de la cual se extendió una pequeña cantidad del polímero, el dispositivo así formado se metió a la cabina previamente enfriada de un

crióstato Microm HM505N facilitado por la QBP Esther Uria Galicia del Laboratorio de Histología del Departamento de Morfología de la ENCB-IPN.

Una vez enfriado el Tissue-Tek, las raíces se colocaron en la dirección y orientación apropiada para cortes transversales y longitudinales y se cubrió con más polímero, dejándose enfriar hasta que el endurecimiento fuera total; posteriormente se retiraron las escuadras y el papel aluminio, y el bloque resultante se montó sobre las platinas del crióstato para la realización de los cortes a -30 °C y con un grosor de 10µm los cuales fueron transferirlos con la ayuda de una pequeña espátula fría, a portaobjetos limpios, desengrasados y secos, previamente bañados en una solución de gelatina Difco al 2%.

Finalmente los portaobjetos conteniendo los cortes se sacaron del crióstato y se guardaron a temperatura ambiente libre de polvo.

La tinción de los cortes se realizó por la técnica de Fucsina básica -verde rápido (Zielh Nielsen) y montados en resina sintética; adicionalmente y con fines comparativos, cortes de material correspondiente a la segunda fecha (45 ddi) y de agallas fueron teñidos por la técnica cuádruple de Johansen y montados de igual manera (Apéndices 5 y 6).

3.5. Experimento 2

CAMBIOS QUÍMICOS EN RAÍCES DE DOS CULTIVARES DE FRIJOL INOCULADOS CON *N. aberrans* POBLACIÓN CHAPINGO

En este estudio los cultivares Azufrado y Negro Querétaro fueron confrontados con la población Chapingo de *N. aberrans*. Como se señaló con anterioridad, esta población no crece en el cv Negro Querétaro mientras que para el cv Azufrado no hay reportes que indiquen que haya sido confrontado con esta u otra población (cuadro 1).

Semillas de cada cultivar fueron sembradas en macetas conteniendo 2 kg de suelo esterilizado por calor; ocho días después de la germinación las plantas fueron reducidas a una planta por maceta.

Nueve plantas de cada cultivar fueron inoculadas con 2000 juveniles de segundo estadio de *N. aberrans* población Chapingo obtenidos e inoculados según procedimiento ya detallado en el apartado 3.3., manteniéndose un número similar de plantas sin inocular como control.

La inoculación fue realizada a los 15 días después de germinadas las plantas las cuales fueron mantenidas en condiciones de invernadero a 25-30 °C en una distribución completamente al azar. Cada cultivar con o sin inóculo fueron considerados un tratamiento. El experimento fue montado durante los meses de Mayo - Agosto de 2005 que corresponde al ciclo agrícola primavera – verano.

Tres plantas de cada tratamiento fueron desenraizadas a 15, 30 y 60 ddi, y las raíces fueron lavadas profusamente con agua corriente y separadas del tallo. Algunas raíces de este material fueron teñidas por la técnica de fucsina ácida (Apéndice 2) para corroborar la infección.

Las raíces se colocaron sobre papel de estrasa donde se dejaron secar a temperatura ambiente por una semana antes de ser enviadas al estudio Fitoquímico los cuales se realizaron en el Laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias de la UNAM bajo supervisión de la Q.A. Verónica Muñoz Ocotero y de la Dra. Ma. Cristina Pérez Amador siguiendo el procedimiento que a continuación se detalla.

Las raíces de cada tratamiento fueron pesadas y molidas hasta ser reducidas a un polvo fino que se colectó en tubos de ensaye donde se realizó la extracción consecutiva de compuestos mediante el uso de disolventes de diferente polaridad. Los disolventes fueron

empleados en grado ascendente de polaridad: hexano, acetato de etilo y metanol. Se realizaron dos extracciones en cada disolvente, con duración de 24 hs cada uno, y se calcularon los rendimientos de extracto obtenido. El procedimiento empleado se puede revisar en el Apéndice 8.

Una vez obtenido los extractos y los rendimientos se determinó la fase móvil más adecuada para la separación de compuestos por cromatografía en capa fina de cada uno de los tratamientos estudiados, para lo cual se prepararon diferentes combinaciones de disolventes (Apéndices 9 y 10), con los que se realizaron pequeños corrimientos cromatográficos en pruebas presuntivas empleando los extractos de la primera fecha de los controles; estas pruebas señalaron que las fases móviles más adecuadas fueron las mezclas hexano : acetato de etilo (6.5 : 3.5), acetato de etilo : cloroformo : metanol (7 : 2 : 1) y butanol : ácido acético : agua (4 : 1 : 7) para los extractos de hexano, acetato de etilo y metanol respectivamente.

El corrimiento cromatográfico se realizó en cámaras verticales de vidrio de 30 x 27 con 50 ml de la fase móvil determinada para cada caso.

La cromatografía fue desarrollada en placas de vidrio para cromatografía en sílica gel 60F₂₅₄ Merck de 20 x 10 cm con aplicaciones de volúmenes de muestra equivalentes a 60 µg de los extractos de los tratamientos de la población Chapingo y Tecamachalco respectivamente. La aplicación de las muestras en la placa fue realizada de manera automática con aplicador CAMAG Automatic TLC sampler 4.

Después del desarrollo cromatográfico, las placas fueron observadas con luz ultravioleta a 254 y 365 nm en un gabinete SPECTROLINE modelo cx-20 para ubicar el perfil cromatográfico, marcando las bandas que pudieron visualizarse. Posteriormente las placas fueron asperjadas con una solución de Sulfato Cérico en ácido sulfúrico y colocadas en una plancha CIMAREC BARNSTEAD/THERMOLYNE a 95°C hasta la clara revelación de bandas, las cuales fueron nuevamente marcadas y comparadas con las anteriormente observadas en el gabinete. Se tomaron fotografías para cada una de las observaciones y sobre ellas se calcularon los factores de corrimiento (Rf) para cada una de ellas.

3.6. Experimento 3

CAMBIOS QUÍMICOS EN RAÍCES DE DOS CULTIVARES DE FRIJOL INOCULADOS CON *N. aberrans* POBLACIÓN TECAMACHALCO

Se confrontó a la población Tecamachalco del nematodo con los cultivares Canario y Negro Querétaro cuyas reacciones con esta población ya han sido reseñadas (cuadro 1 y experimento 1).

Para este estudio se siguió un procedimiento similar al del experimento 1 excepto que por razones de disponibilidad de semilla el cv Azufrado fue substituido por el cv Canario y las plantas fueron inoculadas a los 30 días de germinadas con 15,000 huevecillos, con fechas de evaluación a los 15, 45 y 90 ddi. El establecimiento de las unidades experimentales se realizó durante Mayo – Agosto de 2006 bajo condiciones de invernadero, realizándose cada tercer día las labores de riego y control de plagas.

La preparación del material para el estudio fitoquímico y la obtención de los extractos se realizó como en el experimento 2. Para el desarrollo cromatográfico se determinaron como fases móviles las combinaciones hexano : acetato de etilo (5.3 : 4.7) para el extracto hexánico, acetato : hexano (8 : 2) para el extracto de acetato de etilo, y butanol : ácido acético : agua (4 : 1.1 : 7) para el extracto con metanol (Apéndice 11).

La cromatografía fue desarrollada en placas de aluminio para cromatografía en sílica gel 60F₂₅₄ Merck de 10 x 10 cm con aplicación manual de volúmenes de muestra de 800 µg de los extractos; el corrimiento cromatográfico se realizó en cámaras verticales de vidrio de 12.5 x 14.5 cm, con 30 ml de la fase móvil determinada para cada caso.

Las observaciones y revelado de las placas se realizó igual a como ya se mencionó.

3.7. Experimento 4

REPRODUCCIÓN DE *N. aberrans* POBLACIÓN CHAPINGO EN DIVERSOS CULTIVARES DE FRIJOL

Semillas de cultivares de frijol Azufrado, Canario, Flor de Mayo, Negro Ejotero, Negro Querétaro y Negro Jamapa fueron puestas a germinar directamente en macetas conteniendo 2.5 kg de suelo esterilizado por calor; se eligieron estos cultivares porque a excepción del cv Negro Querétaro no hay reportes que indiquen hayan sido confrontado con el nematodo (cuadro 1).

A los ocho días de germinadas, las plantas fueron reducidas a una por maceta, y una semana más tarde tres plantas de cada cultivar fueron inoculadas como ya se indicó (Apartado 3.3 de materiales y método), con 4000 huevecillos de *N. aberrans* población Chapingo. Las plantas fueron mantenidas bajo condiciones de invernadero a una temperatura de 22 a 25 °C en un diseño experimental simple completamente al azar con 6 tratamientos (los cultivares) y 3 repeticiones.

El experimento fue implementado en los meses de Julio a Noviembre de 2004, que corresponden en condiciones de campo al ciclo agrícola otoño-invierno.

Ciento cinco ddi (el ciclo biológico del frijol es de aproximadamente 120 días), las plantas fueron retiradas, las raíces separadas del tallo, lavadas con agua corriente, pesadas y contabilizado el número de agallas producidas por el nematodo para calcular el índice de agallamiento que es el cociente entre el número de agallas y peso de raíz.

Posteriormente se tomaron raíces al azar para teñirlas con fucsina ácida (Apéndice 2) y se cuantificaron los nematodos presentes que no alcanzaron el estado adulto en los tejidos de la raíz de la planta. Las raíces posteriormente fueron aclaradas y montadas en resina, según la técnica establecida para tal propósito que se muestran en el Apéndice 3.

Finalmente se realizó el aislamiento de huevecillos por la técnica de McClure (Apéndice 1) y se calculó el factor de reproducción F que es el cociente del tamaño de la población final (número de huevecillos recuperados) entre el tamaño de la población inicial de nematodos (tamaño de inóculo), y que proporciona un indicador del grado de resistencia o susceptibilidad que una planta tiene. Si $F = 1$, se dice que la planta o cultivar es mantenedora de la población; si $F > 1$, la planta o cultivar es susceptible e incrementa el tamaño de la población del nematodo; si $F < 1$ la planta o cultivar se considera que

muestra resistencia y disminuye el tamaño de la población del nematodo (Canto-Sáenz, 1985).

Paralelo al establecimiento del ensayo de reproducción de la población Chapingo en frijol se implementó otro ensayo para determinar el grado de penetración del parásito de esta misma población en los mismos cultivares de frijol con la finalidad de conocer si la entrada a la raíz de los primeros nematodos afecta la entrada de los subsiguientes, para lo cual se procedió de la siguiente manera:

Las semillas de los seis cultivares de frijol fueron puestas a germinar directamente en macetas conteniendo 2.5 kg de suelo esterilizado y después de germinadas las plantas fueron aclareadas a una por maceta.

Seis plantas de cada cultivar fueron inoculadas a los 15 días después de germinadas con 2000 J₂, tres de las cuales fueron desenraizadas 48 horas (2 días) después de inoculadas y otras tres a las 72 horas (3 días); las repeticiones se manejaron por separado.

Las unidades experimentales se mantuvieron en condiciones de invernadero en un diseño factorial aleatorio con 12 tratamientos (cultivares x fecha de observación) y tres repeticiones.

Inmediatamente después de desenraizadas, las raíces de las plantas fueron lavadas con agua corriente hasta eliminar los residuos de suelo, cortadas y colocadas en fijador FAA (Alcohol etílico 96%: formol: ácido acético) y llevadas al laboratorio.

Después de 48 horas las raíces fueron cortadas en trozos más pequeños, lavadas para eliminar el fijador y teñidas con fucsina ácida, según modificaciones al procedimiento sugerido para tal efecto (Apéndice 2), para visualizar y contabilizar bajo microscopio estereoscópico el número de nematodos presentes por sistema de raíz

Se seleccionaron y prepararon algunas raíces parasitadas para ser montadas en laminillas (Apéndice 3).

Con los resultados numéricos obtenidos en cada uno de los ensayos experimentales se calcularon los parámetros estadísticos básicos y los análisis de varianza, las pruebas de diferencia de medias por el método de Duncan, y los análisis de regresión entre variables.

El análisis estadístico se realizó por separado para cada experimento y fue realizado utilizando el programa de cómputo STATGRAPHICS Plus versión 5.1

3.8. Experimento 5

REPRODUCCIÓN DE *N. aberrans* POBLACIÓN TECAMACHALCO EN DOS CULTIVARES DE FRIJOL

En esta parte se confrontaron los cultivares Canario y Negro Querétaro con el nematodo en cuestión procedente de Tecamachalco, Puebla. Las referencias bibliográficas señalan a estos cultivares como susceptible y resistente respectivamente a la población Tecamachalco (cuadro 1). El procedimiento seguido fue similar al señalado para el experimento 4 pero con un nivel de inóculo de 15000 huevecillos en plantas de 30 días de germinadas, la evaluación de los parámetros se realizó de igual modo. El diseño experimental empleado fue uno simple completamente al azar con dos tratamientos y tres repeticiones. El experimento fue montado en los meses de Mayo a Agosto de 2006 que en condiciones de campo corresponden a los meses en que se siembra frijol durante el ciclo agrícola primavera - verano, y fue mantenido en condiciones de invernadero a 25-30 °C.

En ambos casos, después del conteo de agallas y antes de la elaboración del McClure, se midió el peso fresco de raíz y se tomaron muestras al azar para teñirlas con fucsina ácida (apéndice 2) para la observación y cuantificación de nematodos presentes que no alcanzaron el estado adulto en los tejidos de la raíz de la planta. Las raíces posteriormente fueron aclaradas y montadas en resina, según la técnica establecida para tal propósito (De la Jara *et al.*, 1994) y que se muestran en el Apéndice 3.

Con los resultados numéricos obtenidos se calcularon los parámetros estadísticos básicos y los análisis de varianza, las pruebas de diferencia de medias por el método de Duncan, y los análisis de regresión entre variables utilizando el programa de cómputo STATGRAPHICS Plus versión 5.1

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Experimento 1. CAMBIOS HISTOLÓGICOS EN RAÍCES DE DOS CULTIVARES DE FRIJOL PARASITADOS POR DOS POBLACIONES DE *N. aberrans*

a) Anatomía de la raíz de frijol

Con la finalidad de ubicar topológicamente al nematodo en la raíz y las alteraciones que causó en los sitios donde se ubicó, se hace una descripción de las observaciones realizadas en los materiales que sirvieron como testigos en el presente estudio.

La raíz del frijol presentó la zonación característica de la mayoría de las plantas vasculares y que son: zona meristemática o de división celular, zona de elongación o alargamiento celular, zona de absorción o de diferenciación de tejidos y zona de maduración o de tejidos secundarios (Halfacre y Barden, 1992).

No hubo diferencias evidentes en la disposición de tejidos entre los cultivares Negro Querétaro y Canario y mostraron ser similares a los descritos en *Phaseolus coccineus* por Yépez-Basurto (1977); en la figura 11 se muestran las características histológicas de cada una de las zonas de la raíz de esta planta.

La zona meristemática se encontró cubierta por una cofia de células vivas isodiamétricas que tiñen fuertemente con fucsina, con grandes núcleos y dispuestas de manera concentrica alrededor del promeristemo (fig 1 A) el cual mostró ser un macizo de células pequeñas con paredes delgadas, en continua división y con gran actividad nuclear, como lo señaló el hecho que los núcleos tiñeran fuertemente de rojo.

En la zona de elongación se observó una protodermis formada por una capa de células pequeñas monoestratificada con paredes delgadas, e igualmente un meristemo con células isodiamétricas de mayor tamaño y con paredes primarias delgadas, con núcleos que van dejando gradualmente de ser tan evidentes y son ligeramente rosados. En el centro de esta región se visualizó el procambium vascular como un macizo de células nucleadas pequeñas (figuras 1 B, C).

La zona de diferenciación (figuras 1 D-F) presentó una epidermis monoestratificadas con pelos radiculares largos y un córtex formado por grandes células

parenquimatosas irregulares, con paredes primarias delgadas; en esta zona fue común encontrar cristales de naturaleza desconocida (figura 1 D). La endodermis se mostró como una sola capa de células isodiamétricas pequeñas en las que en algunos cortes, eran evidentes las bandas de Caspary. En el cilindro vascular el cambium se limitó a una sola capa de células bajo la cual se encontró una capa de células más pequeña correspondiente al periciclo. En el centro del cilindro vascular se observó un gran vaso del cual se iniciaban hileras de xilema flanqueadas por floema y parénquima floemático.

La zona de maduración (figura 1 G) no presentó muchos pelos radiculares. Se observó una epidermis con paredes primarias engrosadas y un córtex de células parenquimáticas grandes dispuesta de manera radial alrededor del cilindro vascular en el cual se hallaba un actinoestele tetraarco bien diferenciado que por el crecimiento de sus tejidos conductores puede considerarse de tipo exarco; el floema se dispuso adjunto al xilema y al periciclo, con grandes huecos aparentemente vacíos entre los brazos del actinoestele.

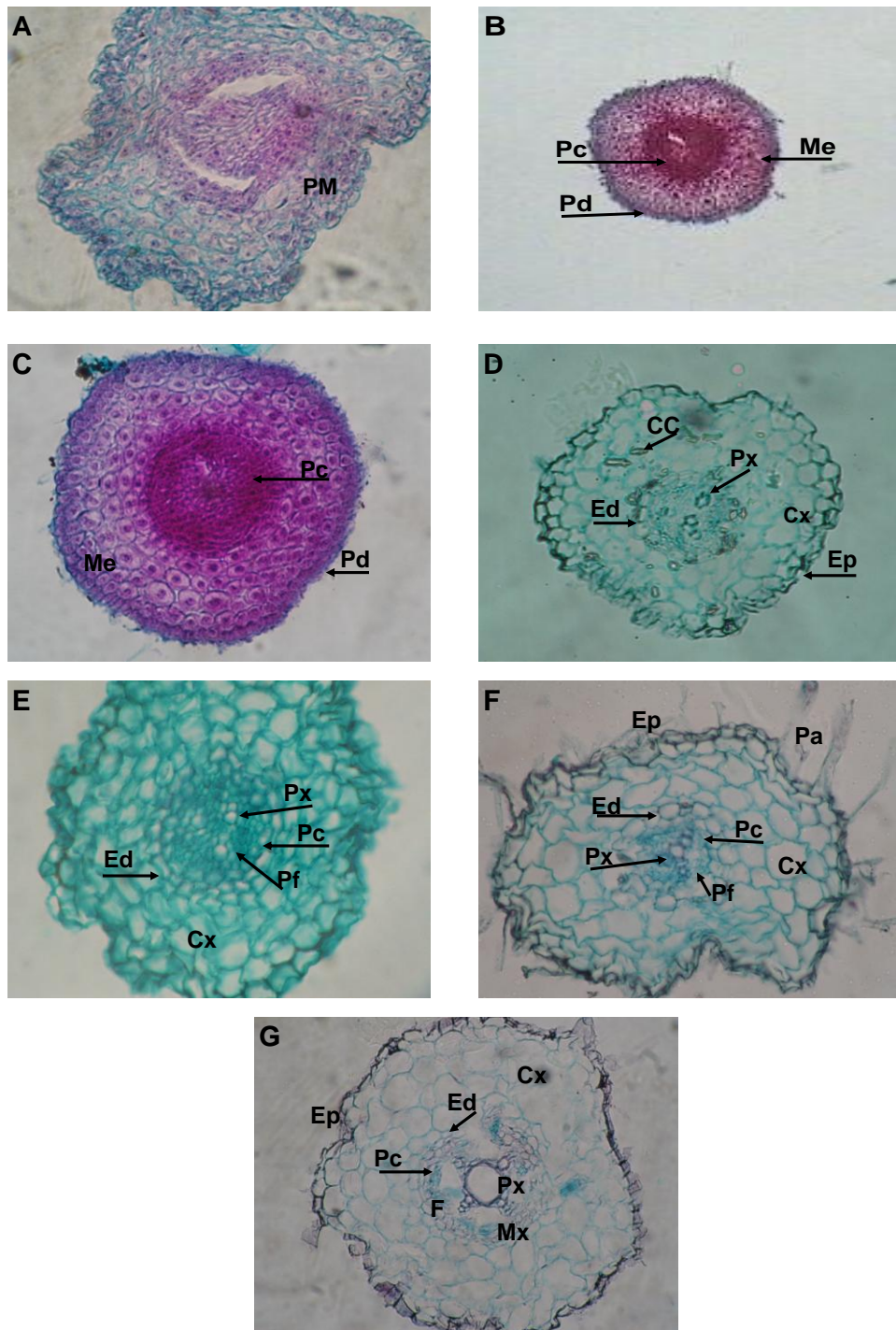


Figura 1. Cortes histológicos transversales en diferentes zonas de la raíz de frijol (*P. vulgaris*) que muestran los cambios graduales que ocurren a nivel histológico del cilindro vascular a lo largo de una raíz, desde el meristemo hasta la región madura. A. Zona meristemática o de proliferación 20x; B. Zona de elongación 10x; C. Zona de elongación 10x; D. Zona de diferenciación 10x; E. Zona de diferenciación 20x; F. Zona de diferenciación 20x; G. Zona de maduración 10x. CC = cristales corticales, Cx = córtex, Ed = endodermis, Ep = epidermis, Me = meristemo, Mx = metaxilema, Pa = pelo absorbente; Pc = periciclo, Pcb = procambium, Pd = protoderma, Pf = profloema, PM = promeristemo, Px = protoxilema.

b) Alteraciones histológicas por *N. aberrans* en raíces de frijol a 15, 45 y 90 días después de inoculado (ddi)

No hubo diferencias entre las lesiones causadas por las dos poblaciones de nematodo en las raíces de los dos cultivares de frijol probados; en todos los casos los nematodos se encontraron parasitando raíces secundarias y terciarias, y se ubicaron principalmente en las zonas de diferenciación y de maduración de la raíz, en cavidades que abrieron en el córtex.

En la figura 2 B, D, F se muestran cortes transversales o longitudinales de raíces de frijol parasitadas con el nematodo a los 15, 45 y 90 ddi. Las cavidades estuvieron ocupadas por uno u ocasionalmente dos nematodos, esto último como resultado de la fusión de cavidades que en las raíces terciarias ocupaban en corte transversal más del 80% de su diámetro. En ningún caso se encontraron nematodos con la cabeza colocada sobre alguna de las células que rodeaban la cavidad que indicara que el nematodo se estuviese alimentando. En la segunda y tercera fecha (figura 2 D, F) se observó la presencia de células hipertróficas en mayor número, que provocaron un engrosamiento en la porción de la raíz afectada sin llegar a constituirse como una agalla, hecho consistente con la observación hecha en el estudio de reproducción (Apartado 4.1. Experimento 5).

Los nematodos disectados de estas cavidades generalmente se encontraron en estados de desarrollo J₃ o J₄; a los 15 ddi, el principal estado encontrado fue el J₃ con nematodos adquiriendo una forma de “C” que gradualmente se cerraba, llegando incluso a formar un círculo con los extremos del nematodo, cabeza y cola, cruzados (figura 2 A), mientras que a 45 y 90 ddi los estados más comunes fueron principalmente J₄ los cuales mostraron ser más gruesos y grandes, y en general se encontraron circularizados en una o dos vueltas y en ocasiones con sus cabezas dispuestas hacia el exterior del círculo (figura 2 C, E). En estas fechas también se encontraron nematodos J₂ y J₃ en cavidades semejantes a las encontradas a 15 ddi, hecho que es de esperarse ya que la inoculación se realizó con huevecillos en vez de juveniles y por lo tanto hay una estructura de edades en la población que ocupaba la raíz.

Sólo en la interacción c.v. Canario con la población Tecamachalco se encontraron algunos nematodos desenrollados, ligeramente más delgados, con colas ya no tan redondeadas y con labios claramente esclerotizados pertenecientes a estados avanzados del J₄ sin llegar a ser preadultos. Posiblemente estos sean individuos que les faltó tiempo para desarrollarse

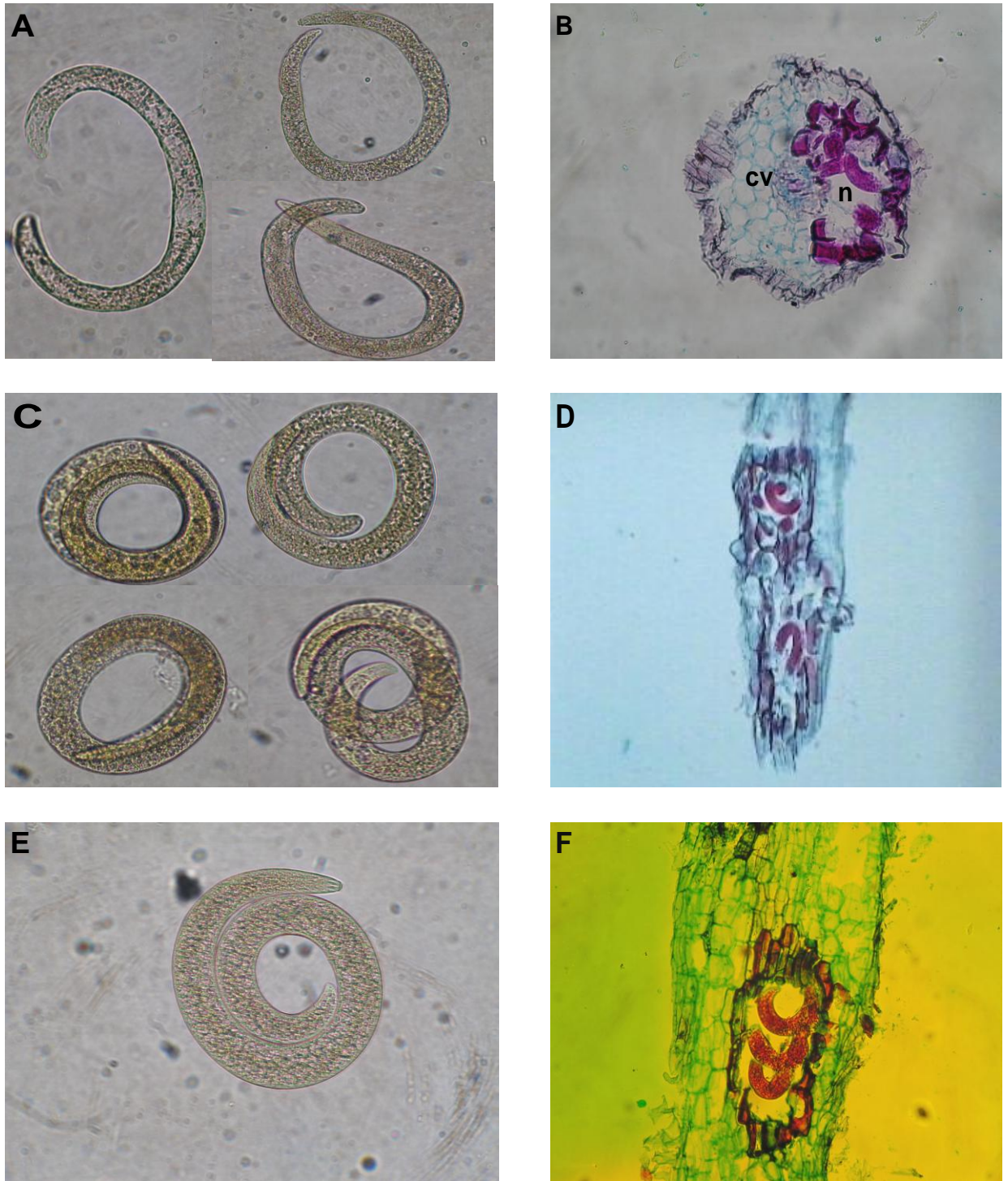


Figura 2. Juveniles recuperados de lesiones en raíces de frijol común (*P. vulgaris*) inoculadas con huevecillos de *N. aberrans*. A, C, E) fases J₃ y J₄ presentes a 15, 45 y 90 días respectivamente después de inoculadas (ddi) en frijol 675x. B) Lesión en cultivar (cv) Negro Querétaro a 15 ddi con la población Chapingo 450x. D) cv Canario a 45 ddi con la población Tecamachalco 150x. F) cv Negro Querétaro a 90 ddi con la población Tecamachalco 450x. Los nematodos corresponden a las fechas y poblaciones de las lesiones mostradas en las imágenes adjuntas.

por completo en fechas posteriores, es decir tal vez pertenezcan a los pocos genotipos detectados en el experimento 5 (sección 4.5., página 113), que fueron capaces de formar la agalla y de reproducirse a 105 ddi.

Los daños a nivel histológico a 15, 45 y 90 ddi se muestran en la figura 3; a este nivel no se observaron diferencias en las respuestas de los cultivares a las poblaciones del nematodo; se observó que a los 15 ddi (Figura 3 A, E, H) los principales cambios ocurrieron en las células parenquimáticas del córtex, principalmente en aquellas que rodeaban la cavidad en la que se encontraba el nematodo. Las principales características de estos cambios fueron un aumento de tamaño celular, con núcleos grandes y nucléolos muy prominentes (figura 3 E) y en ocasiones con polarización de núcleos (figura 3 H). El citoplasma aumentó su densidad y adquirió una consistencia granulosa mientras que las paredes celulares engrosaron de manera no homogénea siendo más evidente en la región posterior de la célula, la parte más alejada al nematodo y la cavidad. Estos cambios ocurrieron en todas las células que rodeaban la cavidad y que constituían una capa u ocasionalmente dos, las células adjuntas a éstas también mostraron cambios aunque no tan acentuados y el cilindro vascular no se vió afectado excepto en las raíces terciarias donde mostraron cierto engrosamiento en las paredes de las células de la endodermis e incluso del periciclo.

A los 45 ddi (figura 3 B, D, F) la cavidad se observó bordeada por las mismas células que ya se describieron con anterioridad y por otras que se encontraron totalmente rodeadas de paredes engrosadas (figura 3 F), con un lumen celular pequeño, con núcleos picnóticos; el número de capas de células que rodeaban la cavidad no fue mayor al de la primer fecha. En algunas raíces secundarias y terciarias la lesión se extendió en todo el córtex en ocasiones causando la desaparición casi completa del córtex y afectando a las células de la epidermis, así como a las de la endodermis y del periciclo, las cuales mostraron engrosamiento de las paredes que daban hacia el haz vascular; no se observó hipertrofia en estos dos últimos tejidos (figura 3 D).

En las raíces de los frijoles confrontados con ambas poblaciones de *N. aberrans* se apreció a 90 ddi (figura 3C, G) un ligero engrosamiento en los sitios en los que se encontraba el nematodo como resultado de la hipertrofia celular, sin que esto indicara la formación de una agalla; no pudo apreciarse proliferación o hiperplasia de células corticales que señalaran la formación de esta estructura ni indicio alguno de la formación de un sincicio

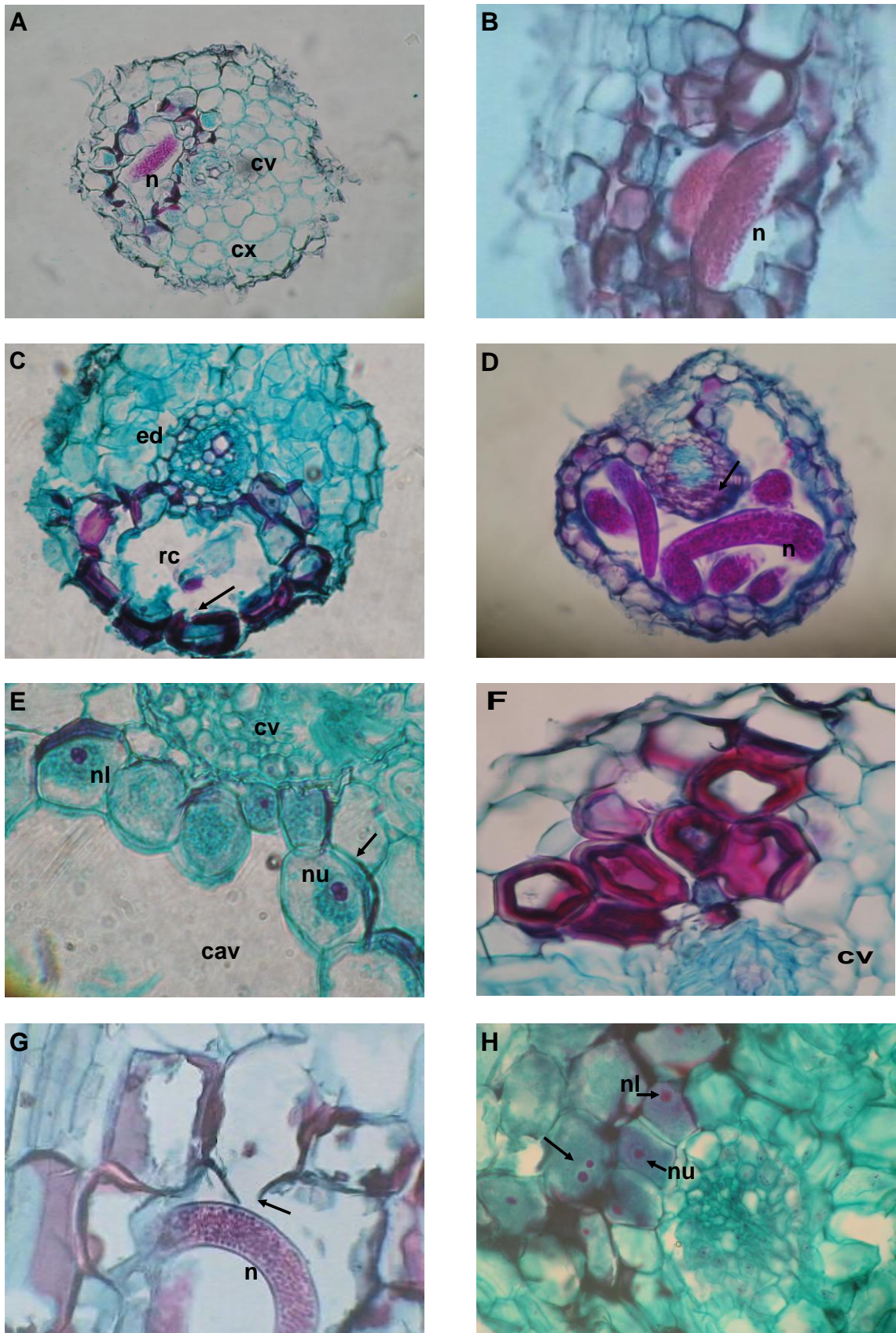


Figura 3. Alteraciones histológicas causadas por *N. aberrans* en frijol. A) cultivar (cv) Negro Querétaro con nematodo de la población Chapingo a 15 ddi 450x. B) cv Canario con misma población que A 45 ddi 600x. C) cv Negro Querétaro con población Chapingo a 90 ddi 900x. D) cv Negro Querétaro con nematodo de la población Tecamachalco a 45 ddi 900x. E) cv Canario con nematodo de Tecamachalco a 15 ddi 1800x. F) cv Negro Querétaro con población Chapingo a 15 ddi 1800x. G) cv Canario con población Tecamachalco a 90 ddi 600x. H) cv Negro Querétaro con población Tecamachalco a 15 ddi 1800x. Las flechas señalan a células hipertróficas con núcleos y nucleólos prominentes (E) en algunos casos replicados (H), así como engrosamientos y/o rompimientos de la pared de células del córtex que rodean la cavidad (C,F,G) o de la endodermis (D); cav = cavidad, cv= cilindro vascular, ed = endodermis, rc = restos celulares, n = nematodo,

Las células que bordeaban las cavidades donde se encontraron los nematodos mostraron rompimientos de las paredes celulares (figura 3G) y por lo consiguiente, un mayor número de fragmentos celulares en el interior de la cavidad (figura 3 C) así como una disminución del número de células hipertrofiadas; el engrosamiento de las células de la endodermis y del periciclo se mostró en algunos casos más acentuada en esta fecha.

La observación de series completas de cortes transversales, una de las cuales se muestra en la figura 4 (A – M) y que corresponde al cultivar Canario con la población Tecamachalco en la segunda fecha; y su comparación con la presentada en el cultivar Negro Querétaro (figura 4 N), sugiere que las cavidades tienen forma de huso y están cerradas por sus extremos con un macizo de células hipertrofiadas cuyo número va disminuyendo gradualmente y con características similares a las células que bordean la cavidad; no se distinguió si estos grupos de células señalaban alguna polaridad, es decir si las células anteriores que limitaban la cavidad eran diferentes a las posteriores o si tenían características distintivas que las señalaran como células iniciales del sitio de alimentación del nematodo.

Los cortes transversales realizados antes y después del sitio en que se encontró la cavidad con el nematodo, presentaban algunas zonas de rotura o interrupción de la epidermis cercana a cada cavidad, lo que puede representar nuevas zonas de entrada del nematodo (Figura 4 A,B,C); al respecto Manzanilla-López *et al.* (2002) consideran que *N. aberrans* tiene dos estrategias para desarrollarse a estado adulto: 1) después de la penetración a las raíces por el J₂, el desarrollo puede ocurrir dentro o fuera de la raíz con repetidas penetraciones y emigraciones hasta que obtiene el estado adulto, 2) después de la penetración por el J₂, el desarrollo procede dentro de la raíz hasta alcanzar dicho estado.

