

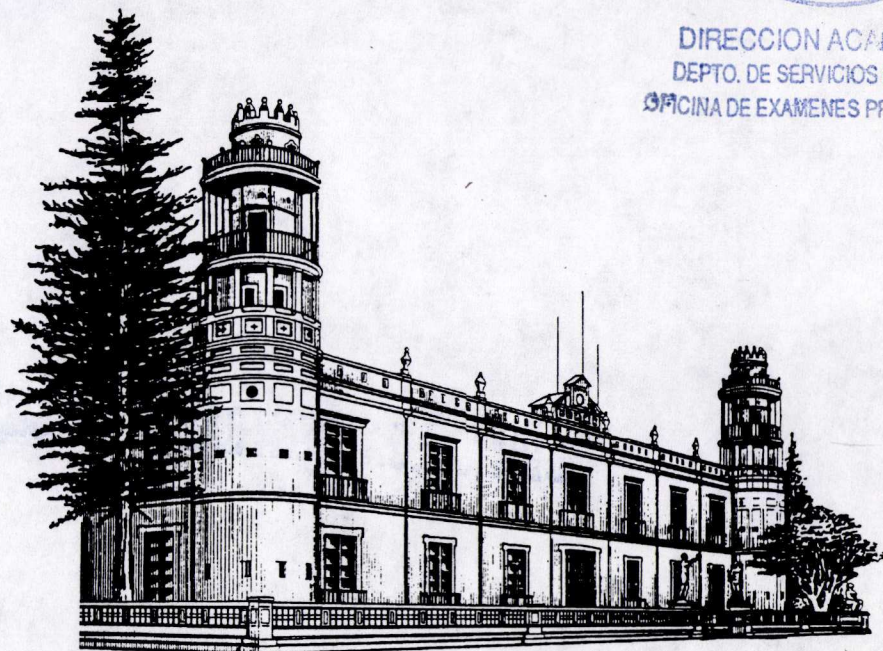
UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA AGRICOLA



IDENTIFICACION Y ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DEL NEMATODO
AGALLADOR (*Meloidogyne* spp.) EN BELEN (*Impatiens balsamina*)

DIRECCION ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN
PROTECCION VEGETAL
P R E S E N T A :
JAVIER SOTERO PALACIOS TORRES

CHAPINGO, MEXICO

JUNIO DE 1998.



**IDENTIFICACION Y ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DEL NEMATODO
AGALLADOR (*Meloidogyne* spp.) EN BELEN (*Impatiens balsamina*)**

Tesis realizada por **Javier Sotero Palacios Torres** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

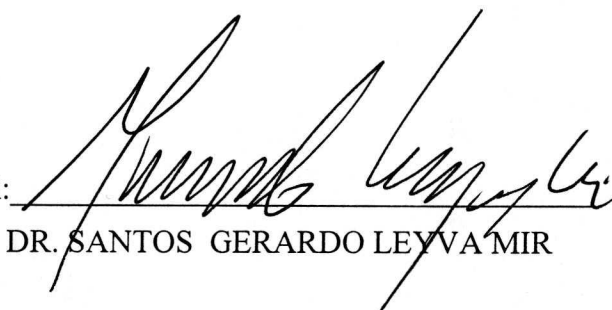
MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCION VEGETAL

DIRECTOR:



M.C. CALIXTO L. CARRILLO FONSECA

ASESOR:



DR. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

33138

ASESOR:

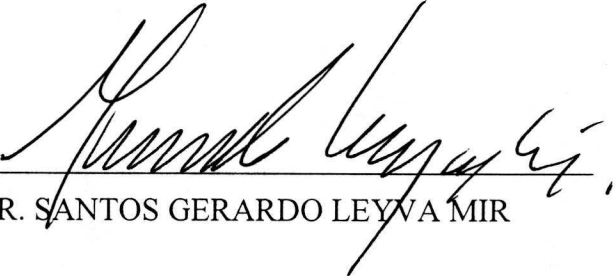


DR. NAHÚM MARBAN MENDOZA

**IDENTIFICACION Y ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DEL NEMATODO
AGALLADOR (*Meloidogyne* spp.) EN BELEN (*Impatiens balsamina*)**

El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de **Javier Sotero Palacios Torres** autor de la presente tesis de Maestría en Ciencias en **Protección Vegetal** estuvo constituido por:

PRESIDENTE: 
M.C. CALIXTO L. CARRILLO FONSECA

ASESOR: 
DR. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

ASESOR: 
DR. NAHÚM MARBAN MENDOZA

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, por las facilidades proporcionadas para poder realizar mis estudios de Maestría.

Al M.C. Calixto L. Carrillo Fonseca, por su apoyo brindado, enseñanzas y asesoría en esta investigación, así como la ayuda brindada durante mi estancia en la Universidad Autónoma Chapingo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento otorgado, y que sin el no hubiera sido posible haber realizado mis estudios de Maestría.

A la secretaria de la Coordinación General de Postgrado Rocío Rodríguez y a la secretaria de la Coordinación de Postgrado en Protección Vegetal, Virginia Moreno Sánchez, quienes me brindaron apoyo y amistad durante mi estancia en la Universidad.

A mi hermana **Elvia Carmelita Palacios Torres**, que gracias a su ayuda y apoyo este trabajo fue posible, a mis padres quienes me dieron el apoyo moral e incondicional durante mis estudios, y con gran cariño a mis dos abues Crucita y Carmelita.

Al colega y amigo Lino Corrales Villanueva quién me ayudó y alento a seguir adelante en este trabajo.

DATOS BIOGRÁFICOS

Javier Sotero Palacios Torres nace en Cuautla Morelos, el día 14 de Octubre de 1971. Estado civil soltero. Sus padres son el Ing. Sotero Palacios Alvarez y la Maestra Julia Elvia Torres Rebolledo. Estudió la primaria en “El centro escolar Nezahulcóyotl” de la ciudad de Texcoco y finalizandola en la Esc. Prim. Urb. Fed. “Narciso Mendoza” de la ciudad de Cuautla Morelos, la secundaria en Esc. Sec. Fed. “Cuitlahuac” obteniendo el tercer lugar general en aprovechamiento con promedio de 9.75, la preparatoria en la Esc.Prep. diurna “Cuautla”.

El autor es Ingeniero Agrónomo con especialidad en Fitosanidad, egresado del Instituto Profesional de la Región Oriente (I.P.R.O) dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos en la generación 1990-1995.

Participó como docente en la institución antes mencionada durante el semestre de Febrero-Agosto de 1998.

Actualmente labora para la Organización de Viveristas de ORNAPLANT en la Ciudad de Cuautla Morelos.

INDICE

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS	i
RESUMEN	ii
SUMMARY	iii
RESUMEN	vi
SUMMARY	vii
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION DE LITERATURA	3
2.1 Cultivo	3
2.1.1 Taxonomía	3
Especie <i>balsamina</i>	3
2.1.1.1 Descripción botánica de <i>Impatiens balsamina</i>	3
2.1.1.2 <i>Impatiens balsamina</i>	4
2.1.1.3 <i>Impatiens sultani</i>	4
2.1.1.4 <i>Impatiens walleriana</i> = <i>I. holsti</i>	4
2.1.1.5 Enfermedades y plagas de <i>Impatiens</i> spp.	5
2.2 Nemátodos agalladores en <i>Impatiens</i>	7

2.3 Importancia del género <i>Meloidogyne</i>	7
2.3.1 Taxonomía	8
2.3.2 Morfología de <i>Meloidogyne</i> spp	9
2.3.1.1 <i>Meloidogyne</i> incognita	9
2.3.1.1.1 Modelos perineales	9
2.3.1.1.2 Estiletos	9
2.3.1.2 <i>Meloidogyne</i> arenaria	10
2.3.1.2.1 Modelos perineales	10
2.3.1.2.2 Estiletos	10
2.3.1.3 Ciclo Biológico	11
2.4 Interacción Planta-Nemátodo	12
2.5 Respuestas morfológicas y fisiológicas de la planta	13
2.6 Respuesta de las células en plantas susceptibles	14
2.7 Identificación	15
2.8 Histopatología	16
2.9 Historia de la histología	16
2.10 Métodos microtécnicos en nematología	17
2.11 Método de la parafina	17
2.12 Selección y preparación del tejido	17
2.13 Fijado del tejido vegetal	18
2.14 Deshidratación y aclaramiento	18

2.15 Infiltración, inclusión y corte	18
2.16 Técnicas de tinción	19
2.17 Tejido de plantas incluido en plástico para microscopio de luz	19
2.18 Estudios histopatológicos	19
3. MATERIALES Y METODOS	21
3.1 Obtención del material enfermo	21
3.2 Conservación de la población obtenida	21
3.3 Fase de laboratorio	21
3.4 Extracción de hembras adultas (piriformes)	22
3.5 Morfometría	22
3.6 Medición y Observación	23
3.7 Análisis estadístico.	23
3.8 Comparación de los modelos perineales del nemátodo agallador en <i>Impatiens balsamina</i> con los modelos descritos por Eisenback	23
3.9 Fijado de hembras	23
3.10 Identificación de hembras adultas	24
3.11 Cortes perineales	24
3.12 Cortes de cabezas	24

3.13 Preservación, deshidratación e infiltración con parafina del tejido sano y enfermo	24
3.14 Inclusión del tejido en parafina (Merke)	26
3.15 Cortes histológicos	26
3.16 Tinción de cortes	27
3.17 Toma de fotografía	29
4. RESULTADOS Y DISCUSION	31
4.1 Identificación de especies	31
4.2 Por comparación de los cortes perineales con modelos ya establecidos	31
4.3 Por comparación y medición de estiletes	32
4.4 Descripción histológica del corte transversal de la raíz sana de <i>I. balsamina</i> de flores de color rosa y color púrpura	32
4.5 Descripción histológica del corte transversal de la raíz enferma de <i>I. balsamina</i> de flores de color rosa y color púrpura	33
4.6 Descripción histológica del corte longitudinal de la raíz sana de <i>I. balsamina</i> de flores de color rosa y color púrpura	35
4.7 Descripción histológica del corte longitudinal de la raíz enferma de de <i>I. balsamina</i> de flores de color rosa y color púrpura	36
5. CONCLUSIONES	37
6. SUGERENCIAS	38

7. LITERATURA CITADA	39
8. Figuras	46
9. Anexo	49

RESUMEN

En Xochimilco D.F., se colectaron belenes (*Impatiens balsamina*) con agallas radicales provocadas por los nemátodos *Meloidogyne incognita* y *M. arenaria*. Estos nemátodos fueron identificados por comparación con las claves pictóricas de (Eisenback, 1983), estas especies de nemátodos agalladores provocan diferentes alteraciones fisiológicas a la planta como clorosis y crecimiento reducido; así mismo en el tejido radical se observaron de 2 a 5 células gigantes que se encontraban alrededor de la cabeza de los nemátodos, cerca del cilindro vascular. Los núcleos observados en el interior de cada célula no tenían ningún arreglo dentro del citoplasma y el número de éstos varió entre los 4 hasta 15 dependiendo del tamaño de la célula observada. El tejido agallado se fijó en FAA, y posteriormente se deshidrató e infiltró con parafina (Merck). Los cortes de 12 μm de grosor se tiñeron con la técnica cuádruple de Johansen y Safranina-Verde Rápido.

Palabras clave: *Impatiens*, *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* e histopatología.

