

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

**ESTUDIOS SOBRE *Pratylenchus thornei* EN
TRIGO EN MÉXICO: CULTIVO MONOXÉNICO,
CICLO DE VIDA Y RESISTENCIA**

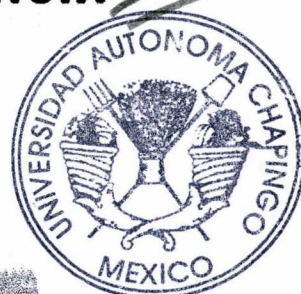
T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN PROTECCIÓN VEGETAL**

P R E S E N T A

HIGINIO CHAVARRÍA ROMERO



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

Bib. 100963

Chapingo, México, Diciembre, 2001

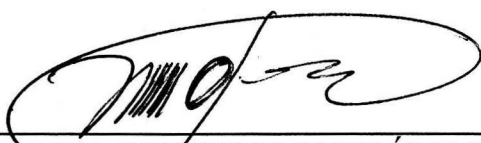


ESTUDIOS SOBRE *Pratylenchus thornei* EN TRIGO
EN MÉXICO: CULTIVO MONOXÉNICO, CICLO DE VIDA Y RESISTENCIA

Esta tesis fue realizada bajo la dirección del comité asesor indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTORES:



DR. NAHUM MARBÁN MENDOZA



DRA. JULIE MARGARET NICOL



DR. LUCY GILCHRIST SAAVEDRA

ASESOR:



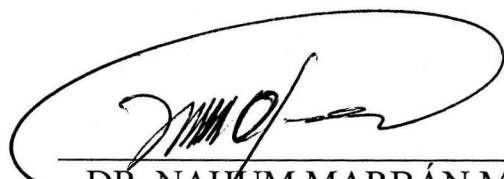
DR. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

A. 42938

ESTUDIOS SOBRE *Pratylenchus thornei* EN TRIGO
EN MÉXICO: CULTIVO MONOXÉNICO, CICLO DE VIDA Y RESISTENCIA

El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de Higinio Chavarría Romero autor de la presente tesis de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal estuvo constituido por:

PRESIDENTE:



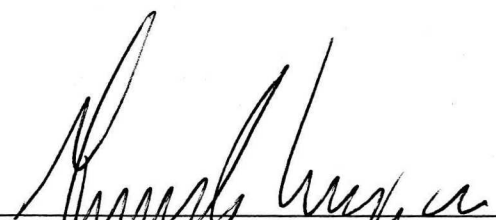
DR. NAHUM MARBÁN MENDOZA

ASESOR:



DRA. LUCY GILCHRIST SAAVEDRA

ASESOR:



DR. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico con todo mi corazón a mis papás:

Agustín Chavarría Ponce
Juana Romero Olvera

Y a mis hermanos:

Manuel, Naty, Kiko, Chano, Esthela, Chayo y Mago

.....porque son todos ahora, el motivo más grande para seguir viviendo.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento para la culminación de mi posgrado.

Infinitas gracias a la Universidad Autónoma Chapingo, porque nuevamente al darme la oportunidad de realizar la maestría, hizo posible el cumplimiento de otra de mis más grandes metas.

Al Centro de Investigación en Mejoramiento en Maíz y Trigo por haberme brindado todas las facilidades para el desarrollo de la presente investigación.

Con toda sinceridad, le doy gracias a la Dra. Julie Margaret Nicol, Dr. Nahúm Marbán Mendoza, Dra. Lucy Gilchrist Saavedra y Dr. Santos Gerardo Leyva, porque por su acertada dirección fue posible la realización del presente trabajo.

A la Dra. Mónica Mezzalama, M.C Rosa María López Atilano y a todo el personal de los laboratorios de Patología y Sanidad de Semillas del CIMMYT, porque fueron clave fuerte durante el desarrollo de este trabajo.

A los profesores de Parasitología Agrícola de Chapingo que me dieron clases y que con su experiencia y gran conocimiento me instruyeron en el camino de la sanidad vegetal.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos generales:

Nombre: Higinio Chavarría Romero.

Lugar de Origen: Sapioríz, Lerdo Durango.

Fecha de nacimiento: 11 de enero de 1974.

Formación Académica:

Primaria: Lázaro Cárdenas del Río, Sapioríz Lerdo Durango (1980-1986).

Secundaria: Escuela Secundaria Técnica No. 5, La Loma Lerdo Durango (1986-1989).

Preparatoria: Preparatoria Agrícola, Chapingo México (1989-1993).

Licenciatura: Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo México (1993-1996).

Profesión: Ingeniero Agrónomo especialista en Fitotecnia.

Desempeño profesional:

Técnico en el Programa Elemental de Asistencia Técnica 1996, en Miahuatlán Oaxaca.

Secretario Técnico en la empresa Corporación Chapingo SA de CV, en Texcoco México, durante 1997 a 1998.

Oficial fitosanitario en la Dirección General de Inspección Fitosanitaria, en el Aeropuerto Internacional del Bajío, en el 2001.

Actualmente labora en la Empresa Impulsora Agrícola SA de CV con el cargo de subjefe de zona en Calera Zacatecas.

CONTENIDO

<i>Comité asesor de la tesis</i>	ii
<i>Jurado del examen de grado</i>	iii
<i>Dedicatoria</i>	iv
<i>Agradecimientos</i>	v
<i>Datos Biográficos</i>	vi
<i>Contenido</i>	vii
<i>Índice de cuadros</i>	x
<i>Índice de figuras</i>	xi
<i>Resumen</i>	xii
<i>Abstract</i>	xiii
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Objetivos generales</i>	2
CAPÍTULO II REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 <i>Ubicación taxonómica y descripción</i>	3
2.2 <i>Biología y ciclo de vida del género <i>Pratylenchus</i></i>	4
2.3 <i>Sintomatología</i>	6
2.4 <i>Rango de hospedantes</i>	7
2.5 <i>Influencia ambiental</i>	8
2.6 <i>Distribución de <i>P. thornei</i></i>	9
2.7 <i>Importancia económica y daño</i>	10
2.8 <i>Control</i>	11
2.9 <i>Mecanismos de resistencia para nematodos en general</i>	15
2.10 <i>Genética de resistencia para nematodos en general</i>	17
2.11 <i>Técnicas para cultivar nematodos del género <i>Pratylenchus</i></i>	19
CAPÍTULO III TÉCNICAS DE EXPERIMENTACIÓN EN LABORATORIO E INVERNADERO	22
3.1 <i>Cultivo de <i>P. thornei</i> en zanahoria</i>	22
3.2 <i>Cosecha de nematodos cultivados en zanahoria</i>	23
3.3 <i>Siembra de trigo en invernadero con fines experimentales</i>	25
3.4 <i>Extracción de nematodos de raíz de trigo</i>	26
3.5 <i>Tinción de raíces de trigo</i>	27
CAPÍTULO IV CULTIVO DE <i>Pratylenchus thornei</i> EN RODAJAS DE ZANAHORIA	28
4.1 <i>Introducción</i>	28
4.2 <i>Materiales y métodos</i>	29
4.3 <i>Resultados</i>	30

4.4	<i>Discusión</i>	33
4.5	<i>Conclusiones</i>	36
4.6	<i>Recomendaciones</i>	36
CAPÍTULO V CICLO DE VIDA DE <i>P. thornei</i> EN LÍNEAS DE TRIGO RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES		37
5.1	Introducción	37
5.2	Experimento: Relación densidad de inóculo/invasión de <i>P. thornei</i> sobre líneas resistentes y susceptibles de trigo	38
5.2.1	<i>Objetivos específicos</i>	38
5.2.2	<i>Materiales y métodos</i>	38
5.2.3	<i>Resultados</i>	39
5.2.4	<i>Discusión</i>	40
5.3	Experimento: Infección y duración de ciclo de vida de <i>P. thornei</i> en trigo	41
5.3.1	<i>Objetivos específicos</i>	41
5.3.2	<i>Materiales y métodos</i>	41
5.3.3	<i>Resultados</i>	43
5.3.4	<i>Discusión</i>	48
5.4	Conclusiones	51
5.5	Recomendaciones	52
CAPÍTULO VI CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA DE DIFERENTES MATERIALES DE TRIGO (<i>T. aestivum</i>) Y <i>Aegilops geniculata</i> ANTE LA MULTIPLICACIÓN DE <i>P. thornei</i>		53
6.1	Introducción	53
6.2	Materiales y métodos	54
6.3	Experimento: Invasión inicial de <i>P. thornei</i> en variedades resistentes y susceptibles de trigo	55
6.3.1	<i>Resultados</i>	55
6.3.2	<i>Discusión</i>	57
6.4	Experimento: Multiplicación de <i>P. thornei</i> en <i>T. aestivum</i> y <i>A. geniculata</i>	58
6.4.1	<i>Resultados</i>	59
6.4.2	<i>Discusión</i>	61