En el córtex se observaron zonas claras grandes que pueden representar la degradación de las células vecinas que el nematodo deja en su migración a través de la raíz y que posiblemente señala la trayectoria intercelular seguida por el nematodo antes de su establecimiento final (Clark,1967); Quimí, 1981b). Manzanilla-López *et al.* (2002) consideran que *N. aberrans* combina el comportamiento migratorio de los juveniles, hembras y machos inmaduros vermiformes propio de los Pratylenchidae con el hábito endoparasítico de la hembras maduras de los Heteroderidae

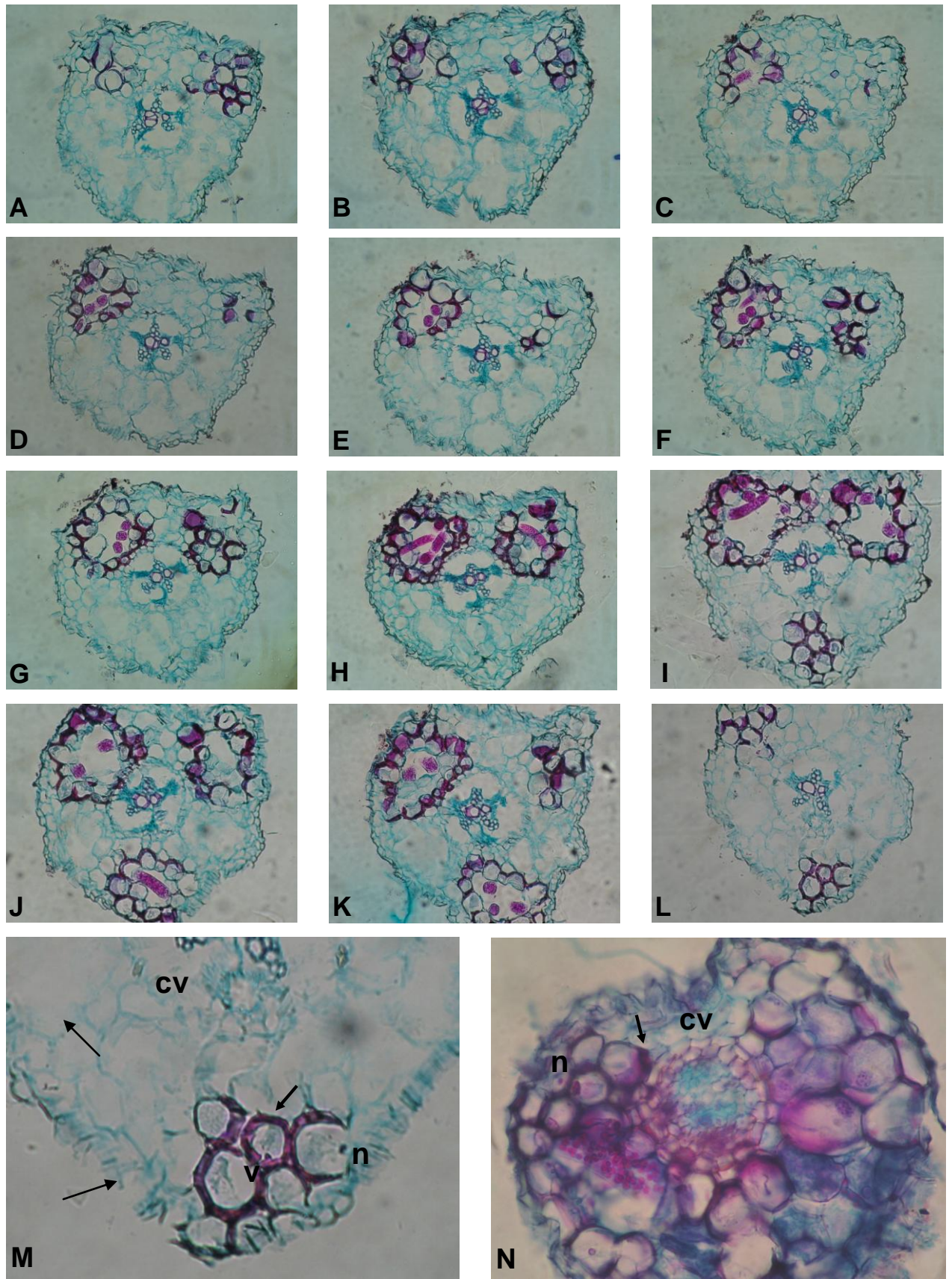


Figura 4. Serie completa de secciones transversales de una raíz de frijol cv Canario a 45 ddi con *N. aberrans* población Tecamachalco 450x. A – L) secuencia completa de la lesión de la parte superior izquierda del corte de la raíz. C – K) secuencia completa de la lesión de la parte superior derecha. I – L) secuencia de la lesión de la parte inferior del corte; M y N muestran los detalles a 900x de las células presentes en los extremos de las cavidades en los cultivares Canario y Negro Querétaro respectivamente en el mismo lapso; las flechas señalan engrosamientos de la pared celular y lesiones en epidermis y córtex por la migración del nematodo; cv = cilindro vascular, n = núcleo, v = vacuola.

A pesar que la tinción con la técnica cuádruple de Johansen aplicada a material de la segunda fecha (figura 5) fue más contrastante que la realizada con la de Fucsina básica-Verde rápido (Zielh-Nielsen), no se detectaron características sobresalientes a las ya descritas, aunque puso en evidencia:

- 1) la presencia de gránulos de almidón en las células que bordean la cavidad y de otras próximas a éstas (figura 5 C);
- 2) la posible presencia de lignina en los engrosamientos de la pared (figura 5 E, F);
- 3) evidenció claramente la presencia de núcleos ameboideos grandes con nucléolos muy evidentes en las células corticales hipertrofiadas adyacentes a la cavidad (figura 5 D, F).

Las cavidades anteriormente descritas han sido reportadas por Quimí (1981a) e Inserra *et al.* (1983, 1985) en remolacha y por Castillo (1982) y Castillo y Marbán-Mendoza, (1984) en Chile, aunque no describieron los cúmulos de células que cierran la cavidad. De acuerdo con estos autores las cavidades fueron formadas respectivamente por los J₂ a los 5 y 10 días después de la penetración del nematodo, estando generalmente ocupadas por J₃ y J₄.

Inserra *et al.* (1985) han mencionado que en algunos casos las cavidades se extendían del córtex al estele llegando a destruir el 50% del cilindro vascular, mientras que Castillo (1982) y Castillo y Marbán-Mendoza (1984) señalaron que en Chile se forma por lisis celular debido a acción mecánica, sin descartar la existencia de algún mecanismo bioquímico de parte del nematodo.

Las alteraciones histológicas observadas en los cultivares de frijol aquí estudiados se mantienen, salvo ligeros cambios, de manera constante durante las tres fechas analizadas y corresponden a los descritos para Chile a 10 días después de la penetración, siendo las alteraciones más notables, además de la lisis, la hipertrofia de las células corticales, los engrosamientos de la pared celular (que Castillo (1982) considera como necrosis), un aumento en la densidad del citoplasma, la presencia de núcleos gigantes y deformes, una mayor vacuolización, y la formación de gránulos de almidón. A excepción de la vacuolización, que no fue muy evidente en las células de los cultivares de frijol aquí estudiados, las alteraciones son muy similares entre ambas especies de hospederos y parecidos a los reportados para otras especies de plantas.

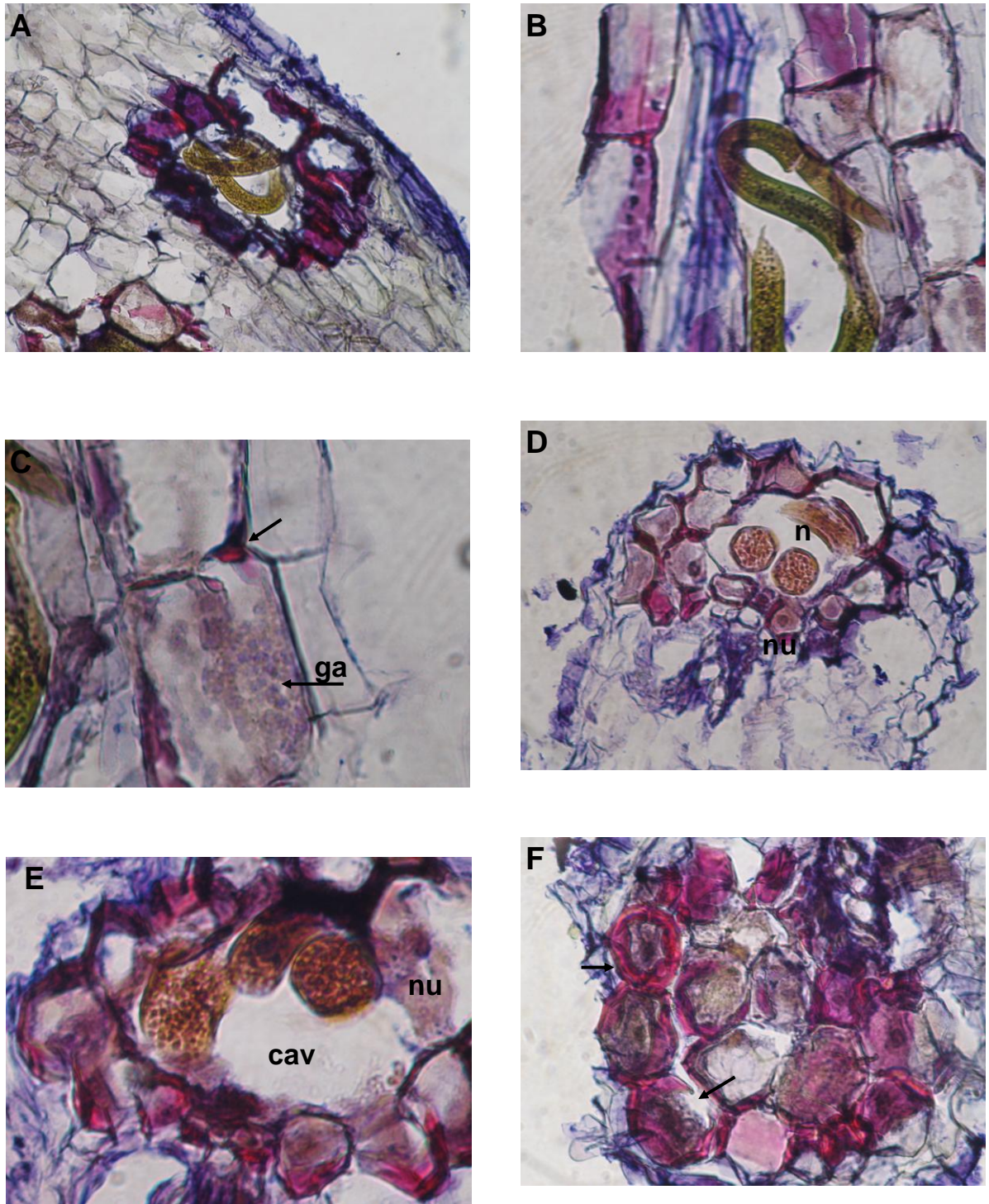


Figura 5. Alteraciones histológicas en raíces de frijol cv Canario a 45 ddi con *N. aberrans* población Tecamachalco visualizadas por la técnica de Johansen. A) sección transversal de una lesión 450x, el nematodo se encuentra aislado por células completamente lignificadas. B) sección longitudinal de una lesión donde se observa al nematodo J_2 formando la cavidad 400x. C) detalle ampliado de B, una célula observada 1590x comienza a lignificarse por la cara distal a la cavidad (flecha) con numerosos gránulos de almidón (ga). D) sección transversal 900x de una cavidad con nematodo (n) bordeada por células en proceso de lignificación con núcleos y nucléolos hipertrofiados (nu). E) cavidad (cav) 1590x con células completamente lignificadas que empiezan a romperse. F) rompimiento (flecha) de células de la cavidad después de la lignificación a 900x.

c) Histología de raíces de frijol a 2 y 3 ddi con *N. aberrans*

El estudio histológico del material procedente del ensayo de penetración mostró que numerosos J₂ entraron a las raíces del frijol por la zona de proliferación, cerca del ápice y atravesaron la zona de elongación (figura 6 A); la disposición de los nematodos en los tejidos de la raíz, tanto en corte transversal como en corte longitudinal, indicaron que su movimiento es ondulatorio y nunca invaden el cilindro central (figura 6 A, B) y aparentemente atraviesan y destruyen las células corticales, es decir es de tipo intracelular (figura 6 C, D, E, F).

Inserra *et al.* (1983) reportaron que en remolacha la penetración se realiza por el ápice de la raíz mientras que Castillo (1982) refiere que en Chile, es en la región de elongación. En el presente estudio las observaciones señalan que en el frijol es principalmente por arriba de la caliptra en la zona de proliferación, y por la zona de elongación.

El desplazamiento de *N. aberrans* en el interior de la raíz ha sido documentada por Clark (1967), Quimí (1981) e Inserra, (1983), quienes coinciden que es a través de las células del córtex, dejando el nematodo en su trayecto células destruidas; una migración similar es realizada por *Heterodera* spp., *Globodera* spp. (Endo, 1987b), *Cactodera gallinsogae* (Tovar-Soto, 19) y diversas especies de *Pratylenchus* sp. (Krusberg, 1963; Dropkin, 1969) y es diferente al que realizan las especies pertenecientes al género *Meloidogyne* spp. que ha mostrado ser de tipo intercelular (Hussey, 1985; Wyss y Grundler 1992; Wyss *et al.*, 1992).

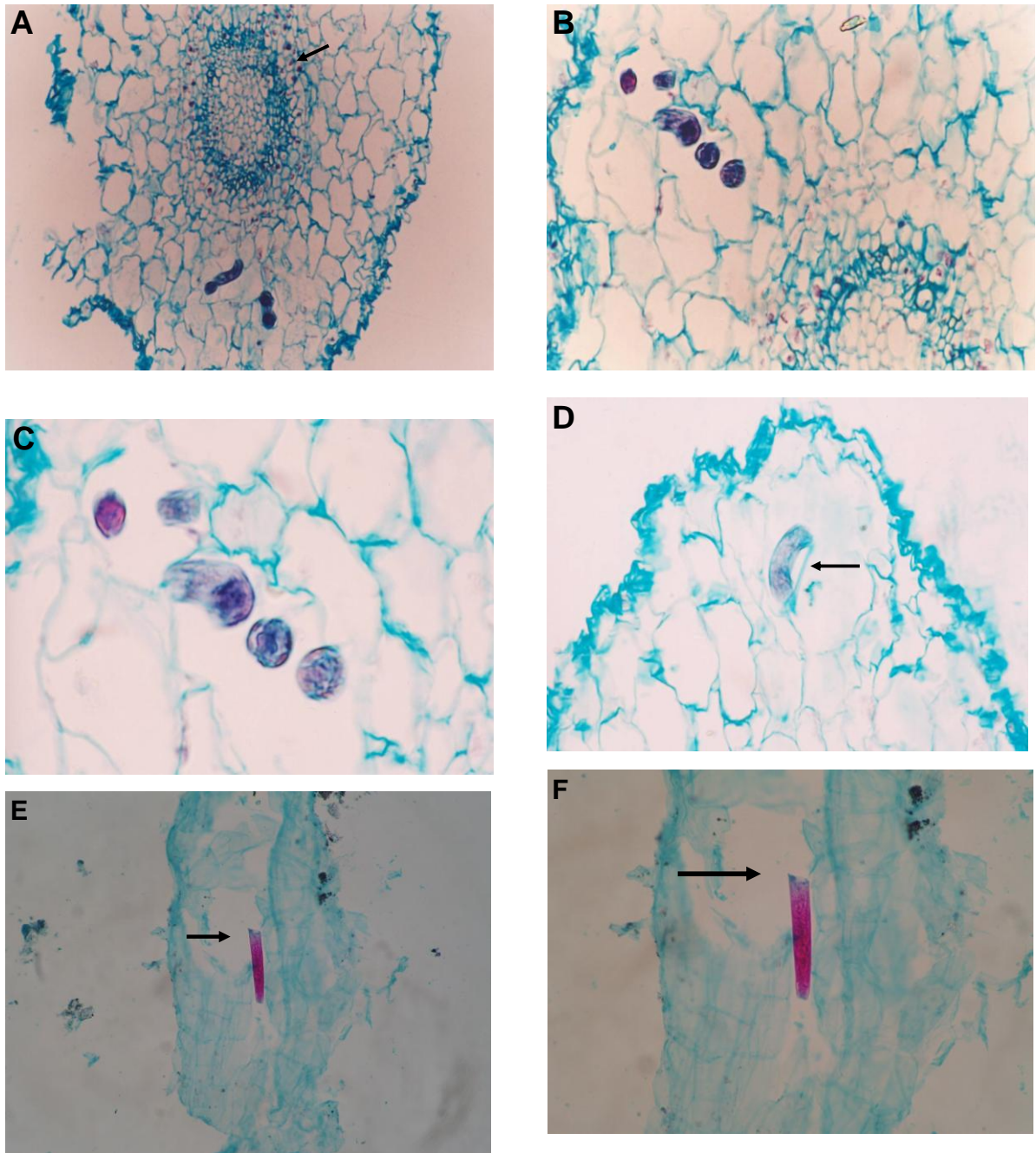


Figura 6. Juveniles segundo estadio de *Nacobbus aberrans* atravesando la interfase entre la zona de proliferación celular y la zona de elongación a 3 ddi; A) sección transversal 150x, la flecha señala los núcleos de células del procambium; B – D) secciones transversales 300x y 600x en las que se aprecia el desplazamiento intracelular del nematodo a través de las células del córtex; E, F) secciones longitudinales 150x y 300x respectivamente. La flecha en D, E, F señala la destrucción de células que el nematodo deja a su paso.

d) Histología de agallas a 105 ddi con *N. aberrans*

La histología de las pocas agallas formadas en el cultivar Canario por *N. aberrans* población Tecamachalco y que fueron recuperadas del estudio de reproducción después de 105 días de inoculadas se muestran en las figuras 7, 8 para aquellas muestras procesadas con la técnica de Fucsina básica-Verde rápido, y en la figura 9 con la técnica de Johansen. En ambos casos se evidenció la presencia de un sincicio sacciforme bien desarrollado que ocupa transversal y longitudinalmente más del 75% de la agalla (Figura 7 A, B), claramente delimitado por varias capas de células hiperplásicas pequeñas con una gran actividad nuclear evidenciada por la fuerte tinción de la cromatina y del nucleólo que lo distinguen de las demás células del córtex. En esta región limítrofe se observó también la presencia de cristales corticales de naturaleza desconocida, muy similares a los encontrados en las raíces control aunque en mayor número (figura 7 E); igualmente se encontraron células con numerosos gránulos de almidón o amiloplastos (figura 7 F, 9 C, D).

Los diversos estudios realizados sobre los sincicios inducidos por *N. aberrans* han mostrado que la forma y tamaño del sincicio depende de la especie de planta, cultivo e incluso cultivar parasitado; en papa y tomate es fusiforme o cordado, mientras que en otras especies de plantas puede ser reniforme, sigmoide, irregular, de medio sol (Castillo, 1982; Castillo y Marbán-Mendoza, 1984; Caballero y Muñoz, 1987; Ponce de León y Doucet, 1989; Aguilar, 1994), en ocasiones con formación de cristales en los tejidos agallados y de gránulos de almidón dentro y fuera del sincicio; en papa se ha reportado el depósito de sílice en las células de la endodermis cercana a las células sinciciales (Jatala y Hadad, 1993). En este estudio no se detectaron granulos de almidón dentro del sincicio.

La observación en el córtex de células activas fuera del sincicio indican que el crecimiento de la agalla ocurre en un sólo lado de la raíz, así como por el empuje que realiza el sincicio al crecer, de tal manera que la agalla es asimétrica comparada con las producidas por las especies de *Meloidogyne* spp., las cuales son más redondeadas, al respecto Schuster y Sullivan (1960) y Schuster *et al.* (1965) reportaron que en remolacha la agalla se forma por hipertrofia pero no por hiperplasia, y es estimulada por los juveniles.

Los cortes en la sección baja de la agalla (figura 7 C, D) mostraron una hembra nematodo con un tamaño aumentado y engrosado pero sin alcanzar el engrosamiento que muestran en otros cultivos, posiblemente por falta de tiempo para

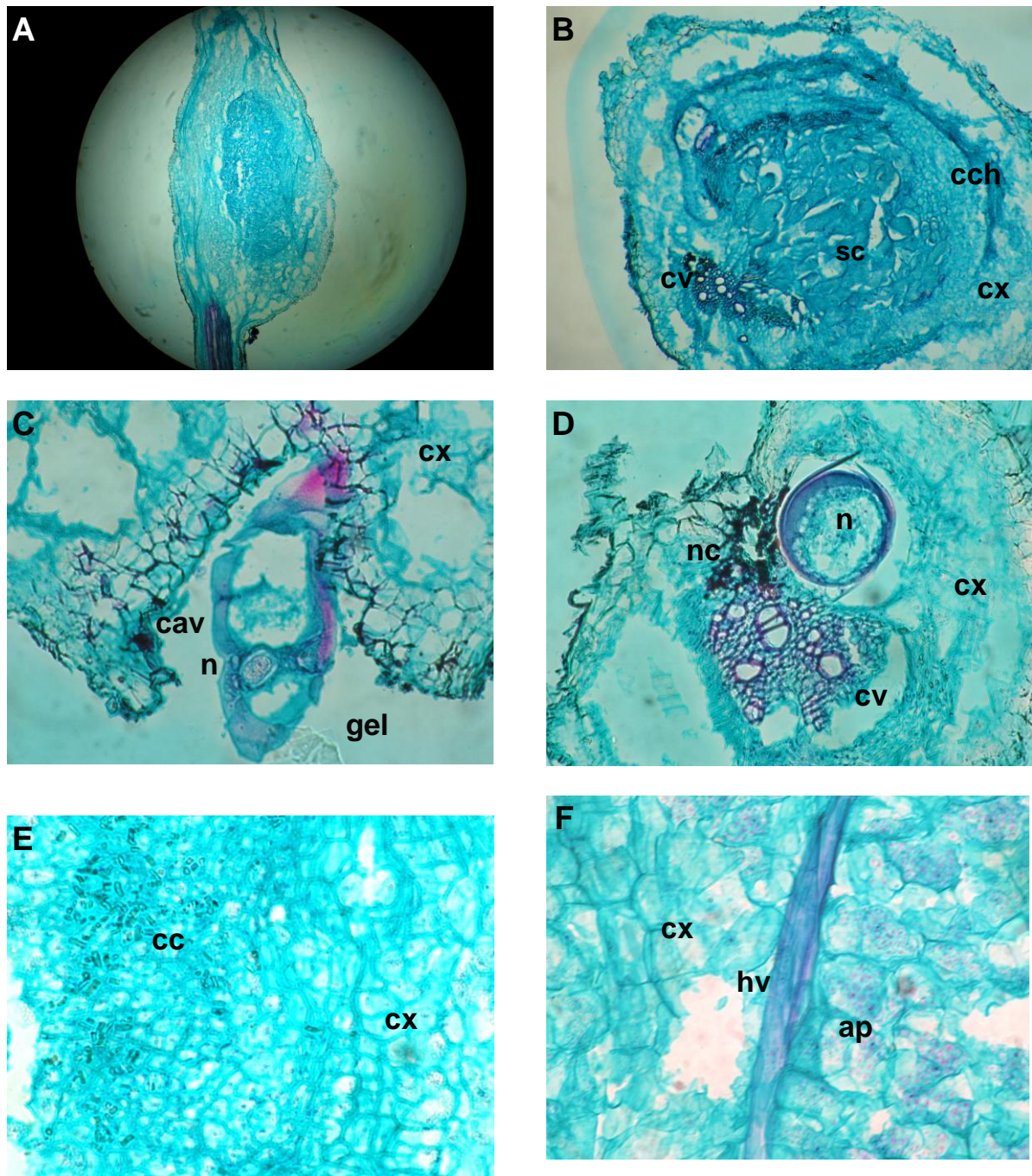


Figura 7. Cortes histológicos de agallas de *N. aberrans* población Tecamachalco en frijol cv Canario a 105 ddi teñidos con la técnica de Zielh-Nielsen. A y B) secciones longitudinal y transversal respectivamente de la agalla completa 180x; C) parte de una hembra extruída de la agalla 450x; D) sección transversal de la parte baja de la agalla, el nematodo muestra restos de la última muda; E) presencia de cristales corticales en el córtex 450x; F) sección longitudinal 900x del córtex mostrando numerosos amiloplastos. cav = cavidad, cch = células corticales hiperplásicas, cv = cilindro vascular, cx = córtex, gel = gelatina, hv = haz vascular, n = nematodo, nc = zona de necrosis, sc = sincicio

lograr un engrosamiento completo. La nematodo se encontraba en una cavidad que no llena en su totalidad pero que comprimía al cilindro vascular; la cavidad no mostró las células hipertrofiadas que la bordeaban a los 15, 45 y 90 ddi y en su lugar quedan células parenquimáticas con paredes primarias muy gruesas y en ocasiones con zonas necróticas causadas posiblemente por la acción de hongos saprófitos.

En algunos cortes el cuerpo del nematodo presentó ciertas separaciones de la cutícula (figura 7 D), que posiblemente fueron restos de la última muda, con la región caudal extruída de la cavidad y consecuentemente de la agalla (figura 7 C), con una masa de gelatina en la que se hallaron embebidos los huevecillos y algunos nematodos, tal vez machos, cortados transversalmente. La presencia de hembras con estas características así como las condiciones en que se realizó el estudio (inoculación de huevecillos en lugar de juveniles J₂ y largos intervalos de tiempo entre observaciones) no permite elucidar el momento en que se inicia la formación del sincicio y ni el estado de desarrollo del nematodo que lo induce, Castillo (1982) señala que las hembras jóvenes J₄ son las responsable de su formación en chile a 30 ddi, por su parte Prasad y Webster (1967) e Inserra *et al.* (1983), consideran que el sincicio es inducido por hembras adultas vermiformes e inmaduras en tomate y remolacha, es posible que este sea el caso en frijol.

En secciones medias de la agalla se observó que las células sinciciales invadieron el cilindro vascular entre los radios de xilema con desplazamiento del vaso xilemático central y de los radios xilemáticos con grupos de células floemáticas asociadas a ellos, los cuales se extendían lateralmente al sincicio y llegaron incluso a romperse (figura 8 A, F), en algunas regiones del cilindro vascular la penetración del sincicio fue profunda que se pierde la forma tetraarca del estele y pudieron observarse entre las células sinciciales grupos de células xilemáticas y floemáticas que posiblemente mantienen la continuidad con el cilindro vascular de las zonas posteriores al sincicio (figura 9 A, B), mientras que en otras regiones donde el sincicio no profundizaba tanto, se observaron hileras de células proyectándose hacia afuera de la endodermis posiblemente como resultado de hiperplasia en este tejido (figura 8 C); estas alteraciones que ocurren como resultado de la penetración del sincicio en el cilindro vascular también se han detectado en chile, jitomate y remolacha (Jones, 1981; Castillo, 1982; Castillo y Marbán-Mendoza, 1984; Inserra *et al.* (1983), aunque Endo (1987) ha reportado que el sincicio por *Nacobbus* se encuentra ubicado dentro del córtex y está limitado por la endodermis u ocasionalmente por los elementos del

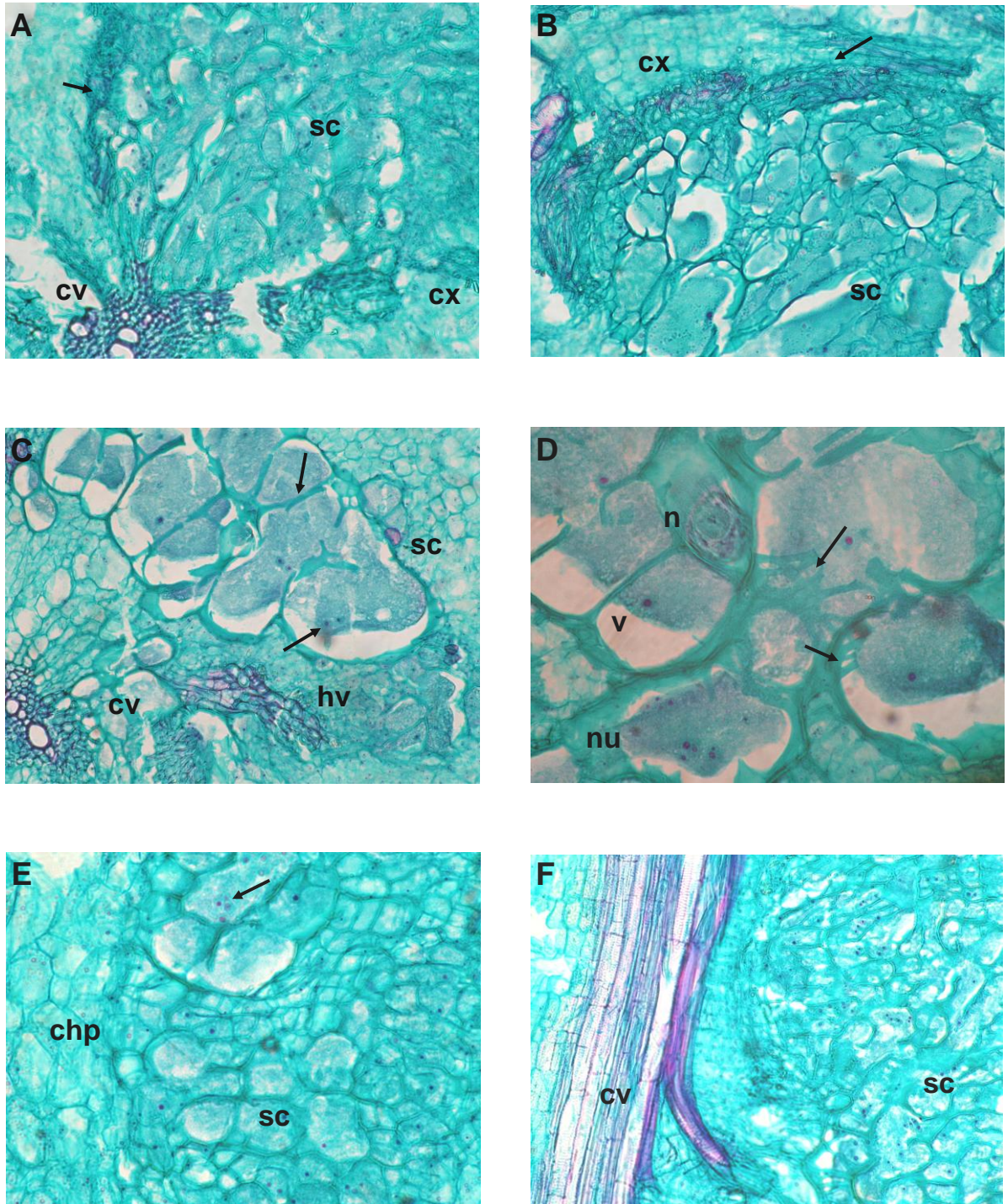


Figura 8. Sincicios de *N. aberrans* población Tecamachalco en frijol cv Canario a 105 ddi teñidos con la técnica de Zielh-Nielsen; A y B) observación del sincicio 450x, sus límites están marcados por la flecha; C) células sinciciales 450x, las flechas señalan la presencia de paredes que mantienen la individualidad de las células del sincicio; D) células sinciciales 900x, las flechas indican la presencia de aberturas en sus paredes; E y F) secciones longitudinales de sincicios 450x, la flecha en E y C señala polarización de núcleos en la célula sincicial; chp = células hiperplásicas, cv = cilindro vascular, cx = córtex, hv = haz vascular, n = nematodo, nu = nucleólos, sc = sincicio, v = vacuolas

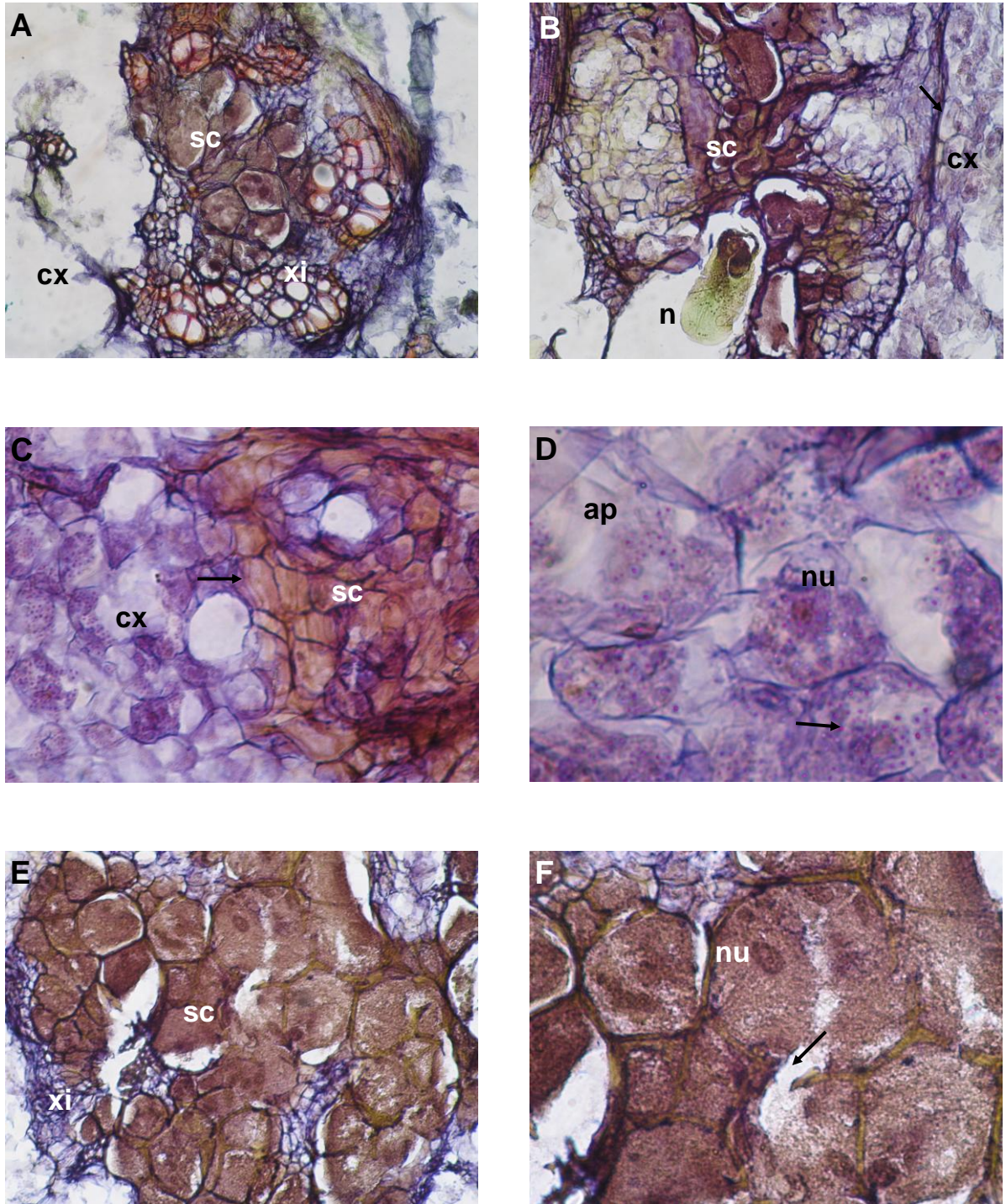


Figura 9. Sincicios de *N. aberrans* población Tecamachalco en frijol cv Canario a 105 ddi teñidos con la técnica de Johansen; A) sección transversal del sincicio invadiendo el cilindro vascular 450x; B) sincicio 900x; C) límite entre el sincicio y el córtex observado a 900x, se observan células hipetrofiadas (flecha) incorporándose al sincicio; D) Amiloplastos presentes en el interior de las células (flecha) de la región limítrofe entre el córtex y el sincicio; E y F) sincicio observado a 900x y 2010x, se visualiza la disolución parcial de las paredes celulares (flecha); ap = amiloplasto, cx = córtex, n = nematodo, nu = nucleólo, sc = sincicio, xi = xilema.

xilema cuando se ubica cerca del estele y Dropkin (1969) ha señalado que, al menos en remolacha, es en el córtex y no afecta al estele.

El sincicio mostró ser una estructura multinucleada formada por células hipertrofiadas que mantenían aún su individualidad (figura 8 A, B), con citoplasma denso, núcleos alargados hipertrofiados y paredes celulares engrosadas no lignificadas, es decir, citológicamente muy semejante a los reportados en la literatura para remolacha, chile, espinaca, papa, tomate y algunas arvenses, sin que se haya detectado formación de gránulos de almidón dentro del sincicio tal y como se ha reportado ocurre en algunas de estas especies (Schuster y Thorne, 1956; Schuster *et al.*, 1965; Inserra *et al.*, 1983; Castillo y Marbán-Mendoza, 1984; Jatala y Haddad, 1993, Aguilar, 1994).

Los núcleos se mostraron hipertrofiados, en ocasiones alargados o amiboideos y con grandes nucleólos algunos de los cuales mostraron cierta polarización, lo que parece indicar la posible presencia de endoreplicación. Según Schuster *et al.*, (1965), la condición multinucleada del sincicio es alcanzada por amitosis, ya que se observan nucleólos empaquetados concomitantemente con invaginaciones del núcleo. En los sincicios inducidos por *Nacobbus* en *Opuntia tortispina* Nutt y *Kochia scoparia* L. se encontraron núcleos empaquetados que sugieren que la condición multinucleada surge por amitosis más que por polarización del núcleo (Schuster, 1956).