SUMMARY

In Xochimilco, D.F. was collected *Impatiens* sp with rotnot caused by nematodes *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria* . These nematodes were identified by comparison with pictorial keys from Eisenback, 1983. These species of rotnot nematodes ocasioned fisiological distortions that clorosis and stunt plant; In the tissue rotnot was observed two or five giant cells that rounded the cephalic of the nematodes; near of the vascular system. The nuclei observed in the cytoplasm and its number had variation among four until fifteen depending of the dimensions of the observed cell. The rotnot tissue was fixed with F.A.A and followed was deshidrated and infiltrated on wax (Merk). The cuts of 12 μm was stained with the technique of Johansen and Safranin fast green.

Key words: *Impatiens*, *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* and Histopathology.

1. INTRODUCCION

Es importante recordar que si bien el género *Meloidogyne* tiene diferentes especies, algunas de ellas se encuentran presentes en nuestro país, y otras más que no están presentes en México, es por eso que al conocer el mayor número de hospederos que tiene este patógeno nos ayude a tomar las medidas necesarias para no correr el riesgo de introducir de alguna de las especies exóticas en México, y con el tiempo esto llegue a representar un gran problema fitosanitario.

Considerando que el belén (*Impatiens balsamina*) es una ornamental altamente comercializada en Xochimilco y que se distribuye tanto en mercados locales como en provincia, la presencia del nematodo *Meloidogyne* asociada con esta ornamental representa una forma de diseminar a dicho patógeno a lugares que se encuentren libres de dicho problema o bien incrementar poblaciones en los lugares donde ya se encuentre el nematodo.

La formación de células multinucleadas es la característica más notable en plantas infectadas por nemátodos agalladores, creadas por la presencia de sustancias emitidas por la región glandular para predigerir el alimento a succionar.

La histopatología ha jugado un papel importante en los métodos para estudiar la relación que existe entre parásito-hospedero, enfocado principalmente a la búsqueda de reacciones de hipersensibilidad u otras reacciones que conlleven ha detectar con facilidad plantas resistentes a sus parásitos.(Barker and Hussey, 1976).

Todos los nemátodos parásitos de plantas requieren tejidos vivos para su reproducción, con una gran variación en los hospedantes como entre los diferentes nemátodos. Por ejemplo, el nemátodo dorado se reproduce sólo sobre unas cuantas especies de plantas mientras que hay centenares de especies huéspedes de nemátodos agalladores de raíces. (N.A.S., 1978).

En la actualidad existen procedimientos modernos para describir taxonómicamente a las diferentes especies de *Meloidogyne*, como ejemplo tenemos, el análisis de proteína vía electroforesis con gel de poliacrilamida, la cual distingue las especies de este género, pero la

morfología del modelo perineal, la morfología de la cabeza de hembras y la morfología del estilete de hembras parecen ser los caracteres más útiles y sencillos.

Dado que la bibliografía relacionada a *Impatiens* spp. y asociada a enfermedades ocasionadas por nemátodos fitoparásitos es muy escasa y con la finalidad de contribuir al conocimiento de las mismas, se diseñó la siguiente investigación con los siguientes objetivos:

1. Identificar la o las especies de nemátodos que ocasionan el agallamiento de las raíces en *Impatiens* spp
2. Mediante la histología de la raíz del hospedero observar que partes del tejido se ven afectados por la presencia de los nemátodos en cortes transversales como longitudinales.
3. Observar cual de las dos variedades de *Impatiens* spp. es más susceptible al ataque del nemátodo agallador.
4. Analizar las medidas de las células gigantes para ver si hay relación de largo por ancho.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Cultivo

La familia Balsaminaceae tiene como género importante de plantas ornamentales de trasplante a *Impatiens*, siendo la balsamina común *Impatiens balsamina* la especie más conocida. Sin embargo, la *Impatiens* híbrida de la actualidad ha venido de *I. holsti* e *I. sultani* y sus híbridos, por eso el nombre común de “sultana” , “paciencia” o “belén”. (Larson, 1988).

En estudios realizados por otros investigadores, de las especies que se tiene mayor información sobre la incidencia de nemátodos fitoparásitos en esta ornamental son: *I. balsamina* y *I. walleriana*.

2.1.1 Taxonomía

Sánchez (1984) clasifica a los belenes de la siguiente forma:

Subdivisión	Angiospermas
Orden	Sapindales
Familia	Balsaminaceae
Género	<i>Impatiens</i>
Especie	<i>balsamina</i>
Nombre científico	<i>I. balsamina</i>

2.1.1.1 Descripción botánica de *Impatiens* spp.

El género *Impatiens* tiene hojas ovales lanceoladas, dentadas, pecioladas, alternas u opuestas. Las flores parecen tener solo cuatro sépalos, pero el anterior, bifurcado en el ápice, probablemente deriva de dos. El posterior, que aparece como anterior cuando la flor cuelga de su pedicelo, es el

más grande y forma un espolón. La corola consta de 5 pétalos de colores vivos, como rosa, rojo, púrpura, amarillo o blanco, los pétalos laterales están unidos por parejas (Heywood, 1985).

2.1.1.2 *Impatiens balsamina*

Planta anual con tallo verde claro y succulento, hojas lanceoladas y flores abundantes simples o dobles de colores vistosos: blanco, rojizas, rosas o púrpuras. Las flores nacen en racimos muy cerca del tallo principal, a lo largo de su tercio superior. Las semillas se liberan por sí solas. Se pueden cortar las flores cuando la mitad o un poco más de las flores de todo el tallo ya han abierto por completo. Se recomienda eliminar las flores más bajas cuando ya están marchitas. Algunas variedades enanas de flores dobles tienen floración central encima de una roseta de hojas. Se recomienda cortar este tipo de variedad tan pronto como el botón terminal está totalmente abierto. Tallos hendidos (cuarteados). Se debe remover suficiente follaje para mostrar las flores lo mejor posible, y perdurar más tiempo (Nehrling y Nehrling, 1958).

2.1.1.3 *Impatiens sultani*

Esta especie, al igual que las otras, tiene tallos jugosos con hojas brillantes de color verde claro, y flores de color blanco, rosa, rojas o salmón (Nehrling y Nehrling, 1958). Requiere de lugares sombreados. Aunque las variedades de Nueva Guinea toleran una mayor cantidad de sol. Planta excelente para lugares sombreados. Los nuevos híbridos son muy coloridos y de floración continua. Esta planta es considerada un problema mientras crece en el invernadero, ya que las flores caen fácilmente en las plantas inferiores y puede comenzar alguna enfermedad con el clima nublado y húmedo (Larson, 1988).

2.1.1.4 *Impatiens walleriana* = *I. holsti*

Originaria de Africa tropical. Sus tallos son muy ramificados, de 40 a 50 centímetros de altura. Sus flores son de color rosa, naranja, rojo o violeta (Bossard, 1983). A esta especie algunos autores la enlistan como *I. sultani*. Los híbridos formados de esta especie tienen flores blancas, rosas o salmónes, con tallos succulentos y de color verde claro y follaje. Excelente para floración

de verano en jardines sombreados. Necesitan de mucho sol durante los meses de invierno. Su propagación es por medio de semillas (Laurie y Ries, 1950).

2.1.1.5 Enfermedades y plagas de *Impatiens* spp.

Enfermedades

Marchitez bacteriana

Ocasionado por *Pseudomonas solaracearum* en Wisconsin el marchitamiento en *Impatiens* se atribuye a este patógeno, el cual ataca a solanáceas (Pirone, 1978).

Control: Eliminar y destruir a las plantas infectadas. Antes de replantar, esterilizar con vapor de agua el suelo donde aparecieron las plantas enfermas (Pirone, 1978).

Damping off

Ocasionado por *Pythium ultimum* y *Pellicularia filamentosa* las plantas de *Impatiens* jóvenes son bastante susceptibles al damping off (Pirone, 1978).

Control: Usar suelo limpio o sembrar las semillas en un sustrato bien tamizado y húmedo (Pirone, 1978).

Mancha foliar

Ocasionada por *Cercospora fukushiana*, *Septoria noli-tangeris*, *Phyllosticta* sp., y *Stemphyllium botryosum* estos hongos causan manchas pequeñas más o menos circulares de color café (Pirone, 1978).

Control: Arrancar y destruir las hojas infectadas (Pirone, 1978).

Otras enfermedades

Pudrición de tallo ocasionada por *Pellicularia rolfsii* y marchitez por *Verticillium alboatrum* son dos parásitos fungosos del *Impatiens* (Pirone, 1978).

Control: Usar suelo limpio o tratar el suelo infestado con calor o productos químicos. (Pirone, 1978).

Plagas

Afido del *Impatiens*, *Macrosiphum impatiens*, algunas veces esta especie puede ser muy frecuente en este hospedero (Pirone, 1978).

Control: Asperjar con Malation (Pirone, 1978).

Diabrotica de la calabaza

Diabrotica undecimpunctata howardi. El cuerpo de este coleoptero es negro, los élitros son verde amarillentos, cada uno marcado con seis manchas grandes. Se alimenta de botones haciendo agujeros en ellos y en los peciolos (Pirone, 1978).

Control: Asperjar Diazinon, o Metoxicloro (Pirone, 1978).

Chinche Lygus

Lygus linearis los nuevos retoños del *Impatiens* se tornan negros cuando son atacados por esta chinche (Pirone, 1978).

Control: Asperjar Diazinon, o Metoxicloro (Pirone, 1978).

Araña ciclamina

Steneotarsonemus pallidus este ácaro es uno de los más pequeños que atacan a las plantas ornamentales (Pirone, 1978).

Control: Aplicar Dicofol (Pirone, 1978).

2.2 Nemátodos agalladores en *Impatiens*

Cuadro 1. Lugares donde se reporta la presencia de especies de *Meloidogyne* en *Impatiens*.

Nemátodo agallador	Especie	Lugar donde se reporta
<i>M. grahami</i>	<i>I. walleriana</i>	Florida, E.U.A. (Triology Technical Report, 1990)
<i>M. arenaria</i> y <i>M. javanica</i>	<i>I. balsamina</i>	Paraná, Brasil. (Dos Santos y Pivatto, 1986)
<i>M. incognita</i>	<i>I. balsamina</i>	Moldavia, ex URSS. (Batyr y Kozhokaru, 1985)
<i>M. arenaria</i> , <i>M. javanica</i> Y <i>M. incognita</i>	<i>I. balsamina</i>	Aligarh, India. (Haider y Khan, 1986)
<i>M. arenaria</i>	<i>I. balsamina</i>	Meerut, India. (Singh y Goyal, 1979)

También se tienen reportes de otros nemátodos que se pueden encontrar en *Impatiens*, como *Helicotylenchus dihystra* y *Pratylenchus brachyurus* (Triology Technical Report, 1990).

2.3 Importancia del género *Meloidogyne*

El nemátodo agallador, *Meloidogyne* spp. es un patógeno económicamente importante de las plantas ya que se encuentra distribuido a lo largo de todo el mundo parasitando a más de 2,000 especies diferentes de plantas; es un parásito obligado que ocasiona daños a diferentes especies de

plantas en el cual se incluyen monocotiledóneas, dicotiledóneas, herbáceas y plantas leñosas; causando la formación de agallas en las raíces de hospederos susceptibles. Sin embargo, estas agallas no se pueden confundir con los nódulos nitrificantes de las leguminosas, porque éstos, además de no afectar fisiológicamente a la raíz, se desprenden fácilmente al tocarlos. Una vez dentro de la raíz, el nemátodo forma lo que se llaman “células gigantes multinucleadas” o “células nodrizas”, que son producto de una serie de reacciones inducidas por el nemátodo. Las especies del género *Meloidogyne* son patógenos que ocasionan daños en la mayoría de los cultivos alimenticios, vegetales, frutícolas y ornamentales, así como malezas que crecen en clima tropical, subtropical y templado. Estos reducen el rendimiento al igual que la calidad del producto (Sasser, 1972; Bird, 1974; Hatman y Sasser, 1985). Las especies más ampliamente distribuidas y de importancia económica de todas las especies del nemátodo agallador son *M. incognita*, *M. hapla* y *M. arenaria* (Sasser, 1977); varias razas del nemátodo se han caracterizado citológicamente y utilizando hospederos diferenciales como testigo, en *M. incognita* se han identificado cuatro razas (Eisenback, et al., 1981).