6.5	Conclusiones	64
CAPÍTULO VII POSIBILIDAD DEL CONTROL GENÉTICO DE <i>P. thornei</i> CON UNA POBLACIÓN DE HAPLOIDES DOBLADOS DERIVADOS DEL CRUZAMIENTO DE LAS VARIEDADES AUS4930 5.1 * SPEAR		65
7.1	<i>Introducción</i>	65
7.2	<i>Materiales y métodos</i>	66
7.3	<i>Resultados</i>	69
7.4	<i>Discusión</i>	72
7.5	<i>Conclusiones</i>	73
CAPÍTULO IX LITERATURA CITADA		74

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Organización del experimento: Cultivo de <i>P. thornei</i> en rodajas de zanahoria, considerando los factores origen de inóculo, tiempo de cosecha y densidades de inoculación	29
Cuadro 2	Análisis de varianza de las fuentes de variación origen de la muestra, meses a cosecha, densidades y sus interacciones en las variables respuesta número de nematodos, número de huevecillos y contaminación; de el experimento cultivo de <i>P. thornei</i> en rodajas de zanahoria	30
Cuadro 3	Tasa de multiplicación en las interacciones generadas a partir de los diferentes tiempos de cosecha (periodo de incubación) con las densidades de inoculación, para las variables número de nematodos y número de huevecillos, en el experimento Cultivo de <i>Pratylenchus thornei</i> en rodajas de zanahoria	32
Cuadro 4	Organización del experimento: Relación densidad de inóculo/invasión de <i>P. thornei</i> sobre líneas resistentes y susceptibles de trigo, los factores considerados y sus respectivos niveles	39
Cuadro 5	Análisis de varianza de la fuentes de variación: líneas, densidades y su interacción en la variable respuesta número de J2, a los ocho días después de haber inoculado huevecillos de <i>P. thornei</i> en el experimento: Relación densidad de inóculo/invasión de <i>P. thornei</i> sobre líneas resistentes y susceptibles de trigo	39
Cuadro 6	Organización del experimento: Infección y duración del ciclo de vida de <i>P. thornei</i> en trigo, factores considerados en el experimento y sus respectivos niveles	42
Cuadro 7	Análisis de varianza para las variables número de nematodos, número de huevecillos, largo y ancho de nematodos en el experimento Infección y duración del ciclo de vida de <i>P. thornei</i> en una variedad de trigo resistente y otra susceptible realizado en CIMMYT. Estado de México, México 2001	44
Cuadro 8	Características de los materiales evaluados en el experimento invasión inicial de <i>P. thornei</i> en líneas resistentes y susceptibles de trigo	55
Cuadro 9	Análisis de varianza para las variables número de nematodos y número de huevecillos por raíz de las líneas implícitas en el experimento invasión inicial de <i>P. thornei</i> en variedades resistentes y susceptibles de trigo	56
Cuadro 10	Análisis de varianza para las variables número de nematodos por raíz de las líneas implícitas en el experimento multiplicación de <i>P. thornei</i> en <i>T. aestivum</i> y <i>Aegilops geniculata</i>	59
Cuadro 11	Agrupación de medias de los materiales de trigo y <i>Ae. geniculata</i> según Duncan en el experimento multiplicación de <i>P. thornei</i> para la caracterización de germoplasma de <i>T. aestivum</i> y <i>Ae. geniculata</i>	60
Cuadro 12	Organización del experimento: Posibilidad del control genético de <i>P. thornei</i> con una población de haploides doblados derivados del cruzamiento de las variedades AUS4930 5.1*SPEAR	67
Cuadro 13	Análisis de varianza de la variable número de nematodos en el experimento: Posibilidad del control genético de <i>P. thornei</i> con una población de haploides doblados derivados del cruzamiento de las variedades AUS4930 5.1*SPEAR	69
Cuadro 14	Comparación de medias según Tukey de la variable número de nematodos por material evaluado, con una diferencia mínima significativa de 383.4, en el experimento: Posibilidad del control genético de <i>P. thornei</i> con una población de haploides doblados derivados del cruzamiento de las variedades AUS4930 5.1*SPEAR	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo patológico del nematodo lesionador <i>Pratylenchus</i> sp	6
Figura 2	Cultivo Monoxénico de <i>P. thornei</i> en callo de zanahoria	24
Figura 3	Comparación de medias según prueba de Tukey para la interacción meses a cosecha por densidad de inóculo, con una diferencia mínima significativa de 6795.4, de la variable número de nematodos por rodaja	31
Figura 4	Comparación de medias según prueba de Tukey para la interacción meses a cosecha por densidad de inóculo, con una diferencia mínima significativa de 9132.4, de la variable número de huevecillos por rodaja	31
Figura 5	Comparación de medias según prueba de Tukey para la interacción origen de la muestra por meses a cosecha, con una diferencia mínima significativa de 9132.4, de la variable número de huevecillos por rodaja	31
Figura 6	Comparación de medias según prueba de Tukey para el factor meses a cosecha (periodo de inoculación) con una diferencia mínima significativa de 1.08, en la variable contaminación	33
Figura 7	Comparación de medias según prueba de Tukey para el factor densidad de inóculo, con una diferencia mínima significativa de 1.08, en la variable contaminación	33
Figura 8	Comparación de medias según prueba de Tukey para densidades de inoculación con una diferencia mínima significativa de 6.08, en el experimento relación densidad de inóculo/invasión de <i>P. thornei</i> sobre líneas resistentes y susceptibles de trigo	40
Figura 9	Comparación de medias según prueba de Tukey para periodo de incubación con una diferencia mínima significativa de 29.478, de la variable número de nematodos por raíz en el experimento infección y duración del ciclo de vida de <i>P. thornei</i> en trigo	45
Figura 10	Comparación de medias según prueba de Tukey para la interacción temperatura*variedades*periodo de incubación, con una diferencia mínima significativa de 76.567, de la variable número de nematodos por raíz en el experimento infección y duración del ciclo de vida de <i>P. thornei</i> en trigo	46
Figura 11	Comparación de medias según prueba de Tukey para la interacción temperatura*variedades*periodo de incubación, con una diferencia mínima significativa de 14.084, de la variable número de huevecillos por raíz en el experimento infección y duración del ciclo de vida de <i>P. thornei</i> en trigo	46
Figura 12	Comparación de medias según prueba de Tukey para la interacción temperatura*variedades*periodo de incubación, con una diferencia mínima significativa de 22.266, de la variable largo del nematodo en el experimento infección y duración del ciclo de vida de <i>P. thornei</i> en trigo	47
Figura 13	Comparación de medias según prueba de Tukey para la interacción temperatura*variedades*periodo de incubación, con una diferencia mínima significativa de 2.65, de la variable ancho del nematodo en el experimento infección y duración del ciclo de vida de <i>P. thornei</i> en trigo	47
Figura 14	Comparación de medias según prueba de Tukey para las líneas evaluadas con una diferencia mínima significativa de 52.065, de la variable número de nematodos por raíz en el experimento invasión inicial de <i>P. thornei</i> en variedades resistentes y susceptibles de trigo	56
Figura 15	Comparación de medias según prueba de Tukey para las líneas evaluadas con una diferencia mínima significativa de 93.678, de la variable número de huevecillos por raíz en el experimento invasión inicial de <i>P. thornei</i> en variedades resistentes y susceptibles de trigo	57

RESUMEN

Chavarría R.H, Nicol J.M, Marbán M.N, Gilchrist S.L, Leyva M.G

ESTUDIOS SOBRE *P. thornei* EN TRIGO EN MÉXICO: CULTIVO MONOXÉNICO, CICLO DE VIDA Y RESISTENCIA

(Enero del 2002)

Los campos productores de trigo en México están infestados por el nematodo fitopatógeno *P. thornei*, principalmente en la zona noroeste. Sin embargo se han hecho muy pocos estudios sobre la biología, la relación enfermedad-hospedante y resistencia al nematodo.

Esta investigación se hizo con la finalidad de evaluar factores del ciclo de vida, penetración y respuesta de un cultivar de trigo resistente (AUS4930 5.1) y otro susceptible (Machete) en el tiempo (8, 16, 24, 40 y 48 días después de la inoculación) y con temperaturas (18-22° C y 25-30 °C). La penetración de nematodos más alta se obtuvo con aquellas plantas de trigo incubadas durante 16 y 24 días. La penetración más alta se obtuvo en la variedad Machete sin importar la temperatura y el periodo de incubación. A 40 días de incubación se obtuvieron un promedio de 9.3 huevecillos por raíz, por lo tanto el ciclo de vida de *P. thornei* es de 40 días o menos. El desarrollo del nematodo fue afectado por la temperatura y variedades. Las dimensiones de los nematodos (largo y ancho) fueron menores en especímenes de *P. thornei* desarrollados en la temperatura más baja (18-22 °C) y/o en la variedad AUS4930 5.1 (resistente).