Aun cuando las células del sincicio mantuvieron su individualidad, el citoplasma mostró homogeneidad y continuidad gracias a rompimientos en la pared celular (figura 8 D). La técnica de Johansen aplicada a este material (figura 9 E, F) confirmó la descripción anterior y puso en mayor evidencia la riqueza protéica del citoplasma del sincicio y su carácter multinucleado, así como la disolución parcial de paredes las cuales estaban sin lignificar.

Jones y Payne (1977) y Payne (1981) han demostrado que en tomate el sincicio crece por incorporación de células hiperplásicas externas a él y la continuidad del citoplasma se debió a la presencia de huecos en las paredes celulares, posiblemente por digestión enzimática en los campos de las punteaduras, es posible que los núcleos polarizados encontrados en el presente trabajo se haya debido a la incorporación al sincicio de células hiperplásicas recién divididas. Endo (1987b) mencionó que en el sincicio multinucleado inducido por los nematodos quísticos hay pérdida de identidad de las células incorporadas, un hecho que lo diferencia del inducido por *N. aberrans*.

Los resultados del presente estudio permiten hacer algunas inferencias acerca del comportamiento de este nematodo en las raíces de frijol, sobretodo de los aspectos generales relacionados con la penetración, migración y de los primeros cambios histológicos que ocurren en el sitio de establecimiento, y finalmente sobre la agalla y el sincicio, dinámica que en el caso del frijol dura más de 105 días, un ciclo muy largo comparado con el que el nematodo ha mostrado en otros cultivos bajo las mismas condiciones (Inserra *et al.*, 1983; Prasad y Webster, 1967).

Aparentemente los juveniles J₂ de ambas poblaciones de *N. aberrans* invaden la raíz por arriba de los ápices o en la zona de elongación y se mueven intracelularmente por el córtex hasta la zona de diferenciación donde se establecen abriendo cavidades posiblemente por acción mecánica y/o bioquímica, es en estas cavidades donde el nematodo posiblemente realiza la segunda y tercera muda. Castillo (1982) menciona la posibilidad de que al menos la muda a J₃ ocurra en las cavidades, mientras que la muda a J₄ y a estado adulto inmaduro puede realizarse también en el suelo (Quimi, 1979 citado por Manzanilla-López *et al.*, 2002).

En el presente estudio no se encontraron evidencias que señalaran un movimiento de los nematodos a través de las células corticales hacia afuera de las raíces, aunque es muy probable que en los tiempos establecidos entre observaciones haya ocurrido alguna recuperación de la raíz de las lesiones causadas por el traslado del nematodo.

La constancia de la estructura de las cavidades en esos lapsos en donde mostraron muy pocos cambios sugiere que el nematodo realiza ahí mismo la muda subsiguiente a J₄, estado en el que se quedan al menos hasta 90 ddi.

Aunque es posible que en cada población de nematodos presentes en las raíces de frijol hubiera genotipos capaces de un desarrollo ininterrumpido y que por las condiciones del estudio no se les dio tiempo a que completaran su ciclo, lo más probable es que ambas poblaciones tengan capacidades genéticas y fisiológicas distintas para desarrollarse en frijol, que se manifiestan después de los 90 ddi. Si después de este lapso el nematodo tiene la capacidad de aprovechar el recurso que proporciona la planta, continúa su desarrollo a preadulto y adulto e induce la formación de la agalla y del sitio de alimentación, como fue el caso de aquellos genotipos de la población Tecamachalco en el cv Canario; en caso contrario entra en estado quiescente como J₄ encerrado en las cavidades, como ocurrió con la población

Chapingo y la mayoría de genotipos de la población Tecamachalco en el cv Negro Querétaro, manteniéndose en ese estado que les permite sobrevivir, hasta el ciclo agrícola siguiente posiblemente sin pérdida de infectividad en espera de mejores condiciones para su desarrollo, tal como ocurre en tomate (Cristobal–Alejo *et al.*, 2001b).

Los cultivares usados en el presente estudio presentan incompatibilidad (manifestación de la resistencia a nivel celular según Canto-Sáenz, 1985; Kaplan y Davis, 1987) a las poblaciones de nematodos con las que fueron confrontados.

A nivel celular la incompatibilidad se manifiesta de manera variable desde la formación de sitios de alimentación pequeños hasta el aislamiento y muerte del parásito por la respuesta hipersensible (Huang, 1985b; Mojtahedi *et al.*, 1995; Pedrosa *et al.*, 1996a). El presente estudio histopatológico mostró al nematodo encerrado en cavidades del córtex de la planta, rodeado de células hipertrofiadas que mostraron a 90 ddi lignificación y lisis celular sin que se encontrara necrosis que sugiriera la manifestación de una respuesta hipersensible como mecanismo de incompatibilidad; se desconocen los cambios subsecuentes y el destino de los nematodos en los cultivares Negro Querétaro con ambas poblaciones y Canario con la población Chapingo.

4.2. Experimento 2. CAMBIOS QUÍMICOS EN RAÍCES DE DOS CULTIVARES DE FRIJOL INOCULADOS CON *N. aberrans* POBLACIÓN CHAPINGO

a) Análisis cromatográfico de los extractos hexánicos

El perfil cromatográficos del extracto hexánico de las raíces inoculadas con *N. aberrans* población Chapingo en los cultivares (cv) Negro Querétaro y Azufrado se muestra en la figura del Apéndice 12.

El número y disposición de las bandas (Rf) del cv Negro Querétaro se resume en el cuadro 4. Se encontraron tres bandas observables a 254 nm, tres a 365 nm y cinco reveladas con Sulfato Cérico.

Cultivar	Observación	Rf	Fecha					
			1		2		3	
			C	E	C	E	C	E
NQ	254	0.92	+	-	+	+	+	+
		0.74	+	+	+	+	+	+
		0.43	+	+	+	+	+	-
	365	0.87	-	-	+	+	+	+
		0.79	-	-	+	+	+	+
		0.70	+	+	+	+	+	+
	Sulfato Cérico	0.94	+	-	+	+	+	+
		0.72	-	-	+	+	+	-
		0.52	+	+	+	+	+	+
		0.38	+	+	+	+	+	+
		0.17	+	-	+	-	+	+

Cuadro 4. Presencia de bandas con sus respectivos Rf's en el perfil cromatográfico del extracto hexánico de raíces de frijol cv Negro Querétaro (NQ) inoculado con 2000 juveniles de *N. aberrans* población Chapingo evaluado a 15 ddi (fecha 1), 30 ddi (fecha 2), 60 ddi (fecha 3); C = Tratamiento control, E = Tratamiento experimental; + = presencia; - = ausencia

Algunas bandas de los tratamientos experimentales mostraron efectos por la presencia del nematodo, como lo ejemplifican las bandas con Rf's de 0.92 observada a

254 nm y 0.94 del revelado a 15 ddi (fecha 1), 0.43 observada a 254 nm a 60 ddi (fecha 3), así como las bandas reveladas con Sulfato Cérico con Rf's 0.72 a 60 ddi, 0.17 a 15 y 30 ddi.

Aparentemente las demás bandas no mostraron efectos por el nematodo; sin embargo, para detectar efectos que pudieran pasar desapercibidos es necesario observar la variación que existe en la intensidad de las bandas de cada tratamiento y de la comparación entre ellos.

Las perfiles cromatográficos realizados de los diversos extractos (Apéndice 12, 13, 14) son de tipo cuantitativo y por lo tanto la intensidad de cada banda al ser observada bajo luz ultravioleta, o la puesta en evidencia en el revelado puede interpretarse como una medida de la concentración de compuestos en esa banda y pueden describirse gráficamente considerando la magnitud de la banda como baja (=0.5), intermedia (=1.0), alta (=1.5) y muy alta (=2.0).

La expresión gráfica de las bandas del perfil cromatográfico del extracto hexánico del cv Negro Querétaro se muestra en la figura 10 donde se observa que el efecto del nematodo fue diferente en ambos cultivares.

Bandas que no experimentaron cambios en su patrón de intensidad fueron la 0.87, 0.70 a 365 nm y la 0.38 del revelado. Hubo bandas que mostraron disminución o decrementos en su grado de intensidad a diferentes fechas como fue el caso de las bandas 0.92, 0.74 a 254 nm o 0.94 del revelado que experimentaron esta disminución a 15 ddi mientras que la 0.43 a 254 y 0.72 la presentaron a 30 ddi desapareciendo en estos casos a los 60 ddi.

En otros casos hubo interrupción en los aumentos graduales de intensidad que experimentaba la banda como fue el caso de la 0.79 a 365 y 0.52 del revelado a 30 ddi.

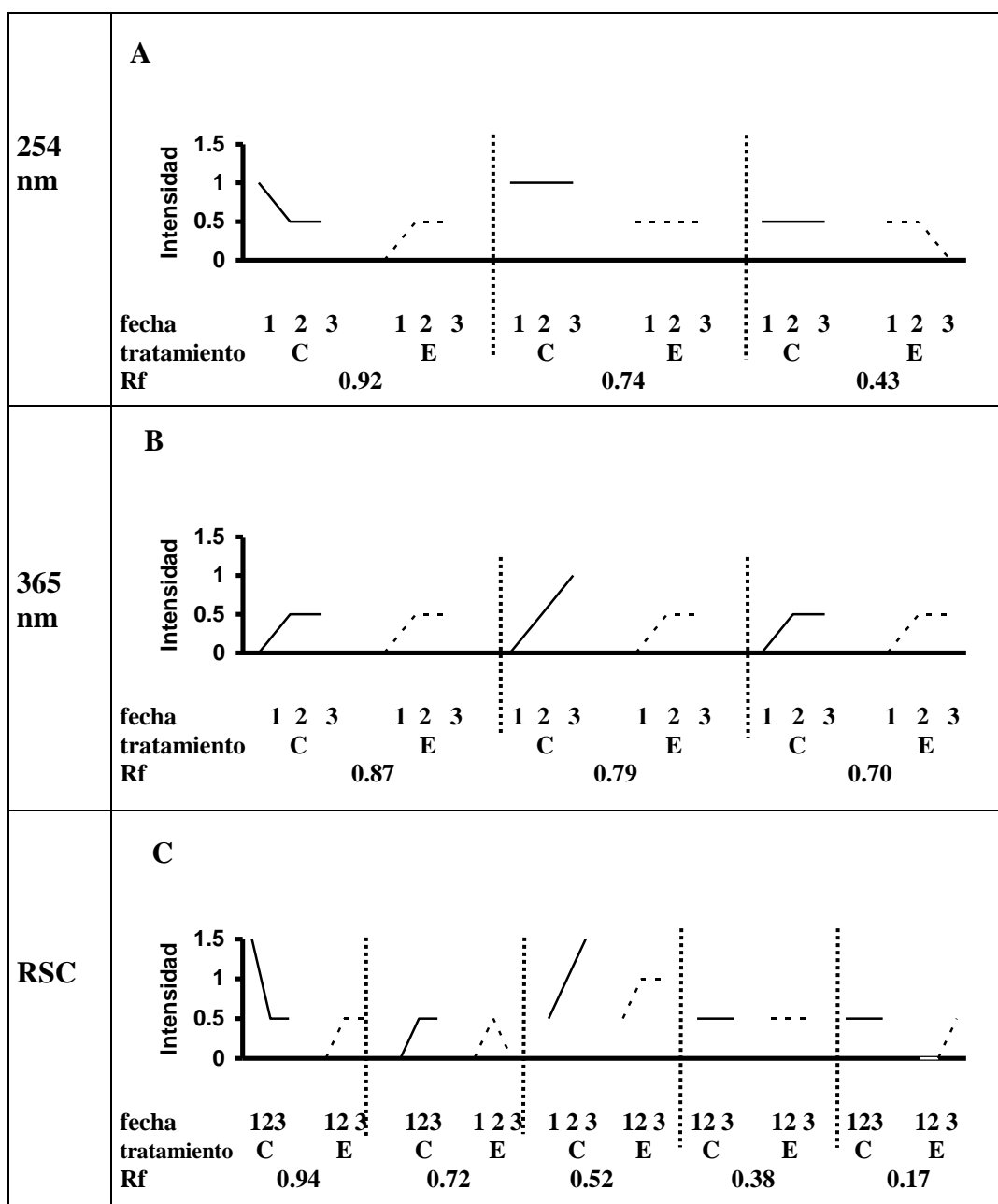


Figura 10. Variaciones en la intensidad de bandas del perfil cromatográfico del extracto hexánico de raíces de frijol cv Negro Querétaro inoculado con *N. aberrans* población Chapingo observado con luz ultravioleta (254 y 365 nm) y revelado con Sulfato Cérico (RSC). Fecha: 1= 15 ddi; 2= 30 ddi; 3 = 60 ddi. Tratamiento: C= control, E= experimental

La banda 0.17 del revelado apareció con su máxima intensidad en el tratamiento experimental en fechas posteriores a las del control, condición que para fines prácticos se denominará como retraso positivo.

Por su parte, el cv Azufrado (Cuadro 5) presentó el mismo tipo de bandas que el cultivar Negro Querétaro aunque con comportamiento diferente en algunas de ellas.

Cultivar	Observación	Rf	Fecha					
			1		2		3	
			C	E	C	E	C	E
AZF	254	0.92	+	+	+	+	+	+
		0.74	+	+	+	+	+	+
		0.43	+	+	+	+	+	-
	365	0.87	+	+	+	+	+	-
		0.79	+	+	+	+	+	-
		0.70	+	+	+	+	+	-
	Sulfato Cérico	0.94	+	+	+	+	+	+
		0.72	+	+	+	+	+	+
		0.52	+	+	+	+	+	+
		0.38	+	+	+	+	+	+
		0.17	+	+	+	+	+	+

Cuadro 5. Presencia de bandas con sus respectivos Rf's en el perfil cromatográfico del extracto hexánico de raíces de frijol cv Azufrado (AZF) inoculado con 2000 juveniles de *N. aberrans* población Chapingo evaluado a 15 ddi (fecha 1), 30 ddi (fecha 2), 60 ddi (fecha 3); C = Tratamiento control, E = Tratamiento experimental; + = presencia; - = ausencia

Efectos por el nematodo se observan a 60 ddi en las bandas 0.43 a 254 nm, 0.87, 0.79 y 0.70 a 365 nm.

La figura 11 muestra la variación en el grado de intensidad de las bandas encontradas en el perfil cromatográfico de este cultivar.

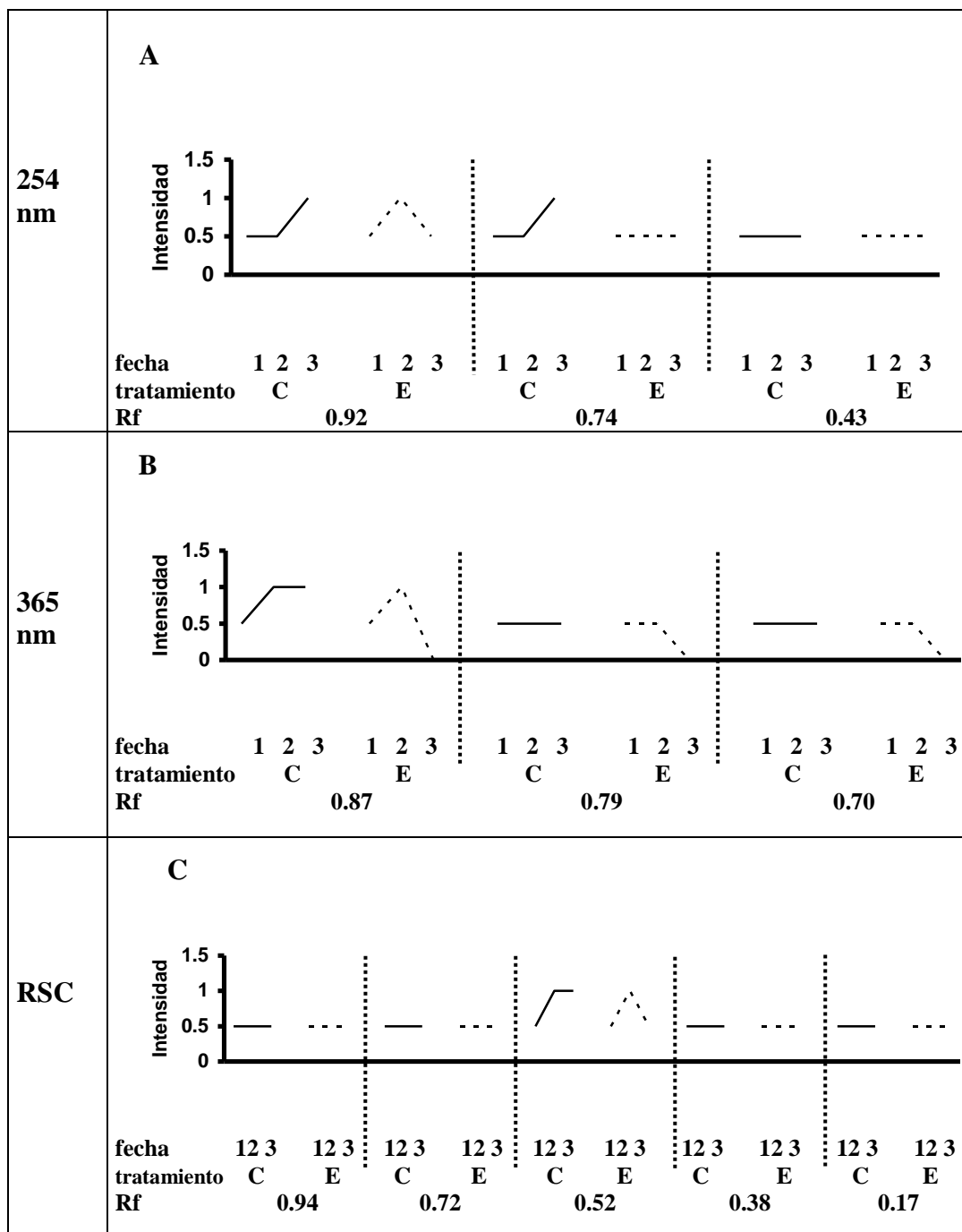


Figura 11. Variaciones en la intensidad de bandas del perfil cromatográfico del extracto hexánico de raíces de frijol cv Azufrado inoculado con *N. aberrans* población Chapingo observado con luz ultravioleta (254 y 365 nm) y revelado con Sulfato Cérico (RSC). Fecha: 1= 15 ddi; 2= 30 ddi; 3 = 60 ddi. Tratamiento: C= control, E= experimental

Las bandas que no mostraron cambios en sus niveles de intensidad por efecto de nematodo fueron la 0.43 a 254 nm y todas las bandas del revelado.

Interrupciones en el aumento gradual de intensidad se encontraron en la banda 0.74 a 254 nm mientras que las bandas 0.79 y 0.70 a 365 nm mostró decrementos a 30 ddi. Desapariciones ocurrieron a los 60 ddi en las bandas 0.79, 0.70 a 365 nm. La banda 0.92 a 254 nm mostró un efecto combinado de adelanto en la fecha de obtención de máxima intensidad seguido de un rápido decremento que no se observa en el tratamiento control.

El comportamiento de las bandas del perfil cromatográfico de ambos cultivares del extracto hexánico se resume en el cuadro del apéndice 18

b) Análisis cromatográfico de los extractos de acetato de etilo

Las placas cromatográficas del extracto de acetato de etilo de las raíces inoculadas con *N. aberrans* población Chapingo en los cultivares Negro Querétaro y Azufrado se muestran en el Apéndice 13.

La posición y número de bandas presentes en el cv Negro Querétaro se muestra en el cuadro 6.

Cultivar	Observación	Rf	Fecha					
			1		2		3	
			C	E	C	E	C	E
NQ	254	0.93	+	+	+	+	+	+
		0.87	+	+	+	+	+	-
		0.76	-	+	+	+	+	-
	365	0.91	+	+	+	+	+	+
		0.80	-	-	+	+	+	+
		0.50	+	+	+	+	+	+
		0.30	-	+	-	-	-	-
	Sulfato Cérico	1.00	+	+	+	+	+	+
		0.95	+	+	+	+	+	-
		0.87	-	+	+	+	+	+
		0.52	-	+	+	+	+	+

Cuadro 6. Presencia de bandas con sus respectivos Rf's en el perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de raíces de frijol cv Negro Querétaro (NQ) inoculado con 2000 juveniles de *N. aberrans* población Chapingo evaluado a 15 ddi (fecha 1), 30 ddi (fecha 2), 60 ddi (fecha 3); C = Tratamiento control, E = Tratamiento experimental; + = presencia; - = ausencia

Se visualizaron tres bandas a 254 nm, cuatro a 365 nm y cuatro reveladas con Sulfato Cérico. Los efectos por el nematodo se manifestaron en las bandas 0.87 y 0.76 a 254 nm; 0.30 a a 365 nm; 0.95, 0.87, 0,52 del revelado.

La expresión gráfica de estas bandas se muestra en la figura 12.

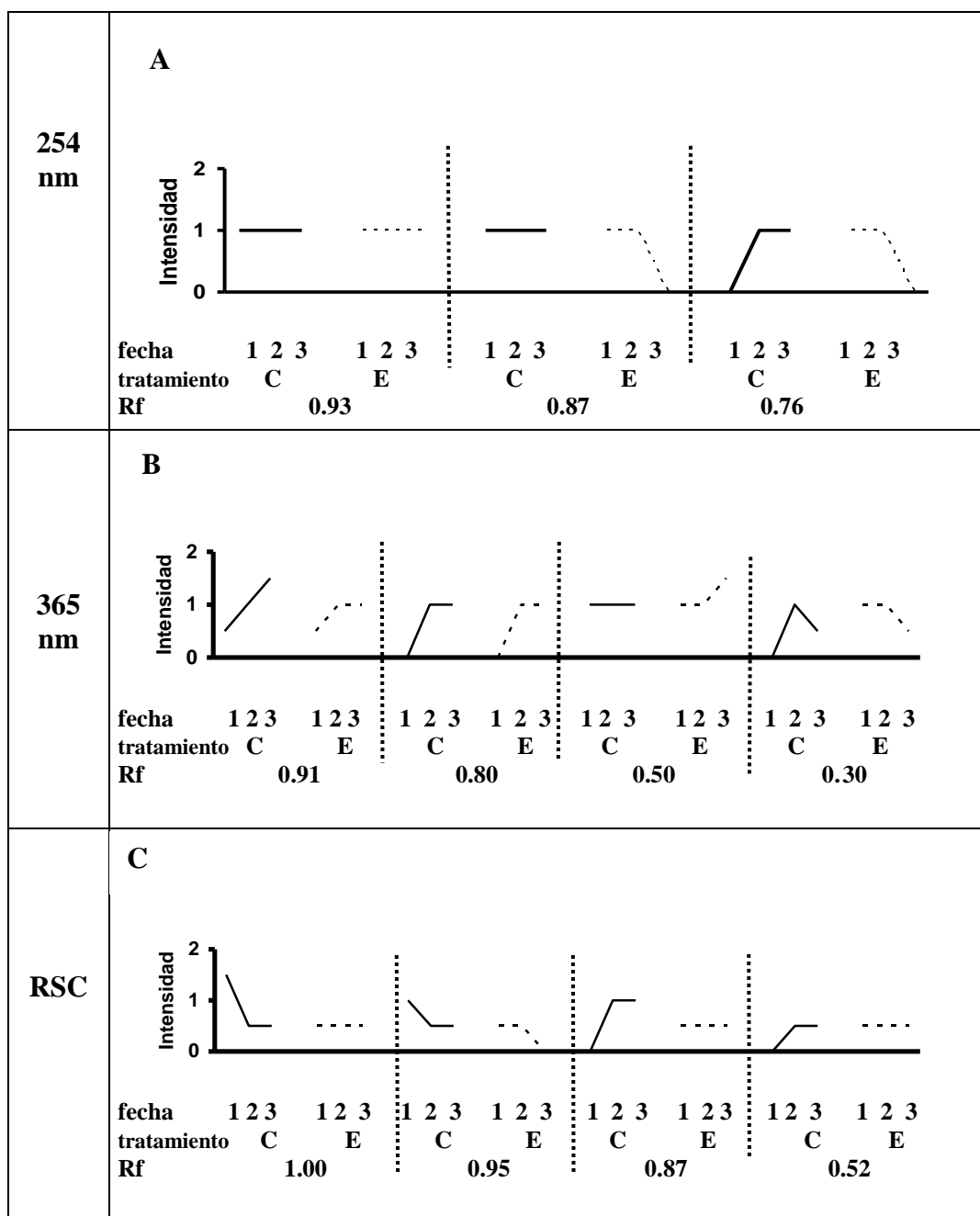


Figura 12. Variaciones en la intensidad de bandas del perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de raíces de frijol cv Negro Querétaro inoculado con *N. aberrans* población Chapingo observado con luz ultravioleta (254 y 365 nm) y revelado con Sulfato Cérico (RSC). Fecha: 1= 15 ddi; 2= 30 ddi; 3 = 60 ddi. Tratamiento: C= control, E= experimental

Las bandas 0.93 a 254 nm y 0.80 a 365 nm no mostraron efectos por la presencia del nematodo; hubo interrupción en el aumento gradual de intensidad a los 30 ddi en la banda 0.91 a 365 nm. Decrementos que resultaron en desaparición completa de bandas ocurrieron en 0.87 a 254 nm y 0.95 del revelado, en este último caso la desaparición de la banda ocurrió después de un adelanto de fecha en la disminución de la intensidad, condición que en lo sucesivo se denominará como adelanto negativo, lo que sugiere que los compuestos de ambas bandas fueron metabolizados. La banda 0.87 del revelado posiblemente fue resultado de un efecto combinado de adelanto de fecha en la síntesis de compuestos seguido de una interrupción en su acumulación que se manifestó en una intensidad menor con respecto a la del control, esta condición será referida como efecto combinado (+)(-). Adelantos en la fecha de máxima intensidad de la banda, al que se referirá como adelanto positivo, se encontraron a los 15 ddi en la banda 0.76 a 254 nm, 0.30 a 365 nm, 0.52 del revelado. Un incremento en intensidad fue detectado en la banda 0.50 a 365 nm a 60 ddi.

Para el cv Azufrado (cuadro 7), el efecto del nematodo se manifestó en las bandas 0.87 a 254 nm; 0.80 y 0.30 a 365 nm.

Cultivar	Observación	Rf	Fecha					
			1		2		3	
			C	E	C	E	C	E
AZF	254	0.93	+	+	+	+	+	+
		0.87	-	-	+	-	+	+
		0.76	+	+	+	+	+	+
	365	0.91	+	+	+	+	+	+
		0.80	-	-	+	-	+	+
		0.50	+	+	+	+	+	+
		0.30	-	+	-	-	-	-
	Sulfato Cérico	1.00	+	+	+	+	+	+
		0.95	+	+	+	+	+	+
		0.87	+	+	+	+	+	+
		0.52	-	+	+	+	+	+

Cuadro 7. Presencia de bandas con sus respectivos Rf's en el perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de raíces de frijol cv Azufrado (AZF) inoculado con 2000 juveniles de *N. aberrans* población Chapingo evaluado a 15 ddi (fecha 1), 30 ddi (fecha 2), 60 ddi (fecha 3); C = Tratamiento control, E = Tratamiento experimental; + = presencia; - = ausencia

La representación gráfica de estas bandas se muestra en la figura 13.

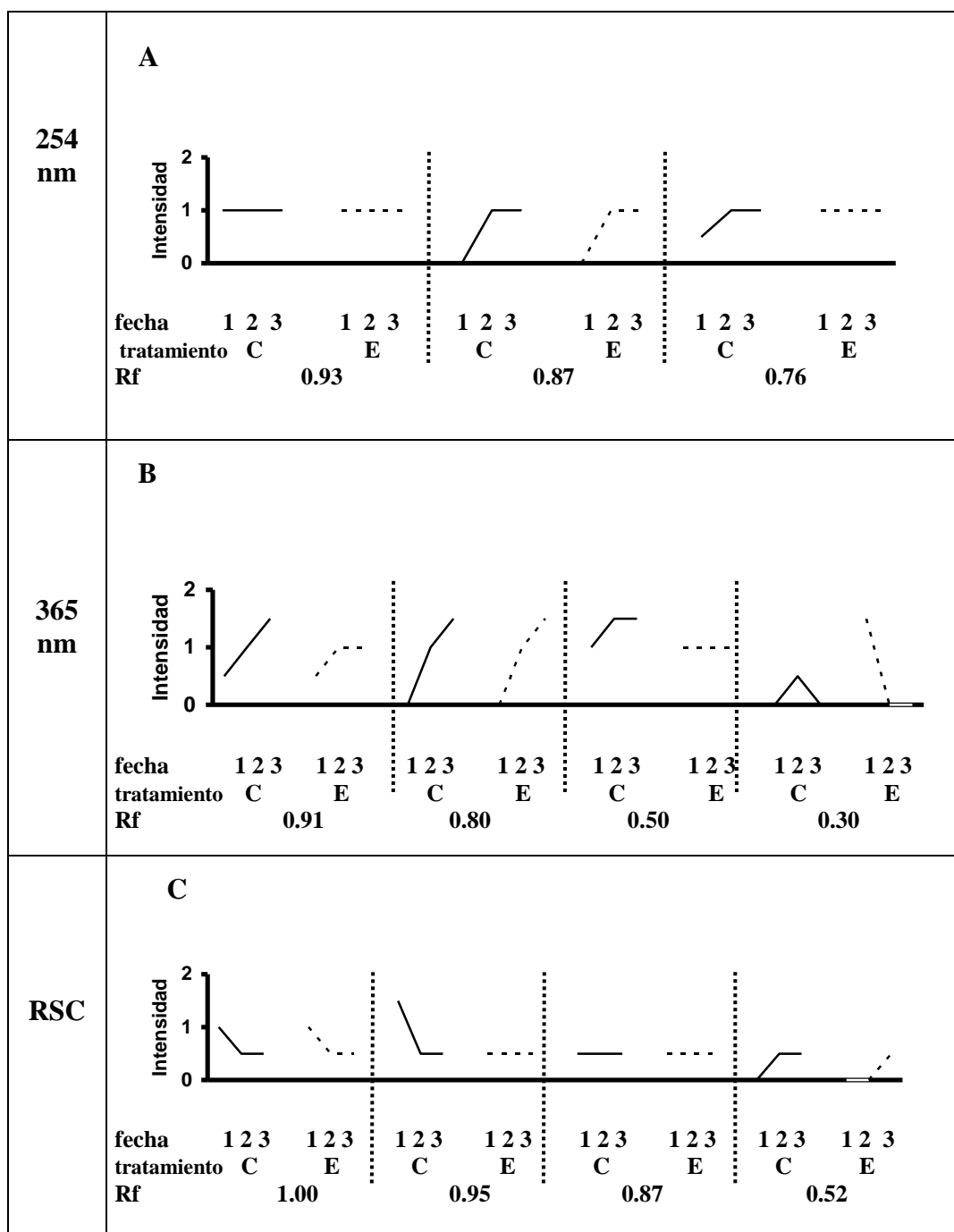


Figura 13. Variaciones en la intensidad de bandas del perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de raíces de frijol cv Azufrado inoculado con *N. aberrans* población Chapingo observado con luz ultravioleta (254 y 365 nm) y revelado con Sulfato Cérico (RSC). Fecha: 1= 15 ddi; 2= 30 ddi; 3 = 60 ddi. Tratamiento: C= control, E= experimental

Los efectos del nematodo en las bandas de este extracto fueron mínimos, sólo se encontraron adelantos en la aparición de máxima intensidad (fecha 1 de 0.76 a 254 nm), interrupciones en el aumento intensidad (0.91, 0.50 a 365 nm; 0.95 del revelado), e incrementos (0.30 a 365 nm); las demás bandas presentes no manifestaron cambios por efectos del nematodo (0.93, 0.87 a 254 nm; 0.80 a 365 nm y 1.00, 0.87 del revelado).

La banda 0.30 a 365 nm aparece en la fecha 1 del tratamiento experimental con una intensidad alta comparada con la del tratamiento control, el incremento en intensidad de la banda en fecha temprana puede considerarse como una respuesta inicial de defensa de la planta ante la presencia del nematodo.

Efectos por adelantos de la fecha de disminución de la intensidad de la banda (adelantos negativos) se encontraron a los 15 ddi en la banda 0.95 del revelado, mientras que retrasos en la aparición de máxima intensidad de la banda, a los que se referirá en lo sucesivo como retrasos positivos, se hallaron en 0.52 del revelado. Un resumen del comportamiento de las bandas de ambos cultivares de este extracto se muestra en el cuadro del apéndice 19

c) **Análisis cromatográfico de los extractos de metanol**

Las placas cromatográficas del extracto de metanol se muestran en la figura del apéndice 14, y el número y disposición de las bandas para el cv Negro Querétaro se resumen en el cuadro 8 y en la figura 14

Los efectos del nematodo en este cultivar se manifestaron en las bandas 0.40 a 254 nm, 0.69, 0.56, 0.37, 0.28 a 365 y 0.38 del revelado.

No se detectaron efectos del nematodo en las bandas 0.96, 0.78, 0.17, 0.13 y 0.08 del revelado

Bandas que mostraron retrasos de fecha en la aparición de la máxima intensidad (retrasos positivos) fueron la 0.74 y 0.40 a 254 nm mientras que adelantos positivos se hallaron en 0.37 a 365 nm; disminuciones en la intensidad se encontraron en la 1.00 a 254 nm.

Cultivar	Observación	Rf	Fecha					
			1		2		3	
			C	E	C	E	C	E
NQ	254	1.00	+	+	+	+	+	+
		0.74	+	+	+	+	+	+
		0.46	+	+	+	+	+	+
		0.40	-	+	+	+	+	+
	365	0.96	+	+	+	+	+	+
		0.92	+	+	+	+	+	+
		0.88	+	+	+	+	+	+
		0.82	+	+	+	+	+	+
		0.69	-	+	+	+	+	+
		0.56	-	+	+	+	+	+
		0.37	-	+	+	+	+	+
		0.28	-	+	+	+	+	+
	Sulfato Cérico	0.96	+	+	+	+	+	+
		0.78	-	-	+	+	+	+
		0.38	-	-	+	-	+	+
		0.22	-	+	+	-	+	+
		0.17	+	+	+	+	+	+
		0.13	+	+	+	+	+	+
		0.08	+	+	+	+	+	+
		0.12	+	+	+	+	+	+

Cuadro 8. Presencia de bandas con sus respectivos Rf's en el perfil cromatográfico del extracto de metanol de raíces de frijol cv Negro Querétaro (NQ) inoculado con 2000 juveniles de *N. aberrans* población Chapingo evaluado a 15 ddi (fecha 1), 30 ddi (fecha 2), 60 ddi (fecha 3); C = Tratamiento control, E = Tratamiento experimental; + = presencia; - = ausencia

Incrementos en la intensidad de las bandas se encontraron en la fecha 1 de 0.96 a 365 nm y en la fecha 3 de 0.38 del revelado, con la diferencia que en la primera el incremento no fue sostenido en fechas posteriores contrariamente a lo que ocurrió con la 0.38 la cual alcanza su máxima intensidad después de un período de retraso y por lo tanto debe de ser considerado como un efecto combinado (-)(+).

Hubo bandas que mostraron efectos combinados (+)(-) como en 0.28, 0.56, 0.69 a 365 nm y 0.22 del revelado que tuvieron incrementos en intensidad con decrementos en fechas posteriores.