Las alteraciones producidas en la raíz por nemátodos agalladores difiere según la especie y la planta. Al respecto Schuster y Sullivan (1960) proponen una técnica para identificar géneros y especies tomando como base particularidades tales como: estimulación o inhibición del desarrollo de pelos absorbentes, raíces secundarias y células de la epidermis.

2.3.1 Taxonomía

Golden (1971) y Maggenti et al. (1987), señalan que *Meloidogyne* se encuentra ubicado taxonómicamente en:

Phyllum:	Nemata
Clase:	Secernentia
Orden:	Tylenchida
Suborden:	Tylenchina
Superfamilia:	Tylencoidea

Familia: Heteroderidae
Subfamilia: Meloidogyninae
Género: *Meloidogyne*.

2.3.2 Morfología de *Meloidogyne* spp

La morfología básica de las especies de *Meloidogyne* es bastante similar; sin embargo, existen ciertos caracteres distintivos que son de utilidad en la diferenciación de ellas. Esos caracteres incluyen: la morfología del modelo perineal y la morfología del estilete. Deben tomarse en cuenta también, ciertos datos morfométricos que pueden usarse y, por eliminación, descartar algunas especies en el proceso de identificación. (Eisenback et al., 1983).

2.3.1.1 *Meloidogyne incognita*

En plantas susceptibles las poblaciones de *M. incognita* pueden producir agallas individualizadas, pero generalmente éstas coalescen para formar agallas grandes y algunas veces masivas, como ocurre en cucurbitáceas. Generalmente el tipo de agallamiento no se considera útil para la identificación de la especie. Tiene un rango de hospedantes muy extenso. Frecuentemente esta especie se encuentra coexistiendo con *M. javanica* (Eisenback et al., 1983).

2.3.1.1.1 Modelos perineales

Los modelos perineales de *M. incognita* tienen un arco dorsal alto formado por estrías que pueden ser desde lisas hasta onduladas. Algunas estrías se bifurcan cerca de las líneas laterales, las que no están claramente visibles. Frecuentemente se observan estrías que se dirigen hacia la vulva. (Eisenback et al., 1983).

2.3.1.1.2 Estiletes

En *M. incognita* el cono del estilete está claramente curvado dorsalmente. La porción anterior del cono es cilíndrica y la mitad posterior, cónica. La columna es ligeramente más ancha en la base.

Los nódulos son anchos y planos, separados de la columna y con proyecciones hacia la parte anterior tan marcadas en algunos especímenes, que cada nódulo se ve como si fueran dos. La longitud del estilete es de 15 a 17 μ m. (Eisenback et al., 1983).

2.3.1.2 Meloidogyne arenaria

Esta especie generalmente produce muchas agallas pequeñas, en forma de “cuentas de rosario”, que no tienen raíces laterales cortas, sin embargo, muy frecuentemente las agallas producidas por las poblaciones de *M. arenaria* son similares a las de *M. incognita* y *M. javanica*. Se considera que *M. arenaria* es menos importante que *M. incognita* o *M. javanica* (Eisenback et al., 1983).

2.3.1.2.1 Modelos perineales

El arco dorsal en las poblaciones de *M. arenaria* es de aplanado a redondeado. Las estrías en el arco se curvan ligeramente hacia las líneas laterales y forman generalmente una ondulación pronunciada, llamada “hombrera”. Frecuentemente las estrías dorsales y ventrales se unen formando un ángulo, en las líneas laterales, algunas se bifurcan y son cortas e irregulares, cerca de las líneas laterales. Las estrías son lisas a onduladas y algunas pueden dirigirse hacia la vulva. Los modelos perineales pueden también presentar estrías que se prolongan lateralmente para formar una o dos alas. Sin embargo, algunas poblaciones presentan modelos perineales similares a los de *M. hapla* o *M. incognita* (Eisenback et al., 1983).

2.3.1.2.2 Estiletes

Las hembras de *M. arenaria* tienen estiletes típicos que son muy característicos de la especie. En general, el estilete es muy robusto; el cono y la columna son gruesos. La columna incrementa su anchura hacia la base y emerge gradualmente de los nódulos basales del estilete; éstos son anchos y redondeados en su parte posterior. La longitud es de 13 a 17 μ m (Eisenback et al., 1983).

2.3.1.3 Ciclo Biológico

El nemátodo agallador presenta un marcado dimorfismo sexual; la hembra es periforme y el macho vermiforme, la diferencia de la forma del cuerpo entre el macho y la hembra se vuelve estable durante el desarrollo postembrionario (Triantaphyllou y Hirschmann, 1960).

La hembra produce un saco gelatinoso en el extremo posterior de su cuerpo, el cual se adhiere en la apertura genital y recibe el depósito de aproximadamente 500 huevecillos (Filipjev y Stekhoven, 1959; Agrios, 1985). La primera etapa larvaria se desarrolla en el interior del huevecillo y después de sufrir la primera muda dentro de él se desarrolla la segunda etapa larvaria; este último estado juvenil vermiforme e infectivo emerge del huevecillo y llega al suelo donde se desplaza hasta encontrar una raíz susceptible o migra al tejido adyacente donde se establece. La localización de su hospedero es posiblemente por medio de sus anfidias (Christie, 1936; Thorne, 1961; Agrios, 1985).

Las larvas son atraídas generalmente alrededor de la zona subapical de las raíces en crecimiento, penetran y se desplazan en los tejidos, tanto intercelular como intracelularmente, destruyen la pared de las células por medio de la acción repetida del estilete, hasta llegar cerca del cilindro central donde se inmovilizan y fijan la cabeza en el sitio de alimentación (Lownsbery y Viglierchio, 1960; Dropkin y Nelson, 1960).

El nemátodo se alimenta de las células que se encuentran en torno a su cabeza a las que hace que crezcan y también licúa parte de su contenido, el cual succiona a través de su estilete. El nemátodo sufre una segunda muda y da lugar a la tercera etapa larvaria, que es similar a la segunda etapa larvaria, diferenciándose la tercera por carecer de estilete y ser más gruesa. La tercera etapa larvaria sufre una tercera muda y se desarrolla la cuarta etapa larvaria donde es posible distinguir el sexo. Este puede ser identificado por el número de gónadas: las hembras siempre tienen 2 gónadas y los machos usualmente sólo una (Agrios, 1985).

Los machos formados después de la cuarta muda se encuentran desarrollados en el interior de las cutículas de los estadios precedentes. Reaparece el estilete y se desarrollan las espículas, los

órganos digestivos y reproductores se presentan en la muda final. Ellos con ayuda del estilete rompen las cutículas larvales para emerger como un adulto macho (Bird, 1959).

La hembra de la cuarta etapa larvaria continúa aumentando de grosor y un poco más de largo, sufre la cuarta y última muda y se desarrolla en una hembra adulta (Agrios, 1985). Durante el desarrollo postembrionario el sistema reproductivo se desarrolla y las gónadas se vuelven funcionales (Trintaphyllou y Hirschmann, 1960).

Bajo condiciones desfavorables para su desarrollo, la hembra en etapa juvenil experimenta una reversión sexual y se desarrolla en macho; dependiendo de la etapa de desarrollo en el cual se presenta la reversión sexual, el macho puede tener una o dos gónadas de diferente tamaño. De esta manera si la reversión sexual se presenta al inicio del segundo estado juvenil, se transforma en un macho con un sólo testículo y si se presenta al final de esta fase de desarrollo, se convierte en un macho con dos testículos (Papadopoulou y Triantaphyllou, 1982).

Dependiendo del tipo de reproducción de la especie, sexual o partenogenética, el macho puede buscar una hembra y aparearse o marcharse de la raíz y mantenerse en el suelo hasta morir. El ciclo de vida está fuertemente influenciado por la temperatura, para *Meloidogyne incognita* en tomate es de aproximadamente a 29° C, la primera hembra adulta aparece 13 a 15 días después de penetrar la raíz; la primera deposición de huevecillos se presenta a los 19 ó 21 días de la penetración (Triantaphyllou y Hirschmann, 1960). El tiempo en que la hembra produce huevecillos puede extenderse de 2 a 3 meses.

2.4 Interacción Planta-Nemátodo

Todas las plantas que presentan susceptibilidad dan lugar a pronunciados cambios morfológicos y fisiológicos en respuesta a estímulos del nemátodo, es por esta razón por la que hay que conocer estos cambios que ocurren en la planta para poder comprender la interacción existente entre esta y el parásito (Agrios, 1985).

2.5 Respuestas morfológicas y fisiológicas de la planta

Este tipo de parásito generalmente penetra por las partes subterráneas como la raíz, rizomas y tubérculos donde induce el desarrollo de un crecimiento anormal o elongación. Aunque hay algunos casos en que la porción basal del tallo es invadida por el nemátodo (Christie, 1936). Steiner (1940) menciona que el nemátodo agallador ocasiona severos daños en cotiledones, tallos y hojas de plántulas de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) cuando germinan bajo condiciones de alta infestación del suelo; así cuando el tallo de esta misma especie se cubre con el suelo, puede ser invadido por el nemátodo (Tyler, 1938; citado por Linford, 1941).

Las plantas infectadas presentan un crecimiento reducido y tienden a marchitarse durante el día. Cuando las poblaciones del nemátodo son muy altas, las plantas jóvenes pueden morir sin indicios aparentes de la formación de agallas (Thorne, 1961).

La respuesta morfológica más obvia es la formación de agallas en las raíces de la planta infectada, cuyo tamaño y cantidad va a depender de la especie tanto del nemátodo como de la planta involucrada en la relación parásito-planta. Las agallas generalmente son pequeñas, sin embargo el tamaño puede estar relacionado con su localización anatómica en la planta (Bird, 1974).

Los tubérculos, rizomas y ciertas raíces pueden contener un considerable número de hembras sin la producción de síntomas característicos. Este únicamente puede ser detectado al cortarlos durante la inspección. Los tubérculos susceptibles de papa se caracterizan por un crecimiento verrucoso y la posición de la hembra se reconoce por las manchas cafés que son formadas por un grupo de células en contacto con la masa de huevecillos (Thorne, 1961).

Dropkin et al. (1969) fueron los primeros en demostrar que el suministro de citoquininas exógenas en plantas resistentes de tomate las hace más susceptibles al ataque de *Meloidogyne incognita* e incrementa la formación de agallas. Posteriormente Kochba y Samish (1972) establecieron que los bajos niveles de citoquininas y auxinas se encuentran en plantas resistentes e inversamente en las susceptibles. Esto indica que el nemátodo puede usar las hormonas de

crecimiento para su propio desarrollo y que puede requerir ciertos niveles de ellos en las plantas hospederas antes de poder crecer y reproducirse.

Todas las plantas responden a la infección con una reducción en su grado de fotosíntesis, crecimiento y rendimiento. Esto sugiere que el nemátodo influye en la fisiología de la planta al interferir con la síntesis y translocación de hormonas de crecimiento producidas en la raíz (Bird, 1974).

2.6 Respuesta de las células en plantas susceptibles

Para que el nemátodo se desarrolle de manera exitosa, es importante la producción de células gigantes o células de transferencia multinucleadas. Esta es una adaptación celular altamente especializada que induce y mantiene el nemátodo (Bird, 1974), que actúa como un arrastrador de nutrientes al incrementar la actividad metabólica de células gigantes, provocando la movilización de fotosintatos de los brotes a la raíz y en particular a las células gigantes. La movilización y acumulación de sustancias, alcanza su máximo cuando la hembra inicia la deposición de huevecillos y disminuye cuando éste finaliza (Mc Clure, 1977; Bird y Loveys, 1975).