La respuesta varietal de trigo para determinar la resistencia o tolerancia, fue evaluada inoculando plántulas con 400+- 10 nematodos (una mezcla de todos los estadios) por nueve semanas, bajo condiciones de invernadero en CIMMYT México. Se encontraron catorce cultivares moderadamente resistentes. Dentro del germoplasma de *Aegilops geniculata* (fuente de resistencia contra patógenos) se encontraron 4 líneas moderadamente resistentes a *P. thornei*. Estos resultados mejoran las posibilidades de usarlos para el desarrollo futuro de germoplasma.

En una población de haploides doblados (AUS4930 5.1*Spear) se determinó que la resistencia en AUS4930 5.1 es monogénica y la heredabilidad de un 33 %.

Palabras clave: *Pratylenchus thornei*, *Aegilops geniculata*, ciclo de vida, penetración, resistencia

ABSTRACT

Chavarría R.H, Nicol J.M, Marbán M.N, Gilchrist S.L, Leyva M.G

STUDIES ON *Pratylenchus thornei* OF WHEAT IN MÉXICO: MONOXENIC CULTURE, LIFE CYCLE AND RESISTANCE

(January 2002)

Pratylenchus thornei is affecting wheat growing areas in Mexico particularly in north east region. Nevertheless very few studies has been done with this nematode on the biology, host-pest relationship and resistance. This investigation was undertaken to survey life cycle factors, penetration and wheat response (resistant: AUS4930 5.1 and susceptible: Machete) with time (8, 16, 24, 40 y 48 days after inoculation) and temperature (18-22 and 25-30 °C). Higher nematode penetration was obtained with those wheat plants incubated for 16 or 24 days. The higher penetration rate was obtained in Machete variety regardless both temperature and incubation period. At 40 days incubation period 9.3 eggs/root were obtained so life cycle of *P. thornei* is 40 days or less.

Nematode development was affected by temperature and cultivars. Nematode dimensions (long and wide) were smaller with *P. thornei* specimens growing in lower temperature (18-22 °C) and/or in AUS4930 5.1 (resistant).

Wheat varietal response to determine resistance o tolerance were carried out inoculating seedless with 400+-10 nematods (all stages) for nine weeks under greenhouse conditions at CIMMYT facilities in Mexico. Fourteen cultivars were found moderately resistant. Whiting the germoplasma of *Aegilops geniculata* (source of resistant against pathogens) there were 4 lines moderately resistants to *P. thornei*. These results improved the chances to use then for future germoplasma development.

In a double haploid population (AUS4930 5.1*Spear) was determined that resistance in AUS4930 5.1 is monogenica and the heritage of 33 %.

Key words: *Pratylenchus thornei*, *Aegilops geniculata*, life cycle, penetration, resistance.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Los cereales constituyen la fuente de alimento más importante a nivel mundial, proveen de calorías y proteínas tanto en la nutrición humana como en la alimentación animal. En términos de producción, la primera posición la ocupa el trigo *Triticum aestivum* (Luc *et al.*, 1990). Este último es un cultivo anual que debido a su gran variabilidad genética, en muchos lugares, se siembra en cualquier época del año. Se cultiva desde el nivel del mar hasta los 3 000 msnm, se adapta a cualquier tipo de suelo, aunque prefiere los suelos francos con presencia de humedad.

El trigo es esencial en la dieta alimenticia de la población mexicana y un producto básico en la economía del país, motivo por el cual se siembra en casi todos los estados de la república. En México se ubica en el cuarto lugar en importancia después del maíz, frijol y sorgo, tanto por el número de productores como por la superficie que ocupa. México se caracterizó por ser autosuficiente en la demanda de trigo durante la década de los sesenta hasta los ochenta, sin embargo, durante la última década se han generado faltantes que superan un millón de toneladas (Villaseñor y Espitia 2000).

De acuerdo a INEGI (1995) los estados productores más importantes en México son Sonora, Sinaloa, Guanajuato, Baja California Norte y Chihuahua, los cuales en 1990 aportaron el 77 % de la producción total nacional. La gran variabilidad de condiciones ambientales en los diversos lugares de cultivo permite el desarrollo de enfermedades que limitan la producción.

Los nematodos, por ejemplo, interfieren decisivamente en la producción de trigo, ya que provocan cuantiosas pérdidas al reducir los rendimientos, provocan lesiones en los sistemas radicales, y ayudan a la penetración de otros microorganismos fitopatógenos abriendo puertas de entrada que incrementan el daño causado por estos. Aunque se ha reportado un gran número de nematodos fitoparásitos de trigo, sólo pocas especies son de importancia económica. Las especies más importantes son: *Heterodera avenae*, *Anguina tritici*, especies de los géneros *Meloidogyne* y *Pratylenchus*.

Pratylenchus es uno de los tantos géneros endoparasítico lesionado y migratorio que vive libremente en el suelo, que se alimenta de una amplia variedad de cultivos y está distribuido en la mayoría de las regiones del mundo (Wiese, 1977), sin embargo su importancia económica radica en que ataca precisamente a una de las fuentes de alimento más importantes del mundo, al trigo (Wiese, 1977 y Luc *et al.*, 1990).

A trigo se han asociado varias especies de *Pratylenchus*, por ejemplo: *P. thornei*, *P. neglectus*, *P. zaeae*, *P. crenatus*, *P. pinguicaudatus* y *P. mediterraneus*. Sin embargo, en México sólo toma importancia *P. thornei*. Autores como Van Gundy *et al.* (1974) reportan un 32 % de pérdidas y Nicol y Ortiz-Monasterio (2001) un 29 % en variedades susceptibles bajo condiciones de estrés hídrico. Por tal razón se hace necesaria la realización de diferentes estudios, acerca del comportamiento y biología de *Pratylenchus thornei* en trigo en México, ya que no existen investigaciones al respecto. El objetivo más importante en este trabajo es generar información del patógeno y así tener bases sólidas para proceder a su manejo en el cultivo.

Los objetivos de esta investigación son los siguientes:

1.1 Objetivos generales:

- ⇒ Determinar la densidad de inóculo y el tiempo de cosecha óptimos para cultivar *P. thornei* en rodajas de zanahoria libre de contaminación bacteriana.
- ⇒ Estudiar el ciclo de vida de *P. thornei*, en variedades resistentes y susceptibles de trigo.
- ⇒ Caracterizar diferentes materiales de trigo (*Triticum aestivum*) así como de *Aegilops geniculata* en base a la multiplicación de *Pratylenchus thornei*.
- ⇒ Estudiar la resistencia presente en la línea AUS4930 5.1 a partir de una población de haploides doblados.

CAPÍTULO II REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Ubicación taxonómica y descripción

De acuerdo a Cepeda (1996) la clasificación de *P. thornei* se ubica como se muestra en la siguientes categorías:

Clase Secernentea, Von Linstow 1905, Dougherty 1958.

Subclase Diploglasteria, Chitwood y Chitwood 1937.

Orden Tilenchida, Thorne 1949.

Suborden Tylenchina, Chitwood 1950.

Superfamilia Tylenchoidea, Orley 1880.

Familia Pratylenchidae, Thorne 1949.

Subfamilia Pratylenchinae, Thorne 1949.

Género Pratylenchus, Filipjev 1936

En la actualidad, este género posee 66 especies, de las cuales, *P. thornei* (Fortuner, 1977), *P. neglectus* (Anderson y Townshend, 1976), *P. zea* (Colbran y McCulloch, 1965), *P. creantus* (Loof, 1978), *P. mediterraneus* y *P. pinguicaudatus* (Corbett, 1970) son patógeno de trigo. En México sólo se ha reportado *P. thornei* por Van Gundy *et al.* (1974), Fortuner (1977) y Nicol y Ortiz-Monasterio (2001).

Las características del género *Pratylenchus* son: El largo del cuerpo de los adultos va de 0.3 a 0.9 mm, bastante corpulento, la cutícula es delgada y muestra estrías finas transversas o anillos. Lateralmente se muestra marcada por cuatro líneas longitudinales (Loof, 1991). Los nódulos basales son visibles al microscopio, adopta forma de C cuando está muerto, su cabeza es cónica, redondeada o truncada, el istmo es delgado, el bulbo espatulado o redondeado y la vulva normalmente con membranas cuticulares laterales (Cepeda, 1996).

Las hembras de *P. thornei* tienen de tres a cuatro anillos en la región labial, la cual es fuertemente esclerotizada y continua al resto del cuerpo, el estilete es moderadamente grueso, con nódulos basales redondeados aplanados y muy marcados. El poro escretor está ubicado a 75-85 μ m de la

cabeza a la cola. Espermateca indistinta, vacía. El brazo post uterino es ligeramente mas largo que el diámetro del cuerpo en la vulva. La cola con 18 a 25 anillos, redondeada, sin estrías, alrededor del terminus. Es muy raro encontrar machos de esta especie (Troccoli *et al.*, 1992).

Pratylenchus es un género con especies muy similares por lo cual se hace muy difícil su identificación.