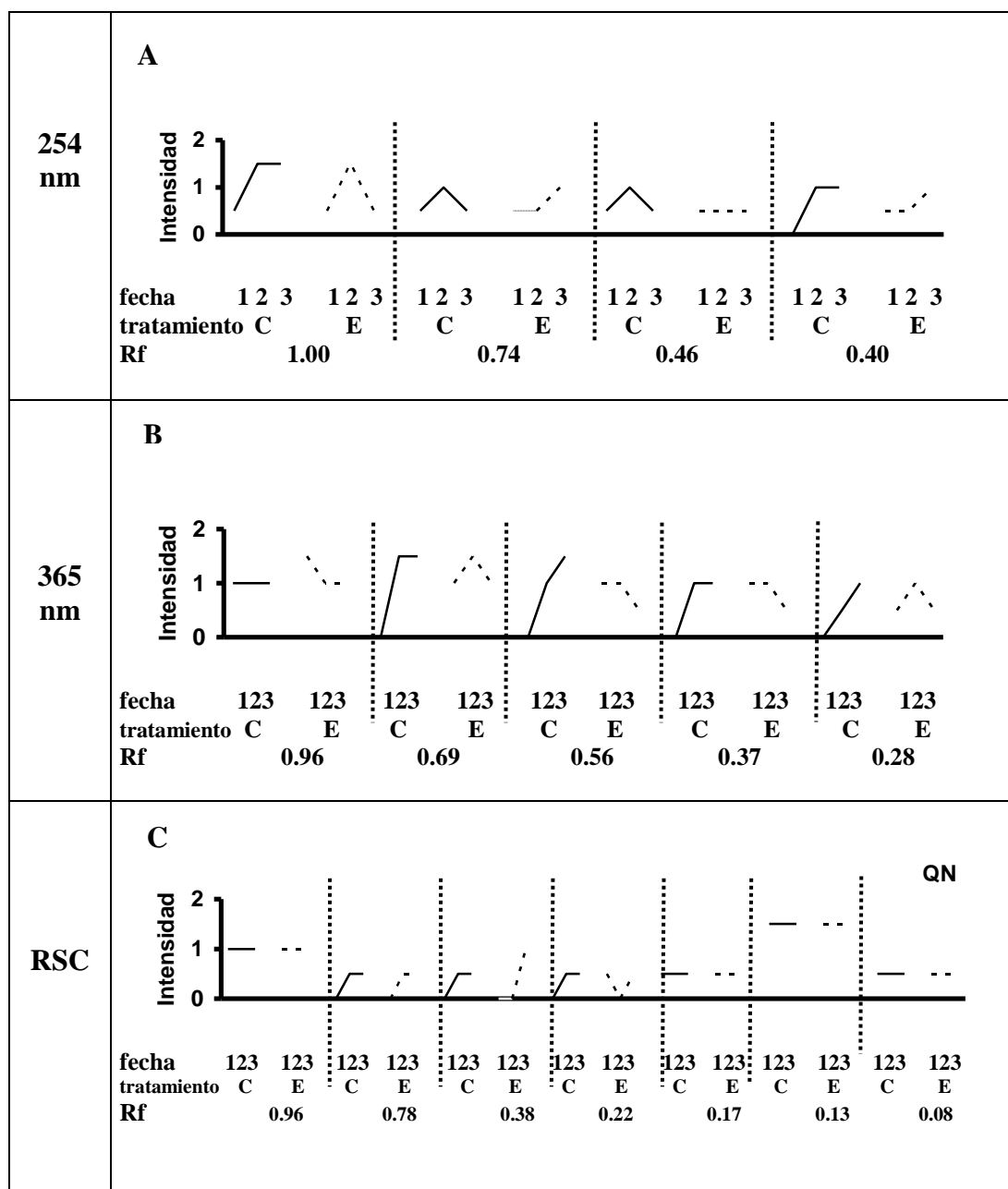


Figura 14. Variaciones en la intensidad de bandas del perfil cromatográfico del extracto de metanol de raíces de frijol cv Negro Querétaro inoculado con *N. aberrans* población Chapingo observado con luz ultravioleta (254 y 365 nm) y revelado con Sulfato Cérico (RSC). Fecha: 1= 15 ddi; 2= 30 ddi; 3 = 60 ddi. Tratamiento: C= control, E= experimental

Las bandas presentes en el perfil cromatográfico para el extracto del cv Azufrado se muestra en el cuadro 9.

Cultivar	Observación	Rf	Fecha					
			1		2		3	
			C	E	C	E	C	E
AZF	254	1.00	+	+	+	+	+	+
		0.74	-	-	+	+	+	+
		0.46	-	+	+	+	+	+
		0.40	+	+	+	+	+	+
	365	0.96	+	+	+	+	+	+
		0.92	+	+	+	+	+	+
		0.88	+	+	+	+	+	+
		0.82	+	+	+	+	+	+
		0.69	+	+	+	+	+	+
		0.56	-	+	+	+	+	+
		0.37	-	+	+	+	+	+
		0.28	-	+	+	+	+	+
	Sulfato Cérico	0.96	+	+	+	+	+	+
		0.78	-	-	+	+	+	+
		0.38	-	-	+	+	+	+
		0.22	+	+	+	-	-	-
		0.17	+	+	+	+	+	+
		0.13	+	+	+	+	+	+
		0.08	+	+	+	+	+	+

Cuadro 9. Presencia de bandas con sus respectivos Rf's en el perfil cromatográfico del extracto de metanol de raíces de frijol cv Azufrado (AZF) inoculado con 2000 juveniles de *N. aberrans* población Chapingo evaluado a 15 ddi (fecha 1), 30 ddi (fecha 2), 60 ddi (fecha 3); C = Tratamiento control, E = Tratamiento experimental; + = presencia; - = ausencia

Las bandas 0.46 a 254 nm, 0.56, 0.37, 0.28 a 365 nm, y 0.22 del revelado mostraron efectos por el nematodo.

La descripción gráfica de las bandas se muestra en la figura 15 donde se observa que las bandas que no manifestaron efectos por el nematodo fueron 0.74 a 254 nm, 0.96, 0.69 a 365 nm, 0.96, 0.78 y 0.08 del revelado.

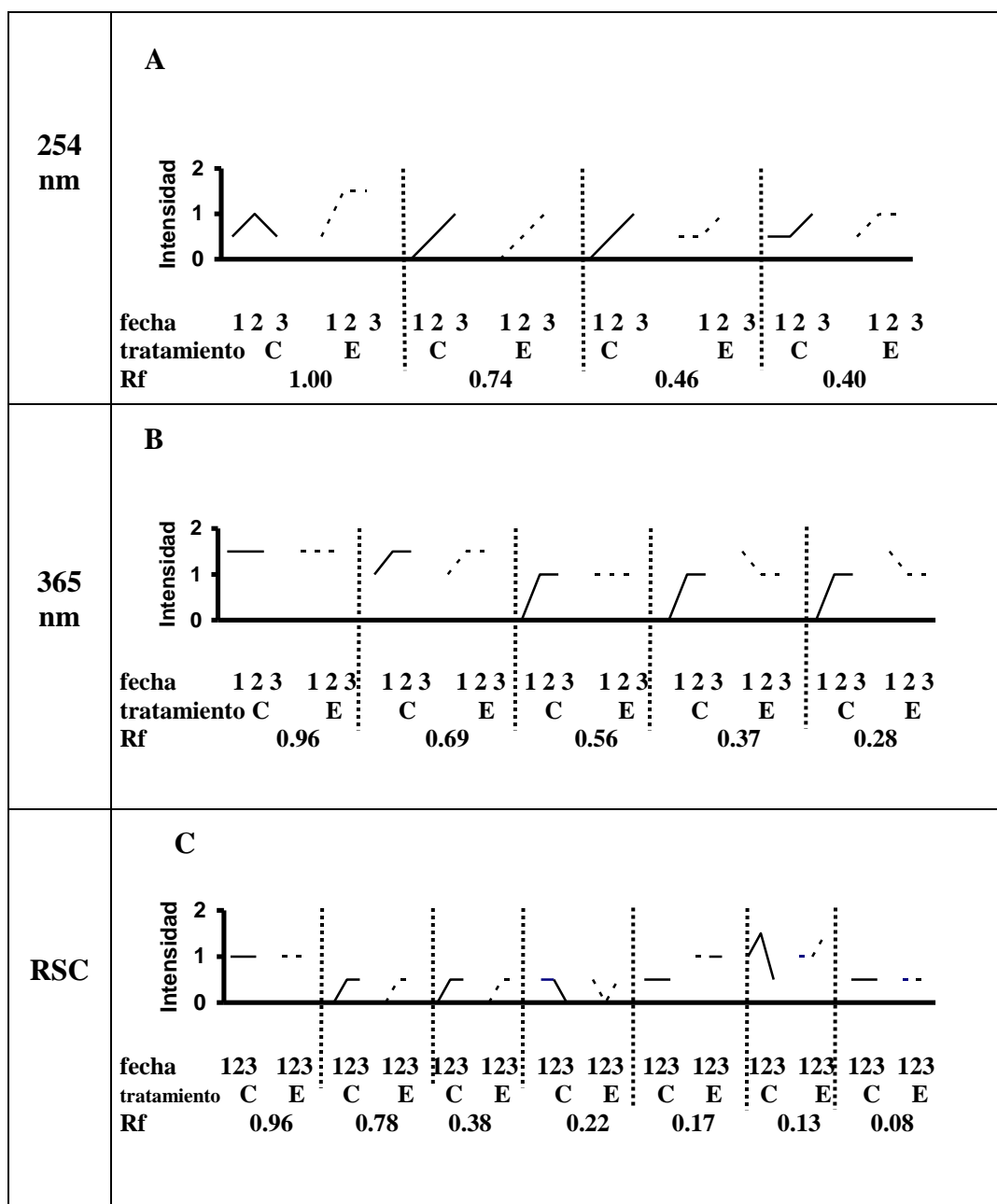


Figura 15. Variaciones en la intensidad de bandas del perfil cromatográfico del extracto de metanol de raíces de frijol cv Azufrado inoculado con *N. aberrans* población Chapingo observado con luz ultravioleta (254 y 365 nm) y revelado con Sulfato Cérico (RSC). Fecha: 1= 15 ddi; 2= 30 ddi; 3 = 60 ddi. Tratamiento: C= control, E= experimental

Adelantos de fecha en la aparición de la máxima intensidad de la banda (adelantos positivos) se muestran en 0.46, 0.40 a 254 nm y 0.56 a 365 nm.

Incrementos no sostenidos en la intensidad se encontraron en las bandas 0.37, 0.28 a 365nm mientras que las bandas 1.00 a 254 nm y 0.17 del revelado

tuvieron incrementos sostenidos en fechas posteriores al aumento. Retrasos positivos los hubo en las bandas 0.78 y 0.38 del revelado. La banda 0.22 del revelado mostró un efecto combinado de decremento seguido por un incremento.

El comportamiento de las bandas de ambos cultivares del extracto de metanol se resúmen en el cuadro del apéndice 20 y el tipo y número de efectos provocados por el nematodo en el patrón de intensidad de bandas de los perfiles cromatográficos de los extractos de ambos cultivares se muestran en el cuadro 10.

Efecto	Hexano		Acetato de etilo		Metanol		Total	
	NQ	AZF	NQ	AZF	NQ	AZF	NQ	AZF
Sin cambio	3	5	2	5	5	5	10	15
Adelanto (+)	--	--	3	1	1	3	4	4
Adelanto (-)	--	--	1	1	--	--	1	1
Retraso (+)	1	--	--	1	2	3	3	4
Retraso (-)	--	--	--	--	--	--	--	--
Disminución	5	4	2	--	1	--	8	4
Incremento	--	--	1	--	1	5	2	5
Interrupción	2	1	1	2	1	--	4	3
Combinado (-)(+)	--	--	--	--	1	1	1	1
Combinado (+)(-)	--	1	1	--	4	--	5	1
TOTAL	11	11	11	11	16	16	38	38

Cuadro 10. Número total de cambios por efecto del nematodo en la intensidad de las bandas del perfil cromatográfico de tres extractos de raíz de los cultivares de frijol Negro Querétaro (NQ) y Azufrado (AZF) inoculados con *N. aberrans* población Chapingo.

Los efectos más comunes que se observaron en ambos cultivares fueron disminuciones, adelantos y retrasos positivos (adelantos y retrasos en las fechas de aparición de máxima intensidad de la banda respectivamente), incrementos de

intensidad, interrupciones en el aumento progresivo de intensidad, adelantos negativos (adelantos de fecha en la disminución de la intensidad de una banda) y combinaciones de ellos.

Hubo diferencias en cuanto al número de bandas mostradas en los perfiles cromatográficos de los extractos, siendo el de metanol el de mayor número de bandas. Aún cuando ambos cultivares presentaron el mismo número total de bandas los efectos por la presencia del nematodo fue diferente en ellos y se manifestó principalmente como cambios en el grado de intensidad de las bandas.

Hubo un mayor número de bandas que no mostraron efecto alguno por la presencia del nematodo en el cv Azufrado el cual también mostró bandas que fueron resultado de adelantos y retrasos positivos así como de incrementos e interrupciones en la magnitud de su intensidad.

Por su parte, los principales efectos por la presencia del nematodo en el cv Negro Querétaro fueron disminuciones en la intensidad de las bandas así como interrupciones, adelantos positivos y efectos combinados en los que había incrementos seguido de decrementos en la intensidad de la banda. Aunque fue alto el número de bandas que no experimentaron cambios, fue menor al mostrado por el cv Azufrado.

La intensidad de una banda es el reflejo de la concentración de compuestos que hay en ella de tal manera que los cambios en su intensidad por efecto del nematodo son resultado de cambios en el metabolismo secundario de la planta.

Las disminuciones en la intensidad, así como las interrupciones y los adelantos negativos tal vez sean resultado del catabolismo de compuestos presentes en ellas por parte del nematodo en diversas etapas de su desarrollo o por la planta misma cuando su metabolismo es acelerado como resultado de los cambios fisiológicos que el parásito provoca en la planta. (Rojas *et al.*, 1993; Zavaleta-Mejía, 1995).

Los retrasos positivos (retraso en la fecha de aparición de una banda) y negativos (retraso en la fecha de disminución de una banda) posiblemente sean resultado de la inhibición o alentamiento de algunas rutas metabólicas de la planta por parte del nematodo, hecho ligado con la reducción significativa en altura y peso

que muestran algunas plantas inoculadas con *N. aberrans* y que ha sido reportado por varios autores (Zamudio *et al*, 1990; García-Camargo y Trejo, 1995).

Es posible que el nematodo no sólo inhiba algunas rutas sino que también acelere otras, lo que conduciría a un aumento en la concentración de algunos compuestos, lo que explicaría los adelantos positivos (adelantos en la fecha de máxima intensidad de una banda) e incrementos que se visualizaron en los perfiles cromatográficos.

Los incrementos pueden también ser resultado de la concentración de compuestos que son sintetizados para actuar en contra del nematodo como una medida de defensa de la planta, ya que ha sido establecido que el reconocimiento de un microorganismo por parte del hospedero induce la expresión genética necesaria en éste para defenderse o acrecentar la interacción (Anaya-Lang, 2003).

Ejemplos de bandas que posiblemente presenten compuestos implicados en la defensa son la 0.38 del revelado y 0.96 a 365 nm del extracto de metanol del cv Negro Querétaro, la primera mostró un incremento sostenido a partir de los 30 ddi las plantas.

En el cv Azufrado también se encontraron este tipo de bandas en el extracto de metanol (ejemplos de ellas son la 0.37, 0.28 a 365 nm). En el extracto de acetato de etilo de este mismo cultivar se detectó la banda 0.30 que incremento dramáticamente su intensidad en la fecha 1 del tratamiento experimental, es decir en las primeras etapas de la interacción con el nematodo lo que indica un posible mecanismo de defensa en la planta.

Además de sus características agronómicas (el cv Azufrado es de semillas amarillas y es más lento en germinar que el Negro Querétaro), los cultivares empleados en este estudio también difieren en su metabolismo secundario y en la manera como es afectado por el nematodo, como lo sugiere:

1. La observación de que no obstante los perfiles cromatográficos de los extractos de las raíces de los tratamientos sin inocular de ambos cultivares mostraron las mismas bandas, no siempre mostraban los mismos cambios.
2. En los perfiles cromatográficos de los tratamientos sin inocular no se detectaron bandas específicas de cultivar.

3. El cv Azufrado experimentó menos efectos por el nematodo en sus bandas que el cv Negro Querétaro, siendo el principal efecto los incrementos en la intensidad de la banda que fueron resultado de una mayor síntesis y acumulación de compuestos por aceleración o activación de rutas metabólicas en la raíz.

4. El cv Negro Querétaro experimentó más efectos por el nematodo que el cv Azufrado, siendo el efecto principal el debido a disminuciones en la intensidad de las bandas que resultaron del catabolismo de los compuestos presentes en ellas por parte de la planta y/o el nematodo.

Estos hechos son de esperarse si se considera la alta variabilidad genética que existe en el frijol como resultado de factores evolutivos y la acción del proceso de domesticación (Miranda, 1979; Gepts y Debouck, 1991).

4.3. Experimento 3. CAMBIOS QUÍMICOS EN RAÍCES DE DOS CULTIVARES DE FRIJOL INOCULADOS CON *N. aberrans* POBLACIÓN TECAMACHALCO

a) Análisis cromatográfico de los extractos hexánicos

Las placas cromatográficas de los extractos hexánicos se muestran en el Apéndice 15.

El número de bandas con sus Rf's respectivos se muestran en los cuadros 11 y 12 para los cultivares Querétaro y Canario respectivamente.

Para el cv Querétaro se visualizaron 3 bandas a 254 nm, 5 a 365 nm y 3 reveladas con Sulfato Cérico. En cuanto a la ausencia o presencia de bandas, no se encontraron diferencias que señalaran efectos del nematodo entre los tratamientos en ninguna de las observaciones. Todas las bandas aparecen desde la primera fecha excepto la 0.31 que aparece hasta los 90 ddi en ambos tratamientos.

Cultivar	Observación	Rf	Fecha					
			1		2		3	
			C	E	C	E	C	E
NQ	254	0.89	+	+	+	+	+	+
		0.56	+	+	+	+	+	+
		0.44	+	+	+	+	+	+
	365	0.90	+	+	+	+	+	+
		0.82	+	+	+	+	+	+
		0.71	+	+	+	+	+	+
		0.67	+	+	+	+	+	+
		0.31	-	-	-	-	+	+
	Sulfato Cérico	.86	+	+	+	+	+	+
		.74	+	+	+	+	+	+
		.41	+	+	+	+	+	+

Cuadro 11. Presencia de bandas con sus respectivos Rf's en el perfil cromatográfico del extracto hexánico de raíces de frijol cv Negro Querétaro (NQ) inoculado con 15000 huevecillos de *N. aberrans* población Tecamachalco evaluado a 15 ddi (fecha 1), 45 ddi (fecha 2), 90 ddi (fecha 3); C = Tratamiento control, E = Tratamiento experimental; + = presencia; - = ausencia

Para detectar efectos del nematodo más sutiles se elaboraron las gráficas de la figura 16.

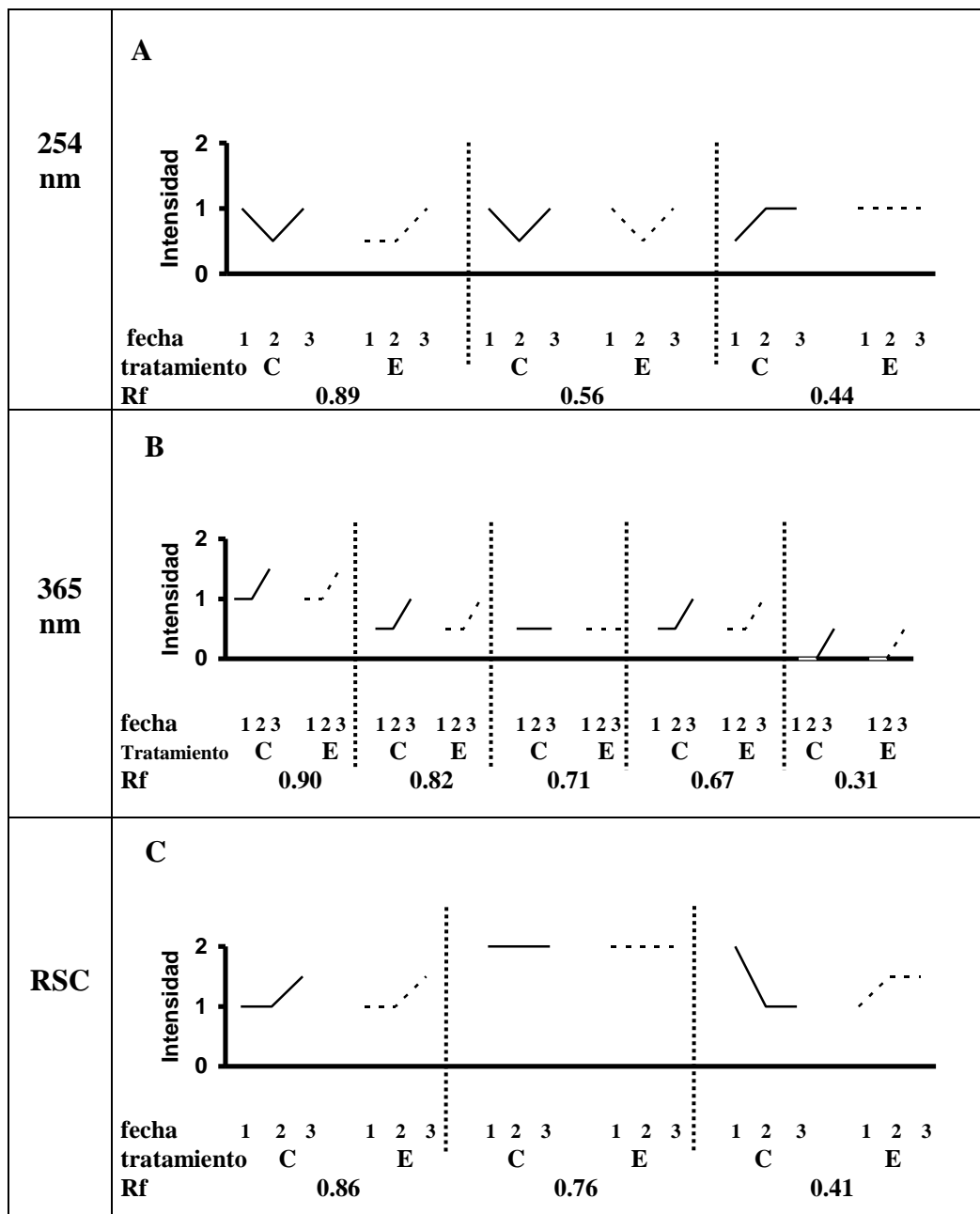


Figura 16. Variaciones en la intensidad de bandas del perfil cromatográfico del extracto hexánico de raíces de frijol cv Negro Querétaro inoculado con *N. aberrans* población Tecamachalco observado con luz ultravioleta (254 y 365 nm) y revelado con Sulfato Cérico (RSC). Fecha: 1= 15 ddi; 2= 45 ddi; 3 = 90 ddi. Tratamiento: C= control, E= experimental

El número y disposición de bandas del cv Canario se muestran en el cuadro 12 que indica efectos por el nematodo en las bandas 0.89 a 254 nm, 0.31 a 365 nm y 0.41 del revelado con Sulfato Cérico, las demás bandas tuvieron un comportamiento similar aparente al de las bandas del cv Negro Querétaro.

Cultivar	Observación	Rf	Fecha					
			1		2		3	
			C	E	C	E	C	E
CNR	254	0.89	+	-	-	+	+	+
		0.56	+	+	+	+	+	+
		0.44	+	+	+	+	+	+
	365	0.90	+	+	+	+	+	+
		0.82	+	+	+	+	+	+
		0.71	+	+	+	+	+	+
		0.67	+	+	+	+	+	+
		0.31	+	-	-	+	+	+
	Sulfato Cérico	0.86	+	+	+	+	+	+
		0.74	+	+	+	+	+	+
		0.41	+	-	+	+	+	+

Cuadro 12. Presencia de bandas con sus respectivos Rf's en el perfil cromatográfico del extracto hexánico de raíces de frijol cv Canario (CNR) inoculado con 15000 huevecillos de *N. aberrans* población Tecamachalco evaluado a 15 ddi (fecha 1), 45 ddi (fecha 2), 90 ddi (fecha 3); C = Tratamiento control, E = Tratamiento experimental; + = presencia; - = ausencia

La descripción gráfica de estas bandas se muestra en la figura 17.

Se encontraron adelantos de la fecha de pérdida o disminución de la intensidad por efecto del nematodo (adelantos de fecha negativos) a los 15 ddi en la banda 0.89 a 254 nm; adelantos de la fecha en que la banda alcanza su mayor intensidad (adelantos positivos) en las bandas 0.44, 0.56 a 254 nm a 15 ddi y en la mayoría de las bandas a 365 nm y en la 0.86 ambas a 45 ddi del revelado.

La única banda que no manifestó efectos por la presencia del nematodo fue la 0.74 del revelado.

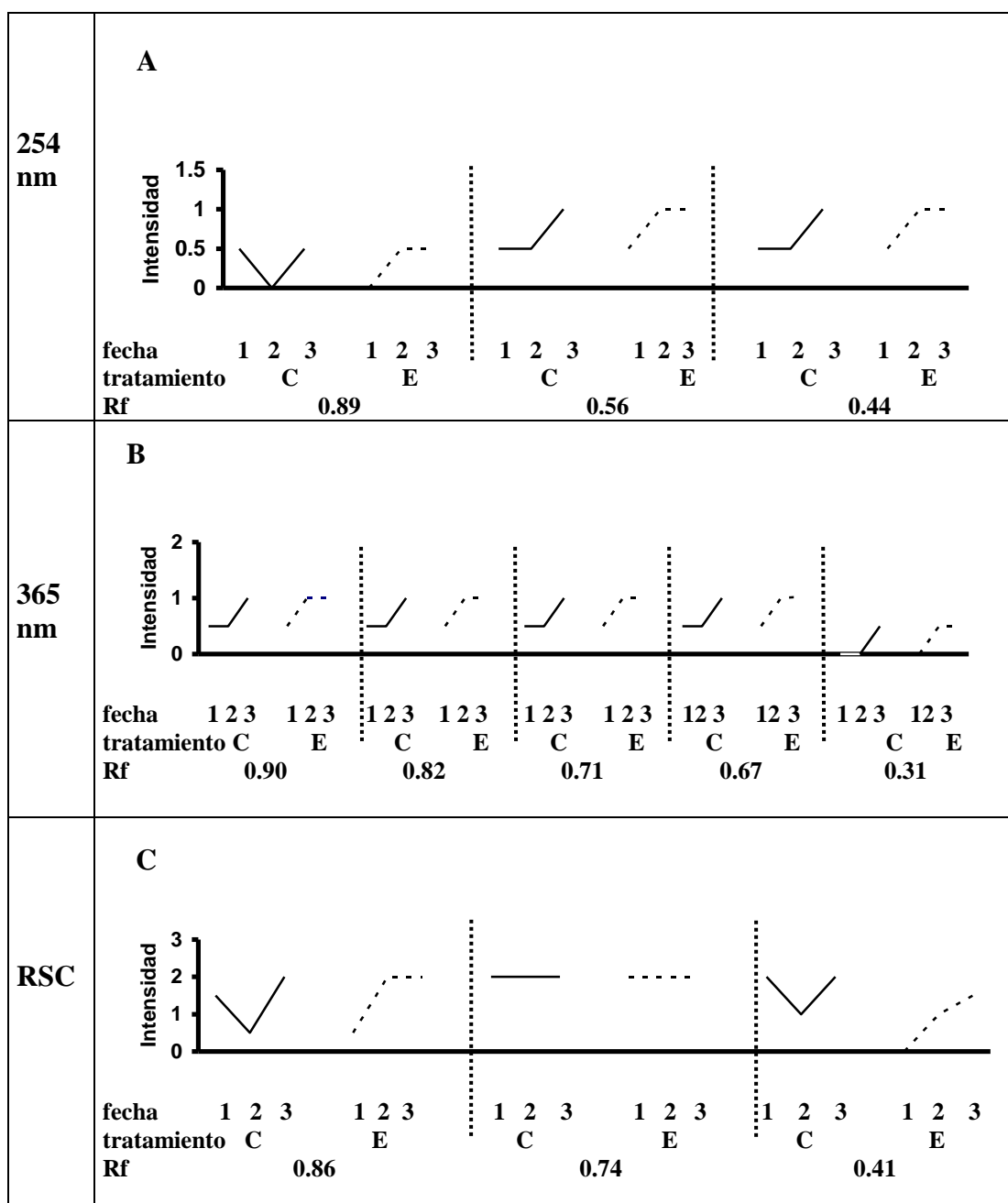


Figura 17. Variaciones en la intensidad de bandas del perfil cromatográfico del extracto hexánico de raíces de frijol cv Canario inoculado con *N. aberrans* población Tecamachalco observado con luz ultravioleta (254 y 365 nm) y revelado con Sulfato Cérico (RSC). Fecha: 1= 15 ddi; 2= 45 ddi; 3 = 90 ddi. Tratamiento: C= control, E= experimental

Bandas que mostraron el mismo efecto en ambos cultivares fueron las pertenecientes al extracto hexánico. La banda 0.41 del revelado del cv Canario no mostró el efecto combinado señalado para el cv Negro Querétaro.

El comportamiento de las bandas del perfil cromatográfico de ambos cultivares del extracto hexánico se resume en el cuadro del apéndice 21

b) Análisis cromatográfico de los extractos de acetato de etilo

En el Apéndice 16 se muestran las placas cromatográficas de los extractos de acetato de etilo.

El perfil cromatográfico del cv Negro Querétaro mostró efectos por el nematodo en las bandas 0.55, 0.34, 0.03 a 365 nm, 0.61, 0.52 del revelado (cuadro 13).

Cultivar	Observación	Rf	Fecha					
			1		2		3	
			C	E	C	E	C	E
NQ	254	0.89	-	-	+	+	+	+
		0.56	+	+	+	+	+	+
		0.44	+	+	+	+	+	+
	365	0.90	+	+	+	+	+	+
		0.81	+	+	+	+	+	+
		0.73	+	+	+	+	+	+
		0.70	+	+	+	+	+	+
		0.55	-	+	+	+	+	+
		0.34	-	+	+	+	+	+
		0.27	+	+	+	+	+	+
	Sulfato Cérico	0.87	+	+	+	+	+	+
		0.77	+	+	+	+	+	+
		0.66	+	+	+	+	+	+
		0.61	-	-	-	+	+	+
		0.52	-	-	-	+	+	+
		0.25	+	+	+	+	+	+
		0.06	+	+	+	+	+	+

Cuadro 13. Presencia de bandas con sus respectivos Rf's en el perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de raíces de frijol cv Negro Querétaro (NQ) inoculado con 15000 huevecillos de *N. aberrans* población Tecamachalco evaluado a 15 ddi (fecha 1), 45 ddi (fecha 2), 90 ddi (fecha 3); C = Tratamiento control, E = Tratamiento experimental; + = presencia; - = ausencia

La representación gráfica de estas bandas se muestra en la figura 18.

Bandas que no mostraron efectos por el nematodo fueron la 0.44 y 0.56 a 254 nm, 0.81 a 365 nm, 0.25, 0.66 y 0.76 del revelado.

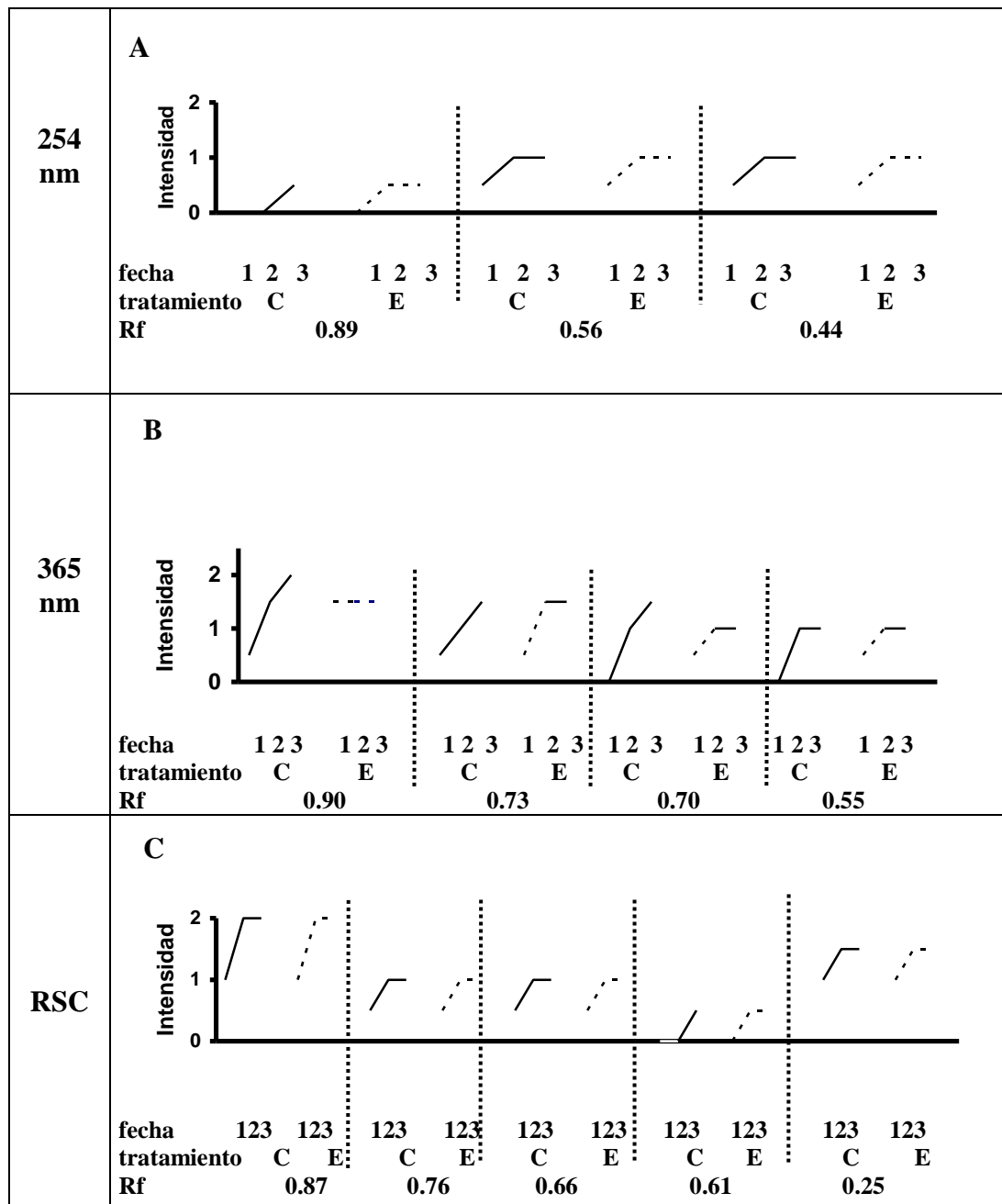


Figura 18. Variaciones en la intensidad de bandas del perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de raíces de frijol cv Negro Querétaro inoculado con *N. aberrans* población Tecamachalco observado con luz ultravioleta (254 y 365 nm) y revelado con Sulfato Cérico (RSC). Fecha: 1= 15 ddi; 2= 45 ddi; 3= 90 ddi. Tratamiento: C= control, E= experimental

Se observan adelantos positivos en las fechas de máxima intensidad de los tratamientos experimentales a los 45 ddi en las bandas, 0.73 a 365 nm, y 0.87 del revelado. La banda 0.90 a 365 nm mostró un efecto combinado de incremento en la intensidad en la primera fecha (adelanto positivo) con permanencia constante en fechas posteriores pero a un perfil disminuido con respecto al control.

La única banda que mostró disminuciones en su intensidad fue la 0.70 a 365 nm

Las bandas presentes en el perfil cromatográfico del extracto con acetato de etilo de las raíces de frijol cv Canario se encuentran especificadas en el cuadro 14.

Cultivar	Observación	Rf	Fecha					
			1		2		3	
			C	E	C	E	C	E
CNR	254	.89	-	+	-	+	+	+
		.56	+	+	+	+	+	+
		.44	+	+	+	+	+	+
	365	.90	+	+	+	+	+	+
		.81	+	+	+	+	+	+
		.73	+	+	+	+	+	+
		.70	+	+	+	+	+	+
		.55	+	+	+	+	+	+
		.34	+	+	+	+	+	+
		.27	+	+	+	+	+	+
	Sulfato Cérico	.87	+	+	+	+	+	+
		.76	+	+	+	+	+	+
		.66	+	+	+	+	+	+
		.61	-	+	-	+	+	+
		.52	-	+	-	+	+	+
		.25	+	+	+	+	+	+
		.06	+	+	+	+	+	+

Cuadro 14. Presencia de bandas con sus respectivos Rf's en el perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de raíces de frijol cv Canario (CNR) inoculado con 15000 huevecillos de *N. aberrans* población Tecamachalco evaluado a 15 ddi (fecha 1), 45 ddi (fecha 2), 90 ddi (fecha 3); C = Tratamiento control, E = Tratamiento experimental; + = presencia; - = ausencia

Se hallaron diferencias entre tratamientos en la 0.89 a 254 nm, la 0.61 y 0.52 reveladas con Sulfato Cérico; todas ellas se hallan presentes en los tratamientos

experimentales en fechas anteriores a la de los controles donde generalmente aparecen hasta los 90 ddi.

La figura 19 describe las variaciones en intensidad de las bandas.