Las células gigantes se desarrollan por la acción repetida de un proceso que involucra pinchazones de la pared celular por medio del estilete del nemátodo, inyección de secreciones dentro de la célula y succión del contenido celular (Christie, 1936). Solamente el segundo estado juvenil es capaz de iniciar la formación de las células gigantes, mientras que la hembra adulta sólo requiere mantener la actividad fisiológica de dichas células previamente establecidas (Veech, et al., 1987).

Los mecanismos de formación de las células gigantes han sido estudiados, y se ha sugerido que las células gigantes se forman por la disolución de paredes celulares y consecuente fusión de células adyacentes (Christie, 1936; Dropkin y Nelson, 1960).

Basándose en el número de cromosomas presentes en las células gigantes, Huang y Maggenti (1969) sugirieron que se forman a través de repetidas endomitosis sin citoquinesis, considerando la expansión de una sola célula. La no evidencia de disolución celular fue demostrada por Jones y

Payne (1978). A pesar de este descubrimiento, existe la posibilidad de que la disolución de la pared celular pueda estar involucrada en la formación de células gigantes en alguna relación hospedero-parásito, dependiendo de la especie de ambos (Bird, 1974).

2.7 Identificación

Las agallas producidas por *Meloidogyne* son similares en su morfología; sin embargo, algunas especies como *M. exigua*, *M. hapla* y *M. kikuyensis* producen agallas características, las cuales pueden ser usadas para su identificación (Jepson, 1987).

El concepto de lo que constituye una especie es necesariamente subjetiva en un género donde los modos de reproducción van desde amfimixis, partenogénesis meiótica facultativa o partenogénesis meiótica obligada (Triantaphyllou, 1982).

Sasser (1972), demostró que existen razas fisiológicas o patotipos en algunas especies de *Meloidogyne* a partir de estudios realizados en 9 plantas indicadoras con respecto a 11 poblaciones de *M. incognita*, 15 de *M. javanica*, 10 de *M. hapla*, 2 de *M. exigua* y 10 de *M. arenaria*.

Varios fenotipos de enzimas, especialmente las esterasas son específicas y pueden ser usados confiablemente como carácter taxonómico para identificar especies de *Meloidogyne*. Recientemente el uso de tales fenotipos de enzimas en la identificación de especies de *Meloidogyne* se ha vuelto fácil y práctico. Los avances de la tecnología hicieron posible la invención de un aparato electroforético automático, en el cual los fenotipos de dos o más enzimas pueden ser revelados a partir del extracto de la proteína de una sola hembra de *Meloidogyne*. Tales aparatos son usados ahora cotidianamente en algunos laboratorios como el primer paso en la identificación de especies de poblaciones del mencionado género. En muchas ocasiones los fenotipos de esterasas de un pequeño número de hembras de una población desconocida son comparados con el fenotipo de una hembra de *M. javanica*, tal comparación frecuentemente revela si la población es pura o si la población es heterogénea (Esbenshade y Triantaphyllou, 1989).

2.8 Histopatología

La histopatología es una herramienta de gran ayuda ya que nos ayuda para poder entender la fisiología tanto normal como alterada provocada por algún tipo de patógeno que interfiera en el desarrollo o metabolismo, en este caso de algún vegetal de interés. Para poder familiarizarse con este tema hay que tener noción de la historia de la histología, los métodos microtécnicos utilizados en nemátodos y algunos estudios recientes realizados con los patógenos de interés.

2.9 Historia de la histología

Desde Nechemiah Grew y Robert Hooke que fueron de los primeros en realizar este tipo de trabajos hasta los realizados por Matthias Schleiden y Herman Schacht, la técnica histológica se encontraba en condiciones muy precarias, dado que cada investigador de aquel tiempo tenía que construir su propio microscopio así como algunos otros aditamentos. Los tejidos eran sujetados con la mano y cortados con una navaja filosa. La teoría celular de Scheiden, de que las plantas están constituidas por células fue observada a partir de este tipo de preparaciones. Para el año de 1770, ya se había usado un carmín como colorante propuesto para su uso en microscopía, sin embargo, cuando Sherder anuncia su teoría celular, el colorante no toma parte importante en la técnica histológica (Chamberlain, 1932).

El mismo autor indica que a partir del año de 1850 los colorantes se usaron cada vez más y su demanda hizo que en Alemania se conformaran compañías proveedoras de colorantes para su uso en el microscopio. Durante la primera guerra mundial los colorantes fueron fabricados en América y cuando se conformó la Comisión de Estandarización de los Colorantes Biológicos, éstos mejoraron notablemente.

Durante los primeros años del microscopio fotónico, la tinción de los cortes era realizada con un sólo colorante. Después se hizo común emplear dos colorantes, el primero teñía algunos componentes y después otro que contrastaba con el anterior (Ham y Cormark, 1984).

Antes de fin de siglo fueron numerosos los agentes fijadores, tipos de parafina y microtomos, así como los colorantes que hicieron alcanzar un alto grado de eficiencia (Chamberlain, 1932).

2.10 Métodos microtécnicos en nematología

Los estudios histológicos que involucran especies de *Meloidogyne*, requieren de la capacidad de preparar secciones delgadas del tejido infectado con el mínimo de distorsión. La examinación de tales secciones con el microscopio puede ser usada para el estudio y comparación de las reacciones de varios tejidos a tratamientos de nemátodos. El tejido es embebido en una matriz de parafina o plástico, para su posterior seccionado y manipulado. Las secciones de parafina que se obtienen con el tejido embebido, no requieren de un equipo muy sofisticado y con este una gran cantidad del tejido puede ser examinado con rapidez. Sin embargo secciones más delgadas se pueden obtener de tejido embebido en plástico donde se pueden observar grandes detalles histológicos (Daykin y Hussey, 1985).

2.11 Método de la parafina

De este método, es importante tener conocimiento de los siguientes pasos: la selección, preparación, fijado, deshidratado y aclaramiento del tejido, así como su infiltración e inclusión en parafina; el corte, tinción y montaje del tejido.

2.12 Selección y preparación del tejido

En todo estudio histopatológico siempre se debe incluir el tejido sano e infectado, esto para tener parámetros de comparación, y se aconseja colectarlo en diferentes etapas de desarrollo del nemátodo. Las raíces deben lavarse con agua corriente para eliminar la mayoría de las partículas de suelo adheridas al tejido. Esto favorece al seccionado ya que si no se eliminan esas partículas puede dejar sin filo la navaja del microtomo. Después de lavadas las raíces se seccionan en piezas de casi medio centímetro de longitud, mientras que las raíces grandes y tallos de 1 cm de diámetro también deben ser cortadas longitudinalmente para permitir el intercambio de las sustancias químicas durante el proceso de fijado. Cuando se prepara el tejido para el fijado hay

que tener cuidado de que no se rompa o deshidrate durante la manipulación (Daykin y Hussey, 1985).

2.13 Fijado del tejido vegetal

Casselman (1962) menciona que el fijado del tejido tiene por objeto provocar una muerte rápida de las células y conservar su estructura y ultraestructura con las menores modificaciones posibles. Esto se logra por medio del fijador, que actúa como un coagulante de los constituyentes celulares y tiene una acción mordiente que propicia las condiciones para la retención de los colorantes y el endurecimiento del tejido que facilita el corte. Debido a que en la práctica una sola sustancia no cumple con las cualidades antes mencionadas, los ingredientes de las fórmulas que se utilizan con este propósito se encuentran en proporciones tales que ejercen un balance entre sus acciones.

2.14 Deshidratación y aclaramiento

El procedimiento consiste en sumergir el bloque de tejido primero en una solución poco concentrada de alcohol hasta pasarlo finalmente por dos cambios de alcohol absoluto, después de lo cual se elimina el agua. Este procedimiento evita el colapso de las células o la distorsión del espécimen. Del alcohol, el tejido se pasa por cambios sucesivos de xilol (un agente clarificante que es soluble en parafina y alcohol) para remover el agente deshidratador del tejido y proporcionar las condiciones para su infiltración en parafina (Ham y Cormark, 1984; Gray, 1964).

2.15 Infiltración, inclusión y corte

Después del aclaramiento, el tejido se coloca en parafina fundida y se deja en ella hasta que todo el xilol sea sustituido por la parafina, enseguida, se embebe en parafina pura o nueva. El bloque incluido se monta en un microtomo, por medio del cual se obtienen secciones de parafina con el tejido (Ham y Cormark, 1984; Konarev, 1972).

2.16 Técnicas de tinción

Se han usado tres procedimientos de tinción para las muestras de raíz infectados con nemátodos, la tinción cuádruple de (Johansen, 1940) Safranina-Verde Rápido y la “Triarch Quadruple Stain” (Daykin y Hussey, 1985). Después de la tinción, el tejido es montado en bálsamo para su observación al microscopio (Konarev, 1972; Gray, 1964).

2.17 Tejido de plantas incluido en plástico para microscopio de luz

Un procedimiento general involucra la fijación de pequeñas piezas de tejido en glutaraldehído (4 %) en amortiguador de fosfato 0.1 M a pH 7.2, enjuagar dos veces, deshidratar e incluir en resina de Spurr (Spurr, 1969). Las secciones de 3 μ m de grosor son cortadas con mucho cuidado, devastando el bloque de plástico en un ultramicrotomo por medio de una navaja de vidrio y haciendola flotar en agua destilada con gelatina a 60° C para colocarla sobre un portaobjetos. La tinción de las secciones se realiza con azul de toluidina y se monta en forma permanente en resina Polimount (Dawes, 1971). Excelentes resultados se han obtenido con el tejido incluido en plástico que previamente ha sido infectado con nemátodos (Jones y Payne, 1978).

2.18 Estudios histopatológicos

Dropkin y Nelson (1960), en el estudio que realizaron en raíces de soya observaron que la larva de *Meloidogyne arenaria* provocó una intensa multiplicación celular, seguida por una hipertrofia de células circundantes a región cefálica del nemátodo, así como una disolución de la pared celular lo que provoca la formación de células gigantes multinucleadas. También Minton (1962) realizó trabajos similares con *M. arenaria* en raíces de cacahuate, dichos estudios revelaron que por la acción de este nemátodo se presenta hipertrofia e hiperplasia en los tejidos. Mariscal (1984) trabajando con cacahuate encontró que en las vainas, *M. arenaria* causa necrosis en las células de la epidermis, hipertrofia e hiperplasia en los haces vasculares y la formación de almidón en las células parenquimatosas.

Huang y Maggenti (1969) encontraron que en la presencia de *M. javanica* originó la formación de células gigantes, las cuales se derivaron de repetidas mitosis a partir de una célula original diploide sin la subsecuente citoquinesis.

Taha y Raski (1969), reportaron que *M. javanica* se reproduce de manera acelerada en el trébol blanco y formando agallas en los nódulos nitrificantes, lo que provocó un decremento en el número de nódulos por el hecho de suprimir el crecimiento de la raíz. También reportaron la formación de nódulos en agallas y la no destrucción del tejido nodular por la infección y formación de células gigantes en el haz vascular.

Barker y Hussey (1976) realizaron una investigación en nódulos de leguminosas, donde demostraron que *M. incognita* se desarrolla y reproduce en el haz vascular de la soya e induce la formación de células gigantes multinucleadas con áreas de la pared celular agrandadas, mientras que en chícharo provoca un crecimiento interno de la pared, lo que permite su función como una célula de transferencia al transportar solutos a través de la pared celular. También reportan que *M. hapla* ocasiona un daño mínimo y no hay presencia de alteraciones en los tejidos nodulares del cacahuate.