De acuerdo a las claves de Loof (1991) para la identificación de las especies de la familia Pratylenchidae, las características más distintivas de *P. thornei* son: cabeza alta; cola truncada; cuerpo estrecho ventralmente; vulva $V = 73-80 \%$; longitud del estilete: 14-20 μm ; terminus liso, espermateca vacía (machos raros o ausentes) y región labiar compuesta por tres anillos (dos estrías).

Según Fortuner (1977) las medidas características de *P. thornei*, hembra y macho se describen en seguida: hembra: $L = 450 - 770 \mu\text{m}$; $a = 26-36$; $b = 5.5-8$; $c = 18-22$; $V = 73-80$; Macho: $L = 480 \mu\text{m}$; $a = 32$; $b = 5.6$; $c = 20$; $T = 30$.

2.2 Biología y ciclo de vida del género *Pratylenchus*

Todas las especies del género *Pratylenchus* son, ya sea, endoparásitas como ectoparásitas obligadas y migratorios (Fulton *et al.*, 1960; Loof, 1991). Usualmente viven en la raíces, rizomas, o tubérculos, pero ocasionalmente se pueden encontrar en tallos y frutos que están en contacto con la tierra. Una vez que han penetrado a la raíz se multiplican a una tasa de 10,000 a 35,000 especímenes por 10 g de raíz (Loof, 1991); y todos los estados a partir del J2 pueden entrar a la raíz, pero también pueden emigrar fuera de ella y vivir algún tiempo en el suelo para después infestar a una nueva raíz del mismo hospedante (Luc *et al.*, 1990; Loof, 1991).

La hembra deposita los huevecillos en la raíz y ahí se completa el ciclo de vida total. El tiempo que toma el cambio de una generación a otra es generalmente entre seis y ocho semanas (Loof, 1991) o hasta nueve según Agrios (1998). Otros autores aseguran que este tiempo puede variar entre tres y cuatro semanas (Luc *et al.*, 1990). De acuerdo a Fulton *et al.* (1960) el ciclo de vida

varía según la especie y la temperatura; posteriormente se desarrollan varias generaciones en la estación de crecimiento del cultivo. Cuando, debido a la actividad de hongos y bacterias, las raíces se pudren, estas llegan a ser desfavorables para los nematodos, entonces estos emigran hacia afuera de las mismas, por ello se sabe que en el comienzo de la estación de crecimiento, hay a menudo una buena correlación entre el número de especímenes de *Pratylenchus* por cantidad de raíces y daño en la mismas, sin embargo más tarde esta correlación desaparece (Loof, 1991).

De acuerdo con Larson (1953) *P. thornei* completa su ciclo de vida en 40 a 45 días a una temperatura de 27 °C, sin embargo Siyanand *et al.* (1982) encontraron que de huevo a huevo *P. thornei* podía demorar de 25 a 29 días bajo una temperatura de 30 °C $\pm$ 2 °C. Por su parte Orion *et al.* (1979) indican que la temperatura óptima del suelo para la reproducción de *Pratylenchus thornei* es de 18 a 22 °C.

Los nematodos se alimentan principalmente de células de la corteza y forman cavidades conteniendo nidos o colonias de nematodos de todos los estados (Luc *et al.*, 1990).

Según Fortuner (1977) es muy raro encontrar nematodos machos en poblaciones de *P. thornei*. Autores como Thompson y Clewett (1990) aseguran que *P. thornei* tiene la habilidad de reproducirse partenogénicamente. Todos los estados de esta especie, los cuales son muy similares en cuanto a forma (Fulton *et al.*, 1960) invaden la raíz al azar, aunque algunos lo hacen por heridas (Fortuner, 1977). El desarrollo de este nematodo se completa con cuatro estados, cada uno separado por una muda. El primer estado larval y la primera muda ocurren dentro del huevecillo, la larva del segundo estado larval emergida se mueve por el suelo o entra a la raíz. El siguiente estado larval se desarrolla y así hasta la cuarta muda de la cual la larva emerge como adulto (Fulton *et al.*, 1960).

De acuerdo a Agrios (1998) el ciclo de la enfermedad causada por *Pratylenchus* sp. se completa como se muestra en la figura 1.

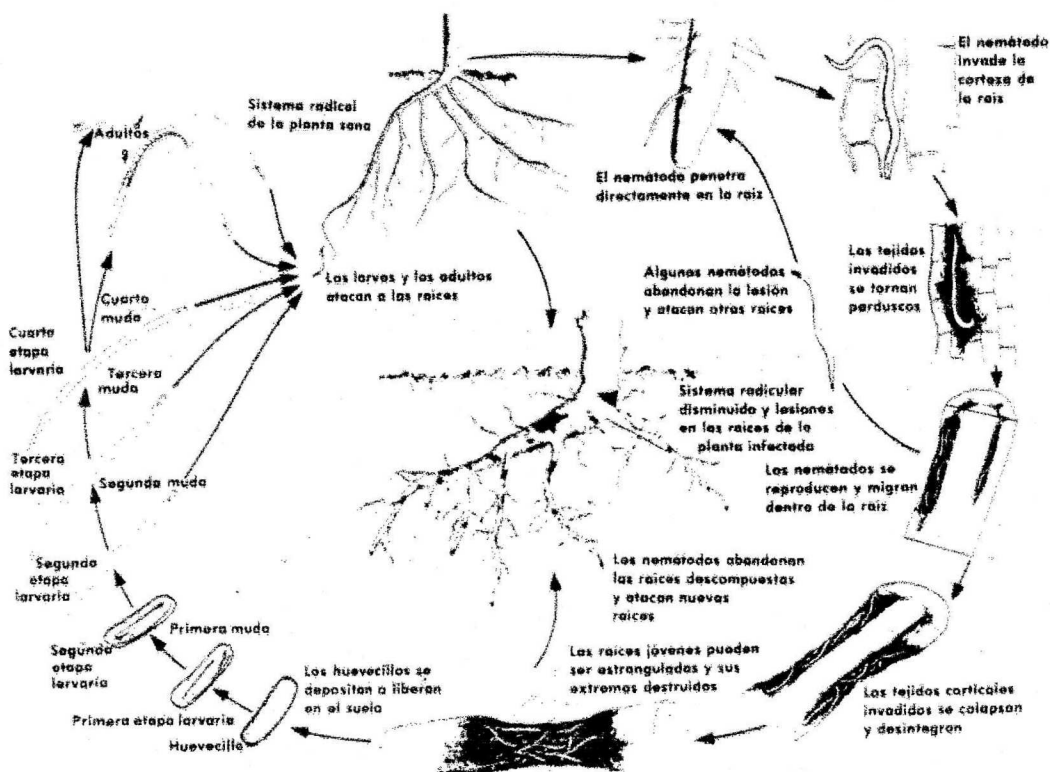


Figura 1. Ciclo patológico del nematodo lesionador *Pratylenchus* sp. (Agrios, 1998).

Según Fulton *et al.* (1960) el ciclo de la enfermedad se resume en tres componentes, el primero que corresponde a la **penetración** del nematodo a la raíz, el segundo la **diseminación** de huevecillos, larvas y adultos dentro de la misma y el tercero la forma **anhidrobiótica** en que sobrevive en el invierno.

2.3 Sintomatología

La alimentación de *Pratylenchus* generalmente produce lesiones necróticas sobre la raíz, por eso el nombre de nematodos lesionadores (Heyns, 1971).

Las raíces crecen de forma irregular, a menudo toman una coloración café o rojo oscuro causado por la necrosis de las células invadidas y la invasión de patógenos secundarios como hongos o bacterias (Baxter y Blake, 1968; Loof, 1991). La necrosis causada por la destrucción de células corticales se debe a la migración y alimentación de los nematodos (Evans *et al.*,

1993). Usualmente hay decoloración pronunciada en los tejidos afectados. En la parte aérea los síntomas del ataque incluyen clorosis y atrofia de la planta (Luc *et al.*, 1990; Evans, *et al.*, 1993).

Las raíces de cereales infestadas muestran necrosis cortical, desprendimiento de la corteza, se retarda el desarrollo de las raíces laterales, las plantas en su parte aérea pueden mostrar falta de vigor, crecimiento irregular y muestran síntomas como deficiencias nutricionales (particularmente una combinación de deficiencias de nitrógeno y fósforo, evidenciadas por un amarillamiento de las hojas más viejas) (Odihirin 1971; Orion *et al.*, 1984; Farsi *et al.*, 1995). La absorción de agua y nutrientes es afectada por lo cual causa una baja en el rendimiento.

El daño causado por estos nematodos a menudo es difícil de identificar y cuantificar debido a que pueden ser confundidos por otros factores bióticos o abióticos. La medición del daño basado en síntomas tales como decoloración o reducción en largo y número de raíces laterales y aéreas puede ser confundido debido a la contaminación con hongos (Taheri, 1996). Como consecuencia los nematocidas han sido usados para medir las pérdidas en la producción causadas por los nematodos (Doyle *et al.*, 1987).

Van Gundy *et al.* (1974) notaron que las plantas de trigo eran extrañamente muertas, atrofiadas, cloróticas y algunas veces con necrosis en las puntas de las hojas acompañada de reducción de tallos, tamaño y número de espigas, con solamente la expresión de una espiga por planta en lugar de 2 a 4.