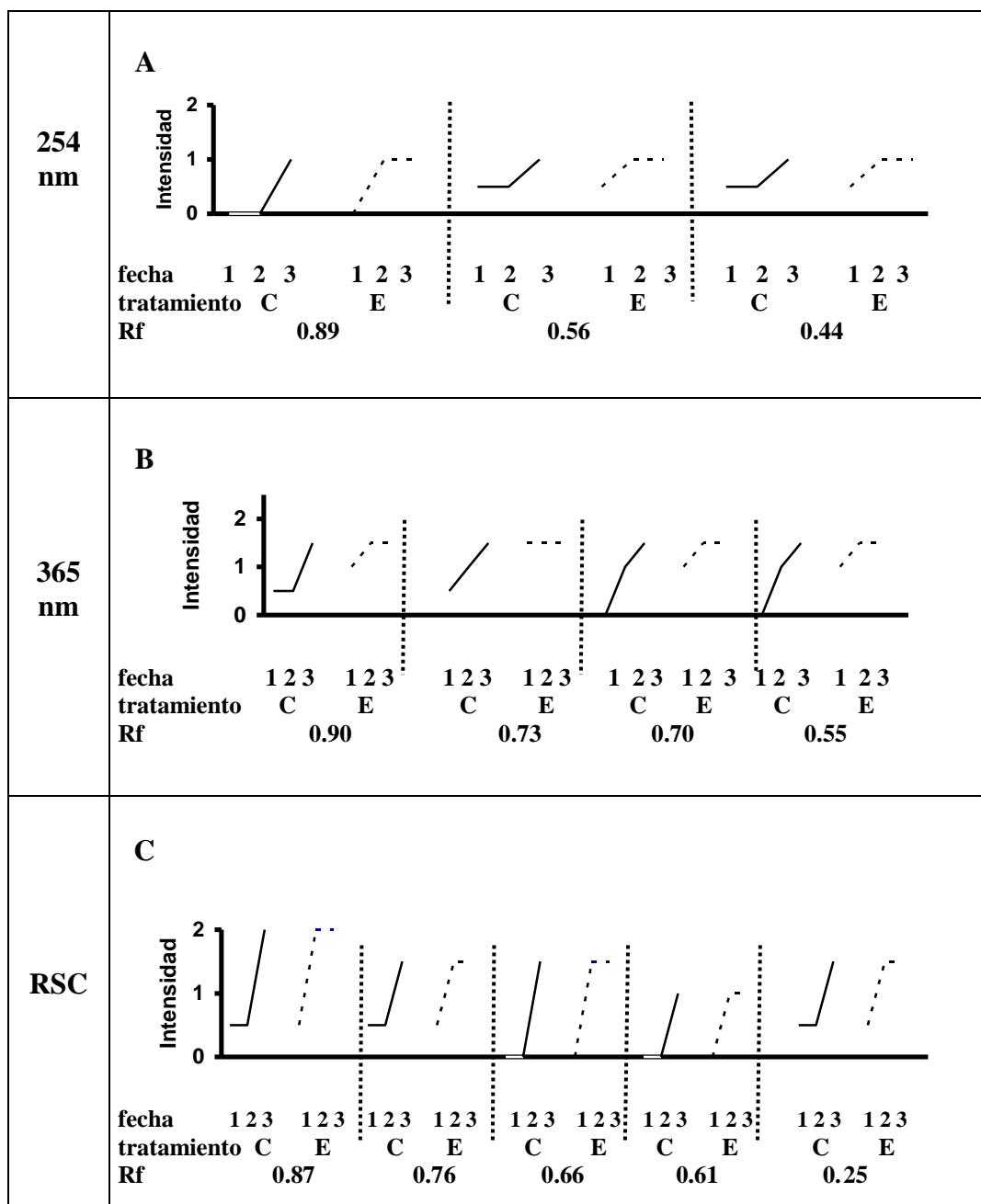


Figura 19. Variaciones en la intensidad de bandas del perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de raíces de frijol cv Canario inoculado con *N. aberrans* población Tecamachalco observado con luz ultravioleta (254 y 365 nm) y revelado con Sulfato Cérico (RSC). Fecha: 1= 15 ddi; 2= 45 ddi; 3 = 90 ddi. Tratamiento: C= control, E= experimental.

Bandas que mostraron adelantos de fecha en la aparición de su máxima intensidad (adelantos positivos) fueron, además de las ya mencionadas, la 0.56, 0.44 a 254 nm a 15 ddi; 0.90, 0.73, 0.70 a 365 nm a 15 ddi y las bandas del revelado 0.87, 0.76, 0.61 y 0.25 del revelado a 45 ddi. La única banda que no mostró efectos por el nematodo fue la 0.66 del revelado. Un resumen del comportamiento de las bandas de ambos cultivares de este extracto se muestra en el cuadro del apéndice 22

c) Análisis cromatográfico de los extractos de metanol

Las placas cromatográficas de los extractos de metanol se muestran en el Apéndice 17.

Cultivar	Observación	Rf	Fecha					
			1		2		3	
			C	E	C	E	C	E
NQ	254	.75	+	+	+	+	+	+
		.36	+	+	+	+	+	+
		.28	+	+	+	+	+	+
		.18	+	+	+	+	+	+
	365	.78	+	+	+	+	+	+
		.44	+	+	+	+	+	+
		.30	+	+	+	+	+	+
		.25	+	+	+	+	+	+
		.20	+	+	+	+	+	+
	Sulfato Cérico	.77	+	+	+	+	+	+
		.66	+	+	+	+	+	+
		.61	+	+	+	+	+	+
		.45	+	+	+	+	+	+
		.27	+	+	+	+	+	+
		.18	+	+	+	+	+	+
		.14	+	+	+	+	+	+

Cuadro 15. Presencia de bandas con sus respectivos Rf's en el perfil cromatográfico del extracto de metanol de raíces de frijol cv Negro Querétaro (NQ) inoculado con 15000 huevecillos de *N. aberrans* población Tecamachalco evaluado a 15 ddi (fecha 1), 45 ddi (fecha 2), 90 ddi (fecha 3); C = Tratamiento control, E = Tratamiento experimental; + = presencia; - = ausencia

El perfil cromatográfico del cv Negro Querétaro mostró cuatro bandas observables a 254 nm, cinco a 365 nm y siete reveladas con Sulfato Cérico, sin que se

encontraran diferencias en el patrón de bandas entre tratamientos del cv Negro Querétaro en ninguna de las observaciones (cuadro 15).

En la figura 20 se detallan las variaciones en intensidad de estas bandas.

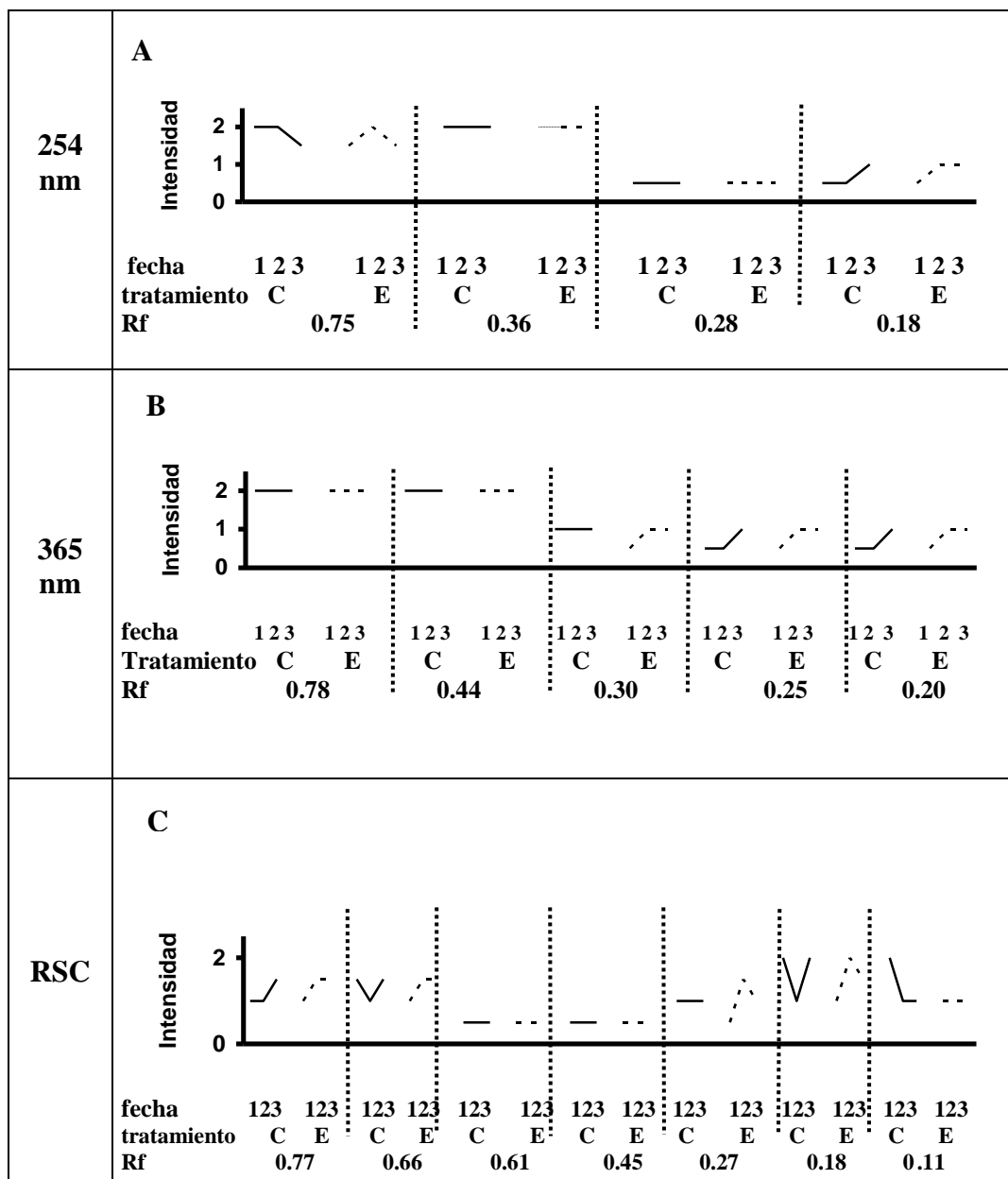


Figura 20. Variaciones en la intensidad de bandas del perfil cromatográfico del extracto de metanol de raíces de frijol cv Negro Querétaro inoculado con *N. aberrans* población Tecamachalco observado con luz ultravioleta (254 y 365 nm) y revelado con Sulfato Cérico (RSC). Fecha: 1= 15 ddi; 2= 45 ddi; 3 = 90 ddi. Tratamiento: C= control, E= experimental

Retrasos en la fecha de aparición de la máxima intensidad de la banda de los tratamientos experimentales respecto a sus controles se detectaron en las bandas 0.75 a 254 nm, 0.30 a 365 nm y se referirá a ellos como retrasos positivos para diferenciarlos de aquellos que muestran un decremento en la intensidad de la banda en fechas posteriores a los que ocurren en los tratamientos controles.

Adelantos de fecha positivos ocurrieron en las bandas 0.18 a 254 nm, 0.25, 0.20 a 365 nm; 0.77, 0.66 y 0.18 del revelado; la banda 0.27 de esta misma placa mostró un efecto combinado de disminución de la intensidad a 15 ddi seguido de un rápido incremento a los 30 ddi que supera la intensidad presente en la banda del tratamiento control, aunque el efecto no es sostenido; es posible que esto sea resultado de un mecanismo de defensa de la planta ante la presencia del nematodo.

En la misma placa del revelado se encontró también a la banda 0.11 que mostró un perfil menor en la intensidad en el tratamiento experimental que su equivalente en el control, este efecto podría ser considerado de disminución o decremento.

Bandas que no mostraron cambios en sus patrones de intensidad fueron la 0.36, 0.28 a 254 nm, 0.78, 0.44 a 365 nm, 0.61, 0.45 del revelado

El número, disposición y variación de las bandas presentes en el perfil cromatográfico del cv Canario se muestran en el cuadro 16 y en la figura 21

Se observaron efectos del nematodo en las bandas 0.28 a 254 nm a 45 ddi; 0.61, 0.45 y 0.27 del revelado a 45 ddi, todas mostraron adelantos de fecha positivos con intensidades finales igual a las del control, excepto la banda 0.27 que fue mayor, por lo que es posible que sea resultado de un mecanismo de defensa.

Cultivar	Observación	Rf	Fecha					
			1		2		3	
			C	E	C	E	C	E
CNR	254	0.75	+	+-	+	+	+	+
		0.36	+	+	+	+	+	+
		0.28	-	-	-	+	+	+
		0.18	+	+	+	+	+	+
	365	0.78	+	+	+	+	+	+
		0.44	+	+	+	+	+	+
		0.30	+	+	+	+	+	+
		0.25	+	+	+	+	+	+
		0.20	+	+	+	+	+	+
	Sulfato Cérico	0.77	+	+	+	+	+	+
		0.66	+	+	+	+	+	+
		0.61	-	+	-	+	+	+
		0.45	-	+	-	+	+	+
		0.27	-	+	-	+	+	+
		0.18	+	+	+	+	+	+
		0.11	+	+	+	+	+	+

Cuadro 16. Presencia de bandas con sus respectivos Rf's en el perfil cromatográfico del extracto de metanol de raíces de frijol cv Canario (CNR) inoculado con 15000 huevecillos de *N. aberrans* población Tecamachalco evaluado a 15 ddi (fecha 1), 45 ddi (fecha 2), 90 ddi (fecha 3); C = Tratamiento control, E = Tratamiento experimental; + = presencia; - = ausencia

Otras bandas con adelantos de fecha positivos que pueden apreciarse en la figura 21 fueron la 0.89, 0.56, 0.44 a 254 nm a 45 ddi; la 0.25 a 365 nm a 15 ddi.

Algunos tratamientos experimentales de este cultivar que mostraron incrementos en la intensidad de las banda con respecto a sus controles fueron la 0.18 a 254 nm a 45 ddi, la 0.30, 0.20 a 365 nm a 15 ddi las cuales tienden a disminuir su intensidad en fechas posteriores.

Bandas sin cambios en sus patrones de intensidad entre tratamientos fueron la 0.78, 0.44 a 254 nm.

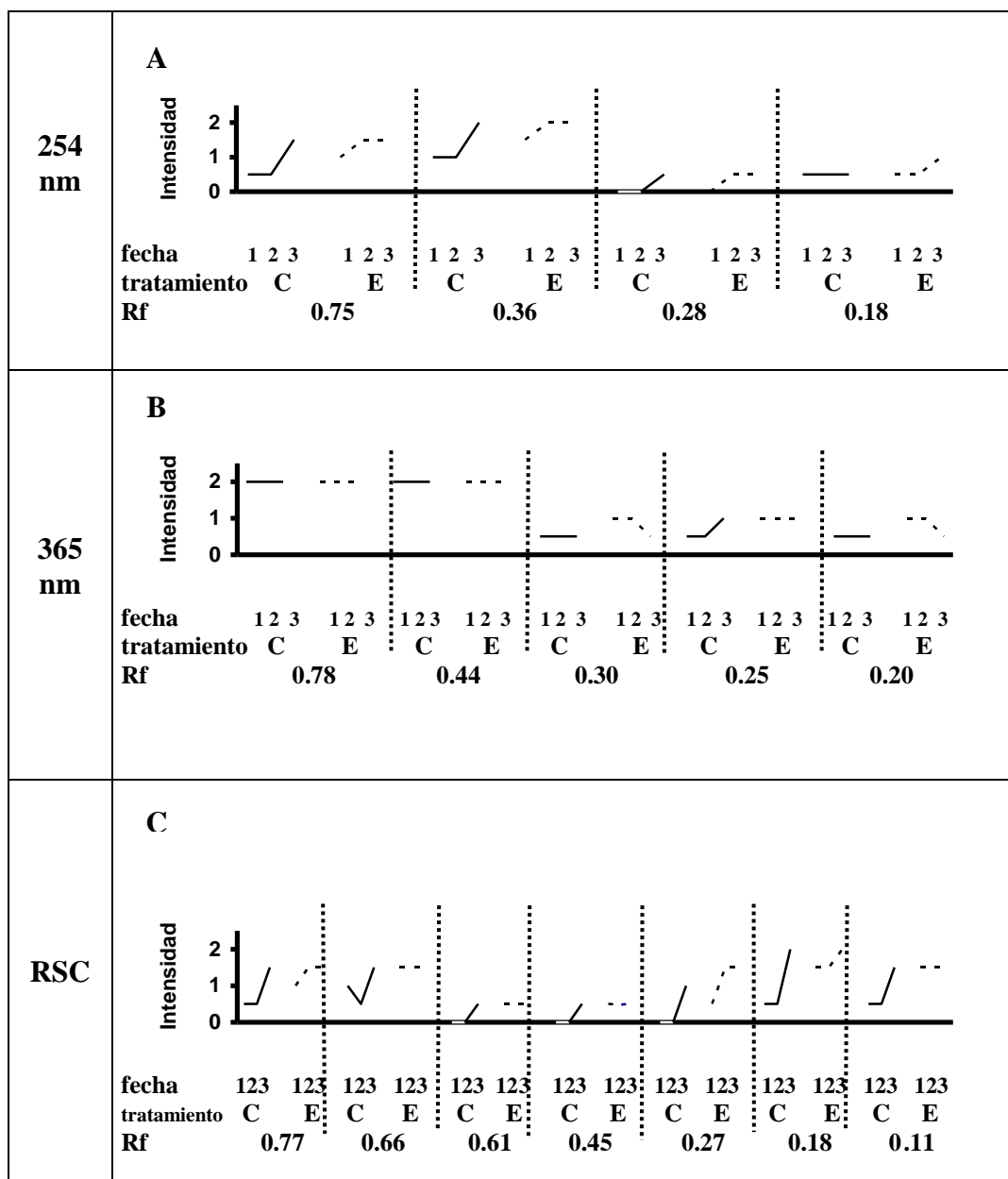


Figura 21. Variaciones en la intensidad de bandas del perfil cromatográfico del extracto de metanol de raíces de frijol cv Canario inoculado con *N. aberrans* población Tecamachalco observado con luz ultravioleta (254 y 365 nm) y revelado con Sulfato Cérico (RSC). Fecha: 1= 15 ddi; 2= 45 ddi; 3 = 90 ddi. Tratamiento: C= control, E= experimental

El comportamiento de las bandas en los perfiles cromatográficos del extracto de metanol de ambos cultivares se resumen en el cuadro del apéndice 23, y un resumen del

número de cada uno de los tipos de efectos provocados por el nematodo en el patrón de intensidad de bandas de los perfiles cromatográficos de todos los extractos de ambos cultivares se muestran en el cuadro 17.

Efecto	Hexano		Acetato de etilo		Metanol		Total	
	NQ	CNR	NQ	CNR	NQ	CNR	NQ	CNR
Sin cambio	8	1	6	--	6	2	20	3
Adelanto (+)	1	7	4	12	5	12	10	31
Adelanto (-)	1	2	--	--	2	--	3	2
Retraso (+)	--	--	--	--	1	--	1	--
Retraso (-)	--	--	--	--	1	-1	1	--
Disminución	--	1	--	--	--	--	--	1
Incremento	--	--	--	--	1	1	1	1
Interrupción	--	--	--	--	--	--	--	--
Combinado (-)(+)	1	--	--	--	--	--	1	--
Combinado (+)(-)	--	--	2	--	--	--	2	--
Total	11	11	12	12	16	16	39	39

Cuadro 17. Número total de cambios por efecto del nematodo en la intensidad de las bandas del perfil cromatográfico de tres extractos de raíz de los cultivares de frijol Negro Querétaro (NQ) y Canario (CNR) inoculados con *N. aberrans* población Tecamachalco.

El número de bandas visualizados en cada uno de los perfiles cromatográficos de los extractos en este estudio, fue muy similar al obtenido en el estudio homólogo realizado en los cultivares Negro Querétaro y Azufrado inoculados con la población Chapingo de *N. aberrans* (experimento 2), siendo el perfil cromatográfico del extracto de metanol el que presentó el mayor número de bandas. No hubo coincidencias en los valores de corrimiento de las bandas en ninguno de los perfiles lo que indica la

presencia de compuestos diferentes debido a que las condiciones experimentales de ambos estudios fueron completamente distintas.

El cv Negro Querétaro presentó un mayor número de bandas sin cambios que el cv Canario, pero el principal efecto del nematodo en ambos cultivares fue el adelanto de fecha en la aparición de máxima intensidad de la banda (adelantos positivos) lo que sugiere que hay una mayor concentración de compuestos como resultado de la aceleración de los procesos metabólicos así como activación de algunas rutas de síntesis que probablemente se activan en la planta cuando es parasitada por el nematodo.

Diversos autores han documentado los efectos de los nematodos *Meloidogyne* spp. sobre varios aspectos de la fisiología y bioquímica de la planta (Taylor y Sasser, 1983; Wilcox-Lee y Loria, 1987; Wallace, 1987); plantas infectadas con *N. aberrans* muestran mayor déficit de agua, reducción de la conductancia estomática, incremento de la temperatura de la hoja, disminución de la fotosíntesis y reducción significativa de su biomasa, lo que indudablemente es un reflejo de las alteraciones que el nematodo provoca en el metabolismo de la planta (Rojas *et al.*, 1993; Zavaleta-Mejía *et al.*, 1995)

La banda 0.27 a 15 ddi del revelado del extracto de metanol de ambos cultivares mostró un incremento de intensidad y consecuentemente de compuestos a 45 ddi, que superaron la de los tratamientos control; es posible que en esta banda se encuentren compuestos que son sintetizados en respuesta al establecimiento del nematodo. Otras bandas con este efecto pero que no mantienen la intensidad en fechas posteriores fueron 0.20 y 0.30 a 365 nm.

Si existen compuestos que jueguen un papel en la resistencia de la planta a las poblaciones de nematodos en los cultivares aquí analizados, deben buscarse en este tipo de bandas, sobre todo en aquellas que se manifiestan en la primer fecha y/o que se incrementan y mantienen a altos niveles en las fechas de estudio subsiguientes.

El presente estudio es preliminar sobre los efectos que *N. aberrans* causa en la química de la raíz y por lo tanto no se determinó la naturaleza de los compuestos presentes en cada una de las bandas; es difícil detectar con la simple observación bajo luz ultravioleta o con el revelado la presencia de compuestos de un mismo grupo ya que pueden distribuirse en diferentes bandas a lo largo del cromatograma y una banda puede

tener diferentes compuestos, sin embargo algunos compuestos que seguramente podrán encontrarse son los flavonoides que fluorescen a 254 y 365 nm con colores amarillo, verde, o azul. Las isoflavonas que son comunes en la familia Leguminosae y algunas de ellas aumentan sus niveles cuando el frijol es atacado por hongos fitopatógenos o nematodos agalladores de la raza 3 de *Meloidogyne incognita*, es incolora al igual que los terpenoide y no puede detectarse por este método. Otros compuestos fenólicos como son los fenilpropanoides pueden ser detectados por su color o fluorscencia en luz UV. Los taninos pueden ser detectados a 365 nm como bandas rojo-violeta, azul y verde (Harborne, 1984; Soriano y Medina, 1989; Waterman, 1994; Besby *et al.*, 2002; Carpentieri-Pípolo *et al.*, 2005)

El aislamiento y caracterización de bandas por métodos más sensibles posiblemente muestre la presencia de fenilpropanoides y otros compuestos fenólicos implicados en el reforzamiento de la pared celular como serían suberina, lignina y/o cutina que se sabe ocurren en interacciones con el nematodo *Meloidogyne* spp y de otros que se hallan presentes en los tejidos vegetales en forma de glicósidos con baja actividad fisiológica y bioquímica que cuando son degradados por glicosidasas, como las presentes en la saliva de los nematodos, pueden dar origen a fenoles libres fisiológicamente activos (Kosuge, 1969; Rohde, 1972; Singh y Choudhury, 1973; Huang, 1985b; Nicholson y Hammerschmidt, 1992; Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003).

El estudio histológico realizado en estos cultivares (experimento 1) mostró que a 45 ddi el nematodo se encuentra ya establecido en cavidades lignificadas en la raíz del frijol y que a los 60 ddi posiblemente detuvo su desarrollo, hecho que se confirmo en el estudio de reproducción respectivo finalizado a 105 ddi (experimento 5). Al respecto, se ha reportado que en plantas resistentes a nematodos hay acumulación de productos que tienen efectos en el desarrollo y viabilidad del parásito incluso desde los inicios de la interacción (Hung y Rohde, 1973; Kaplan *et al.*, 1980a, b; Huang, 1985b; Huang y Baker; 1991).

Se han encontrado diferencias en la concentración promedio de compuestos fenólicos entre cultivares de tomate susceptibles y resistentes a *Meloidogyne incognita* (Hung y Rohde, 1973; Singh y Choudhury, 1973) así como de aumentos en la actividad de la fenilalanina amonio liasa, enzima implicada en su síntesis (Huang, 1985b).

Los resultados aquí obtenidos no indicaron diferencias en los perfiles cromatográficos que permitieran la distinción entre cultivares, aunque sí confirman la

apreciación obtenida en el experimento anterior de que el metabolismo de los cultivares de frijol son afectados de manera distinta por el nematodo posiblemente como resultado de diferencias fisiológicas entre ellos.

El efecto de los nematodos en el metabolismo secundario de la planta ha sido poco estudiado, y particularmente se ha enfocado sobre aislamiento de compuestos presentes en plantas resistentes al parásito, o bien en aquellos que por sus efectos nematicidas puedan ser utilizados como medidas integrales de control (Chitwood, 2002). El presente estudio es el primero que se realiza sobre las alteraciones que *N. aberrans* provoca en el metabolismo secundario de una planta cultivada.

4.4. Experimento 4. Reproducción de *N. aberrans* población Chapingo en seis cultivares de frijol

Los diversos cultivares confrontados con ambas poblaciones del nematodo mostraron raíces pivotantes muy similares entre sí, altamente ramificadas desde su origen y con abundantes raíces secundarias y terciarias.

La tinción de las raíces detectó la presencia de nematodos en el interior de las mismas en un estado de desarrollo correspondiente al tercer o cuarto estadio, en ligeros engrosamientos de la raíz que no constituían una verdadera agalla (figura 22A), junto a estas raíces se encontraron otras obscurecidas y/o aparentemente secas en las que se visualizaban los sitios de establecimiento del nematodo, aunque se desconoce si aún el parásito se mantenía con vida (figura 24 A en página 110).

Las raíces de los cultivares confrontados con la población del nematodo procedente de Chapingo no mostraron agallamiento ni reproducción del nematodo a los 105 días después de inoculadas (ddi), por lo que no fue posible calcular el índice de agallamiento y el factor de reproducción respectivos y en su lugar se contabilizó el número total de nematodos presentes por sistema de raíz; los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 18 y en la figura 22.

	AZF	CNR	EJT	FM*	JMP	NQ
MEDIA**	1162.67	935.67	136	126.67	384.67	200
VARIANZA	210297.0	1.1 x 10¹¹	1641	2121.33	28940.3	27516.0
DESVIACIÓN STANDARD	458.58	1047.91	40.51	46.06	170.12	165.88
MÍNIMO	718	144	96	82	269	84
MAXIMO	1634	2124	177	174	580	390
RANGO	916	1980	81	92	311	306
COEFICIENTE DE VARIACIÓN	39.44	112	29.79	36.36	44.22	82.94

Cuadro 18. Estadísticos básicos del número de juveniles presentes a 105 días después de inoculados con 4000 huevecillos de *N. aberrans* población Chapingo en seis cultivares de frijol (*P. vulgaris*). NQ = Negro Querétaro; AZF = Azufrado; CNR = Canario; EJT = Ejotero; FM = Flor de Mayo; JMP = Jamapa. *Datos sesgados. **Promedio de tres plantas

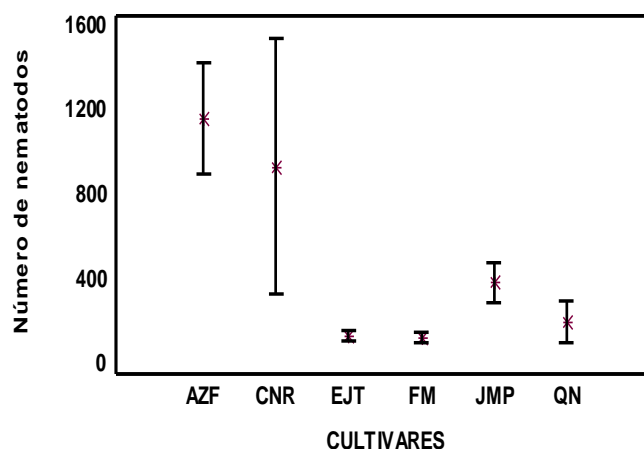


Figura 22. Número de nematodos presentes por sistema de raíz en cultivares de frijol inoculados con 4000 huevecillos de *N. aberrans* población Chapingo a 105 días después de la inoculación. AZF = cv Azufrado, CNR = cv Canario, EJT = cv Ejotero, FM = cv Flor de Mayo, JMP = cv Jamapa, NQ = cv Negro Querétaro; valor promedio de tres repeticiones

El estudio de penetración fue realizado inoculando a las plantas con juveniles segundo estadio (J_2) de la población Chapingo. En todos los cultivares confrontados con el nematodo se encontró que hubo penetración en la zona de crecimiento de la raíz, a corta distancia del ápice más allá de la zona de la caliptra y en la zona de elongación, en algunas raíces se encontraron grupos de nematodos lo que sugiere que hubo penetración simultánea, estos hechos son similares a los reportados por diversos autores en tomate, chile y remolacha (Prasad y Webster, 1967; Castillo, 1982; Inserra *et al.*, 1985).

En el interior de la raíz los nematodos se desplazaron de manera ondulante y paralela al cilindro vascular; no se observaron huellas de lesiones que el nematodo dejara a su paso por el tejido cortical. La figura 24 C revela la presencia del nematodo en las raíces de frijol a tres días después de inoculadas.

Los estadísticos básicos del número de nematodos presentes a 2 y 3 ddi se muestran en el cuadro 19 y su descripción gráfica en la figura 23.

Cultivar	ddi	Media*	Varianza	Desviación estandar	Mín	Máx	Rango	C.V
AZF	2	27.00	1000.33	31.63	1	62	61	0.88
	3	114.00	15067.00	122.75	17	252	235	0.94
CNR	2	----	-----	-----	----	-----	----	----
	3	158.33	21122.30	145.34	58	325	267	1.15
EJT	2	32.33	86.33	9.29	22	40	18	-0.83
	3	82.00	6652.00	81.56	30	176	146	1.20
FM	2	0.33	0.33	0.58	0	1	1	1.22
	3	82.00	589.00	24.27	55	102	47	-0.84
JMP	2	0.33	0.33	0.58	0	1	1	1.22
	3	15.67	226.33	15.04	0	30	30	-0.28
NQ	2	54.00	427.00	20.67	31	71	40	-0.84
	3	115.00	1687.00	41.07	69	148	79	-0.90

Cuadro 19. Estadísticos básicos del número de juveniles (J_2) de *Nacobbus aberrans* población Chapingo en diversos cultivares de frijol (*P. vulgaris*) a dos y tres días después de inoculados (ddi) con 2000 juveniles. [†]Promedio de tres plantas, ddi = días después de inoculadas; NQ = Negro Querétaro; AZF = Azufrado; CNR = Canario; EJT = Ejotero; JMP = Jamapa

Se observa que a 3 ddi el número promedio de nematodos es mayor que en la primera fecha; todos los cultivares mostraron valores de dispersión altos, sobretodo a los 3 ddi. En la primera fecha los cultivares Flor de Mayo y Jamapa mostraron el menor número de nematodos en sus raíces y esta tendencia aparentemente se mantiene en el cv Jamapa en la segunda fecha. Negro Querétaro es el cultivar con el mayor número

promedio de nematodos penetrados en ambas fechas. No fue medido el número de nematodos presentes en las raíces del cv Canario en la primera fecha.

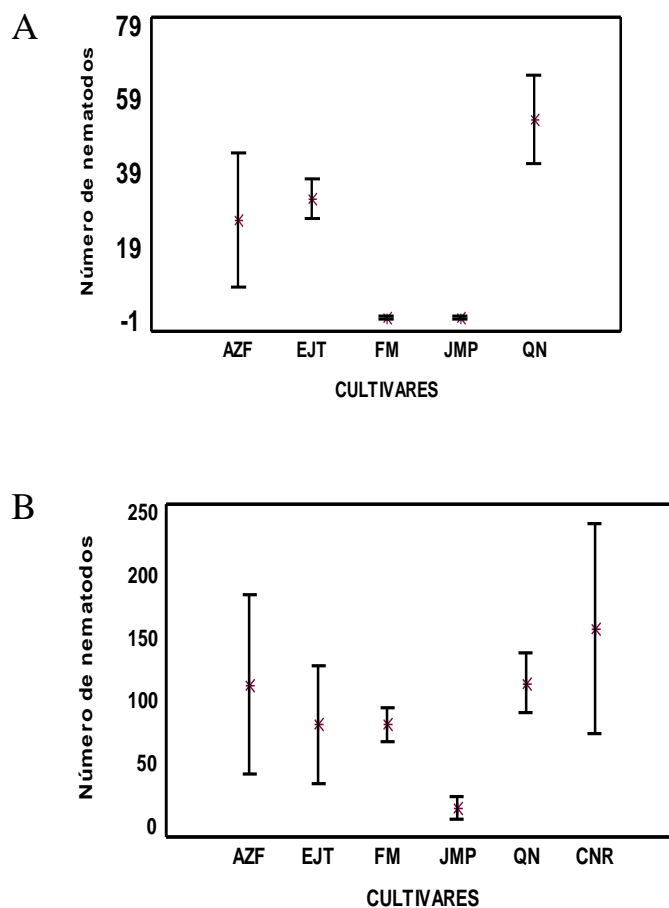


Figura 23. Número de nematodos presentes por sistema de raíz en cultivares de frijol inoculados con 2000 juveniles (J_2) de *N. aberrans* población Chapingo a (A) 2 y (B) 3 días después de la inoculación. AZF = cv Azufrado, CNR = cv Canario, EJT = cv Ejotero, FM = cv Flor de Mayo, JMP = cv Jamapa, NQ = cv Negro Querétaro; valor promedio de tres repeticiones. El cv Canario en la primer fecha no fue determinada

El análisis de varianza mostrado en el Apéndice 21 no señala diferencias estadísticamente significativas entre cultivares pero sí entre fechas.

Los porcentajes de penetración de nematodos con respecto al tamaño del inóculo aplicado fueron bajos (Cuadro 20) y no fueron mayores al 3 y 9% para la primera y segunda fecha respectivamente, con un incremento notable en esta última.

CULTIVAR	DDI	NÚMERO DE J ₂ / SISTEMA DE RAÍZ ⁺	PROPORCIÓN	PENETRACION (%)
JMP	2	0.33	47.58	0.02
	3	15.70		0.87
FM	2	0.33	248.5	0.02
	3	82.00		4.55
EJT	2	33.00	2.47	1.80
	3	81.50		4.52
NQ	2	54.00	2.13	3.00
	3	115.00		6.40
AZF	2	27.00	4.27	1.50
	3	115.00		6.40
CNR	2	----	-----	----
	3	158.40		8.80

Cuadro 20. Número promedio de juveniles (J₂) de *Nacobbus aberrans* población Chapingo en diversos cultivares de frijol (*P. vulgaris*) a dos y tres días después de inoculados (ddi) con 2000 juveniles. ⁺Promedio de tres plantas

Los resultados sugieren que no obstante el número de nematodos que penetran al frijol es muy bajo en las primeras horas, en los días siguientes la penetración continúa y alcanzan valores altos.

Como ya se señaló con anterioridad, Jamapa y Flor de Mayo fueron los cultivares con el menor número de nematodos y por lo consiguiente con los menores porcentajes de penetración; sin embargo, fueron los que tuvieron los incrementos más altos, resultando respectivamente 48 y 248 veces más nematodos a los 3 ddi con respecto a los presentes a los 2 ddi

La ausencia de agallamiento y reproducción del nematodo, así como la presencia de estados juveniles avanzados en el interior de las raíces a 105 ddi podría sugerir que los cultivares empleados en este estudio son resistentes a *N. aberrans*, pero también podría pensarse que el nematodo no tiene al frijol como hospedero, tal como ocurre con una población poblana de *N. aberrans* incapaz de crecer, agallar y reproducirse en 10 genotipos de frijol comparada con una de Zacatecas que se reproduce bien en los mismos genotipos (Hernández, 2001).

Por otra parte, es muy posible que la detención del desarrollo del nematodo obedezca a razones propias de su fisiología o a las condiciones ambientales, es decir que sea la manifestación del fenómeno de diapausa que ha sido documentado por varios autores (Clark, 1967; Inserra *et al.*, 1983; Cristóbal *et al.*, 2001a); sin embargo, se descarta esta posibilidad pues los experimentos fueron establecidos en condiciones de invernadero, en la parte fría del año; por otro lado, a fines del mes de octubre se realizó un muestreo y colecta de material (ver material y métodos) en los campos agrícolas de Chapingo donde se detectaron quenopodios y verdolagas agalladas con hembras reproductivas.

Es más factible que la acción de factores presentes en el frijol actúen como factores estresantes sobre la fisiología del nematodo obligándolo a entrar en quiescencia y así poder sobrevivir hasta el siguiente ciclo de siembra (Cristobal-Alejo *et al.*, 2001a).

Los cultivares de frijol probados en el estudio de reproducción mostraron penetración diferencial del nematodo, lo que señala la variación que existe en frijol para ser penetrados por el nematodo; se desconoce si hubo posterior salida de los J₂ como se ha observado que ocurre en interacciones involucrando a *Meloidogyne incognita* y cultivares resistentes de soya (Herman *et al.*, 1991)

Los mecanismos de resistencia se manifiestan desde el abandono de las raíces por los juveniles hasta su muerte por respuesta hipersensible de la planta, así como grados variables de disminución del crecimiento o detención del desarrollo (Pedrosa *et al.*, 1996b; Sydenham *et al.*, 1996; Choi *et al.*, 1999). Cualquiera que sea el mecanismo de resistencia presente en frijol, los estudios de penetración indican que éste es del tipo postinfectivo y no actúa inmediatamente después de la penetración, ya que los nematodos siguen entrando en mayor número días después de inoculados, y posiblemente se activen cuando el nematodo se establece en la raíz.