Jiménez et al. (1986) reportan que *M. incognita* raza 1 induce en la raíz de garbanzo la formación de tres a cinco células gigantes multinucleadas con el núcleo y los nucleolos agrandados como resultado de la alimentación del nemátodo en el cilindro vascular de el cuerpo hinchado de la hembra, las células gigantes y la hiperplasia provocaron la desorganización del sistema vascular, presionando y desplazando a éste hacia el tejido cortical.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Obtención del material enfermo

Las plantas enfermas se obtuvieron al realizar un muestreo dirigido en el mercado de plantas de Xochimilco en el verano de 1997, a plantas de *Impatiens* que manifestaban síntomas, tales como crecimiento reducido y clorosis, las plantas colectadas fueron de la especie *I. balsamina* con flores de color rosa y púrpura. Con la ayuda de una pala se procedió a extraer dichas plantas, las plantas que presentaban agallas se colocaron en bolsas de polietileno para evitar pérdidas de humedad, después estas fueron llevadas al laboratorio de nematología, de la Universidad Autónoma Chapingo.

3.2 Conservación de la población obtenida

Las muestras obtenidas se guardaron en un refrigerador a una temperatura de 4°C en el laboratorio de nematología del Departamento de Parasitología Agrícola, ubicado en el Campus de la U.A.Ch., dichas muestras sirvieron para llevar a cabo el estudio histopatológico, los estudios de identificación y conservar material de reserva.

3.3 Fase de laboratorio

Una parte de la muestra se utilizó para el estudio de laboratorio el cual comprendió: la identificación de las especies de nemátodos que para llegar a su conclusión se realizó, la extracción de hembras, con sus respectivos cortes de cabeza y su parte perineal, que posteriormente se montaron en preparaciones tanto permanentes como temporales para llevar a cabo la morfometría y por otro lado para cumplir con el objetivo de la histopatología las actividades realizadas fueron las de preservación, deshidratación e infiltración con parafina del tejido sano y enfermo, inclusión del tejido en parafina, cortes histológicos, tinción de cortes y por último la toma de fotografías para describir los tejidos afectados.

3.4 Extracción de hembras adultas (piriformes)

Para realizar la extracción de las hembras piriformes, se lavaron las raíces cuidadosamente tratando de quitarles totalmente la tierra y luego se procedió a fraccionarlas para facilitar su manejo. Las fracciones de raíz con agallas se disectaron y se les extrajo de manera individual bajo un microscopio de disección.

Los principales caracteres morfológicos utilizados en la presente investigación para llevar a cabo la identificación de dichas especies involucradas en la mencionada ornamental fueron los tipos de cortes tanto perineal y de cabeza los cuales sirvieron para tomar algunas medidas como la longitud de la vulva, longitud del estilete, diámetro interno y externo del metacarpus y la distancia de la base del estilete a la desembocadura de la glándula esofágica dorsal.

3.5 Morfometría

La morfometría es una fase importante dentro de la identificación de los especímenes en la nematología y comprende la calibración del microscopio para poder después medir a los nemátodos.

Antes de tomar las medidas se calibró el microscopio de la siguiente manera: Se colocó un ocular graduado cada 10 micras en uno de los oculares, se puso un portaobjeto graduado en micras en la platina y se observó para poder hacer coincidir ambas graduaciones. El punto de intersección de las graduaciones se utilizó para sacar el coeficiente de calibración cuya formula se muestra a continuación:

$$Cc = (\text{No. de Micrones del micrometro de la platina}) / (\text{No. de unidades del micrometro del ocular})$$

Para medir objetos bajo el microscopio se hace en unidades oculares (U.C.) y esto se multiplica por el coeficiente ocular (C.c.)

3.6 Medición y Observación

Tanto para efectuar la medición de los nemátodos así como la observación del tejido en el cuál se observaron las células gigantes tanto en cortes longitudinales y transversales, se utilizó un microscopio marca American Optical, la medición se realizó en micrómetros, utilizando como objetivo el aumento de 40x para tener una mayor precisión en la medición.

3.7 Análisis estadístico.

Se realizó un análisis estadístico de las dimensiones hechas a las células gigantes utilizando el procedimiento PLOT (Gráficas) del Sistema de Análisis Estadístico (SAS), mediante el cual se graficaron los datos de los valores mínimos y máximos, para poder observar como se distribuían en un diagrama de dispersión y de esa manera ajustar un modelo no lineal a partir de una ecuación lineal.

Después se procedió a efectuar una regresión lineal simple por medio del procedimiento Modelo General Lineal, GLM (General Linear Model) del SAS para poder describir la relación entre dos variables, una llamada independiente o predictoria (ancho de la célula) y otra llamada dependiente (longitud de la célula). Esto nos permite estudiar la influencia de una o más variables que llamamos independientes sobre otra que llamamos dependiente.

3.8 Comparación de los modelos perineales del nemátodo agallador en *Impatiens* sp. con los modelos descritos por Eisenback

Los cortes perineales hechos, sirvieron para su posterior comparación con las descripciones de las claves pictóricas de Eisenback de los modelos perineales de *Meloidogyne*. Dichos cortes llevaron a la identificación de los agentes causales que forman las agallas en las raíces de *Impatiens* sp.

3.9 Fijado de hembras

Para poder llevar un registro controlado, cada hembra extraída se transfirió a una cavidad “X” de una placa de ELISA, la cual dada su forma fue muy útil para una buena manipulación de los

ejemplares (a esta se le adicionó previamente 5 gotas del fijador FA 4:1 en cada una de sus cavidades), para que las matara y los tejidos de la raíz se fijaran sin distorsionarse.

3.10 Identificación de hembras adultas

Ya fijadas las hembras en FA 4:1 (de 24 a 96 horas), se procedió a realizar los cortes perineales y los cortes de cabezas para poder identificar las especies involucradas mediante comparación de modelos perineales, estiletes, y algunas mediciones.

3.11 Cortes perineales

Los cortes perineales se realizaron en glicerina con la ayuda de una navaja de rasurar nueva y dos pescadores (microestiletes preparados con cerdas de cerdo). Los montajes se realizaron en portaobjetos con glicerina y se sellaron con barniz de uñas.

3.12 Cortes de cabezas

Los cortes de cabeza se realizaron en glicerina con la ayuda de una navaja de rasurar nueva y dos pescadores. Los montajes se realizaron en portaobjetos con glicerina y se sellaron con barniz de uñas. Se midió la longitud del estilete, diámetro interno y externo del metacarpus, y la distancia de la base del estilete a la desembocadura de la glándula esofágica dorsal (Fig. 10).

3.13 Preservación, deshidratación e infiltración con parafina del tejido sano y enfermo

El tejido sano y enfermo se lavó con agua de la llave, se fraccionó en porciones de 1 cm, posteriormente se fijó en solución FAA (Cuadro 2), en el cual permaneció por 24 horas.

Cuadro 2. Reactivos que componen al fijador FAA.

Alcohol etílico al 70%	90 ml
Acido acético glacial	5ml
Formaldehido	5 ml

El bajo porcentaje de alcohol etílico debe ser empleado en los tejidos más delicados y la proporción de ácido acético y formaldehído puede variar de acuerdo a la naturaleza del material. Para material leñoso, es conveniente decrecer la cantidad de ácido acético e incrementar el formaldehído. El tiempo mínimo de fijado es de 18 horas (Johansen, 1940).

Antes de poner el tejido a deshidratar e infiltrar en parafina se consideró pertinente delimitar en el tejido enfermo el área infectada por el nemátodo. Por este motivo el tejido se colocó en una caja Petri con agua para evitar su desecación y se observó bajo el microscopio estereoscópico. Localizado el daño se procedió a seccionarlo a una longitud no mayor de 0.5 cm.

Las secciones obtenidas tanto de tejido sano como del enfermo, se transfirieron a un vaso de precipitados con agua y se lavaron con agua corriente durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, el tejido se colocó en una caja de plástico, se etiquetó y se puso a deshidratar e infiltrar con parafina (Merck) en el cambiador automático "Histokinete" (Cuadro 3).

Cuadro 3. Pasos seguidos en la técnica de inclusión en parafina.

No. de paso	Proceso
1	Alcohol 50 %
2	Alcohol 70 %
3	Alcohol 96 %
4	Alcohol 100 %
5	Alcohol 100 %
6	Alcohol 100 % y Xilol (1:1)
7	Xilol
8	Xilol
9	Xilol
10	Parafina
11	Parafina

3.14 Inclusión del tejido en parafina (Merke)

La inclusión en parafina consistió en colocar el tejido vegetal en una posición longitudinal y transversal en un molde de aluminio que estaba sobre una plancha caliente, conteniendo parafina fundida. Esta se dejó enfriar y se moldearon a pequeñas fracciones piramidales de 1 cm de base, mismas que se pegaron en bloques de madera para poder manipularlo y hacer el corte en el microtomo. Ya montados los bloques que contenían las agallas, se procedió a eliminar el exceso de parafina tratando que los lados quedaran paralelos, para que la película o tira que se forma durante el proceso de seccionado quedara lo más derecha posible, para facilitar la preparación de los montajes.

3.15 Cortes histológicos

Para realizar los cortes histológicos se utilizó un microtomo de la marca American Optical, en el cual, se hicieron cortes longitudinales y transversales de 12 y 13 micrómetros de grosor; las tiras obtenidas se guardaron en cajas de cartulina. Para lograr una buena calidad en los montajes y se facilitaran las observaciones, se lavaron previamente los portaobjetos en alcohol al 90% y se dejaron escurrir en posición inclinada y se secaron a temperatura ambiente. Las tiras de 4 cortes de parafina con el tejido se colocaron en un portaobjetos limpio conteniendo adhesivo de Haupt (Cuadro 4), después se le agregó una gota de formol al 10 % y de 1 a 3 gotas de resina sintética y después se le colocó el cubreobjetos. Los portaobjetos con los cortes se colocaron en una platina a 50° C, para que se estiraran. Una vez que estas se estiraron, los portaobjetos se dejaron inclinados durante 10 minutos con la finalidad de que el exceso de formol escurriera. Ocurrido lo anterior se limpió alrededor de los cortes con papel seda, se colocaron en una canastilla metálica y se puso a desparafinar por 24 horas en una estufa a 50° C.

Cuadro 4. Componentes del adhesivo de Haupt para cortes histológicos

Componente	Cantidad
Gelatina	1 g
Glicerina	13 ml
Fenol	2 g
Agua destilada	100 ml

Preparación

Se mezcló la gelatina con glicerina y se le agregó agua; posteriormente se calentó a no más de 45° C hasta que se disolvió, por último se agregó fenol y se filtró.

3.16 Tinción de cortes

Para la tinción de los cortes se utilizó la técnica cuádruple de Johansen modificada por Castillo (1982) (Cuadro 5) y la técnica de tinción Safranina-Verde Rápido (Johansen, 1940) (Cuadro 6).

Cuadro 5. Técnica de tinción cuádruple de Johansen (1940), con tiempos adaptados para raíces de belén (*Impatiens balsamina*)

No. de paso.	Sustancias	Tiempo
1	Xilol	5 min.
2	Xilol	5 min.
3	Xilol-etanol (1:1)	5 min.
4	Alcohol 96 %	5 min.
5	Alcohol 70 %	5 min.
6	Safranina	45 min.
7	Agua destilada	Enjuagar.
8	Cristal violeta al 0.5 % (1)	1 min.
9	Agua destilada	Enjuagar
10	Butanol (2)	3 min.
11	Butanol	3 min.
12	Verde rápido 1% (3)	15 min.
13	Verde Rápido-Naranja G (145 ml-5ml)	15 min.
14	Verde Rápido-Naranja G (148 ml-2ml)	15 min.
15	Naranja G	30 seg.
16	Butanol	Enjuagar
17	Xilol	5 min.
18	Xilol	5 min.