Las raíces dañadas por *P. thornei* o por cualquiera otra especie del nematodo lesionante se vuelven muy vulnerables a la invasión por otros organismos que causan pudrición, por ejemplo hongos y bacterias (Taheri, 1996).

2.4 Rango de hospedantes

Fortuner (1977) cita al trigo como hospedante primario de *P. thornei*, sin embargo es sabido que este patógeno ha sido asociado con una gama muy amplia de especies de plantas incluyendo

leguminosas tales como chícharos, garbanzos y soya, donde el nematodo se multiplica de igual manera que en trigo.

De acuerdo a Nicol (1996), Evans y Webb (1989) y Bendixen (1988) *P. thornei* posee una amplia gama de hospedantes, reportan alrededor de 61 especies pertenecientes a las familias: Chenopodiaceae, Compositae, Convolvulaceae, Cucurbitaceae, Cupressaceae, Cruciferae, Ericaceae, Fagaceae, Gramineae, Grossulariaceae, Juglandaceae, Leguminosae, Liliaceae, Linaceae, Pinaceae, Rosaceae, Solanaceae, Theaceae, Umbelliferae, Vitaceae. Es importante saber que *Pratylenchus thornei* como especie polífaga (capaz de infectar a un número de especies cultivo muy extenso) limita la rotación de cultivos y las posibilidades de control se reducen aun más cuando se sabe que también un número considerable de malezas son hospedantes del patógeno.

2.5 Influencia ambiental

a) Clima

P. thornei ataca a los cultivos en la estación de crecimiento de invierno y subsecuentemente sobrevive en condiciones de sequía en estado disecado (Grandison y Wallace, 1974).

Grandison y Wallace (1974) aseguran que no hay influencia alguna por la lluvia y temperatura en la población y densidad de *P. thornei*, así mismo Thompson *et al.* (1989) encontró que altas poblaciones de *P. thornei* causan pérdidas en la producción independientemente de la estación del año en Australia.

En Sonora México, Nicol y Ortiz-Monasterio (2001) encontraron que las variedades susceptibles a *P. thornei* se ven severamente dañadas por los nematodos en condiciones de sequía, aún cuando se les ha aplicado nematicida. Cabe señalar que este lugar corresponde a zonas semi aridas donde las temperaturas son muy drásticas, de hecho, ya se había reportado en estas mismas condiciones en esta misma localidad (Van Gundy *et al.*, 1974), y en otras como: Utah (USA) (Thorne, 1961), en Australia (Baxter y Blake, 1968) y en Israel (Orion *et al.*, 1984).

Van Gundy *et al.* (1974) aseguran que en plantaciones de invierno, cuando la temperatura del suelo es de 15 °C se promueve un buen control de nematodos y por ende un incremento en la producción, de hecho Orion, *et al.* (1984) menciona que la temperatura óptima para la reproducción de *P. thornei* es entre 18 y 22 °C.

b) Suelo

En Utah, USA la infección de *P. thornei* ocurre solamente en suelos franco arcillosos bastante pesados, los nematodos pueden emigrar al suelo cuando las raíces son duras o poco hospitalarias y quedarse allí hasta que el siguiente cultivo es establecido (Thorne, 1961). En Holanda y en México la infestación también se da en suelos pesados (Van Gundy *et al.*, 1974; Loof, 1978).

El trabajo de Nicol (1996) dice que tanto *P. thornei* como *P. neglectus* se encuentran en varios tipos de suelo incluyendo arcillosos, francos y arenosos siendo el primero el más favorable para las dos especies individualmente.

Pratylenchus thornei puede ser protegido contra el calor y la deshidratación en los suelos vertisoles con alto contenido de arcillas, predominantemente en el norte de la franja zona granera de Australia. (Oteifa *et al.*, 1963).

Pratylenchus thornei tiene una habilidad importante para sobrevivir en el suelo y se ha mostrado que sobrevive en suelo de campo árido almacenado a temperatura ambiente por mas de dos años sin disminuir el número de especímenes. Baxter y Blake (1968) encontraron que secando con aire una muestra de suelo franco arcilloso, se encontraron sólo el 19.5 a 5 % de especímenes de *P. thornei* muertos.

2.6 Distribución de *P. thornei*

De acuerdo a Fortuner (1977) *P. thornei* es un nematodo fitoparásito cosmopolita, sin embargo los niveles más altos de población y los daños han sido reportados principalmente en zonas semiáridas tales como Utah, USA (Thorne 1961; Fortuner , 1977; Whitehead, 1998), México

(Van Gundy *et al.*, 1974; Whitehead, 1998) y Australia (Luc *et al.*, 1990; Whitehead, 1998). Por otra parte y específicamente en trigo, autores como Greco *et al.* (1984) lo reportan en Siria, Orion *et al.* (1984) en Israel, Lamberti (1981) en Italia y la Región Mediterránea; Ammati (1987) en Morocco; Troccoli *et al.* (1992) en Algeria; Wiese (1977) en Queensland; Doyle *et al.* (1987) en NSW; Fortuner (1977) y Whitehead (1998) en Yugoslavia; Maqbool (1987) en Paquistán y Whitehead (1998) en la India.

Nicol In press, menciona que *Pratylenchus thornei* es un patógeno de trigo en muchas partes del mundo incluyendo países de Europa, África, Norte América, Asia, Medio Oriente y Australia.

En otros países aunque no en su mayoría atacando al cultivo de trigo *P.thornei* también está presente en Jordán, Inglaterra, Dinamarca, Alemania, Francia, España, Italia, Yugoslavia, Bélgica, Holanda, Grecia, México, USA, Venezuela, Morocco, Egipto, Islas Canarias, Algeria, Sudáfrica, Israel, Iran, Siria, Cyprus, India, Corea, Japón y Australia (Fortuner, 1977; Hashim, 1983; Sauerborn *et al.*, 1990; Troccoli *et al.*, 1992; Esparrago y Navas, 1995; Tobar *et al.*, 1995; Castillo *et al.*, 1995; Talavera y Tobar, 1997).

2.7 Importancia económica y daño

Thompson (1984) en Australia ha reportado pérdidas de hasta un 85 % en variedades de trigo susceptibles (por ejemplo Gatcher y Banks), sin embargo en términos generales las pérdidas son mucho menores. Eastwood *et al.* (1994) reportan un 44 % de pérdidas; Doyle *et al.* (1987) un 50 %, Nicol *et al.* (1999) un 38 % y Taylor *et al.* (1999) un 20 %. Van Gundy *et al.* (1974) reportan 32 % de pérdidas en México, así mismo Nicol y Ortiz-Monasterio (2001) un 29 % en variedades susceptibles con estrés hídrico y Orion *et al.* (1984) 70% en Israel. La rotación de cultivos es una buena táctica para reducir las pérdidas, se recomienda intercalar la producción de trigo con otros cultivos como sorgo y cebada; además usar variedades tolerantes de origen comercial como lo son Cook, Oxley y Suneca y aún cuando las plantas estén muy infectadas con nematodos se pueden obtener altos rendimientos, pues es bien sabido que aunque estos tengan una alta tasa de multiplicación no causan estrago alguno (Thompson y Clewett, 1990).

Por lo general el daño en trigo se nota en áreas donde además de tener altas poblaciones de nematodos existen bajas porciones de nitrógeno disponible. El daño que ocasiona *P. thornei* en el sistema radical de trigo limita la absorción de nitrógeno disponible y presumiblemente otros nutrientes, lo cual ocasiona severas deficiencias en la planta (Thompson, 1987). Existe un incremento en los costos de producción, al tratar de evadir las pérdidas con altas dosificaciones de fertilizante. Otro aspecto implícito en el incremento de costos es la alta incidencia de malezas en el cultivo debilitado por la acción de los nemas, ya que es necesario un incremento en el uso de herbicidas (Thompson and Clewett, 1989). En el oeste de Australia *P. thornei* ha sido un factor en las decisiones de algunos agricultores en la reducción de áreas de producción de trigo e incremento de áreas con cultivos alternativos.

2.8 Control

a) Químico

Pratylenchus thornei ha sido controlado con nematicidas fumigantes y no fumigantes, pero en trigo y otros cultivos de valor bajo, son demasiados caros y poco prácticos (Whitehead, 1998). Aunque económicamente no es viable el control químico de nematodos, y mucho menos en cereales, es una de las tácticas de combate más eficientes en términos de control. (Van Gundy *et al.*, 1974; Thompson *et al.*, 1982).