La población de *N. aberrans* procedente de Chapingo se consideraba incapaz de reproducirse en frijol aunque sólo se había probado en el cultivar Negro Querétaro (Toledo, 1990; Toledo *et al.*, 1993), los resultados del presente estudio confirman que aun cuando no se reproduce en éste y en los cultivares Azufrado, Canario, Ejotero, Jamapa y Flor de Mayo, la población Chapingo del nematodo tiene la capacidad de penetrar en las raíces y mantenerse ahí. Céspedes *et al.*, (1998) consideran como no hospederas eficientes a las plantas que no se agallan pero en las que sí hay penetración excesiva y establecimiento pero no desarrollo ni reproducción del nematodo.

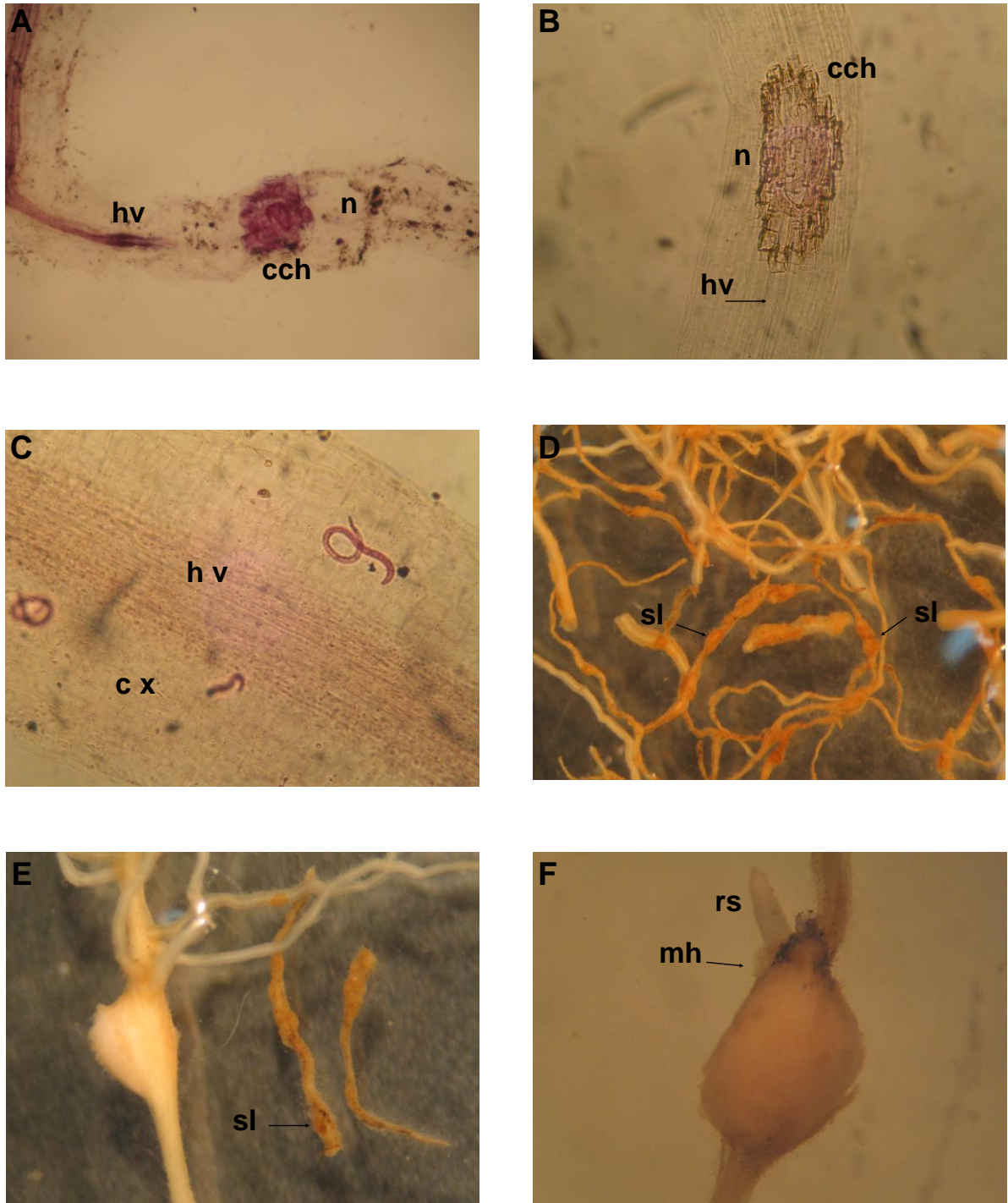


Figura 24. Presencia de *N. aberrans* población Chapingo (A) y población Tecamachalco (B) en raíces de frijol cv Querétaro Negro a 105 d.d.i.; (C) juveniles segundo estadio (J₂) de *N. aberrans* población Chapingo a 3 d.d.i en cv Querétaro negro; (D) sitios de lesión de *N. aberrans* población Chapingo en raíces de frijol cv Querétaro negro a 105 d.d.i.; (E) raíces de frijol cv Canario mostrando agallas y sitios de lesión de *N. aberrans* población Tecamachalco a 105 d.d.i; (F) agalla igual que en (E); cch = células corticales hipertrofiadas, cx = córtex, hv = haz vascular, mh = masa de huevecillos, n = nematodo, rs = raíz suplementaria, sl = sitio de lesión.

4.5. Experimento 5. Reproducción de *N. aberrans* población Tecamachalco en dos cultivares de frijol

La población Tecamachalco de *N. aberrans* no se reprodujo ni provocó agallamiento en las raíces del cv Negro Querétaro, tal como se esperaba de la información bibliográfica (Toledo., 1989; Toledo *et al.*, 1993; Hernández, 2001); contrariamente a lo esperado con el cv Canario, del cual se ha reportado que es susceptible a esta población (Silva-Jaramillo, 1989); sin embargo, en el presente estudio el factor de reproducción y el índice de agallamiento en este cultivar fue cercano a cero ya que se encontraron muy pocas agallas y masas de huevecillos.

La tinción de las raíces reveló la presencia de estadios juveniles avanzados del nematodo en raíces secundarias y terciarias de ambos cultivares (figura 24B), muy similares a los encontrados en los cultivares parasitados por la población Chapingo, con raíces con diferentes grados de lesión, algunas de las cuales se mostraban secas o con un color pardo como posible resultado de procesos de oxidación pero mantenían la estructura hiperplásica que resguardaba al nematodo (figura 24E).

El número de agallas presentes en las raíces del cv Canario fue de 1 a 2 por planta, con una longitud de 3 a 5 mm, y con algunas raicillas suplementarias; en algunos casos con pequeñas masas gelatinosas con 100 a 300 huevecillos cada una, por lo que el valor del factor de reproducción fue cercano a cero (figura 24E, F); este material fue fijado y preparado para estudios histológicos e histoquímicos complementarios al experimento 2.

Los parámetros estadísticos básicos del número de juveniles de *N. aberrans* población Tecamachalco presentes en las raíces de ambos cultivares de frijol al final del experimento (105 ddi) se muestran en el cuadro 21 y en la figura 25.

Ambos cultivares mostraron valores de dispersión altos, principalmente en el cv Negro Querétaro, con una media numericamente mayor en el cv Canario lo que sugiere cautela en la interpretación de los resultados. El análisis de varianza para esta variable se muestra en el Apéndice 22 y no mostró diferencias significativas entre cultivares.

Cultivar	estadístico						
	Media	Varianza	Desviación estandar	Mínimo	Máximo	Rango	Coficiente de variación
CNR	2877.67	264252.0	514.06	2424	3436	1012	17.86
NQ	2366.33	273 x 10 ⁹	1651.99	816	4104	3288	69.81

Cuadro 21. Estadísticos básicos del número de juveniles presentes a 105 días después de inoculados con 15000 huevecillos de *N. aberrans* población Tecamachalco en dos cultivares de frijol (*P. vulgaris*). CNR = Canario; NQ = Negro Querétaro. * Promedio de 3 plantas.

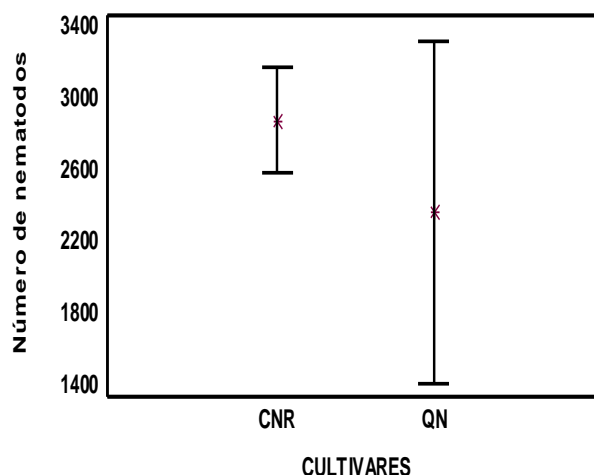


Figura 25. Número de nematodos presentes por sistema de raíz en cultivares de frijol inoculados con 15000 huevecillos de *N. aberrans* población Tecamachalco a 105 días después de la inoculación. NQ = cv Negro Querétaro, CNR = cv Canario; valores promedio de tres repeticiones

La población Tecamachalco ha sido reportada que se reproduce en los cultivares Canario 107, Canario 1087II, Puebla 458 y Black Valentine (Silva-Jaramillo, 1989; Zamudio *et al.*, 1990), mientras que los cultivares Bayo INIFAP, Bayo Macentral, Flor de Mayo, Flor de Mayo M38, Negro San Luis y Río Grande han mostrado que no son hospederos de esta población (Hernández, 2001). En otros cultivares como Amarillo

Calpan, Negro Puebla y Negro Querétaro los resultados no son concluyentes ya que Silva-Jaramillo (1989) y Toledo (1990) consideran que sí se reproducen en dichos cultivares mientras que Hernández (2001) afirma lo contrario.

El cv Canario presentó algunas agallas con hembras adultas de *N. aberrans* población Tecamachalco que comenzaban a depositar huevecillos a los 105 ddi lo que sugiere por un lado que el ciclo de huevecillo a huevecillo de los nematodos de esta población dura más de 100 días en frijol, y por otra parte son evidencias de la existencia de individuos en la población Tecamachalco que son capaces de crecer y reproducirse en este cultivo, y que se mantienen como restos del potencial que posiblemente tenía esta población cuando fue colectada por primera vez ya que tiene tiempo de haber sido obtenida y se ha mantenido desde entonces en invernadero y no ha sido renovada, lo que tal vez a disminuido su patogenicidad, tal como se ha observado sucede en poblaciones de *Meloidogyne* spp. en tales condiciones (Roberts, 1995), por lo que cualquier inferencia que pudiera hacerse con respecto a la población o a los cultivares empleados debe tomarse con reserva.

La población Tecamachalco de *N. aberrans* no puede reproducirse en el cultivar Negro Querétaro, pero presentó una invasión muy alta de juveniles en raíces hasta terciarias. Toledo (1990) consideró a este cultivar como una planta diferencial para la separación de razas ya que poblaciones poblanas del nematodo, incluida Tecamachalco, pueden desarrollarse en él mientras que poblaciones procedentes de Actopan, Cuautla y Chapingo no lo hacen.

Considerando que la resistencia se define como la capacidad de una planta para detener, inhibir o retrasar el desarrollo o reproducción de un nematodo (Rhode, 1972; Huang, 1985b; Canto, 1985) podría calificarse a los cultivares Canario y Negro Querétaro como resistentes a la población Tecamachalco de *N. aberrans*, sin embargo, como ya se mencionó con anterioridad hay que tener cautela con esta aseveración debido a que el inóculo empleado no fue actualizado. Por otra parte, el cv Canario fue considerado como susceptible a la población Tecamachalco por Silva –Jaramillo (1989), por lo que esta aparente contradicción en los resultados haya sido debido a que el cultivar empleado en el presente estudio fue criollo y no mejorado (ya descartado del mercado) como el probado por Silva – Jaramillo (1989).

V. DISCUSIÓN GENERAL

Los experimentos llevados a cabo en el estudio de reproducción mostraron que la población Chapingo de *N. aberrans* no se reprodujo en ninguno de los cultivares de frijol con los que fue confrontada, aunque sí penetra y se establece en sus raíces, mientras que la población Tecamachalco no se reproduce en el cv Negro Querétaro, aunque lo hace parcialmente en el cv Canario donde forma agallas y sincicios bien desarrollados después de 105 ddi. Ambas poblaciones causan las mismas alteraciones histopatológicas en los cultivares Negro Querétaro y Canario a 15, 45 y 90 ddi, y afectan la intensidad de las bandas que se obtienen en los perfiles cromatográficos de los extractos de la raíz de los cultivares de frijol empleados, lo que sugiere por un lado que el nematodo afecta el metabolismo de la raíz y por otro, la existencia de diferencias fisiológicas entre las poblaciones del nematodo.

Las generalizaciones obtenidas del estudio histológico y reproductivo señalan que los cultivares de frijol utilizados en el presente estudio son resistentes a ambas poblaciones de *N. aberrans*. Diversos autores han observado que la resistencia en frijol y soya a *Meloidogyne* spp. se manifiesta como una inhibición del crecimiento y desarrollo de la hembras (Omweaga y Roberts, 1992; Mojtaheda *et al.*, 1995; Pedroza *et al.*; 1996b). Si efectivamente los cultivares de frijol empleados en este estudio son “resistentes” o “no huéspedes eficientes” (Céspedes *et al.*, 1993) se podría considerar que lo son por inhibición del desarrollo del nematodo por mecanismos postinfectivos, ya que hay penetración y establecimiento del nematodo sin reproducción en los cultivares empleados en este estudio.

Las bases genéticas de la resistencia a nematodos fitoparásitos han sido determinadas en numerosos cultivos (Fassuliotis, 1987; Omweaga *et al.*, 1989; Roberts, 1992). Para el frijol se ha detectado la presencia de dos mecanismos genéticos de resistencia contra el nematodo nodulador *Meloidogyne* spp, uno determinado por dos o más genes recesivos que confieren resistencia contra las razas 2, 3 y 4 de *Meloidogyne incognita* y otro determinado por un gen dominante que confiere resistencia contra la raza 1 de *M. incognita*, *M. javanica* y las razas 1 y 2 de *M. arenaria* por lo que es posible que en el germoplasma de frijol que hay en nuestro país se encuentren mecanismos de resistencia a *Nacobbus aberrans* similares y que en los cultivares ensayados en el presente estudio, el mecanismo de resistencia manifestado tal vez sea el mismo pero con diverso grado de intensidad.

N. aberrans tiene un alto número de hospederos (Cornejo, 1977; Inserra *et al.*, 1985; Zamudio *et al.*, 1990; Manzanilla *et al.*, 2002) y existe una gran variabilidad entre y dentro de sus poblaciones tanto morfológica como posiblemente fisiológica, tal que se ha propuesto la existencia de razas fisiológicas o patotipos (Inserra *et al.*, 1985; Costilla, 1992; Jatala, 1993; Toledo *et al.*, 1993; Cid del Prado *et al.*, 1997; Manzanilla-López *et al.*, 2002).

La presencia de razas en las poblaciones de *N. aberrans* en México no ha sido esclarecida del todo (Manzanilla *et al.*, 2002), y con respecto al frijol, sólo la población procedente de Zacatecas ha probado su capacidad para crecer en algunos cultivares (Hernández, 2001); sin embargo, se está aún lejos de tener una certeza sobre la presencia de una verdadera raza frijolera del nematodo.

La población Tecamachalco empleada en el presente estudio fue colectada en dicha región donde se realizaron evaluaciones que confirmaron que puede reproducirse en el cultivar de frijol Canario (Silva-Jaramillo, 1989) aunque en el presente estudio la reproducción en dicho cultivar fue casi nula, es muy posible que sea debido a que el inóculo empleado más que una población debe ser considerada como un aislado cuyo mantenimiento bajo condiciones de invernadero por mucho tiempo en la ENCB alteró su capacidad parasítica; sin embargo, la presencia de genotipos del nematodo que forman agallas y se reproducen, aunado a la capacidad que tienen de formar sincicios bien desarrollados que ocupan más del 50% del volumen de la agalla, permiten considerar que la población original fue capaz de crecer bien en frijol, y que los resultados que encontró Hernández (2001) se deben a que actualmente las condiciones agrícolas de la zona de Tecamachalco han cambiado.

La presencia del nematodo y su efecto en la raíz de los cultivares estudiados se manifestó como cambios en la intensidad de las bandas en el perfil cromatográfico de los extractos, algunos desde la primera fecha de estudio, lo que sugiere que desde el inicio de la interacción de la planta con el nematodo hay alteraciones metabólicas que se manifiestan en aumentos y decrementos en la síntesis y acumulación de compuestos; varios estudios han demostrado que la presencia de *N. aberrans* en plantas infectadas disminuye la conductancia estomática, la temperatura de la hoja, la fotosíntesis y los niveles de algunos elementos minerales (Hernández, 1990; Rojas *et al.*, 1993; Zavaleta-Mejía *et al.*, 1995; Cristobal-Alejo *et al.*, 2001b). Las generalizaciones obtenidas de los resultados obtenidos en el estudio fitoquímico concuerdan con lo

mencionado por varios autores que consideran que el nematodo provoca una serie de cambios en varios aspectos del metabolismo de la planta (Taylor y Sasser, 1983; Hussey, 1985).

Una observación notable en los resultados es la coincidencia que existe entre la presencia de bandas que aumentan su acumulación en la segunda fecha de la interacción frijol – nematodo de la población Tecamachalco con la lignificación que ocurre en las células que rodearon las cavidades en las que se encontró el nematodo. Giebel (1970 citado por Giebel 1982) ha documentado la formación de lignina en raíces de papa resistentes a *Globodera rostochiensis* como resultado de un incremento en la actividad oxidasa de algunas enzimas.

El tiempo de duración del ciclo de vida de *N. aberrans* ha sido documentado y dependiendo del huésped y de la temperatura, a 25 °C dura 30 días en remolacha (Inserra *et al.*, 1985) y 36 días en jitomate (Prasad y Webster, 1967); Jatala (1985) menciona que en papa dura de 25 a 50 días. Castillo (1982) hizo un estudio histopatológico y encontró hembras inmaduras formando el sincicio a 30 ddi y hembras depositadoras de huevecillos, con sincicios bien desarrollados a 60 ddi en chile. Manzanilla-López *et al.*, (2002) mencionan que en general el ciclo de vida de este nematodo dura de 28 a 95 días. La longitud del ciclo de vida de *N. aberrans* varía dependiendo de la temperatura y del huésped (Prasad y Webster, 1967; Inserra *et al.*, 1983).

En el presente estudio los resultados señalan que el ciclo de vida de los pocos individuos de la población Tecamachalco de *N. aberrans* que fueron capaces de reproducirse en el cultivar de frijol Canario se alarga, y la reproducción quizá empezaba a realizarse a los 105 ddi; si se considera que la inoculación de las plantas se realizó a 30 días después de germinadas y fueron desenraizadas a los 135 días (en general el ciclo biológico de frijol dura 120 días) y además que la inoculación se realizó con huevecillos en vez de juveniles J₂ y que éstos tardan aproximadamente de 7 a 10 días en eclosionar, es posible que el nematodo tuviera 90 - 95 días en el interior de la raíz y le haya faltado tiempo para lograr una mayor producción de huevecillos; también es de considerar que dada la naturaleza del inóculo, en la raíz hubo nematodos de diferente edad, algunos de ellos con el potencial para formar agallas y reproducirse. Hernández (2001) encontró reproducción de *N. aberrans* población Zacatecas a 112 días después de inoculados en algunos cultivares de frijol; el inóculo empleado fueron J₂

en plantas de ocho días de germinadas y analizadas al final del periodo de crecimiento del frijol (120 días).

Los resultados histopatológicos y fitoquímicos realizados son descriptivos de la serie de cambios que el nematodo realiza a través del tiempo en una interacción incompatible en Negro Querétaro confrontado con las poblaciones Chapingo y Tecamachalco y como compatibles en el caso de los individuos de esta población que forman las agallas y sincicios presentes en el cv Canario.

El conocimiento detallado de los cambios que ocurren en la interacción frijol – *N. aberrans* debe realizarse en cultivares susceptibles al nematodo, con poblaciones del nematodo que ciertamente se reproduzcan bien en el cultivar y con un conocimiento detallado del tiempo de duración del ciclo de vida del nematodo en esta planta, además de la inoculación con estadios juveniles más que con huevecillos, lo que implica buscar las mejores condiciones de eclosión de huevecillos ya que los niveles de eclosión que se tienen en condiciones de laboratorio así como la proporción de nematodos que penetran en las raíces son muy bajas (observación personal), aunado a que la puesta de huevecillos son de tamaño pequeño comparado con las obtenidas en algunas especies de *Meloidogyne*.

VI. CONCLUSIONES

Experimento 1. Cambios histológicos en raíces de dos cultivares de frijol parasitados por dos poblaciones de *N. aberrans*

Las poblaciones Chapingo y Tecamachalco de *N. aberrans* provocan la misma reacción histopatológicas en los cultivares Negro Querétaro y Canario a 15, 45 y 90 días después de la inoculación, la cual se manifiesta con la presencia de células corticales hipertrofiadas, con citoplasma denso, con paredes engrosadas y lignificadas que limitan las cavidades que encierran al nematodo, el cual detiene su desarrollo en estadios J₃ y J₄.

Hubo individuos en la población Tecamachalco que a 105 días después de inoculados agallaron la raíz y formaron sincicios sacciformes multinucleados, con citoplasma denso, con rompimiento de paredes y nucleólos prominentes, y que invaden y desorganizan el estele.

Los sincicios crecieron por incorporación de células corticales hiperplásicas aunque se observaron núcleos polarizados que indicaron mecanismos de endoreplicación.

Experimento 2. Cambios químicos en las raíces de dos cultivares de frijol inoculados con *N. aberrans* población Chapingo

Los nematodos de *N. aberrans* población Chapingo afectan de manera diferente la síntesis y/o acumulación de compuestos en las raíces de los dos cultivares.

El principal efecto de los nematodos en la raíz del cultivar Azufrado fueron incrementos en la intensidad de la banda que fueron resultado de una mayor síntesis y acumulación de compuestos por aceleración o activación de rutas metabólicas en la raíz.

El cv Negro Querétaro experimentó principalmente efectos de disminución en la intensidad de las bandas que resultaron del catabolismo de los compuestos presentes en ellas por parte de la planta y/o el nematodo.

Experimento 3. Cambios químicos en las raíces de dos cultivares de frijol inoculados con *N. aberrans* población Tecamachalco

Fitoquímicamente los cultivares Canario y Negro Querétaro son afectados de manera diferente por nematodos de *N. aberrans* población Tecamachalco.

El cultivar Negro Querétaro presentó un mayor número de bandas sin cambios que el cultivar Canario, y aun cuando el principal efecto del nematodo en ambos cultivares fue el adelanto de fecha en la aparición de máxima intensidad de la banda por una mayor concentración de compuestos como resultado de la aceleración de los procesos metabólicos así como por inducción de algunas rutas de síntesis que se activan en la planta cuando es parasitada por el nematodo, estas ocurren en mayor número en el cultivar Canario.

Experimento 4. Reproducción de *N. aberrans* población Chapingo en diversos cultivares de frijol

N. aberrans población Chapingo penetró y se estableció sin inducir agallamiento ni mostrar reproducción en los cultivares Azufrado, Canario, Ejotero, Flor de Mayo, Jamapa y Negro Querétaro por lo que estos cultivares pueden considerarse como resistentes a esta población.

No hay mecanismos de resistencia preinfectivos a *N. aberrans* población Chapingo en los cultivares Azufrado, Canario, Ejotero, Flor de Mayo, Negro Jamapa y Negro Querétaro que impidan la penetración de los nematodos en las raíces.

Experimento 5. Reproducción de *N. aberrans* población Tecamachalco en dos cultivares de frijol

La población Tecamachalco de *N. aberrans* indujo poco agallamiento y se reprodujo poco en el cv Canario y no puede hacerlo en el cv Negro Querétaro.

N. aberrans población Tecamachalco tiene un ciclo de vida de huevo a huevo que dura más de 100 días en el cv Canario a 25 – 30 °C en condiciones de invernadero.

VII. CONCLUSIÓN GENERAL

Las poblaciones Chapingo y Tecamachalco de *N. aberrans* afectan de manera diferente el metabolismo de las raíces de frijol, desencadenando mecanismos de incompatibilidad que actúan después de la infección al inhibir el desarrollo del nematodo y aislándolo en cavidades en el córtex limitadas por células modificadas. De esta manera se evita que los nematodos alcancen el estado adulto y puedan reproducirse; sin embargo, en la población Tecamachalco existen individuos que pueden vencer estos mecanismos y desarrollarse lentamente, formando agallas y sincicios bien desarrollados y reproduciéndose a los 105 días después de inoculados.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Aceves - Rodríguez, J.J. 1988. Enfermedades del frijol en México. En D. Teliz (Ed). "Enfermedades del maíz, frijol, trigo y papa". Colegio de Posgraduados. Centro de Fitopatología, Montecillos, Edo de México; México. Pp: 24-52

Acosta-Gallegos, J.A. 1993. Frijol. En F. Márquez (Ed). "Producción y genotecnia de plantas autógamias". AGT Editor S.A. Chapingo, México: 272p

Acosta, G.J.A.; J.S. Muruaga M. y F. Cárdenas R. 1991. Utilización y disponibilidad de recursos genéticos de *Phaseolus vulgaris* en México. En P. Ortega P., G. Palomino H.F. Castillo G., V.A. González H. y M. Livera M. (Eds). "Avances en el estudio de los recursos fitogenéticos en México". Sociedad Mexicana de Fitogenética, Chapingo, México. Pp: 187-196

Aguilar, S.P. 1994. Histopatología comparada de las agallas producidas por *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen, 1944 en jitomate *Lycopersicon esculentum* Mill. y en maleza asociada. Tesis Biólogo. ENCB-IPN. México: 45p

Agrios, G.N. 1985. Fitopatología. Ed. ED. LIMUSA. México. 838p

Anaya-Lang, A.L. 2003. Ecología química. Plaza y Valdés S.A. de C.V. México: 349p

Bell, A.A. 1981. Biochemical mechanisms of disease resistance. Ann. RSC Plant Physiology 32: 21-81

Bell, A.A.. 1991. Interacción de las plagas de las plantas con el ambiente adverso y mejoramiento para la resistencia a las plagas: Enfermedades de las plantas. En M.N. Christiansen y Ch. F. Lewis (Eds). "Mejoramiento de plantas en ambientes poco favorables". Ed. ED. LIMUSA. México: 534p

Besby, F.A., J. Buckinham and J.B. Harborne. 2005. Phytochemical dictionary of the Leguminosae. Vol. I. The plants and their constituents. International Legume Database and Information Service (ILDIS) and Chapman and Hall Chemical Database (CHCD). Chapman and Hall eds. Cambridge, UK. 1051p

Bird A.F. 1974. Plant response to root – knot nematode. Ann. RSC Phytopathol 12: 69-85

- Brauer, H.O. 1983. Fitogenética aplicada. ED. LIMUSA. México: 518p
- Brunner de Magar, P. 1967. Jicamilla del chile causada por un nuevo nematodo y obtención de fuentes de resistencia. *Agrociencia* 2: 76-91
- Caballero E.L. y M. A. Muñoz. 1987. Cuatro fechas de siembra e histopatología de tres variedades de espinaca (*Spinacea oleracea* L.) al ataque del nematodo falso agallador *Nacobbus* sp Thorne y Allen, 1944. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 106p
- Canto-Sáenz, M. 1985. The nature of resistance to *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White, 1919) Chitwood, 1949. In J.N. Sasser and C.C. Carter (Eds). "An advances treatise on *Meloidogyne* Vol I. Biology and Control". Raleigh North Carolina. Pp: 225-231
- Canto-Sáenz, M., M.J.Arcos, P. Jatala, and R. Haddad. 1996. Morphology, Biology, and management of *Nacobbus aberrans* in Peru. *Nematropica* 23:112
- Cárdenas, R.F.A., J.S. Muruaga, y J.A. Acosta. 1991. Catálogo del Banco de germoplasma de *Phaseolus* spp. del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. INIFAP. México: 250p
- Carpentieri-Pípolo, V., J.M.G. Mandarino, M.C. Carrao-PAn.izi, A. Souza, and A. Kikuchi. 2005. Association of isoflavonoids with the incompatible response of soybean roots to *Meloidogyne incognita* race 3. *Nematropica* 35(2): 103-110
- Carrillo, A.M. 1998. La cocina del tomate, frijol y calabaza. Segunda serie de "La Cocina mexicana a través de los siglos". Ed. Clío. México: 97p
- Carvajal-Sandoval, A. 1991. Manual de Histología Vegetal. Depto. de Botánica Fanerogámica Secc. de Anatomía Vegetal. ENCB-IPN. México. 31p
- Castillo, P.G. 1982. Histopatología y desarrollo de *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen, 1944, en raíces de *Capsicum annuum* y *C. baccatum*. Tesis M. en C. Esp. En Fitopatología. Colegio de Posgraduados. Chapingo, Edo. de México, México. 68p
- Castillo, P.G. y N. Marbán - Mendoza. 1984. Histopatología y desarrollo de *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen, 1944, en raíces de *Capsicum annuum* y *C. baccatum*. *Agrociencia* 56: 85-93.

Céspedes, L., J. Franco, y R. Montalvo. 1998. Comportamiento de diferentes especies vegetales a la invasión y desarrollo de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne and Allen, 1944. *Nematropica* 28: 165-171

Chitwood, D.J. 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. *Ann. RSC Phytopathol* 40: 221-249

Choi, K., M.D. Burow; G. Church, G. Burow, A.H. Paterson, C.E. Simpson, and J.L. Starr. 1999. Genetics and mechanism of resistance to *Meloidogyne arenaria* in peanut germplasm. *J. of Nematol.* 31 (3): 283-290

Cid del Prado-Vera, I. 1985. Ciclo de vida de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1944. En N. Marbán e I.J. Thomason (Eds). "Fitonematología avanzada I". Colegio de Posgraduados. Montecillo, Edo de México; México:

Cid del Prado-Vera, I. 1986. Morphological study of *Nacobbus* spp. including four populations from México using SEM. *J. of Nematol.* 18(4): 603

Cid del Prado-Vera, I. 1992. Variación morfológica de tres poblaciones mexicanas de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne and Allen, 1944. *Memorias XIX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología*. Saltillo, Coahuila; México: p86

Cid del Prado-Vera, I. 1993. Morphological variation and host test for mexican populations of *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne and Allen, 1944. *Nematropica* 23: 113

Cid del Prado-Vera, I., G.E. Avalos, and K.Evans. 1997. Gama de hospedantes de poblaciones mexicanas de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne and Allen, 1944. *Nematropica* 27: 104

Clark, S. P. 1967. The development and life history of the false root-knot nematode, *Nacobbus serendipiticus*. *Nematologica* 13: 91-101

Cohn, E. and Y. Spiegel. 1991. Root – nematode interactions. In W. Yoav; A. Eshel and U. Kafkafi (Eds). "Plant roots: the hidden half (serie books in soils, plant and environment)". Marcel Dekker Inc. New York: 948p

Cook, R. 1974. Nature and inheritance of nematode resistance in cereals. *J. of Nematol.* 6: 165-174

Cornejo, Q.W. 1977. Host range studies for *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 7: 14

Costilla, M.A. 1990b. Comportamiento e importancia de tres poblaciones de *Nacobbus aberrans* en tomate y pimiento en tres localidades del noroeste de Argentina. *Nematropica* 20(1): 2

Costilla, M.A. 1992. Evaluation of four alternative crops to two pathotypes of the false root.knot nematode *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 22: 120

Costilla, M.A. 1996. Physiological races, parasitism and management of *Nacobbus aberrans* on vegetable and field crops in Argentina. *Nematropica* 26: 199

Cristóbal-Alejo, J., I. Cid del Prado-Vera., N. Marbán-Mendoza, G.P Sánchez, G. Mora-Aguilera y L.R.H. Manzanilla. 2001a. Sobrevivencia de estados biológicos de *Nacobbus aberrans* en condiciones de campo. *Nematropica* 31(2): 227-233

Cristóbal-Alejo, J., I. Cid del Prado, V., N. Marbán-Mendoza, G.P Sánchez, L.R.H. Manzanilla y G. Mora-Aguilera. 200b. Alteraciones nutrimentales en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) por efecto de *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 31(2): 219-226

Cruz, C.M.A. 1987. Distribución del nematodo fitoparásito *Nacobbus aberrans* en una región agrícola entre Actopan y Progreso, estado de Hidalgo. Tesis Biología. ENCB-IPN. México, D.F.

Darvill, A.G. and P. Albersheim. 1984. Phytoalexins and their elicitors – A defense against microbial infection in plants. *Ann. RSC Plant Physiol.* 35: 243-275

Davis. E.L; R.S. Hussey and T.J. Baum. 2004. Getting to the roots of parasitism by nematodes. *Trends in Parasitology* 20 (3): 134-141

Debouck, D. G. 1991. Systematics and morphology. In A. Van Schoonhoven and O. Voysest (Eds) “ Common beans. research for crop improvement. CAB International and CIAT. U.K.: 980p

Debouck, D.G. 2005. Beans (*Phaseolus* spp.).

[http:// www.hort.purdue.edu/newcrop/1492/beans.html](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/1492/beans.html)

De la Jara, A.F., Zerón F.B y Tovar S.A. 1990. Malezas como posibles reservorios de *Nacobbus aberrans* en diversos cultivos de Actopan, Hidalgo, México. *Agrociencia serie Protección vegetal* 1(1): 153-157

De la Jara, A.F., Zerón F.B, Tovar S.A. y Torres C.R. 1994. Manual de prácticas de Nematología agrícola. Depto. de Parasitología ENCB-IPN. México. 107p

De la Torre-Almaraz, R. 1995. Datos del desarrollo del cultivo del frijol en México. En "Diversidad genética y patología del frijol". J. Pérez-Moreno, R. Ferrera-Cerrato y R. García –Espinosa (Eds) Colegio de Postgraduados. Montecillo, Pp: 10-15

Delgadillo-Sánchez, F. 1988a. Enfermedad: "Roya" o "Chahuixtle" del frijol. En "Enfermedades del maíz, frijol, trigo y papa". O.D. Teliz Ed. Colegio de Posgraduados. Centro de Fitopatología, Montecillos, Edo de México; México. Pp: 53-54

Delgadillo-Sánchez, F. 1988 b. Enfermedad: "Mosaico común" del frijol. En "Enfermedades del maíz, frijol, trigo y papa". O.D. Teliz (Ed). Colegio de Posgraduados. Centro de Fitopatología, Montecillos, Edo de México; México. Pp: 55-56

Dixon, R.A. 1986. The phytoalexin response: elicitation, signalling and control of host gene expression. *Biol. RSC* 61: 239-291

Doucet, M.E. 1989. The genus *Nacobbus* Thorne and Allen, 1944 in Argentina I. Study of a population of *Nacobbus aberrans* (Thorne 1935) Thorne and Allen, 1944 on *Chaenopodium album* L. From Rio Cuarto. Province of Cordoba. *Revue de Nematologie* 12: 17-26

Doucet, M.E., and C.E. Gardenal. 1992. The genus *Nacobbus* in Argentina. 4. Preliminary comparisons of populations *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne and Allen, 1944. by means of isoenzyme phenotypes. *Nematropica* 22: 243-246

Doucet, M.E., E.L. Ponce de León and J. Franco. 1994. *Spirigula arvensis* y su asociación con *Nacobbus aberrans* en el cultivo de papa en Bolivia. *Nematropica* 24: 69-72

Doucet, M.E. 1996. Systematics of *Nacobbus* in Argentina. *Nematropica* 26: 202

Dropkin, V.H. 1969. Cellular response of plants to nematode infections. *Ann. RSC Phytopathol* 7: 102-122

Dropkin, V.H. 1989. Introduction to plant Nematology. Jhon Willey and sons (Eds) New York: 304p

Ebel, J. 1986. Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. Ann. RSC Phytopathol 24: 235-264

Endo, B.Y. 1975. Pathogenesis of nematode-infected plants. Ann. RSC Phytopathol 13: 213-238

Endo, B.Y. 1981. Nematode-induced syncytia (giant cells). Host-parasite relationships of heteroderidae. Pp: 91-117. In B.M. Zuckerman, W.F. Mai, R.H. Rohde (Eds). B.M. Zuckerman, W.F. Mai, R.H. Rohde (Eds). "Plant Parasitic Nematodes". Vol. III. Academic Press. New York.

Endo, B.Y. 1987 a. Ultrastructure of esophageal gland secretory granules in juveniles of *Heterodera glycines*. Journal of Nematol. 19 (4): 469-483.