Safranina: Safranina al 1 % (1 g de safranina en 100 ml de etanol al 50 %).

Cristal violeta: Cristal violeta acuoso al 1 % (1 g de cristal violeta en 100 ml de agua destilada).

Naranja G: Naranja G al 0.4 % (0.4 g de naranja G en 100 ml de aceite de clavo).

Verde rápido: Verde rápido al 1 % (1 g de verde rápido en 100 ml de butanol).

Algunos de los pasos de la técnica de Johansen se modificaron: el colorante cristal violeta se cambio en su concentración original de 1 % a 0.5 %, el etanol se sustituyó por butanol, se

suprimió el colorante naranja G en uno de los pasos y por último se modificaron los tiempos de exposición a los colorantes.

Cuadro 6. Técnica de tinción Safranina-Verde rápido con tiempos adaptados a la raíz de *Impatiens spp*

Paso	Sustancia	Tiempo
1	Xileno	5 min.
2	Xileno	5 min.
3	Xileno	5 min.
4	OH 96 %	3 min.
5	OH 70 %	3 min.
6	OH 50 %	3 min.
7	Safranina	4 hrs.
8	Agua destilada	Enjuagar
9	OH 50 %	3 min.
10	OH 70 %	3 min.
11	OH 96 %	3 min.
12	Verde rápido	3 min.
13	OH 100 %	3 min.
14	OH 100 %	3 min.
15	Xileno	5 min.
16	Xileno	5 min.
17	Xileno	5 min.

3.17 Toma de fotografía

Para lograr una mejor descripción e ilustración de las alteraciones histológicas provocadas por el nemátodo agallador se procedió a tomar fotografías de las mejores preparaciones, que mostraban los daños en la raíz. Las fotografías se tomaron con una cámara Zeiss integrada a un microscopio

marca Zeiss modelo Axiovert 405 M, utilizando una película Kodak de color de una sensibilidad de 100 ASA se fotografiaron los cortes perineales al igual que la región cefálica de las hembras adultas.

Las fotografías tomadas en el microscopio fueron a 400 aumentos y la ampliación de la correspondiente al tamaño 6x.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Identificación de especies

Las especies de *Meloidogyne* identificadas con los modelos perineales fueron *M. arenaria* y *M. incognita*.

4.2 Por comparación de los cortes perineales con modelos ya establecidos

Se compararon los cortes perineales que se realizaron con la descripción y la comparación visual de los modelos perineales que se encuentran en el libro de Eisenback *et al.* 1983, lográndose identificar a las especies *M. incognita* y *M. arenaria* como los agentes causales del agallamiento de las raíces que sirvieron como inoculo. Las mediciones de la longitud de las vulvas se muestran a continuación. (Cuadros 7 y 8).

Cuadro 7. Morfometría obtenida de los cortes perineales utilizada para la identificación del nemátodo agallador en *Impatiens balsamina*

Ejemplar	Especie	Longitud de la vulva
1	<i>M. incognita</i>	50 µm
2	<i>M. incognita</i>	50 µm
3	<i>M. incognita</i>	45 µm
4	<i>M. incognita</i>	50 µm
5	<i>M. incognita</i>	57.5 µm
X	<i>M. incognita</i>	50.5 µm

Cuadro 8. Morfometría obtenida de los cortes perineales utilizada para la identificación del nemátodo agallador en *Impatiens balsamina*

Ejemplar	Especie	Longitud de la vulva
1	<i>M. arenaria</i>	55 µm
2	<i>M. arenaria</i>	37.5 µm
3	<i>M. arenaria</i>	47.5 µm
X	<i>M. arenaria</i>	46.7 µm

Valera en (1996), reporta un promedio de 28.30 μm de longitud de la vulva en *M. incognita*.

4.3 Por comparación y medición de estiletes

Mediante la comparación de estiletes se logró identificar a otros ejemplares cuyos cortes perineales no se veían muy claros. Así mismo, se realizaron mediciones de la longitud del estilete, diámetro interno del metacarpus, diámetro externo del metacarpus, distancia de la base del estilete a la desembocadura de la glándula esofágica dorsal (Fig. 10) Estos resultados se muestran a continuación (Cuadro 9).

Cuadro 9. Algunas características morfométricas analizadas para su identificación, en el laboratorio de nematología, 1996.

Ejemplar	Especie	E	DIM	DEM	DGED
1	<i>M. incognita</i>	16.5 μm	-	25 μm x 32.5 μm	7.5 μm
2	<i>M. incognita</i>	16.5 μm	12.5 μm	27.5 μm x 37.5 μm	5 μm
3	<i>M. incognita</i>	16.5 μm	-	-	5 μm

Longitud del estilete (E), diámetro interno del metacarpus (DIM), diámetro externo del metacarpus (DEM), distancia de la base del estilete a la desembocadura de la glándula esofágica dorsal (DGED).

4.4 Descripción histológica del corte transversal de la raíz sana de *I. balsamina* de flores de color rosa y color púrpura

En el interior de la raíz se localiza el xilema primario que está conformado por un núcleo sólido, en forma circular. El floema primario se encuentra entre los extremos del círculo del xilema. Fuera del floema existe una capa de células, el periciclo que conserva su actividad meristemática. Esta capa de células es precedida por la endodermis, corteza y finalmente por la epidermis. El crecimiento secundario se inicia con la formación del cambium vascular, que rodea a la circunferencia del xilema y delimita la formación de un nuevo floema hacia afuera y xilema hacia adentro. (Fig. 2)

Cuando se inicia el crecimiento secundario masivo en la raíz, las capas externas corticales se desprenden y se produce corcho mediante un cambium de corcho o felógeno que se origina en el floema. Esta ultima capa externa corresponde a la peridermis que esta constituida por 4 a 5 células rectangulares, con la pared delgada y suberizada, dispuestas una sobre de otra y sin la presencia de espacios intercelulares (Katherine, 1989).

4.5 Descripción histológica del corte transversal de la raíz enferma de *I. balsamina* de flores de color rosa y color púrpura

Las células gigantes formadas por *M. incognita* y *M. arenaria* fueron encontradas siempre en el cilindro vascular, afectando drásticamente su organización. En el cilindro vascular afectado, los elementos del floema y xilema fueron desplazados por las células gigantes, provocando una distorsión y colapso entre los tejidos, empujándolos hacia los lados. (Fig. 3). También se observó que algunas de las células gigantes llegan a ocupar todo el cilindro vascular, compactando hacia afuera, todos los elementos conductores, estas observaciones se encontraron en ambos colores de flor de belén. (Fig. 5).

Estas alteraciones ya han sido estudiadas y descritas con anterioridad, en otros cultivos y con otras especies de *Meloidogyne*. (Littrell, 1966) trabajó con *Hibiscus esculentum* y *M. incognita acrita*, observando que los elementos del xilema se presentaban anormalmente cortos y constituidos por células de forma irregular con un grosor secundario característico; Littrell menciona, que las anormalidades del parénquima y xilema siempre se encontraron asociadas con la infección del nemátodo y con la presencia de hiperplasia del parénquima del periciclo y del xilema, respectivamente. Los investigadores Swamy y Krishnamurthy 1971, al observar las raíces de *Basella alba* atacadas por *M. javanica*, encontraron que, como resultado de la infección, el xilema secundario es empujado y separado de los otros elementos del cilindro vascular quedando así desorganizado y disperso. También Trevedi et al. (1977) en una investigación realizada con *Capsicum annuum* y nemátodos agalladores, observaron que los vasos del xilema afectado

presentaban un tamaño variable y una forma irregular, así como las traqueidas: además en algunas partes de la raíz, el xilema se encontraba en posición transversal y oblicua.

En esta investigación se encontró que donde había la formación de células gigantes, así como los elementos alterados del periciclo, floema y xilema, se localizaban alrededor de la cabeza del nemátodo. (Fig. 6).

En trabajos realizados por Dropkin y Nelson (1960), en relación con el origen de las células gigantes indican que se debe a la hiperplasia e hipertrofia de las células cercanas a la región cefálica de la larva, seguidas de la disolución de membranas y consecuente fusión de las células del parénquima adyacentes a las células gigantes. Años después, Litrell (1966) indicó que tanto la disolución de las paredes celulares como la inducción de mitosis, eran las responsables de la formación de las células gigantes. Sin embargo, Huang y Maggenti (1966) afirman que las células multinucleadas, son el resultado de mitosis solamente en las células diploides infectadas, originándose las células gigantes por la ausencia de citokinesis.

En la presente, se encontró una diversidad en la forma y tamaño de las células gigantes, así como también en el número de estas por cenocito. Se llegaron a observar de 2 a 5 células gigantes asociadas con un nemátodo. (Fig. 4). Al respecto, Litrell (1966) registró de 4 a 7 células gigantes asociadas con un sólo nemátodo en *Hibiscus esculentum*, y Dropkin y Nelson (1960) encontraron en soya grupos de células gigantes, que consistían de 5 a 9 de éstas, por lo que se deduce que el número de células gigantes por cenocito, depende posiblemente de la hospedante de que se trate.

En algunas ocasiones las 2 especies de nemátodos encontradas en *Impatiens* sp, las hembras adultas se observó que la cabeza estaba insertada entre las células gigantes, en algunas otras preparaciones esta observación no era muy clara, pero si se puede intuir que el nemátodo insertó su estilete en las células y de ahí obtener su alimento para poder desarrollarse (Fig. 6).

También se observó que alrededor de las células gigantes se encontraban un gran número de células parenquimatosas, las cuales presentaban cierta elongación (Fig. 3).

La pared de las células gigantes da la impresión de componerse de 2 capas, la exterior más delgada que la interna, la externa se tiñó de verde claro en comparación a la externa que tiñó de un verde más oscuro (Fig. 4).

Se pudo apreciar que entre las células gigantes hay comunicación por medio de plasmodesmos de diámetro variable, el citoplasma de estas células estaba denso y granuloso con vacuolación irregular (Fig. 4).

Todas las células gigantes presentaban diferentes formas, grosor de sus paredes, al igual que el número de núcleos por célula.

Los núcleos observados en el interior de cada célula no tenían ningún tipo de acomodo dentro del citoplasma y el número de estos varió dependiendo del tamaño de la célula observada, el número de estos osciló entre los 4 hasta los 15 dependiendo de lo antes mencionado (Fig.4).

4.6 Descripción histológica del corte longitudinal de la raíz sana de *I. balsamina* de

flores de color rosa y color púrpura

Las hileras longitudinales de células tan prominentes en la raíz irradian de la célula apical y muchas de ellas se dividen en dos. Una célula se divide transversalmente; entonces, una de las dos nuevas células se divide longitudinalmente y cada célula hija de esta división se convierte en el origen de una nueva fila. La primera fila ubicada del centro hacia la periferia es la del cilindro vascular, la segunda fila es la que corresponde al periciclo, la tercera fila la forma el córtex, después sigue otra fila la cual coforma la epidermis la cual separa a la ultima fila conocida como caliptra mediante divisiones periclinales.

4.7 Descripción histológica del corte longitudinal de la raíz enferma de *I. balsamina* de flores de color rosa y color púrpura

En este tipo de cortes se observó un comportamiento muy similar al presentado en los cortes transversales, en cuanto al acomodo de los nemátodos en el tejido, donde se observó de manera particular que además de encontrarlos en el cilindro vascular también se encontraban en la parte conocida como córtex (Fig. 7 y 8).