La forma más eficiente de controlar a los nematodos lesionadores de la raíz consiste en tratar a los surcos o a toda el área de cultivo con nematicidas antes de sembrar. Algunos de los nematicidas que proporcionan un buen control, pero que a menudo no erradican por completo a los nematodos son DD, Brozone y Oxamil (Agrios, 1998). El nematicida que mejores resultados a tenido en el control de *P. thornei* es Temik^R (Aldicarb 10 kg/ha) (Thompson *et al.*, 1980, Doyle *et al.*, 1987; Klein *et al.*, 1987; Eastwood *et al.*, 1994). Otra opción en el control químico de los nematodos es el tratamiento a semilla, con carbofuran y oxamyl a razón de 0.125 a 0.5 kg/ha lo que reduce significativamente el número de *P. thornei* (Thompson y Clewett, 1990). Sin embargo como ya se señaló es muy costoso.

En Italia, el número de *P. thornei* en raíces de trigo fue decrecido, al fertilizar el suelo con nitrógeno, fósforo y practicando la rotación con otros cultivos. La aplicación de metham-sodium al suelo reduce la población de nematodos hasta en un 90 % e incrementa la producción de grano de un 40 a 90 % (Orion *et al.*, 1984).

b) Cultural

Las prácticas culturales reducen bastante las poblaciones de nematodos parásitos de plantas cultivadas y generalmente causan condiciones adversas para los nematodos, por lo cual, la capacidad de estos para sobrevivir, multiplicarse y producir enfermedades se afecta notablemente. En contraste con el control químico, el control cultural reduce gradualmente la cantidad de nematodos, pero es relativo, porque un equilibrio económico conveniente no puede lograrse con el uso de una práctica, pero si con una combinación de ellas (Cepeda, 1996). Las principales prácticas culturales son:

Barbecho: se disminuye la población de nematodos, es efectiva en áreas donde llueve poco y en suelos que tienen altas temperaturas. Cuando se efectúan labores frecuentes en la tierra, la vegetación se destruye y se remueven sus diferentes capas, lográndose en primer lugar la inanición del nematodo, ya que si falta la planta huésped, el nematodo terminará por consumir sus reservas hasta morir, en segundo lugar la acción desecante del viento y sol sobre el suelo expuesto, mata a muchas especies, según sea la etapa de desarrollo en que se encuentren. El hecho del que el barbecho sea una práctica frecuente cuando el problema es grave, no es costeable económicamente, pues las tierras labradas no reditúan ingresos al productor a diferencia de una rotación de cultivos (Cepeda, 1996).

Temporada de siembra: es importante tomar en cuenta la fecha de establecimiento de un cultivo, si este se adapta a las condiciones de todo un año, se planea que parte o todo el ciclo del cultivo coincida con bajas temperaturas; en estos períodos las actividades de los nematodos patógenos se inhiben, en cambio, las temporadas calurosas ocasionan mayor desarrollo de la población y daño (Cepeda, 1996).

Rotación de cultivos: esta práctica consiste en incluir durante la rotación plantas no susceptibles al nematodo, o que son desfavorables como huéspedes. Es muy efectiva y reduce notablemente las poblaciones. Cuando se trata de especies que tienen huéspedes específicos, se pueden seleccionar con facilidad plantas resistentes (Cepeda, 1996).

Abonos orgánicos: se reduce la cantidad de nematodos patógenos después de agregar abono orgánico al suelo. El principio de esta práctica es incrementar la actividad microbial del suelo, para aumentar los organismos destructores de nematodos (Cepeda, 1996).

Nutrición y cuidados de la planta: entre los factores que propician la enfermedad está la deficiencia de uno o más de los nutrientes esenciales y condiciones adversas como el frío que causa problemas a la planta; el desarrollo de la enfermedad se detiene por humedad adecuada, fertilización, protección de las plantas en noches frías y control de las enfermedades de la raíz y el follaje causadas por otros patógenos. Con esto se minimizan los daños causados por estos organismos cuando el grado de infestación no es alarmante. Por otro lado, si se practica continuamente el mismo cultivo, se alcanzará altos niveles de inóculo. Esto implica que es necesario combinar de manera conveniente y adecuada un programa de prácticas para el control de los nematodos. (Cepeda, 1996). Por ejemplo, Van Gundy *et al.* (1974) encontraron que, la rotación de cultivos, una fertilidad de suelo apropiada, el uso de variedades tolerantes y en plantaciones de invierno, cuando la temperatura del suelo es de 15 ° C se promueve un buen control de nematodos y por ende un incremento en la producción.

Solarización: *Pratylenchus thornei* ha sido controlado con solarización del suelo pero en trigo y otros cultivos de costo beneficio bajo es demasiado caro y poco práctico (Whitehead, 1998).

c) Control genético

El método más efectivo y económico para el control del nematodos es el uso de variedades resistentes con la incorporación de genes de resistencia (Farsi *et al.*, 1995). La resistencia ofrece el método de control más económico y aceptado por ambientalistas. La susceptibilidad, tolerancia y resistencia de la planta huésped a los nematodos depende de las propiedades de las células y los

tejidos de las plantas. Los nematólogos y genetistas han desarrollado resistencia en diferentes especies de plantas cultivadas (Cepeda, 1996). Los términos más importantes e implícitos en el control genético son:

Resistencia: La resistencia describe los efectos de los genes del hospedante que restringen o previenen la multiplicación de nematodos en especies hospedantes (Trudgill, 1991). La resistencia (término opuesto a la susceptibilidad) describe las propiedades del hospedante para prevenir la multiplicación de nematodos (Dalmasso *et al.*, 1992). El término resistencia exclusivamente describe el efecto de la planta hospedante sobre la reproducción de nematodo; una planta completamente resistente no permite la reproducción de los nematodos y una planta no resistente o susceptible permite libremente la multiplicación de los nematodos; las plantas parcialmente resistentes soportan niveles intermedios de reproducción (Brown y Kerry, 1987).

La resistencia es un mecanismo de defensa activo, el cual inhabilita, restringe, retarda o altera el desarrollo del nematodo (Dalmasso *et al.*, 1992).

Tolerancia: es considerada la habilidad de un cultivar de trigo para producir bien en suelos infestados con nematodos, no es un tipo de resistencia y el término debe ser restringido a describir la cantidad de daño en el hospedante: una planta tolerante sufre poco daño y una planta intolerante sufre mucho daño (Brown y Kerry, 1987). Una planta tolerante permite el desarrollo de los nematodos dentro de ella. Como consecuencia la densidad del patógeno se incrementa, pero la producción de la planta no es afectada (Dalmasso *et al.*, 1992).

d) Control biológico.

Control biológico es cualquier condición bajo la cual se reduce la actividad del nematodo debido a la acción de otro organismo vivo (a excepción del hombre) lo que da como resultado una disminución en la importancia del daño causado por el patógeno (Cepeda, 1996).

Hay muchos informes de diferentes especies parasíticas y depredadoras de nematodos, apoyados en algunas evidencias experimentales que hacen pensar en la posibilidad de controlar a las poblaciones de nematodos fitoparásitos al mantener una alta relación de estos enemigos naturales

en el suelo. Algunos organismos vivos que controlan nematodos fitoparásitos son protozoarios, turbelarios, ácaros, insectos, bacterias, hongos (Cepeda, 1996), virus (Mankau, 1980), rickettsias (Mankau, 1980) y nematodos (Christie, 1988).

Cepeda (1996) menciona que es común que las amibas ataquen a los nematodos en el laboratorio, pero su importancia en el control de los mismos en ecosistemas naturales no se ha evaluado. Webster (1972) dice que especies como *Theratomyxa weber* pueden comerse un nematodo en 20 minutos a 2 horas, pero atacan nematodos que no exceden de 1 mm, como especies de *Pratylenchus*, *Heterodera*, *Meloidogyne*, *Ditylenchus* y *Hemicycliophora*. Otras amibas que logran controlar nematodos son las del género *Urostyla sp* y especies del orden *Proteomyxa* según Christie (1988).

2.9 Mecanismos de resistencia para nematodos en general

Los mecanismos de resistencia que frecuentemente obstruyen el desarrollo o infección de nematodos pueden ser:

Barreras físicas: los nematodos endoparasíticos tienen que penetrar la cubierta exterior de su hospedante y los tejidos gruesos pueden ser una barrera a la penetración (Trudgill, 1991).

La corteza de la raíz o los tejidos de las hojas son probablemente un obstáculo muy común sobre la penetración de muchas especies de nematodos los cuales son detenidos en la superficie de la epidermis de la planta o bien dentro de la misma (Dalmasso *et al.*, 1992).

Químicos: En algunas ocasiones las plantas poseen una resistencia natural por medio de sustancias que son repelentes, tóxicas e inhibitorias al nematodo. Posiblemente la variedad resistente libera sustancias químicas atractivas en menor cantidad o libera sustancias repelentes, específicamente algunas de estas son: Terthienils, cucurbitacinas y alleloquímicos extraídos de flores y raíces (Cepeda, 1996).

Hay desarrollo en la literatura referente al uso de residuos de plantas y extractos de plantas para el control de nematodos, ciertas plantas contienen toxinas efectivas contra especies endoparasíticas. Las principales son plantas del genero *Tagetes* que contienen alfa terthienyl, un compuesto tóxico a *Pratylenchus* y *Meloidogyne* (Trudgill, 1991).