Endo, B.Y. 1987 b. Histopathology and ultrastructure of crops invaded by certain sedentary endoparasitic nematodes. In J.A. Veech and D.W. Dickson (Eds) "Vistas on Nematol." American Society of Nematologist. E.O. Painter Printing Co. De Leon Springs, Florida: 509p

Engleman, E.M. 1979. Contribuciones al conocimiento del frijol (*Phaseolus*) en México. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Edo. de México, México: 140p

Fahn, A. 1978. Anatomía vegetal. H. Blume Ediciones. Madrid. 643p

Filipjev, I. N. 1936. On the classification of the Tylenchinae. Proceedings of the Helminthological Society of Washington 3: 80 - 82

Finetti, S.M. 1990. Histopathological changes induced *Nacobbus aberrans* in resistant and susceptible potato roots. Revue de Nematologie 13: 155-160

Céspedes, y R. Montalvo. 1998. Comportamiento de diferentes especies vegetales a la invasión y desarrollo de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935), Thorne and Allen, 1944. Nematropica 28: 165-171

Fassuliotis, G. 1987. Genetics bases of plant resistance to nematodes. In J.A. Veech and D.W. Dickson (Eds) "Vistas on Nematol." American Society of Nematologist. E.O. Painter Printing Co. De Leon Springs, Florida: 364-371

Franklin, M.T. 1959. *N. serendipiticus* n. sp., a root - galling nematode from tomatoes in England. *Nematologica* 4: 286-293

García-Camargo, J. y G. Trejo. 1995. Daño causado por *Nacobbus aberrans* en tres variedades de frijol. Resúmenes de trabajos del XIII Congreso Nacional de Fitopatología. Guadalajara, Jalisco. *Revista Mexicana de Fitopatología* 13 (2): 154

Garrido-Ramírez, E.R. 1995. Situación de las enfermedades del frijol en el trópico de México. En J. Pérez-Moreno, R. Ferrera-Cerrato y R. García-Espinosa (Eds). "Diversidad genética y patología del frijol". Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo de México; México: 69-78

Gepts, P. 1991. La biotecnología aclara el proceso de domesticación del frijol. *Diversity* 7: 52-53

Gepts, P and D. Debouck. 1991. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris*, L). In A. Van Schoonhoven and O. Voysest (Eds) A. Van Schoonhoven and O. Voysest (Eds) "Common beans. Research for crop improvement". CAB International and CIAT. United King: 980p

Gheysen, G. and C. Fenoll. 2002. Gene expression in nematode feeding sites. *Ann. RSC Phytopathol* 40: 191-219

Giebel, G. 1982. Mechanism of resistance to plant nematodes. *Ann. Rev Phytopathol* 20: 257 - 279

Goellner, M.; X. Wang and E.L.Davis. 2001. Endo - 1, 4 - glucanasa expression in compatible plant – nematode interactions. *The Plant Cell* 13: 2241-2255

Gómez-Tovar, J. 1973. Contribución al estudio de la infestación y difusión del falso nematodo del nudo de Cobb *Nacobbus serendipiticus* Franklin en el Peru. *Nematropica* 3: 4

González, A., J. Franco, and N. Zara. 1989. Ciclo biológico del falso nematodo del nudo *Nacobbus aberrans* en el cultivo de papa. Programas y resúmenes XXI reunión anual ONTA, Tucumán, Argentina.

Guzmán-Plazola, R. García-Espinosa, R.A. Robinson, A. Muñoz-Orozco y J.G. Valenzuela. 1995. Avances en la obtención de resistencia horizontal e frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). En J. Pérez-Moreno, R. Ferrera-Cerrato y R. García –Espinosa (Eds)

“Diversidad genética y patología del frijol”. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo de México; México: 141p

Halfacre, R.G. and J. A. Barden. 1992. Horticultura. AGT Editores. México. 727p

Hammerschmidt, R. 1999. Phytoalexins: What have we learned after 60 years? Ann. RSC Phytopathol. 37: 285-306

Harborne, J.B. 1984. Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis. Chapman and Hall eds. New York: 288p

Herman, M, R.S. Hussey, and H.R. Boerma. 1991. Penetration and development of *Meloidogyne incognita* on roots of resistant soybean genotypes. J. of Nematol. 23 (2): 155-161

Hernández, A.M. 1990. Rompimiento de la resistencia a *Phytophthora capsici* Leo en Chile por *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen, 1944. Tesis Maestría en Ciencias. Fitopatología. Colegio de Posgraduados. Montecillos, Edo de México; México. 83 p.

Hernández, A.J. 1992. Estudio del rango de hospederas hortícola de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen 1944. Tesis Ingeniería Agrícola. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. Cuautitlán, Edo. de México, México: 119p

Hernández, A. J. 2001. Respuesta de genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Nacobbus aberrans*. Tesis M. en C. Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo de México; México. 76p

Hernández-Xolocotzi, E. 1985. Biología agrícola. Los conocimientos biológicos y su aplicación a la agricultura. Consejo Nacional para la enseñanza de la Biología. CECSA. México: 62p

Hernández-Xolocotzi, E., A. Ramos, y M.A. Martínez. 1991. Etnobotánica. En M. Engleman (Ed). “Contribuciones al conocimiento del frijol (*Phaseolus*) en México”. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo de México; México: 140p

Huang, C.S. 1985a. Formation, anatomy and physiology of giant cells induced by root-knot nematodes.. In J.N. Sasser and C.C. Carter (Eds) “An advances treatise on *Meloidogyne* Vol I. Biology and Control”. Raleigh North Carolina. Pp: 156-164

Huang, J.S. 1985b. Mechanism of resistance to root-knot nematodes. In J.N. Sasser and C.C. Carter (Eds) "An advances treatise on *Melodogyne* Vol I. Biology and Control". Raleigh North Carolina. Pp: 165-174

Huang, J.S. and K.R. Barker. 1991. Glyceollin I in soybean-cyst nematode interactions. Spatial and temporal distribution in roots of resistant and susceptible soybeans. *Plant Physiology* 96: 1302-1307

Hung, C.L. and R.A. Rohde. 1973. Phenol acumulation related to resistance in tomato to infection by root-knot and lesion nematodes. *J. of Nematol.* 5: 253-258

Hussey, R.S. 1985. Host-parasite relationship and associated physiological changes. In J.N. Sasser and C.C. Carter (Eds) "An advances treatise on *Melodogyne* Vol I. Biology and Control". Raleigh North Carolina. Pp: 143-153

Ibrahim, S.K., J.G. Baldwin, P.A. Roberts, and B.C.H. HymAnn. 1997. Genetics variation in *Nacobbus aberrans*: An approach toward taxonomic resolution. *J. of Nematol.* 29(3): 241-249

Inserra, R.N.; N. Vovlas; G.D. Griffin and E.D. and J.L. Anderson. 1983. Development of the false root-knot, *Nacobbus aberrans*, on sugarbeet. *J. of Nematol.* 15 (2): 288-296

Inserra, R.N.; G.D. Griffin and E.D. and J.L. Anderson. 1985. The false root – knot nematode *Nacobbus aberrans*. Research Bulletin 510 Utah Agriculture Experiment Station and crops Research Laboratory. Utah State University. Logan, Utah. USA: 14p

Jatala, P. 1993. *N. aberrans* one species or more? *Nematropica* 23: 120

Jatala, P. and A.M. Golden. 1977a. Taxonomic status of *Nacobbus* species attacking potatoes in South America. *Nematropica* 7(2): 9

Jatala, P., M.L. Arens and L. Pretel. 1977b. Se encuentra el nematode de la pudrición de la papa en el Perú por primera vez. *Nematropica* 7(2): 11

Jatala, P. 1985. El nematodo falso nodulador de la raíz. En "Fitonematología avanzada I". N, Marbán - Mendoza and I. Thomason (Eds) Colegio de Posgraduados, Montecillos, Edo de México; México: 47-55

Jatala, P., and R. Haddad. 1992. Histopatology of potato roots infected with *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 22: 127-128

Jatala, P., and T. Boluarte. 1993. Cytogenetics studies of 25 *Nacobbus aberrans* populations from north and south America. *Nematropica* 23: 120

Jatala, P., and R. Haddad. 1993a. Scanning electron microscope examination of cryofractured galls caused by *Nacobbus aberrans* on roots of susceptible potatoes. *Nematropica* 23: 124

Jatala, P., and R. Haddad. 1993b. Histopathological changes due to *Nacobbus aberrans* infection in roots of resistant potato clones. *Nematropica* 23: 122-123

Jenkins, J.N. 1991. Interacción de las plagas de las plantas con el ambiente adverso y mejoramiento para la resistencia a las plagas: Insectos. En M.N. Christiansen y Ch. F. Lewis (Eds). "Mejoramiento de plantas en ambientes poco favorables" ED. LIMUSA. México: 534p

Jones, M.G.K and H.L. Payne. 1977. Scanning electron microscopy of syncytia induced by *Nacobbus aberrans* in tomato roots. *Nematologica* 23: 172-176

Jones, M.G.K. 1981. Host cell responses to endoparasitic nematode attack: structure and function of giant cell and syncytia. *Ann.als of Applied Biology* 97: 353-372

Judd, W.S., Ch.S. Campbell, E.A. Kellogg, P.F. Stevens. 1999. *Plant Systematics: A phylogenetics approach*. Sinauer Associates Inc. Massachusetts, USA: 464p

Kaplan, D.T., N.T. Keen, and I.J. Thomason. 1980a. Association of gliceollin with incompatible response of soybean roots to *Meloidogyne incognita*. *Physiological Plant Pathology* 16: 309-318

Kaplan, D.T., N.T. Keen, and I.J. Thomason. 1980b. Studies on the mode of action of gliceollin in soybean incompatibility to the root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Physiological Plant Pathology* 16: 319-325

Kaplan, D.T. and E.L. Davis. 1987. Mechanims of plant incompatibility with nematodes. In J.A. Veech and D.W. Dickson (Eds). "Vistas on Nematol.". American Society of Nematologist. Painter Printing Co. De Leon Springs, Florida: 267-276p

Kosuge, T. 1969. The role of fenolics in host response to infection. *Ann. RSC of Phytopathol* 7: 195-222

Krusberg, L.R. 1963. Host response to nematode infection. Ann. RSC Phytopathol 1: 219-240

Lépiz, I.R. 1986. Enfermedades del frijol en México. Revista Mexicana de Fitopatología 4(2): 176:181

Lépiz - Ildefonso, R. 1999. La contribución de la Fitopatología al mejoramiento de los cultivos agrícolas. El caso frijol. Ponencia presentada en el Simposio: Contribución de la Fitopatología al mejoramiento de los cultivos agrícolas. XXV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Revista Mexicana de Fitopatología 17 (1): 54-72.

Lewis, S.A. 1987. Nematode-Plant compatibility: 246-252. In J.A. Veech and D.W. Dickson (Eds) "Vistas on Nematol.". American Society of Nematologist. Painter Printing Co. De Leon Springs, Florida: 509p

Liu, S.D., M. Norris, E.E. Hartwig, and M. Xu. 1992. Inducible phytoalexins in juvenile soybean genotypes predict soybean resistance in the fully developed plants. Plant Physiology 100: 1479-1485

López-Curto, M.L., J. Márquez-Guzmán y G. Murguía-Sánchez. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en Angiospermas. Coordinación de Servicios Editoriales de la Facultad de Ciencias, UNAM, México: 178p

Lordello, L.G.E.; A.P.L. Zamith and O.J. Boock. 1961. Two nematodes found attacking potato in Cochabamba, Bolivia. Anais da Academia Brasileira de Ciencias 33: 209-215

Luc, M. 1987. A reappraisal of Tylenchina (Nemata).7. The family Pratylenchidae Thorne, 1949. Revue de Nematologie 10: 203-208

Manzanilla-López, R.H.; M.A. Costilla; M. Doucet; J. Franco; R.N. Inserra; P.S. Lehman; I. Cid del Prado-Vera; R.M. Souza and K. Evans. 2002. The genus *Nacobbus* Thorne y Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): Systematics, distribution, biology and management. Nematropica 32(2): 149-227.

Martínez-Alemán, J. 1988a. Producción de una variedad de frijol tipo "Flor de Mayo" resistente al virus del mosaico común del frijol (VMCF). En O.D. Teliz (Ed). "Enfermedades del maíz, frijol, trigo y papa". Colegio de Posgraduados. Centro de Fitopatología, Montecillos, Edo de México; México. Pp: 57-58

Martínez-Alemán, J. 1988 b. Producción de una variedad de frijol tipo “Flor de Mayo” resistente a la roya *Uromyces phaseoli* (Pers.) Wint var. *typica* Arth. En O.D. Teliz (Ed). “Enfermedades del maíz, frijol, trigo y papa”. Colegio de Posgraduados. Centro de Fitopatología, Montecillos, Edo de México; México. Pp: 58-59

Martínez, .R., R. Torres, A. Tovar, F. de la Jara y F. Zerón. 1995. Reproducción y número cromosómico de dos poblaciones de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne and Allen, 1944. Revista Mexicana de Fitopatología 13: 154

Miranda, C.S. 1967. Origen de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común). Agrociencia 1(2): 99-109

Miranda, C.S. 1991. Evolución de *Phaseolus vulgaris* y *P. coccineus*. En M. Engleman (Ed). “Contribuciones al conocimiento del frijol (*Phaseolus*) en México”. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo de México; México: 140p

Mojtahedi, H. C.R. Brown, and G.S. Santo. 1995. Characterization of resistance in a somatic hybrid of *Solanum bulbocastanum* and *S. tuberosum* to *Meloidogyne chitwoodi*. J. of Nematol. 27(1): 86-93

Montes, B.R. 1979. Avances de la Nematología en México. SARH. CSAT. México.

Mundo-Ocampo, M. 1985. Cambios celulares inducidos por algunos géneros de la familia Heteroderidae en sus hospedantes. En N, Marbán - Mendoza and I. Thomason (Eds). “Fitonematología avanzada I”. Colegio de Posgraduados, Montecillos, Edo de México; México: 37-45

Muñoz-Orozco, A., S. Miranda-Colín y L.M. Serrano Covarrubias. 1995. Diversidad genética y resistencia a factores adversos en frijol. En “Diversidad genética y patología del frijol”. J. Pérez-Moreno, R. Ferrera-Cerrato y R. García –Espinosa (Eds) Colegio de Postgraduados. Montecillos, Edo de México; México: 141p.

Mullin, B.A.; Abawi and M.A. Pastor-Corrales. 1991. Modification of resistance expression of *Phaseolus vulgaris* to *Meloidogyne incognita* by elevated soil temperatures. J. of Nematol. 23: 182-187

Muruaga-Martínez, J.S., J.A. Acosta - Gallegos y J.R. Aguirre - Rivera. 1995. Enfoque etnobotánico para la búsqueda de fuentes de resistencia a patógenos del frijol común. En J. Pérez-Moreno, R. Ferrera-Cerrato y R. García–Espinosa (Eds).

“Diversidad genética y patología del frijol”. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Edo de México; México: 141p.

Nicholson, R.L., and R. Hammerschmidt. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Ann. RSC Pytopathology* 30: 369-389

Niebel, A.; G. Gheysen and M. Van Montagu. 1994. Plant-cyst nematode and plant- root-knot nematode interactions. *Parasitology Today* 10(11): 424-429.

Ngundo, B.W. and D.P. Taylor. 1974. Effects of *Meloidogyne* spp. on bean yields in Kenya. *Plant Disease Reporter* 58: 1020-1023

Olvera, .S., F. Zerón, F. de la Jara, R. Torres, y A. Tovar. 1995. Comparación de patrones proteínicos en dos poblaciones de *Nacobbus aberrans*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 13: 154

Omweaga, C.O., I.J. Thomason, P.A. Roberts, and J.G. Waines. 1989. Identification of new sources of resistance to root-knot nematodes in *Phaseolus*. *Crop Science* 29: 1463-1468.

Omweaga, C.O. and P.A. Roberts. 1992. Inheritance of resistance to *Meloidogyne* spp. in common bean and the genetics bases of its sensitivity to temperature. *Theoretical and Applied Genetics*. 83: 720-726.

Ortega, .M.L., C. Rodríguez C. y E. Hernández X. 1976. Análisis químico de 68 genotipos del género *Phaseolus* cultivados en México. *Agrociencia* 24: 23-42

Ortega, M.L. 1991. Bioquímica. En M. Engleman (Ed). “Contribuciones al conocimiento del frijol (*Phaseolus*) en México”. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo de México; México: 140p

Ortiz - Valdéz, M. 1998. El frijol en el estado de Zacatecas. Sistema de Orientación y Comunicación Social del Gobierno del Estado de Zacatecas (Edit). Zacatecas, México: 181p

Otazú, V.R.; R. Hoopes; G. Caero and I. Huayta. 1985. El rosario de la papa causado por *Nacobbus aberrans* (Thorne 1935) Thorne y Allen, 1944, su efecto en el rendimiento y algunos aspectos que inciden en su propagación y prevalencia en Bolivia. *Nematropica* 27: 118

Pedrosa, E.M.R., R.S. Hussey, and H.R.Boerma. 1996a. Cellular response of resistant and susceptible soybean genotypes infected with *Meloidogyne arenaria* races 1 and 2. J. of Nematol. 28 (2): 225-232

Pedrosa, E.M.R., R.S. Hussey, and H.R.Boerma. 1996b. Penetration and post-infectional development and reproduction of *Meloidogyne arenaria* races 1 and 2 on susceptible and resistant soybean genotypes. J. of Nematol. 28 (3): 343-351

Ponce de León, E.J. and M. Doucet. 1989. The genus *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen, 1944 in Argentina. 2. Asociation between *Nacobbus aberrans* (Thorne 1935) Thorne y Allen, 1944 and the weed *Sysimbrium irio*. L. Revue de Nematologie 12: 269-271

Potenza, C.L, S.H. Thomas, E.A. Higgins, and C. Sengupta-Gopalan. 1996. Early root response to *Meloidogyne incognita* in resistant and susceptible alfalfa cultivars. J. of Nematol. 28 (4): 475-484

Prasad, S.K.; J.W. Webster. 1967. Effect of temperature on the rate of development of *Nacobbus serendipiticus* in excised tomato roots. Nematologica 13: 85.90

Quimí, V.P. 1981a. Histopathological study of the parasitism of *Nacobbus aberrans*. Nematropica 11: 87

Quimí, V.P. 1981b. Biological cycle and behavior of *Nacobbus aberrans* (XIII Ann. Meet. OTAN. Guayaquil, Ecuador) Nematropica 11: 87 Abs

Reid, A., R.H. Manzanilla-López, and D.J. Hunt. 2003. *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne and Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae), a nascent species complex revealed by RFLP analysis and sequencing of the ITS-rDNA region. Nematology 5(3): 441.451

Reyes, C.P. 1985. Fitogenotécnia básica y aplicada. AGTEditor, S.A. México: 460p

Roberts, P.A. 1992. Current status of the availability, development, and use of host plant resistance to nematodes. J. of Nematol. 24(2): 213-227

Roberts, P.A. 1995. Conceptual and practical aspects of variability in root-knot nematodes related to host plant resistance. Ann. RSC Phytopathol 33: 199-221

Rohde, R.A. 1972. Expression of resistance in plants to nematodes. *Ann. Rev of Phytopathol* 10: 233-252

Rojas, M.R.I., E. Zavaleta-Mejía, y N.T. Sánchez. 1993. Efecto de *Nacobbus aberrans* en el contenido relativo de agua, transpiración y fotosíntesis en plantas de jitomate. *Memorias XI Congreso Nacional de Fitopatología*, Zacatecas, México: 101

Santa-Cruz, V.H. and Marbán-Mendoza. 1986. Asociación de *Nacobbus aberrans* a tres variedades de alegría *Amaranthus hypochondriacus*. Pp 186-192 En "El Amarantho. *Amaranthus* sp (alegría), su cultivo y aprovechamiento". Chapingo, México:

Sasser, J.N. 1972. Physiological variation in the genus *Meloidogyne* as determined by differential hosts. *OEPP/EPO Bull.* 6: 41-48

Sasser, J.N. 1991. Interacción de las plagas de las plantas con el ambiente adverso y mejoramiento para la resistencia a las plagas: nematodos. En M.N. Christiansen y Ch. F. Lewis (Eds). "Mejoramiento de plantas en ambientes poco favorables" Ed. LIMUSA. México: 534p

Sasser, J.N. and C.C. Carter. 1985. An Advances treatise on *Meloidogyne*. Vol. I. Biology and control. Raleigh North Carolina State University Graphics:

Seinhorst, J.W. 1959. A rapid method for the transport of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica* 4: 67-69

Schuster, M.L. and G. Thorne. 1956. Distribution, relation to weeds, and histology of sugar beet root galls caused by *Nacobbus batatiformis* Thorne and Schuster. *Jour of the American Society of Sugar Beets Technology* 13: 523-537

Schuster, M.L. and T. Sullivan. 1960. Species differentiation of nematodes through host reactions in tissue culture I. Comparisons of *Meloidogyne hapla*, *Meloidogyne incognita* and *Nacobbus batatiformis*. *Phytopathol* 50: 874-876

Schuster, M.L.; R. Sandstedt and L.W. Estes. 1964. Starch formation induced by a plant parasitic nematode. *Science* 143: 1342-1343

Schuster, M.L.; R. Sandstedt and L.W. Estes. 1965. Host-parasite relations of *Nacobbus batatiformis* and the sugarbeet and other host. *Jour of the American Society of Sugar Beet Technology* 6: 523-537

Sepúlveda-Jiménez, G., H. Porta-Ducoing, y M. Rocha-Sosa. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 355-363

Serrano-Covarrubias, L.M. 2004. Análisis del caso frijol. Universidad Autónoma Chapingo. [http://www. fitotecnia.uach.gob.mx](http://www.fitotecnia.uach.gob.mx)

Sher, S.A. 1970. Revision of the genus *Nacobbus* Thorne and Allen, 1944 (Nematoda: Tylenchoidea). *J. of Nematol.* 2: 228-235

SIAP. SAGARPA (Servicio de información estadística agroalimentaria y pesquera).. Situación actual y perspectiva del frijol en México. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/Publicaciones/archivos/Frijol00-05>

Sijmons, P.C.; H.J. Atkinson; and U. Wyss. 1994. Parasitic strategies of root nematodes and associated host cell response. *Ann. RSC Phytopatology* 32: 235-259

Silva - Jaramillo, J. 1989. Manejo de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne and Allen, 1944, asociado al cultivo del frijol en el Valle de Valsequillo, Puebla. Tesis M. en C. Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo de México; México. 68 pp

Sing, S.P. 1995. Estrategias del Centro Internacional de Agricultura Tropical para manejar las enfermedades del frijol mediante la resistencia genética. En J. Pérez-Moreno, R. Ferrera-Cerrato y R. García-Espinosa (Eds). “Diversidad genética y patología del frijol”. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo de México; México: 141p

Singh, B, and B. Choudhury. 1973. The chemical characteristics of tomato cultivars resistant to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Nematologica* 19: 443-448

Solano - Vidal, R. 1995. La resistencia vertical como estrategia en el manejo de enfermedades. En J. Pérez-Moreno, R. Ferrera-Cerrato y R. García-Espinosa (Eds). “Diversidad genética y patología del frijol”. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo de México; México: 141p

Soriano, E. y M. Medina. 1989. Formación de fitoalexinas en variedades mexicanas de *Phaseolus vulgaris*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 7(1): 74-80

Sousa, S.M. y A. Delgado. 1979. Herramientas y consideraciones para la revisión del género *Phaseolus*. En E.M. Engleman (Ed). "Contribuciones al conocimiento del frijol (*Phaseolus*) en México". Colegio de Posgraduados. Montecillo, Edo de México; México: 140p

Souza, R.M. and J.G. Baldwin. 2000. Differential behaviour of the survival stages of *Nacobbus aberrans* (Nematoda: Pratylenchidae) under sub-optimal environments. *Nematologica* 2: 211-215

Strasburger, E.; F. Noll; H. Schenck y A. F.W. Schimper. 1974. Tratado de Botánica. Ed. Marín S.A. Barcelona: 799p

Sydenham, G.M., R. McSorley, and R.A. Dunn. 1996. Effects of resistance in *Phaseolus vulgaris* on development of *Meloidogyne* species. *J. of Nematol.* 28 (4): 485-491

Taylor, A.L. y J.N. Sasser. 1983. Biología, identificación y control de los nematodos del nódulo de la raíz (especies de *Meloidogyne*). Artes Graficas de la Universidad del Estado de Carolina del Norte, U.S.A. 111p

Thorne, D.G. 1935. The sugar beet nematode and others indigenous nemic parasites of shadscale. *J. of Agricultural Research* 51: 509-514

Thorne, G.D., and M.W. Allen. 1944. *Nacobbus dorsalis*. nov. gen. nov. sp. (Nematoda-Tylenchidae) producing galls on the roots of alfileria, *Erodium cicutarium* (L.) L'Her. *Proceeding of the Helminthological Society of Washington* 11: 27-31

Thorne, G.D., and M.L. Schuster. 1956. *Nacobbus batatiformis*. n. sp. (Nematoda-Tylenchidae) producing galls on the roots of sugar beet and other plants. *Proceeding of the Helminthological Society of Washington* 23: 128-134

Toledo, R.J.C. 1989. Caracterización patogénica de cinco poblaciones de *Nacobbus aberrans* y evaluación del daño que causan a tomate, chile y frijol en México. Tesis M. en C. Fitopatología. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Edo de México; México: 64p

Toledo, R.J.C., C. Sosa-Moss y E. Zavaleta-Mejía. 1993. Gama de hospederos de cinco poblaciones mexicanas de *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 23(1): 105-108

Torres, C.R., A. Tovar, F. de la Jara, y F. erón. 1994. Nuevo registro de *Nacobbus aberrans* para la República mexicana. *Memorias XXI Congreso Nacional de*

Fitopatología de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Cuernavaca, Morelos, México: 71p

Tovar, S.A., F. de la Jara; P. Aguilar y Torres, C.R. 1990 Estudio histopatológico comparativo de *Nacobbus aberrans* en jitomate (*Lycopersicon esculentum*) var. "Contessa" y malezas. Memorias XVII Congreso Nacional de Fitopatología. Culiacán, Sinaloa, México. 81p

Tovar-Soto, A. 1999. Principales síntomas inducidos por nematodos fitopatógenos. Apuntes del Curso sobre Nematodos fitopatógenos de importancia cuarentenaria, SAGAR. Dirección General de Sanidad Vegetal, México, D.F.

Tovar-Soto, A. 2002. Nematodos formadores de quistes (Nemata: Heteroderinae) en cereales de los Valles Altos de México: Taxonomía, dinámica poblacional y gama de hospedantes. Tesis Doctoral. Fitopatología. Montecillos, Estado de México. 107p

Triantaphyllou, A.C. 1985. Cytogenetics, cytotaxonomy and phylogeny of root.knot nematodes. In J.N. Sasser and C.C. Carter (Eds). "An advances treatise on *Melodogyne* Vol I. Biology and Control". Raleigh North Carolina. Pp: 143-153

Trudgill, D.L. 1991. Resistance to and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. Ann. RSC Phytopathol 29: 167-192

Vavilov, N. 1951. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. The Ronald Press Company. New York

Veech, J.A. 1981. Plant resistance to nematodes. In M.G. Zuckerman and A.R. Rohde (Eds). "Plant Parasitic nematodes" Vol. III. academic Press: 377-403

Veech, J.A. 1982. Phytoalexins and their role in the resistance of plants to nematode. J. of Nematol. 14: 2-9

Velásquez-Valle, R. 2001. Nematodos agalladores afectando hortalizas y otros cultivos en el norte centro de México. Revista Mexicana de Fitopatología. 19 (1): 107 – 109

Wallace, H.R. 1987. Effects of nematodo parasites on photosynthesis. In Veech J.A. and D.W. Dickson (Eds). "Vistas on Nematol.". E.O. Painter Printing Co. De Leon Spring, Florida. USA: 253-259

Waterman, P.G. 1994. Cost and benefits of secondary metabolites to the leguminosae. In "Advances in legume. Systematics. Part 5. The nitrogen factor", J.I. Sprent and D. McKey. The Royal Botanic Garden, Kew. U. K.: 129-149

Wilcox - Lee, D. and R. Loria. 1987. Effects of nematode parasitism on plant-water relations. In Veech J.A. and D.W. Dickson (Eds). "Vistas on Nematol.". E.O. Painter Printing Co. De Leon Spring, Florida. USA: 260-266

Wyatt, J.E.; G. Fassuliotis, A.W. Johnson, J.C. Hoffman, and J.R. Deakin. 1980. B4175 Root-knot nematode resistant snap bean breeding line. HortScience 15: 530

Wyss, U. and F.M.W. Grundler. 1992. Feeding behavior of sedentary plant parasitic nematodes. Netherland J. Plant Pathology (suplement) 2: 165-173

Wyss, U.; F.M.W. Grundler and A. Munch. 1992. The parasitic behaviour of second stage of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. Nematologica 38: 98-111

Yépez-Basurto, M. 1977. Anatomía anómala de raíz, hipocótilo y tallo en *Phaseolus coccineus*, L. tesis Biólogo. Facultad de Ciencias UNAM. México.

Zamudio, G.V. 1987. Evaluación de la resistencia de colecciones y variedades comerciales de tomate (*Lycopersicon* spp.) a *Nacobbus aberrans* *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne and Allen, 1944. Tesis M. en C. Genética. Colegio de Postgraduados, Montecillos, Edo de México; México: 88p

Zamudio, G.V.; A. Carballo y N. Marban. 1990. Gama de hospedantes y evaluación del daño de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen 1944, en hortalizas comerciales. Revista Mexicana de Fitopatología 8(1): 9-12

Zavaleta -Mejía, E. , O. Gómez-Rodríguez, M. GutierrezR. y R. San Miguel-Chávez. 1995. Efecto de *Nacobbus aberrans* en la fotosíntesis de plantas de Chile. Resúmenes de trabajos XIII Congreso Nacional de Fitopatología de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Guadalajara, Jalisco, México. Revista Mexicana de Fitopatología 13 (2)

IX. APÉNDICE

APÉNDICE 1

TÉCNICA DE McCLURE PARA LA EXTRACCIÓN DE HUEVECILLOS DE NEMATODO NODULADOR DE LA RAÍZ *Meloidogyne* spp

(McClure *et al*, 1973)

- 1.- Desenraizar las plantas y lavar las raíces con agua corriente hasta eliminar cualquier resto de suelo.
- 2.- Seleccionar y cortar las raíces que se encuentren agalladas.
- 3.- Colocar las raíces en una solución de hipoclorito (NaOCl) al 1% y agitar vigorosamente, de preferencia en una licuadora, por 40 segundos.
- 4.- Vertir el material licuado en una serie de tamices de 50, 200 y 400 mallas, colocados uno sobre otro, y lavar rápida y vigorosamente con agua corriente el material colectado en este último hasta que sea eliminado todo residuo de hipoclorito.
- 5.- Realizar un último lavado con agua destilada y recolectar en tubos de centrífuga.
- 6.- Añadir una pizca de caolín y centrifugar a 2000 revoluciones por minuto (rpm) por tres minutos.
- 7.- Eliminar la fase acuosa y retener el botón.
- 8.- Añadir una cantidad suficiente de una solución de sacarosa al 45% y agitar con una varilla de vidrio hasta disolver el botón.
- 9.- Centrifugar a 1500 rpm por un minuto y filtrar en un tamiz de 400 mallas.
- 10.- Lavar con agua destilada el material retenido en el tamiz y colectar en un frasco limpio.

APÉNDICE 2

TINCIÓN CON FUCSINA ÁCIDA PARA LA DETECCIÓN DE NEMATODOS PRESENTES EN RAÍCES

(Modificado de De la Jara *et al*, 1994)

- 1.- Desenraizar las plantas y lavar las raíces vigorosamente con agua corriente hasta librar de residuos de suelo.
- 2.- Cortar las raíces y fijarlas con una solución de alcohol absoluto-formol-ácido acético (FAA) por mínimo 48 horas.
- 3.- Lavar con agua destilada hasta eliminar todo residuo de fijador.
- 4.- Calentar 100 ml de una dilución de fucsina ácida (1 ml de solución madre de fucsina ácida por cada 50 ml de agua destilada) a 50 °C y sumergir las raíces por 24 a 48 horas.
- 5.- Mantener a temperatura ambiente y pasado el lapso de tiempo recomendado lavar el exceso de colorante con agua destilada. Observar a microscopio estereoscópico para separar raíces en las que se visualicen los nematodos.
- 6.- Colocar las raíces seleccionadas en alcoholes graduales de 50 y 70%.

NOTA: La técnica original requiere de una transparentación de las raíces con hipoclorito de sodio al 5% por tres minutos antes de la tinción con fucsina la cual debe estar caliente hasta inicio de ebullición y donde se colocan las raíces para después enfriar a temperatura ambiente, esta manipulación fue muy drástica para las raíces de frijol y por lo tanto no fue realizada.