En cuanto a la presencia de células gigantes la cabeza del nemátodo siempre se encontraba muy cerca de ellas, como ocurrió también en los cortes transversales.

En cuanto al número de núcleos y formas de las células coincide con lo observado en los cortes transversales (Fig. 8).

Estas observaciones fueron hechas en *I. balsamina* de ambos colores.

5. CONCLUSIONES

1. Las especies involucradas en esta investigación fueron *Meloidogyne incognita* y *M. arenaria*. Las medidas que se realizaron a los diferentes individuos coinciden en promedio con lo reportado en la literatura, para el caso de *M. incognita* se encontró en medidas promedio de 50.5 μm de longitud de la vulva, en longitud del estilete 16.5 μm , diámetro interno del metacarpus 12.5 μm , diámetro externo del metacarpus 26 μm x 35.5 μm y de la distancia de la base del estilete a la desembocadura de la glándula esofágica dorsal 6.5 μm .

2. En los cortes transversales las células gigantes formadas por *M. incognita* y *M. arenaria* se encontraron siempre en el cilindro vascular, afectando drásticamente su organización. En el cilindro vascular afectado, los elementos del floema y xilema fueron desplazados por las células gigantes, provocando una distorsión y colapso entre los tejidos, empujándolos hacia los lados.

En los cortes longitudinales se observó un comportamiento muy similar al presentado en los cortes transversales, en cuanto al acomodo de los nemátodos en el tejido, donde se observó de manera particular que además de encontrarlos en el cilindro vascular también se encontraban en la parte conocida como córtex.

3. En las raíces de *I. balsamina* tanto las de flores rosas como las de flores púrpura había la presencia de las dos especies de nemátodo *M. incognita* y *M. arenaria*, por lo que se puede afirmar que esta ornamental es muy susceptible al ataque de estos nemátodos, dadas estas circunstancias se podría utilizar a esta ornamental en condiciones controladas como fuente de inóculo para incrementar poblaciones de estos nemátodos sin importar la variante.

4. De los datos graficados en el diagrama de dispersión se observó que no era necesario realizar la regresión lineal ya que dicha distribución muestra que no tiene relación entre la variable llamada independiente o predictoria (ancho de la célula) y la otra llamada dependiente (longitud de la célula). Es decir que el comportamiento que tiene el ancho de la célula no está asociado con la longitud de la misma.

6. SUGERENCIAS

Se sugiere que para estudios posteriores el espesor de los cortes sea diferente al de 10-12 micras, ya que parece ser inadecuado, dado que muchos de los cortes realizados aparecieron destrozados, por lo que impidió una buena apreciación completa de las células gigantes y de los nemátodos involucrados, lo ideal sería aumentar el espesor de los cortes. (Fig. 9).

Dadas las características de esta ornamental en condiciones controladas, se podría utilizar a esta como fuente de inóculo para incrementar poblaciones de estos nematodos.

7. LITERATURA CITADA

- Agrios G., N. 1985. Fitopatología. Limusa. México. 756 pp.
- Barker, K. R., and R. S. Hussey. 1976. Histopathology of nodular tissues of legumes infected with certain nematodes. *Phytopathology* 66(7): 851-855.
- Batyr., A. and G. Kozhokaru I. 1985. Distribution and species composition of gall nematodes in commercially grown flowers in Moldavia. *Ekologiya i prakticheskoe znachenie zoo i fitoparaziticheskikh or ganizmov* 1:3-10.
- Bird A., F. 1959. Development of the root-knot nematodes *Meloidogyne javanica* (Treub) and *Meloidogyne hapla* Chitwood in the tomato. *Nematologica*. 4:31-42.
- Bird A., F. 1974. Plant response to root-knot nematode. *Annual Review of Phytopathology* 12: 69-85.
- Bird A., F. and B. R. Loveys. 1975. The incorporation of photosynthate by *Meloidogyne javanica*. *Jour. Nematol.* 7(2): 111-113.
- Bossaard R. 1983. Floriculture. 5ª edición. Ed. Lavoisier. Paris Francia. 200 p.
- Casselmann W., P. 1962. Histochemical technique. John Wiley & sons Inc. New York. 216 p.
- Castillo P., G. 1982. Histología y desarrollo de *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen 1944 en raíces de *Capsicum annum* y *C. beecatum*. Tesis de maestría. Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Chapingo, Méx.
- Chamberlain C., I. 1932. Methods in plant histology. The University of Chicago Press, Chicago, Illinois. p 3-7.

Christie J., R. 1936. The development of root-knot nematode galls. *Phytopathology*. 30:1-22.

Dawes C., L. 1971. *Biological techniques in electron microscopy*. Harper and Row, Publ., Inc. 193 pp.

Daykin., M., E., and R. S. Hussey. 1985. Staining and histopatological techniques in nematology. In an advanced treatise on *Meloidogyne*, vol. II. Metodology, Barker, K. R., C.C. Carter and J. N. Sasser, eds, North Carolina State Univ. Graphics, Raleigh.

Dos Santos., B., B., and A. Pivatto. 1986. Simultaneous occurrence of the nematodes *Meloidogyne arenaria* and *M. javanica* in three species of plants in Paraná state, Brazil. *Revista de Agricultura*, Piracicaba, Brazil 61(2): 115-118.

Dropkin., V., H., and P. E. Nelson. 1960. The histopathology of root-knot nematode infections in soybeans. *Phytopathology*. 50(5): 442-447.

Dropkin V., H., Hegeson J., P., and Upper C. D. 1969. The hypersensit reaction of tomatoes resistant to *Meloidogyne incognita*: Reversal by Cytokinins

Eisenback J., D., H., Hirschmann J., N., Sasser and A. C. Triantaphyllou. 1981. A guide to the four common species of root-nematodes (*Meloidogyne* spp.), with a pictorial key. International *Meloidogyne* Project North Carolina State Univ., Raleigh.

Eisenback J., D., H., Hirschmann J., N., Sasser and A. C. Triantaphyllou. 1983. Guía para la identificación de las cuatro especies más comunes del nemátodo agallador (*Meloidogyne* spp.), con una clave pictórica. Traducida al español por: C. Sosa Moss. International *Meloidogyne* Project. 47 pp.

Esbenshade P., R., and Triantaphyllou A. C. 1989. Isosyme Phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. *J. Nematol.* 22: 10-15.

- Filipjev I., N., and J., H., Stekhoven Jr. 1959. A manual of agricultural helminthology. 2da. Impresión. Leiden E. J. Brill. 878 pp.
- Golden A., M. 1971. Classification of the genera and higher categories of the orden Tylenchida (Nematoda). 1991-2232. In Plant parasitic nematodes. Zuckerman B. M., W.F. Mai and R., A., Rhode (Eds). Vol. I, Morphology, Anatomy, Taxonomy and Ecology. Academic Press. New York. 345 pp.
- Gray P. 1964. Handbook of basic microtechnique. McGraw-Hill Co., Inc. New York. 302 p.
- Haider S., R., and M. W. Khan. 1986. Root-Knot nematodes infecting some ornamentals in western Uttar Pradesh, India. International Nematology Network Newsletter. 3: 1, 17-18.
- Ham A., W., and D. H. Cormark. 1984. Tratado de histología. Nueva editorial Interamericana, México, D. F. 1079 p.
- Haseeb A., Khan., A., and Saxena S. K. 1983. Histochemical localization in the roots of *Impatiens balsamina* L. induced by the root knot nematode, *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. Indian Journal of Mycological Research. 21: 1, 19-22.
- Hatman K., M. and J.N. Sasser. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of host test and perineal-pattern morphology. In an advanced treatise on *Meloidogyne*. Vol. 2. Methodology. Barker, K. R., C. C. Carter and J.N. Sasser (Eds). North Carolina State Univ. Graphics. Raleigh. U.S.A. p. 69-77.
- Heywood V., H. 1985. Las plantas con flores. Ed. Reverte S.A. Barcelona, España. 332 pp.
- Huang C., S. and A. R. Maggenti. 1969. Mitotic aberrations and nuclear changes of developing giant cells in *Vicia faba* caused by rootknot nematode, *Meloidogyne javanica*. Phytopathology 59 (6): 447-455.

- Jepson S., B. 1987. Identification of *Meloidogyne* species. CAB international, Wallingford, Oxon. U. K. 265 p.
- Jiménez L., M., Cárdenas S. y C. Sosa-Moss. 1986. Alteraciones histológicas en raíces de garbanzo (*Cicer arietium* L.) causadas por *Meloidogyne incognita* raza 1. Mem., XIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología y VI Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Nematología. Museo Regional, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 96 pp.
- Johansen D., A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill book Co., Inc. New York. 523 p.
- Jones M., G., K., and H., L., Payne. 1978. Early stages of nematodes induced giant-cell formation in roots of *Impatiens balsamina*. Jour. Nematol. 10:70-85.
- Kochba J. and R. M. Samish. 1972. Level of endogenous cytokinins and auxin in root of nematode resistant and susceptible peach rootstocks. J. Am. Soc. Hort. Sci. 97:115-119.
- Konarev V., G. 1972. Cytochemistry and histochemistry of plants. Traducido del ruso por P. Harry. Israel Program for Scientific Translation. Jerusalem.
- Larson R., A. 1988. Introducción a la floricultura. Ed. AGT. Editor, S.A. México. 551 p.
- Laurie A. and V., H., Ries. 1950. Floriculture. Fundamentals and Practices. 2ª edición. Ed. McGraw Hill Book Company, Inc. New York, U.S.A. 525 p.
- Linford M., B. 1941. Parasitism of the root-knot nematode in leaves and stems. Phytopathology 32(7): 634-648.
- Littrel R., H. 1966. Cellular responses of *Hibiscus esculentus* to *Meloidogyne incognita* *acrita*. Phytopathology. 56: 540-544.

- Lownsbery B., F., and D., R., Viglierchio. 1960. Mechanism of accumulation of *Meloidogyne incognita acrita* around tomato seedlings. *Phytopathology*. 50(2): 178-179.
- Maggenti A. R., D. J. Raski R., Fortuner and E. Geraert. 1987. Reappraisal of Tylenchina. 2. Suborder Tylenchina. *Revue. Nematol.* 10(2): 134-135.
- Mariscal M., E. 1984. Exploración nematológica en cacahuete (*Arachis hypogea* L.) e histopatología de las vainas infectadas por *M. arenaria* (Neal) Chitwood, en Atlacahualoya, Mor. Tesis de Licenciatura. Parasitología. UACH. Chapingo, Méx.
- McClure M., A. 1977. *Meloidogyne incognita*: A metabolic Sink. *Jour. Nematol.* 9:88-90.
- Minton N., A. 1962. A root observation box and techniques for studying infection and pathogenesis of roots by nematodes. *Plant Diseases Report*. 46: 199.
- N.A.S. 1978. Control de Nemátodos parásitos de plantas. En: Control de plagas de plantas y animales. Vol. 4 National Academy of Sciences. Ed. Limusa 219 pp.
- Nehrling I., and A. Nehrling. 1958. Gardening, forcing, Conditioning and Drying for flower arrangements. Ed. Hearthsides Press, Inc. New York. U.S.A. 228 pp..
- Papadopoulou J., and A., C., Triantaphyllou. 1982. Sex differentiation in *Meloidogyne incognita* and anatomical evidence of sex reversal. *Jour. Nematol.* 14(4): 549-566.
- Sánchez S., O. 1984. La flora del valle de México. Ed. Herrero. S.A. 519 pp.
- Sasser J., N. 1972. Physiological variation in the genus *Meloidogyne* as determined by differential host. In NICKLE, W. R. 1991. Manual of agricultural nematology. MARCEL DEKKER, INC. N.Y. 1035 pp.