Entre las especies más conocidas están *Tagetes patula*, *T. erecta* y *Asparragus officinalis*. La dos primeras especies han tenido buena respuesta en el control del género *Pratylenchus*.

Respuesta de hipersensibilidad: Una respuesta frecuente a la infección, es la rápida coloración parda de las células próximas al nematodo o la hipertrofia de las mismas. Estas tienen la habilidad de transferir metabolitos del hospedero a las larvas en desarrollo. Existen especulaciones considerables sobre el papel de las enzimas del nematodo en la formación de las células de transferencia (Cepeda, 1996).

Fitoalexinas: Específicamente de algunas especies de plantas se conoce que son productoras de fitoalexinas, las cuales inhiben la actividad del nematodo. Rhich *et al.* (1977) mostraron que frijol lima produce coumestrol en respuesta a la infección de *Pratylenchus scribneri* (Cobb) Steiner. Kaplan *et al.* (1979) asociaron la producción de glyceolin en la resistencia de raíces de soya con la infección de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White).

Aminoácidos: De acuerdo con Cepeda (1996) se hicieron estudios de concentración de hidroxiprolina en 12 cultivares de tomate. Las plantas resistentes podían tener más hidroxiprolina en la pared celular, que las plantas susceptibles. La hidroxiprolina de la pared celular se incrementó en todos los cultivares como resultado de la infección y la concentración total de hidroxiprolina de la pared celular se relacionó con la resistencia del hospedero; 50 días después de la inoculación de los cuatro cultivares más resistentes, estos tenían más concentración de hidroxiprolina. La infección de los cultivares susceptibles produjo una pérdida neta de la hidroxiprolina, comparando con los cultivares resistentes hubo ganancia neta. En base a esto, se concluyó que la resistencia se fundamentó en la capacidad del hospedero para utilizar la respiración cianuro-insensitivo para contrarrestar los efectos del patógeno.

2.10 Genética de resistencia para nematodos en general

Diferentes tipos de resistencia han sido reconocidos y clasificados en varias formas. El modo de herencia puede ser usado para distinguir varios tipos de resistencia: monogénica, oligogénica y poligénica, donde la resistencia es controlada por un gen, pocos genes y muchos genes respectivamente. Cuando los genes de resistencia expresan grandes efectos y pueden ser identificados fácilmente son genes mayores, mientras que los genes menores individualmente tienen sólo un pequeño efecto en la expresión de la resistencia. Hay dos principales tipos de resistencia en términos epidemiológicos: horizontal, efectiva contra todas las variantes genéticas de un parásito en particular, y vertical efectiva contra ciertas variantes solamente. La resistencia vertical es frecuentemente condicionada por un gen mayor simple, mientras la resistencia horizontal es usualmente oligogénica o poligénica (Brown y Kerry, 1987).

El termino horizontal y resistencia a razas no específicas son sinónimos pero deben ser usadas con cuidado porque no es posible obtener materiales contra todas las posibles variantes de un parásito. La resistencia activa y postinfeccional concierne para aquellas reacciones del hospedante, las cuales ocurren en respuesta al ataque por un parásito (por ejemplo la formación de fitoalexinas) mientras que la resistencia pasiva o preinfeccional envuelve mecanismos presentes antes del ataque (Johnson y Fushley, 1966).

Las razas hospedantes de especies de nematodos son poblaciones distinguidas por su habilidad o inhabilidad hereditaria para reproducirse en especies designadas de plantas. Patotipos de una especie de nematodo o raza hospedante son distinguidas por su habilidad para reproducirse en una planta hospedante de genotipos designados. La virulencia describe la habilidad de una raza de nematodo, patotipo o individual para reproducirse en un hospedante resistente a otras razas, patotipos o individuales de aquellas especies nematodos (Brown y Kerry, 1987).

Los genes que confieren resistencia son frecuentemente denominados R-genes y los genes que causan virulencia V-genes. Por cada gen de virulencia del patógeno hay un gen de resistencia del hospedante. Este concepto se refiere a la hipótesis de gen por gen. Usualmente (pero no siempre)

los genes de resistencia son dominantes mientras que los genes de virulencia son recesivos (Brown y Kerry, 1987).

La genética de resistencia a nematodos ha sido revisada por Sidhu y Webster (1981) y Fassuliotis (1987). Sin embargo, en la actualidad se sabe que las fuentes de resistencia están reducidas a un grupo muy pequeño de cultivos. Por ejemplo estudios de Sasser *et al.* (1987) han revelado la existencia de una resistencia a varias razas de *Meloidogyne* en un rango de cultivos: la mayoría de todas las resistencias identificadas genéticamente usadas en los cruzamientos están en contra de especies endoparasíticas como *Meloidogyne*, *Heterodera* o *Globodera* y es conferida por genes mayores dominantes (Sidhu y Webster, 1981), excepto *Meloidogyne* en algodón, *Heterodera glycine* en soya y *Globodera pallida* en papa donde se usa la resistencia poligénica o recesiva. Los esquemas de raza/patotipo han sido propuestos por especies dentro de todos estos géneros y para especies de *Pratylenchus*, *Radopholus* y *Tylenchulus* (Sidhu y Webster, 1981). La relación gen a gen ha sido demostrada para *Globodera* spp (Jones, 1975; Janssen, 1990) y asumida por otras interacciones que involucran resistencia de genes mayores. Algunos genes confieren resistencia a más de una especie de nematodos.

La resistencia a *P. thornei* fue determinada en trigo por la evaluación de la población de nematodos presentes en el suelo en cada maceta en el final de la estación (en la cosecha). Para variedades donde no hubo o hubo poca multiplicación se consideran resistentes a *P. thornei*, tal es el caso de GS50, Excalibur y Krichauff (Hollaway y Eastwood, 1997).

La fuente AUS4930 ofrece muy buena resistencia a un rango de población de CCN (*Heterodera avenae*); las fuentes Cre3 (originalmente de *T. tauschii* transferido a *T. aestivum*) y Cre1 son genes altamente efectivos contra 13 patotipos de *H. avenae* (Nicol y Rivoal, 2001).

2.11 Técnicas para cultivar nematodos del género *Pratylenchus*

a) Cultivo en rodajas de zanahoria

Utilizando los principios básicos de Moody *et al.* (1973), pero con significativas modificaciones que tienen que ver con la desinfección de nematodos, el grosor de la zanahoria, el uso de agar agua para evitar deshidratación, así como el uso de frascos gerber y cajas de petri como recipientes de cultivo, Nicol (1996) investigó como cultivar *P. thornei*, para lo cual usó rodajas de zanahoria de aproximadamente de 2 a 3 cm de grosor, las cuales fueron previamente esterilizadas flameándolas con ayuda de alcohol al 95 %. Tres rodajas fueron colocadas en tubos de plástico de 250 ml esterilizados en la autoclave por 20 minutos a 120 °C. Otro de los tratamientos usados por Nicol (1996), fue agregar a los tubos 50 ml de agar agua destilada estéril. Los nematodos fueron inoculados directamente a la zanahoria, pero previamente desinfectados superficialmente con 1 ml de penicilina al 1% y 1 ml de estreptomicina al 1% para eliminar las posibles bacterias. Este proceso duró aproximadamente una hora y fueron lavados posteriormente con abundante agua destilada. Las poblaciones más altas medidas a las 15 semanas se dieron en la zanahoria sin agar (más de 6000 nemas/tratamiento). Existe una metodología muy detallada al respecto en Zuckerman *et al.* (1985).

De la misma manera O' Bannon y Taylor (1968) experimentando con *P. branchiurus* encontraron una alta reproducción de nematodos, sin embargo al utilizar agar inocularon a los nematodos sobre el agar a un lado de la zanahoria. Chitambar y Rasky (1985) realizaron estudios de ciclo de vida y utilizaron esta metodología, recomiendan desinfectar las zanahorias con aretan a 133 ppm durante 2 a 3 horas en una solución de sulfato de dihidro durante 3 a 4 horas. También Moody *et al.* (1973) desinfectaron las zanahorias con sulfato de dihydroestreptomicina a 600 ppm y aretan a 130 ppm. Castillo *et al.* (1995) utilizaron una solución de NaOCl al 20 % durante 5 minutos, la desinfección de los nematodos la realizaron con ethoxiyetil mercur al 0.02 % y estreptomicina al 1 % durante un período de 2 a 24 horas respectivamente. Verdejo y Pinochet (1992) usaron una solución de cloruro de mercurio al 0.01 % y estreptomicina al 1% por 5 minutos y posteriormente usaron agua estéril para lavarlos.