APÉNDICE 3

TRANSPARENTACION Y MONTAJE DE RAICES PARASITADAS CON NEMATODOS

(De la Jara et al, 1994)

- 1.- Desenraizar las plantas y lavar las raíces vigorosamente con agua corriente hasta librar de residuos de suelo.
- 2.- Cortar las raíces y fijarlas con una solución de alcohol absoluto-formol-ácido acético (AFA) por mínimo 48 horas.
- 3.- Lavar con agua destilada hasta eliminar todo residuo de fijador.
- 4.- Colocar las raíces en alcohol etílico al 70% por 20 minutos
- 5.- Pasar a alcohol etílico al 96% por 20 minutos
- 6.- Transferir las raíces a una mezcla de alcohol etílico al 96% y esencia de clavo (1:1) por 30 minutos
- 7.- Pasar a esencia de clavo por 30 minutos
- 8.- Dejar en esencia de clavo – resina sintética (1:1) por 20 minutos
- 9.- Montar en resina sintética

APÉNDICE 4

PREPARACIÓN Y MONTAJE DE NEMATODOS

(Seinhorst, 1959; De la Jara *et al*, 1994)

- 1.- Disectar los nematodos de raíces infectadas y fijadas en FAA por 48 hs
- 2.- Transferir los nematodos a un microsiracusa conteniendo glicerina A, tapar el recipiente y colocarlo en la estufa por 16 horas
- 3.- Al evaporarse la glicerina A añadir glicerina B, tapar el recipiente y colocarlo en una caja de Petri a 35 – 40 °C por tres horas
- 4.- Añadir unas gotas de glicerina pura deshidratada y mantenerlo en la estufa por 4–5 horas
- 5.- Transferir el recipiente a un desecador con cloruro de calcio donde se mantiene hasta que la glicerina adquiera una consistencia espesa
- 6.- Montar en glicerina pura deshidratada

APÉNDICE 5

TINCIÓN CON FUCSINA BÁSICA – VERDE RÁPIDO (ZIELH – NIELSEN)

(Carvajal - Sandoval, 1991)

- 1.- Poner los portaobjetos con los cortes en agua destilada por 5 minutos.
- 2.- Teñir con fucsina básica por 10 minutos.
- 3.- Lavar el exceso de colorante con agua corriente y dejar en agua destilada por 5 minutos.
- 4.- Teñir con verde rápido y escurrir rápidamente el exceso de colorante.
- 5.- Lavar rápidamente con alcohol de 96% y absoluto (2 cambios).
- 6.- Pasar a xilol – alcohol etílico absoluto (1:1) y a xilol puro por 10 minutos en cada uno.
- 7.- Montar en resina sintética

APÉNDICE 6

TÉCNICA CUÁDRUPLE DE JOHANSEN

(López - Curto *et al*, 2005)

- 1.- Teñir por 2 hs. en safranina metilcelosolve
- 2.- Enjuagar en agua corriente
- 3.- Teñir 10 – 15 minutos en solución acuosa al 1% de metilvioleta
- 4.- Lavar en agua corriente
- 5.- Enjuagar por 15 segundos en una solución (1:1:1) de etanol al 96%, metilcelosolve y alcohol butílico terciario
- 6.- Sumergir por 10 -15 minutos de verde rápido preparado en solución FCF
- 7.- Enjuagar brevemente en una mezcla de etanol al 96% y alcohol butílico terciario (1:1) al que se añade ácido glacial en una cantidad que constituya el 0.5% de la mezcla
- 8.- Sumergir por 3 minutos en una solución de Orange G
- 9.- Enjuagar brevemente en una mezcla de aceite de clavo, metilcelosolve y etanol al 96% (1:1:1)
- 10.- Enjuagar brevemente en una mezcla de aceite de clavo, metilcelosolve y etanol absoluto (1:1:1)
- 11.- Sumergir por 10 – 15 minutos en xilol
- 12.- Montar en resina sintética

APÉNDICE 7

FORMULACIONES

(Curtis – Patiño, 1986; López - Curto *et al*, 2005)

Solución madre de Fucsina ácida

Fucsina ácida.....	3.5 g
Acido acético.....	250 ml
Agua destilada.....	750 ml

Fijador FAA

Alcohol etílico (96%).....	100 ml
Formaldehído (40%).....	30 ml
Acido acético glacial.....	5ml
Agua destilada.....	200 ml

Solución madre de Fucsina fenicada de Zielh Nielsen

Fucsina básica.....	1 g
Acido fénico cristalizado.....	5 g
Alcohol etílico (96%).....	10 ml
Agua destilada.....	90 ml

Verde rápido

Verde rápido.....	1 g
Alcohol etílico (96%).....	100 ml

Glicerina A

Alcohol etílico (96%)	20 partes
Glicerina pura.....	1 parte
Agua destilada.....	93 partes

Glicerina B

Glicerina	7 partes
Alcohol etílico (96%)	20 partes

Safranina en metilcelosolve

Safranina O.....	4 g
Metilcelosolve.....	200 ml
Mezclar y agregar:	
Alcohol	
96%.....	100 ml
Agua destilada.....	5 ml
Acetato de sodio.....	4 g
Formol.....	8 ml

Metil violeta

Metil violeta.....	1 g
Agua destilada.....	99 ml

Verde rápido en solución FCF

Solución saturada del colorante en	
partes iguales de aceite de clavo	
y metil celosolve.....	1 parte
Alcohol etílico al 96%.....	3 partes
Alcohol	
terbutílico.....	3 partes
Acido acético glacial.....	1%

Orange G

Solución saturada del colorante en	
metilcelosolve.....	1 parte
Metilcelosolve.....	1 parte
Alcohol etílico al 96%.....	1 parte

APÉNDICE 8

EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS DE RAÍCES

(Harborne, 1984)

- 1.- Desenraizar las plantas y lavar con agua corriente las raíces
- 2.- Separa las raíces del tallo y ponerlas a secar en estufa a 35°C o a temperatura ambiente
- 3.- Ya completamente secas, reducir las raíces a un fino polvo que se colecta en tubos de ensaye limpio
- 4.- No mezclar los tratamientos y etiquetar los tubos
- 5.- Añadir un volúmen de hexano aproximadamente igual al volumen de la muestra y tapar el tubo
- 6.- Mantener los tubos en agitación constante por 24 horas para obtener el extracto
- 7.- Decantar el extracto en otro tubo de ensaye limpio, etiquetar y guardar libre de polvo
- 8.- Repetir el paso 5 y 6
- 9.- Recuperar nuevamente el extracto en el mismo tubo que contiene la primera extracción y guardar
- 10.- Añadir Acetato de etilo al tubo que contiene la muestra y repetir los pasos 6 – 9
- 11.- Añadir metanol al tubo que contiene la muestra y repetir los pasos 6 - 9
- 12.- Poner los tubos con los extractos en baño María y reducir el volúmen de los solventes a 1 ml
- 13.- Con ayuda de una pipeta Pasteur transferir el extracto a tubos de Ependorff previamente etiquetados y pesados, y dejar volatilizar totalmente al solvente
- 14.- Pesar nuevamente los tubos de Ependorff y por diferencia calcular el peso del extracto obtenido

APÉNDICE 9

DETERMINACIÓN DE LA FASE MÓVIL PARA DESARROLLO CROMATOGRÁFICO

(Kirchaer, 1978)

- 1.- Cortar placas cromatográficas de vidrio o aluminio Merck de 1.5 x 5 cm cubiertas de sílica gel 60F₂₅₄
- 2.- Marcar el origen y frente del corrimiento a 0.5 cm de cada extremo de la placa
- 3.- Colocar con ayuda de tubos capilares dos muestras de los extractos, equidistantes una de otra, sobre la línea que señala el origen del corrimiento en la placa
- 4.- Preparar una cantidad apropiada de eluyente para el corrimiento, es recomendable comenzar con el compuesto con que fue realizada la extracción
- 5.- Montar una pequeña cámara cromatográfica con el eluyente y realizar el corrimiento cromatográfico hasta que la marca del eluyente llegue al frente
- 6.- Dejar secar las placas a temperatura ambiente y observarlas bajo luz ultravioleta 254 nm, 365 nm, marcando en cada caso las bandas que se visualicen
- 7.- Asperjar las placas con una solución de sulfato cérico en ácido sulfúrico y poner a calentar a 95 °C en una plancha termoeléctrica y visualizar las placas reveladas.
- 8.- En todos los casos debe observarse una clara separación de bandas
- 9.- Dependiendo de los resultados, repetir con eluyentes de mayor o menor polaridad
- 10.- Realizar el mismo procedimiento con todos los extractos

APÉNDICE 10

Combinaciones de solventes empleados en la determinación de las fases móviles más apropiadas para el desarrollo cromatográfico de extracto de raíces de frijol inoculados con *N. aberrans* población Chapingo obtenidos con tres solventes de diferente polaridad

EXTRACTO	COMBINACIÓN	PROPORCIONES
Hexano	Hexano: acetato de etilo	(8:2), (7:3), (6:4), (5:5), (6.5:3.5)*
Acetato de etilo	Acetato	(1:0)
	Acetato : hexano	(6:4), (7:3), (9:1)
	Acetato : metanol	(8:2)
	Etanol	(1:0)
	Acetato : cloroformo	(8:2)
	Acetonitrilo	(1:0)
	Acetato de etilo : cloroformo : metanol	(8:1:1), (7:2:1)*
Metanol	Acetato de etilo	(1:0)
	Acetato de etilo : metanol	(7:3), (5:5)
	Metanol	(1:0)
	Butanol: ácido acético: agua	(5:1:4), (4:1:5), (4:1.5:5), (4:1:6), (4:1:7)*

* combinaciones más adecuadas para los corrimientos cromatográficos

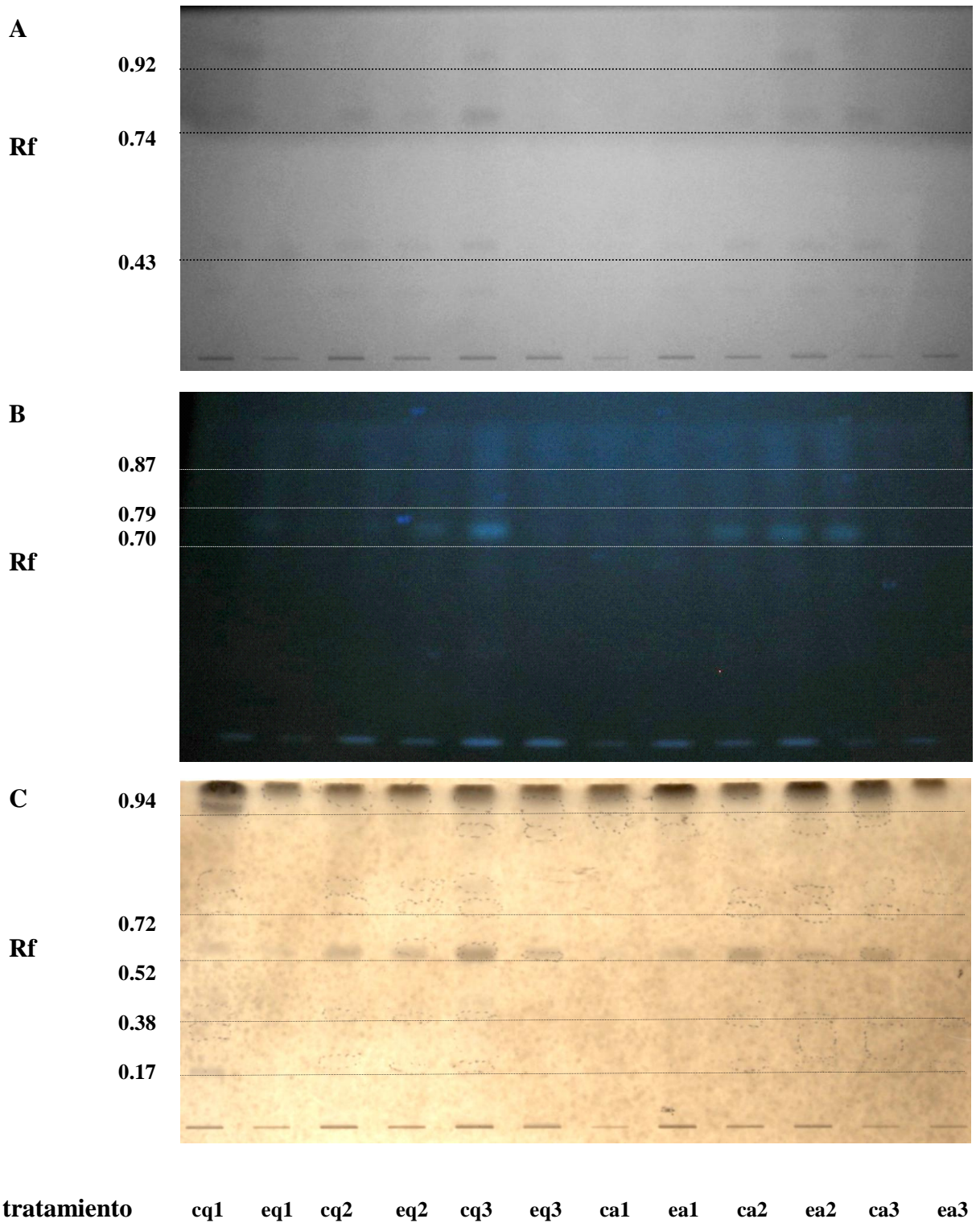
APÉNDICE 11

Combinaciones de solventes empleados en la determinación de las fases móviles más apropiadas para el desarrollo cromatográfico de extracto de raíces de frijol inoculados con *N. aberrans* población Tecamachalco obtenidos con tres solventes de diferente polaridad

EXTRACTO	COMBINACIÓN	PROPORCIONES
Hexano	Hexano: acetato de etilo	(5:5), (5.5:4.5), (5.2:4.8), (5.3:4.7)*
Acetato de etilo	Acetato	(1:0)
	Acetato : hexano	(6:4), (7:3), (8:2)*
	Acetato : metanol	(8:2)
	Acetato : cloroformo	(8:2)
	Acetato : cloroformo : metanol	(8:1:1), (7:2:1)
Metanol	Acetato	(1:0)
	Acetato de etilo : metanol	(5:5)
	Metanol	(1:0)
	Butanol: ácido acético: agua	(5:1:4), (4:1:5), (4:1:6), (4:1.1:7)*

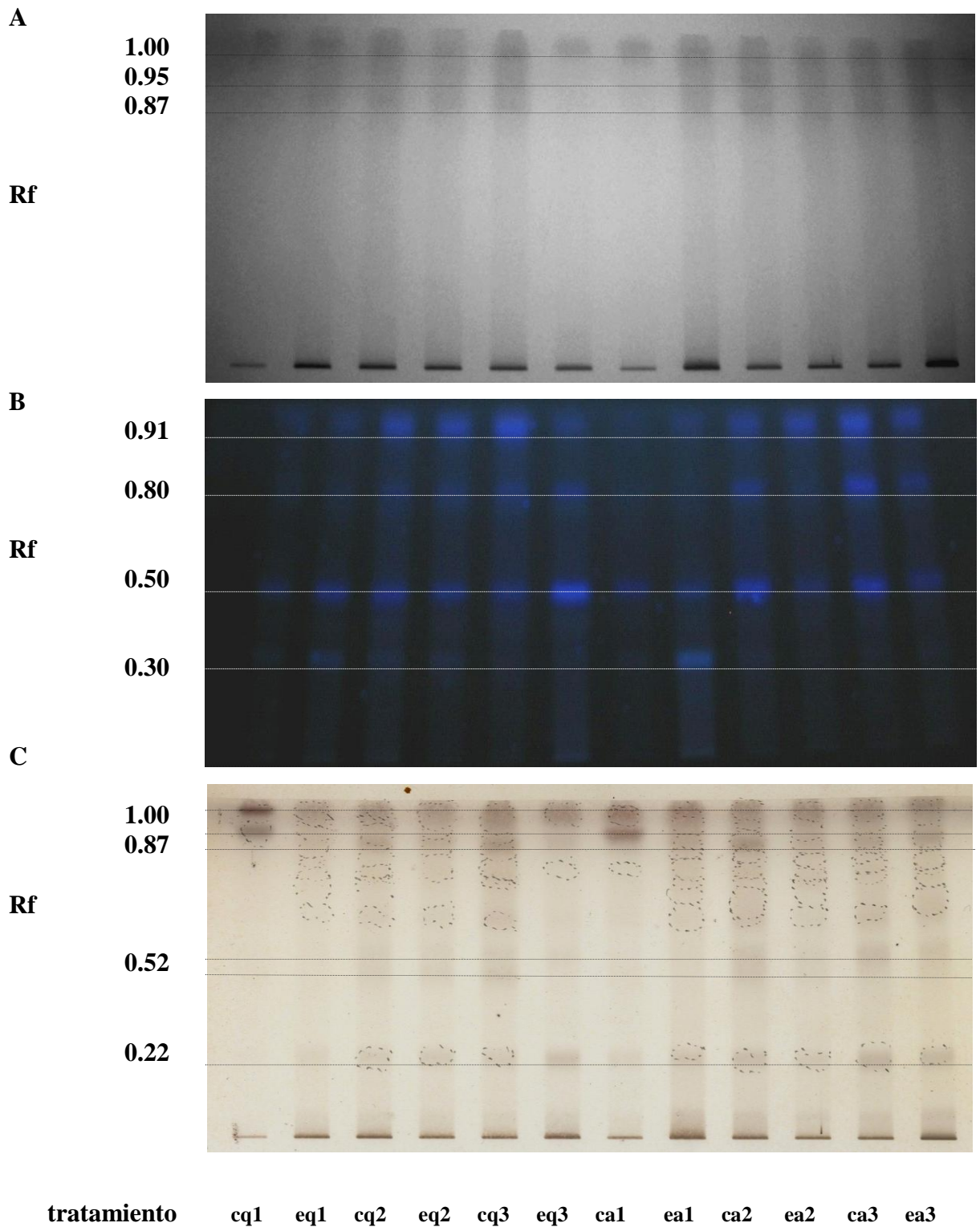
* combinaciones más adecuadas para los corrimientos cromatográficos

APÉNDICE 12



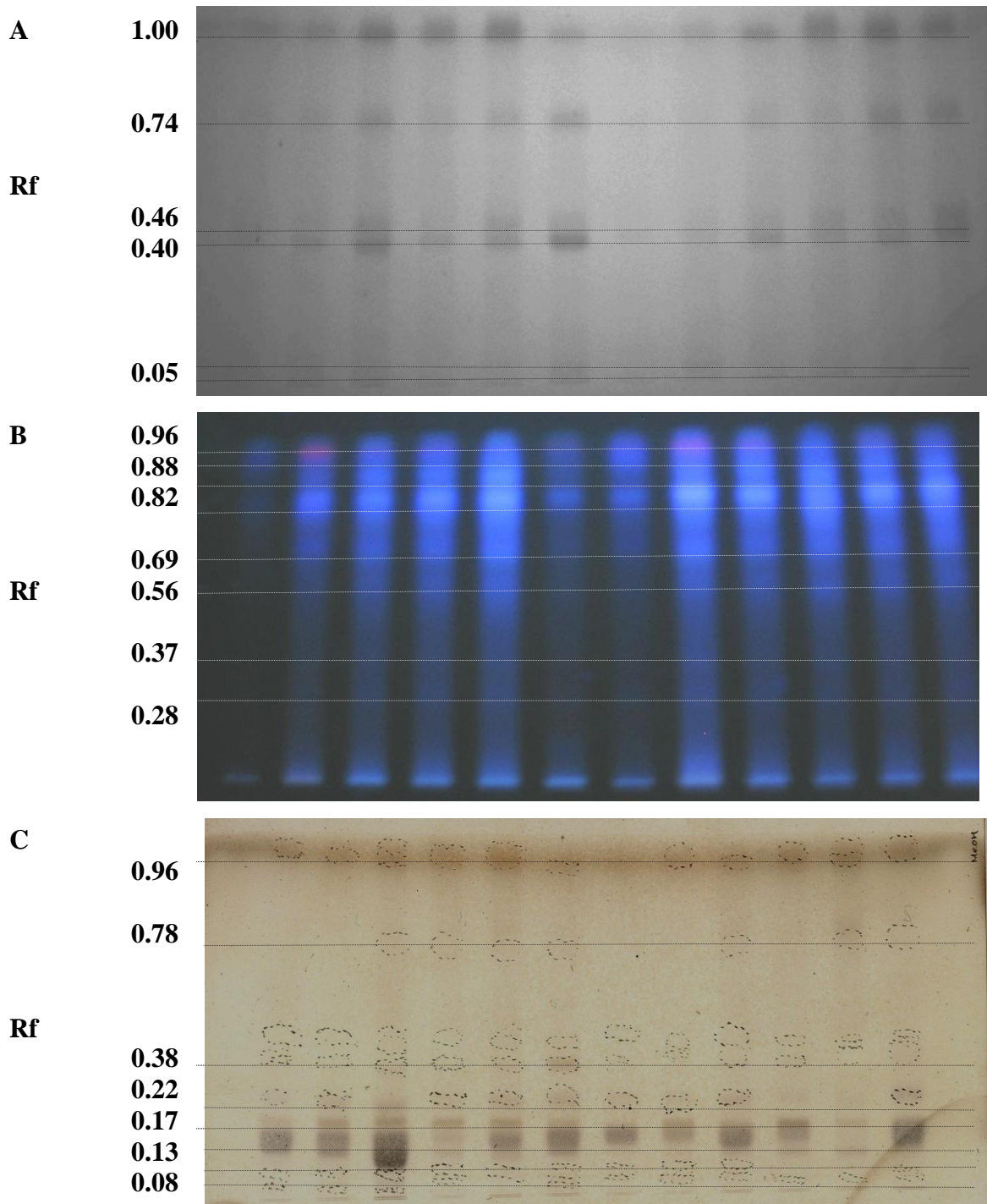
Placa cromatográfica del extracto hexánico de raíces de dos cultivares de frijol parasitado con *N. aberrans* población Chapingo observado a 254 nm (A), 365 nm (B) y revelado con sulfato cérico (C); c = control, e = experimental, q = cultivar (cv) Negro Querétaro, a = cv Azufrado, 1 = 15 días después de inoculado (ddi) ; 2 = 30 ddi ; 3 = 60 ddi; el orden de los tratamientos fue el mismo en las tres placas.

APÉNDICE 13



Placa cromatográfica del extracto de acetato de etilo de raíces de dos cultivares de frijol parasitado con *N. aberrans* población Chapingo observado a 254 nm (A), 365 nm (B) y revelado con sulfato cérico (C); c = control, e = experimental, q = Negro Querétaro, a = Azufrado, 1 = 15 días después de inoculado (ddi) ; 2 = 30 ddi ; 3 = 60 ddi; el orden de los tratamientos fue el mismo en las tres placas.

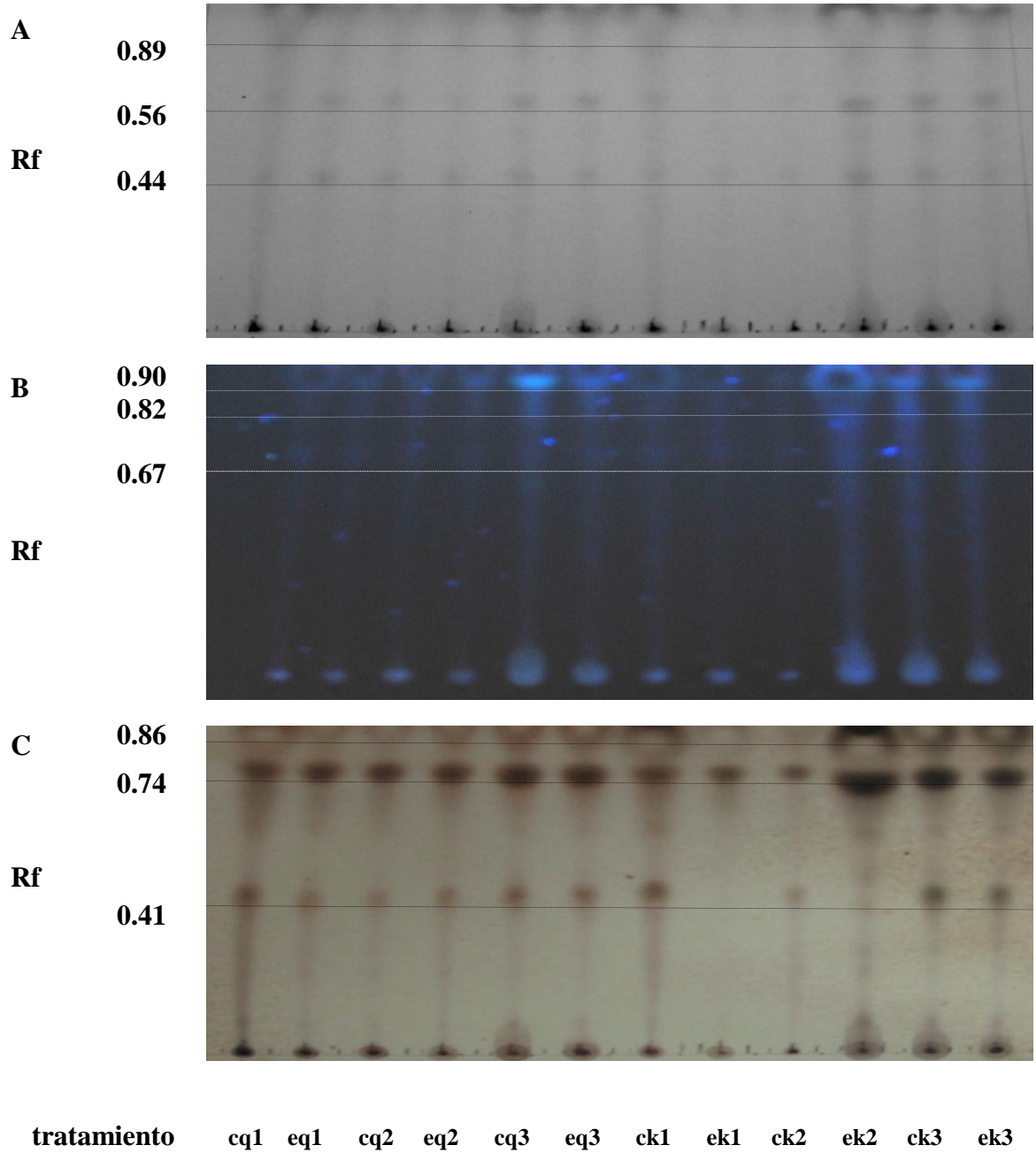
APÉNDICE 14



tratamiento cq1 eq1 cq2 eq2 cq3 eq3 ca1 ea1 ca2 ea2 ca3 ea3

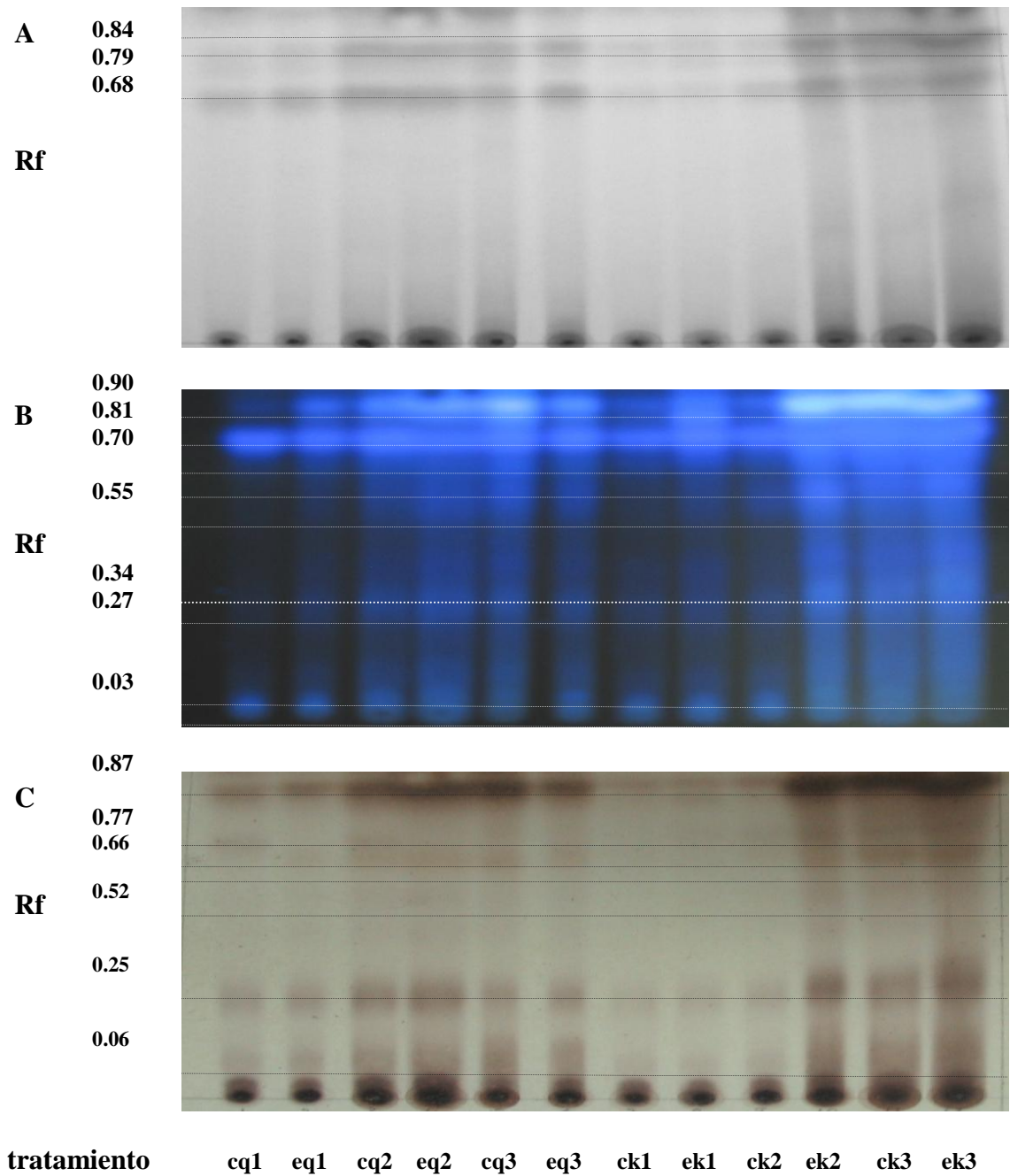
Placa cromatográfica del extracto de metanol de raíces de dos cultivares de frijol parasitado con *N. aberrans* población Chapingo observado a 254 nm (A), 365 nm (B) y revelado con sulfato cérico (C); c = control, e = experimental, q = Negro Querétaro, a = Azufrado; 1 = 15 días después de inoculado (ddi); 2 = 30 ddi; 3 = 60 ddi; el orden de los tratamientos fue el mismo en las tres placas.

APÉNDICE 15



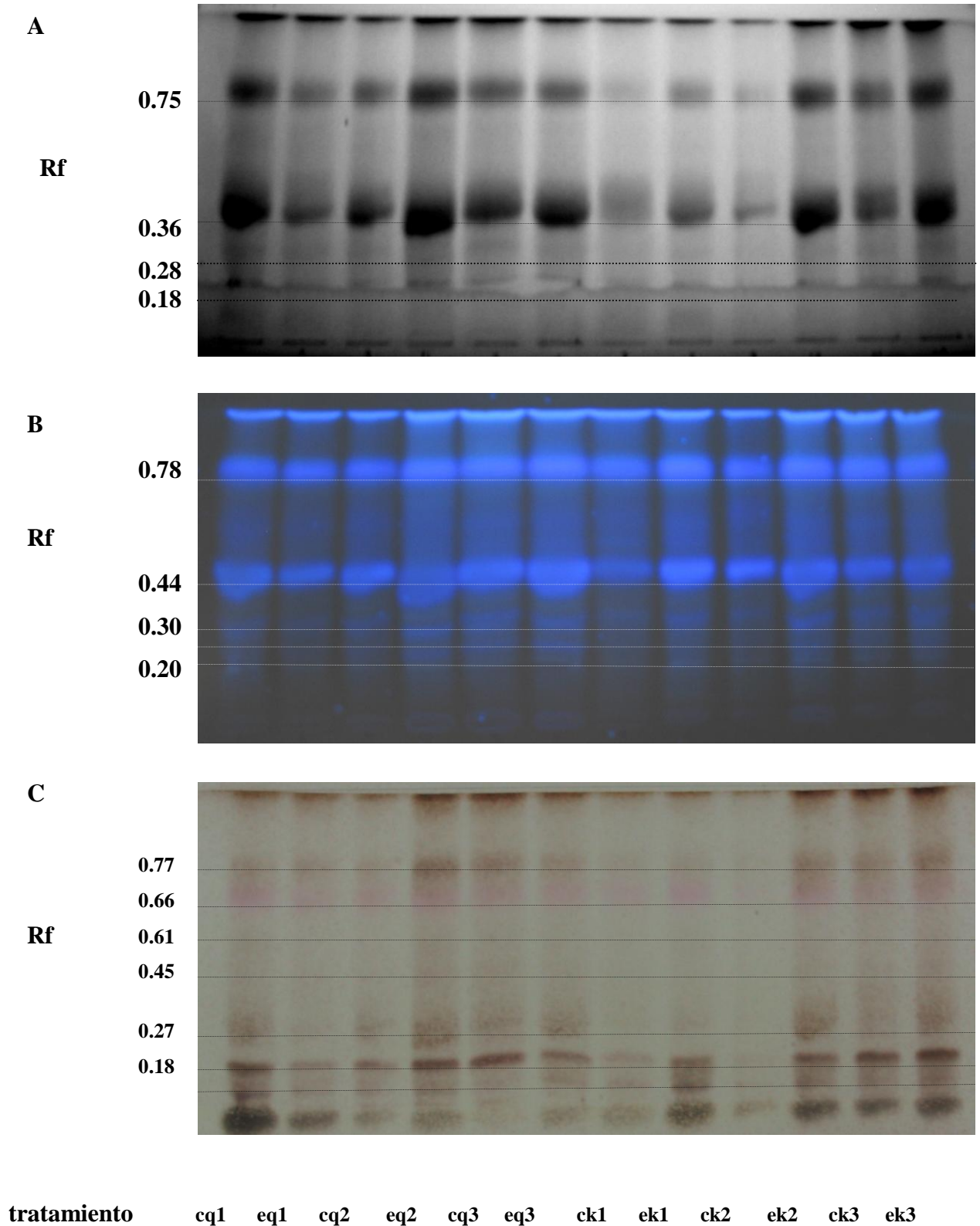
Placa cromatográfica del extracto hexánico de raíces de dos cultivares de frijol parasitado con *N. aberrans* población Tecamachalco observado a 254 nm (A), 365 nm (B) y revelado con sulfato cérico (C); c = control, e = experimental, q = Querétaro negro, k = Canario, 1 = 15 días después de inoculado (ddi) ; 2 = 45 ddi ; 3 = 90 ddi; el orden de los tratamientos fue el mismo en las tres placas.

APÉNDICE 16



Placa cromatográfica del extracto de acetato de etilo de raíces de dos cultivares de frijol parasitado con *N. aberrans* población Tecamachalco observado a 254 nm (A), 365 nm (B) y revelado con sulfato cérico (C); c = control, e = experimental, q = Negro Querétaro, k = Canario, 1 = 15 días después de inoculado (ddi) ; 2 = 45 ddi ; 3 = 90 ddi; el orden de los tratamientos fue el mismo en las tres placas.

APÉNDICE 17



Perfil cromatográfico del extracto de metanol de raíces de dos cultivares de frijol parasitado con *N. aberrans* población Tecamachalco observado a 254 nm (A), 365 nm (B) y revelado con sulfato cérico (C); c = control, e = experimental, q = cultivar (cv) Querétaro negro, k = cv Canario, 1 = 15 días después de inoculado (ddi) ; 2 = 45 ddi ; 3 = 90 ddi; el orden de los tratamientos fue el mismo en las tres placas cromatográficas

APÉNDICE 18

Observación	BANDA	QN	AZF
254 nm	0.92	Retraso (+)	Combinado (+)(-)
	0.74	Decremento	Interrupción
	0.43	Decremento	Sin cambio
365 nm	0.87	Sin cambio	Decremento
	0.79	Interrupción	Decremento
	0.70	Sin cambio	Decremento
Revelado	0.94	Retraso(+)	Sin cambio
	0.72	Decremento	Sin cambio
	0.52	Interrupción	Decremento
	0.38	Sin cambio	Sin cambio
	0.17	Retraso (+)	Sin cambio

Efecto de *N. aberrans* población Chapingo en el patrón de intensidad de bandas del perfil cromatográfico hexánico de raíces de los cultivares de frijol Querétaro Negro (QN) y Azufrado (CNR)

APÉNDICE 19

Observación	BANDA	QN	AZF
254 nm	0.93	Sin cambio	Sin cambio
	0.87	Decremento	Sin cambio
	0.76	Adelanto (-)	Adelanto (+)
365 nm	0.91	Interrupción	Interrupción
	0.80	Sin cambio	Sin cambio
	0.50	Incremento	Decremento
	0.30	Retraso (-)	Incremento
Revelado	1.00	Interrupción	Sin cambio
	0.95	Decremento	Adelanto (-)
	0.87	Interrupción	Sin cambio
	0.52	Adelanto (+)	Retraso (+)

Efecto de *N. aberrans* población Chapingo en el patrón de intensidad de bandas del perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de raíces de los cultivares de frijol Querétaro Negro (QN) y Azufrado (AZF)

APÉNDICE 20

Observación	BANDA	QN	AZF
254 nm	1.00	Decremento	Incremento
	0.74	Retraso (+)	Sin cambio
	0.46	Interrupción	Adelanto (+)
	0.40	Retraso (+)	Adelanto (+)
365 nm	0.96	Incremento	Sin cambio
	0.69	Adelanto (+)	Sin cambio
	0.56	Decremento	Adelanto (+)
	0.37	Combinado (+)(-)	Incremento
	0.28	Combinado (+)(-)	Incremento
Revelado	0.96	Sin cambio	Sin cambio
	0.78	Sin cambio	Retraso (+)
	0.38	Retraso (+)	Retraso (+)
	0.22	Combinado (+)(-)	Combinado (-)(+)
	0.17	Sin cambio	Incremento
	0.13	Sin cambio	Retraso (+)
	0.08	Sin cambio	Sin cambio

Efecto de *N. aberrans* población Chapingo en el patrón de intensidad de bandas del perfil cromatográfico del extracto de metanol de raíces de los cultivares de frijol Querétaro Negro (QN) y Azufrado (AZF)

APÉNDICE 21

Observación	BANDA	QN	CNR
254 nm	0.44	Adelanto (+)	Adelanto (+)
	0.56	Sin cambio	Adelanto (+)
	0.89	Adelanto (-)	Adelanto (-)
365 nm	0.31	Sin cambio	Adelanto (+)
	0.67	Sin cambio	Adelanto (+)
	0.71	Sin cambio	Adelanto (+)
	0.82	Sin cambio	Adelanto (+)
	0.90	Sin cambio	Adelanto (+)
REVELADO	0.41	Combinado (-)(+)	Disminución
	0.74	Sin cambio	Sin cambio
	0.86	Sin cambio	Adelanto (+)

Efecto de *N. aberrans* población Tecamachalco en el patrón de intensidad de bandas del perfil cromatográfico hexánico de raíces de los cultivares de frijol Querétaro Negro (QN) y Canario (CNR)

APÉNDICE 22

Observación	BANDA	QN	CNR
254 nm	0.89	Adelanto (+)	Adelanto (+)
	0.56	Sin cambio	Adelanto (+)
	0.44	Sin cambio	Adelanto (+)
365 nm	0.90	Combinado (+)(-)	Adelanto (+)
	0.73	Adelanto (+)	Adelanto (+)
	0.70	Decremento	Adelanto (+)
	0.55	Adelanto (+)	Adelanto (+)
Revelado	0.87	Sin cambio	Adelanto (+)
	0.76	Sin cambio	Adelanto (+)
	0.66	Sin cambio	Sin cambio
	0.61	Sin cambio	Adelanto (+)
	0.25	Sin cambio	Adelanto (+)

Efecto de *N. aberrans* población Tecamachalco en el patrón de intensidad de bandas del perfil cromatográfico del extractos de acetato de etilo de raíces de los cultivares de frijol Querétaro Negro (QN) y Canario (CNR)

APÉNDICE 23

Observación	BANDA	QN	CNR
254 nm	0.75	Retraso (-)	Adelanto (+)
	0.36	Sin cambio	Adelanto (+)
	0.28	Sin cambio	Adelanto (+)
	0.18	Adelanto (+)	Incremento
<hr/>			
365 nm	0.78	Sin cambio	Sin cambio
	0.44	Sin cambio	Sin cambio
	0.30	Retraso (-)	Incremento
	0.25	Adelanto (+)	Adelanto (+)
	0.20	Adelanto (+)	Incremento
<hr/>			
Revelado	0.77	Adelanto (+)	Adelanto (+)
	0.66	Adelanto (+)	Adelanto (+)
	0.61	Sin cambio	Adelanto (+)
	0.45	Sin cambio	Adelanto (+)
	0.27	Combinado (-)(+)	Incremento
	0.18	Adelanto (+)	Adelanto (+)
	0.11	Decremento	Adelanto (+)

Efecto de *N. aberrans* población Tecamachalco en el patrón de intensidad de bandas del perfil cromatográfico del extracto de metanol de raíces de los cultivares de frijol Querétaro Negro (QN) y Canario (CNR)

APÉNDICE 24

ANDEVA del número de nematodos presentes en raíces de cultivares de frijol a 105 ddi con 4000 huevecillos de *N. aberrans* población Chapingo

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F	P
Cultivares	5	3.01 x 10⁶	137.18	2.64^{NS}	0.08
Error	12	2.74	3.05		
Total	17	5.75 x 10⁶			

P<0.05

APÉNDICE 25

ANDEVA del número de nematodos de dos cultivares de frijol a 105 ddi con 15000 huevecillos de *N. aberrans* población Tecamachalco

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F	P
Cultivares	1	392193.0	392193.0	0.26 ^{NS}	0.64
Error	4	5.97 x 10 ⁶	1.50 x 10 ⁶		
Total	5	578.77			

P<0.05