- Sasser J., N. 1977. Worldwide dissemination and importance of the root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. Jour. Nematol. 9:26-29.
- Schuster L., M., and Sullivan. 1960. Species differentiation of nematodes through host reaction in tissue culture. I. Comparisons of *Meloidogyne hapla*, *Meloidogyne incognita* and *Nacobbus batatiformis*. Phytopathology. 50: 874-876.
- Spurr A., R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrast. Res. 26: 31-43.
- Singh L., and J., P., Goyal. 1979. Cellular response of *Impatiens balsamina* to natural root knot infection due to *Meloidogyne arenaria*. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology. 8: 1, 198.
- Steiner G. 1940. The root-knot nematode attacking stems and leaves of plants. Phytopathology 30(8): 710.
- Swamy B., G., L., and K., V., Krishnamurthy. 1971. Ontogenetic studies on plant galls. II. The histopathology of the roots of *Basella alba* infected with *Meloidogyne javanica*. Phytomorphology. 61: 36-46.
- Taha, A., H., Y., and D., J. Raski. 1969. Interrelationships between root-nodule bacteria, plant-parasitic nematodes and their leguminous host. Jour. Nematol. 1(3): 201-211.
- Thorne G. 1961. Principles of nematology. McGraw Hill Book Co, Inc. New York. 572 pp.
- Triantaphyllou A., C., and H., Hirschmann. 1960. Post- infection development of *Meloidogyne incognita* Chitwood 1949. (Nematoda: Heteroderidae). In Nickle W. R., 1991. Manual of agricultural nematology. Marcel Dekker, Inc. New York. 1035 pp.

Triology Technical Report. 1989b. Bureau of nematology detections of special interest. 28: 4, 7-8.

Triology Technical Report. 1990. Bureau of nematology detections of special interest. 29: 1, 3-6.

Trevedi P. C., A. Bhatnagar and B. Tiagi. 1977. Studies of *Meloidogyne incognita* incited reaction xylem in the root of *Capsicum annum* L. Cytogenetics. Embryology and Morphology. p.p.487-490.

Valera J., F. 1996. Identificación del nemátodo agallador (*Meloidogyne* sp.) en el cultivo de jícama en Huehuetlán el chico, Puebla. Tesis de Licenciatura. Parasitología. UACH. Chapingo, Méx.

Veech J. A., J. L., Starr and R., M., Nordgreen. 1987. Production and partial characterization of stylet exudate from adult females of *Meloidogyne incognita*. Jour. Nematol. 19(4): 463-468.

8. Figuras

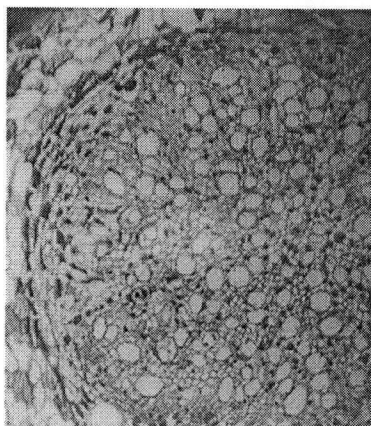


Fig. 1. Corte transversal de raíz
I. balsamina

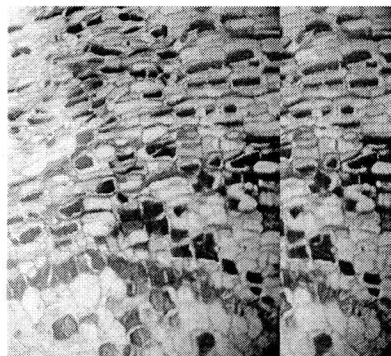


Fig. 2. Corte longitudinal de la raíz sana de
de *I. balsamina*



Fig. 3. Hembras de *M. incognita* y *M. arenaria* creando células gigantes en corte transversal de *I. balsamina*.

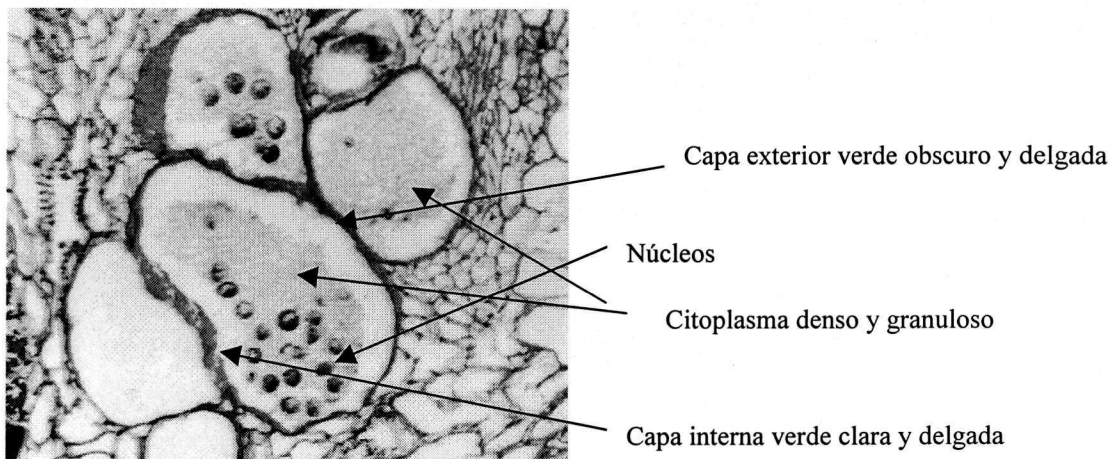


Fig. 4. Células gigantes provocadas por la presencia de nematodos en corte longitudinal de *I. balsamina*

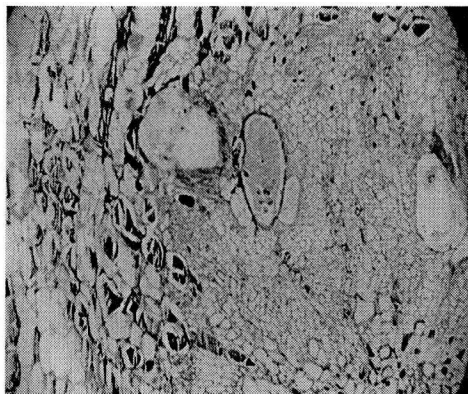


Fig. 5. Célula gigante ocasionando distorsión en el tejido vegetal, corte transversal



Fig. 6. Hembra adulta con su estilete insertado en una célula, corte transversal

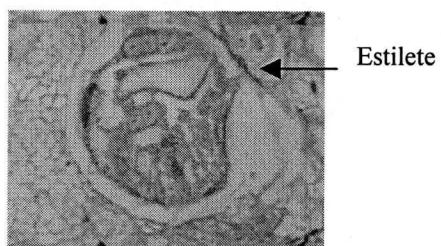


Fig.7. Corte longitudinal de raíz, donde la hembra se alimenta por medio de su estilete de la célula.



Fig. 8. Tres hembras adultas, en corte longitudinal



Fig. 9. Corte deficiente por navaja en mal estado.

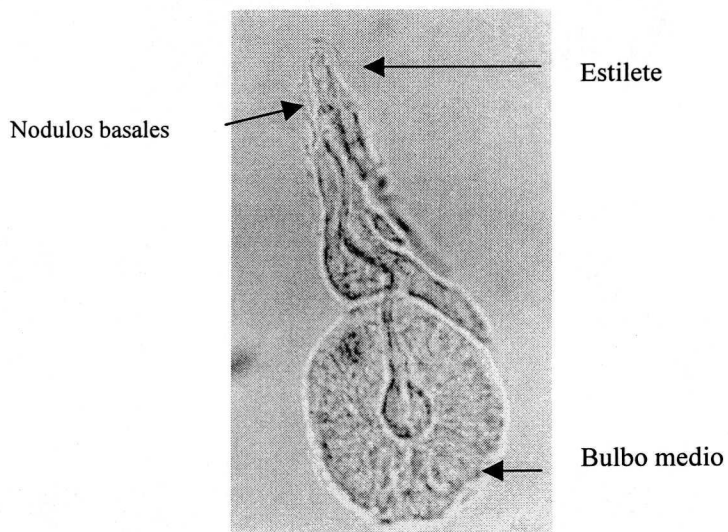


Fig. 10. Partes principales de medición para identificar

8. Anexo

Anexo 1. Medidas de las células gigantes en μm de largo por ancho.

Número de Célula	Medida de largo	Medida de ancho
1.	5.828945	6.186404
2.	5.075173	5.084061
3.	5.521460	5.969643
4.	5.043425	5.593997
5.	5.579729	6.095216
6.	5.736572	6.141741
7.	4.787491	5.344874
8.	5.272999	5.630605
9.	5.541263	5.344874
10.	5.978885	6.539942
11.	5.438079	5.797545
12.	4.653960	4.743125
13.	5.598421	6.208083
14.	5.459585	6.021579
15.	5.164785	5.666050
16.	4.653960	4.892203
17.	5.459585	6.071206
18.	5.416100	5.666050

19.	5.560681	5.857907
20.	5.703782	5.886907
21.	5.579729	5.556149
22.	5.298317	5.593997
23.	6.016157	5.915173
24.	5.799092	5.630605
25.	6.003887	6.141741
26.	6.626717	6.367844
27.	6.429719	5.797545
28.	6.309918	6.349080
29.	6.413458	6.386298
30.	6.204557	6.869063
31.	6.253828	6.270702
32.	6.586171	6.938142
33.	6.040254	6.367844
34.	6.405228	6.186404
35.	6.405228	6.021579
36.	6.469250	6.555778
37.	5.857933	6.290819
38.	6.543911	6.111741
39.	5.814130	5.630605
40.	6.109247	6.164296
41.	6.388561	6.046668

42.	6.272877	6.141741
43.	5.913503	5.766095
44.	5.814130	6.186404
45.	5.799092	4.959886
46.	5.966146	5.969643
47.	6.098074	4.820150
48.	5.899897	5.969643
49.	6.142037	6.367844
50.	6.244166	6.507579
51.	6.309918	6.474251
52.	6.388561	6.310579
53.	5.899897	5.297360
54.	5.886104	5.828134
55.	6.214608	6.539942
56.	6.052089	5.516972
57.	5.768321	5.915173
58.	5.886104	5.733732
59.	5.768321	6.095216
60.	6.052089	5.733732
61.	6.120297	6.507579
62.	6.586171	6.349080
63.	6.075346	5.828134
64.	6.371611	6.378953

65.	6.052089	6.523878
66.	6.063785	5.390449
67.	5.298317	5.915173
68.	5.347107	5.556149
69.	4.653960	4.743125
70.	5.720311	5.593997
71.	5.043425	5.141326
72.	5.669880	5.247732
73.	5.192956	5.195796
74.	5.438079	5.476370
75.	5.899897	6.071206
76.	5.940171	4.959886
77.	6.152732	6.118721
78.	6.028278	6.208083
79.	6.052089	5.915173
80.	6.086774	5.593997
81.	6.437751	6.457206
82.	6.204557	6.229348
83.	5.857933	5.969643
84.	5.966146	5.476370
85.	5.814130	6.141741
86.	5.752572	5.141326
87.	6.309918	6.250217

88.	5.669880	6.164296
89.	5.752572	6.071206
90.	5.857933	6.208083
91.	6.109247	5.630605
92.	6.345636	5.593997
93.	5.616771	5.593997
94.	5.872117	5.733732
95.	6.152732	5.797545
96.	6.461468	6.404451
97.	5.926926	5.886907
98.	5.164785	5.247732
99.	5.720311	5.733732
100.	5.783825	5.476370