Se debe poner mucha atención en la metodología de desinfección de los nematodos a inocular, así mismo en la calidad de la zanahoria. Moody *et al.* (1973) al cultivar *P. vulnus* usaron zanahorias frescas y obtuvieron un bajo índice de contaminación por hongos y bacterias, ya que en experimentos anteriores al igual que Lawn y Noel (1986) encontraban una contaminación completa que se convertía en problema para el cultivo en desarrollo.

b) Cultivo en tejido de callo

En Zuckerman *et al.* (1985) existe una metodología detallada para establecer cultivos monoxénicos en tejido de callo de alfalfa de *Pratylenchus*, el ejercicio requiere de 14 semanas para que las poblaciones de nematodos alcancen su máximo desarrollo. De acuerdo a Southey (1978) las células en proceso de diferenciación del tejido calloso son una fuente de alimento muy apropiada para la reproducción de nematodos del orden tylenchida incluyendo *Pratylenchus*. El callo generalmente se genera de raíces de plantas apropiadas, lo primero es esterilizar la semilla de la planta a utilizar, después ponerla a germinar en agar agua y cuando las raíces tengan de 2 a 3 cm transferir las plántulas al agar previamente nutrido con hormonas para inducir la producción del callo; se requieren generalmente de 2 a 3 semanas a una temperatura de 20 a 25 grados para tener buenos resultados.

Las especies que se han cultivado por medio de esta técnica son *P. penetrans* y *P. zea* en callo de alfalfa (Krusberg y Sardanelli, 1984), *P. penetrans* en callo de chícharo, alfalfa y calabaza (Schroeder and Jenkins, 1963), *P. penetrans* en callo de cebolla, *P. coffeae* en callo y raíces de cítricos (Inserra y O' Bonnon, 1975), *P. agilis*, *P. branchiurus* y *P. scribneri* en callo de zanahoria (Reise *et al.*, 1987).

c) Cultivo en explantes de raíz

De acuerdo a Zuckerman *et al.* (1985) se necesita aproximadamente una semana para completar esta técnica. Cada uno de los pasos requiere de entre 1 a 3 horas y cada uno de los mismos estará espaciado por un período de 2 a 3 días. La metodología consiste en los siguientes pasos: desinfección y germinación de la semilla, transferencia de ápices radicales al medio de

crecimiento e inoculación de explantes con nematodos fitoparásitos axenizados. Nematodos de los géneros *Meloidogyne* y *Pratylenchus* pueden cultivarse con esta metodología.

d) Cultivo en raíces de plántulas completas

En base a Southey (1978) se puede utilizar la raíz de pequeñas plántulas creciendo en agar para cultivar nematodos fitoparásitos, este cultivo puede durar varios días o inclusive semanas, ya que las plántulas obtienen los nutrientes necesarios de la semilla para sobrevivir y la raíz es un medio de cultivo idóneo para los nemas.

Algunos casos donde se han cultivado a través de esta técnica son: *P. penetrans* en raíces de trébol y *P. penetrans* en raíces de fresa (Chen y Rich, 1963).

CAPÍTULO III TÉCNICAS DE EXPERIMENTACIÓN EN LABORATORIO E INVERNADERO.

3.1 Cultivo de *Pratylenchus thornei* en zanahoria

Para generar inóculo de *P. thornei* se utilizó el método propuesto por Zuckerman *et al.* (1985) y con algunas modificaciones de Nicol (1996).

a) Preparación de la zanahoria

- Utilizar zanahoria sana y recién cosechada.
- Seleccionar las zanahoria y lavarla para eliminar impurezas.
- En una cámara de flujo laminar, eliminar la epidermis de la zanahoria, así como los extremos de la misma, para lo cual, utilizar cuchillos y pela papas con mucho filo.
- Sumergirlas en alcohol al 95 % durante 10 min. y posteriormente flamearlas en un mechero tomándolas con unas pinzas largas hasta que todo el alcohol absorbido, sea consumido por el fuego.
- Eliminar la zona flameada con el pela papas y cortar rodajas del grosor deseado, el cual se elige en base al tipo o volumen del recipiente del cultivo que se va a emplear (por ejemplo, frascos de gerber, cajas de petri, etc.).

Nota: es muy importante flamear tanto el pela papas como el cuchillo cada vez que se elimine una porción de la zona flameada de la zanahoria.

- Finalmente colocar las rodajas en el recipiente y sellar con parafilm para evitar deshidratación . Pueden almacenarse de 22 a 24 °C o inocularlas inmediatamente con nematodos desinfectados.

b) Desinfección de nematodos

- Los nematodos son aislados del suelo o de raíces mediante la aplicación de técnicas convencionales (flotación y centrifugación con azúcar o por medios de embudos de Baermann).

- Concentrar los nematodos extraídos en un filtro para esterilización con una malla de 21 μ m hasta tenerlos en un volumen aproximado de 1 ml. Incorporar 30 ml de una solución de estreptomicina al 1 %, dejarlos en reposo durante una hora.
- Eliminar la estreptomicina y posteriormente lavarlos con abundante agua destilada estéril. Una vez lavados eliminar totalmente el agua que se utilizó para lavarlos y extraerlos mediante la malla del filtro donde habían sido concentrados, ya desinfectados colocarlos en un recipiente pequeño previamente esterilizado (una cajita de petri por ejemplo) con la ayuda de una piceta con agua esterilizada.
- Ya en la caja de petri están listos para ser inoculados a las dosis necesaria. Para realizar este procedimiento utilizar pipetas pasteur o micro pipetas, se recomienda esterilizar las puntillas con la finalidad de eliminar la posibilidad de contaminación y además se deberá de utilizar una pipeta o puntilla nueva máximo cada tres inoculaciones.

3.2 Cosecha de nematodos cultivados en zanahoria

Cuando las rodajas de zanahoria tienen una apariencia café oscuro como se muestra en la figura 2 proceder a la cosecha, o bien cuando las fechas de experimentación así lo indiquen, en cualquiera de los dos casos, realizar lo siguiente:

- Con un cuchillo muy filoso cortar en pequeños trozos la rodaja de zanahoria, colocarlos en matraces de erlenmeyer y agregarles agua hasta que floten (150 ml aproximadamente).
- Colocar los matraces en un agitador oscilatorio y dejarlos en movimiento por un periodo de 2 horas.
- Después de la dos horas extraer el agua de los matraces a través de un tamiz del no. 100 para evitar traer residuos de zanahoria. Regresar los trozos capturados en el tamiz a los matraces y agregar nuevamente agua.
- La muestra de agua que se ha obtenido de los matraces y que contiene los primeros nematodos y huevecillos se manipula de acuerdo a los objetivos de la cosecha.

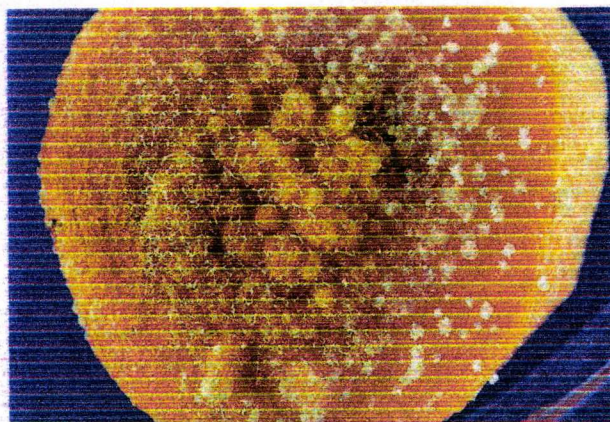


Figura 2. Cultivo Monoxénico de *P. thornei* en callo de zanahoria

a) *Conteo para determinar rendimiento*

- De la muestra contenida extraer un ml y colocarlo en un contador y con la ayuda de un microscopio de disección realizar el conteo.
- Si se obtienen menos de 800 nematodos realizar una extrapolación al volumen, de lo contrario proceder a lo siguiente:

Con la ayuda de una probeta aforar a 100 ml (o a una cantidad más grande dependiendo del número de nematodos por ml) y proceder al conteo, si se obtienen más de 800 nematodos/ml realizar otro aforo como el anterior, y así sucesivamente hasta obtener una muestra que contenga menos de 800 nematodos/ml; cuando esto suceda realizar una extrapolación tomando en cuenta cada uno de los volúmenes de aforo hasta llegar al volumen original.

b) *Conteo para inocular a plantas de trigo*

- Cuando ya se hayan extraído los nematodos necesarios, manipular la muestra total en un matraz extrayendo o agregando agua para ajustar la densidad requerida en un mililitro y considerando el número de plantas a inocular. Lo más recomendable es inocular los nematodos con un ml por cada planta.

- Se recomienda cubrir el matraz con papel aluminio para evitar exponer los nematodos a la luz directa del sol y agitarlo en forma constante para obtener una inoculación homogénea

3.3 Siembra de trigo en invernadero con fines experimentales

a) *Germinación de semilla*

El trabajo se debe realizar bajo una cámara de flujo laminar

- Colocar 100 semillas de cada línea o variedad de trigo en vasos de precipitado por separado e identificarlas.
- Agregarles alcohol al 95 % hasta cubrirlas y un poco más, agitarlas durante 5 minutos y decantar.
- Agregarles cloro al 100 % hasta cubrirlas y un poco más, agitarlas durante 10 minutos y decantar.
- Agregarles agua destilada estéril para lavarlas, agitarlas durante 5 minutos y decantar, realizar nuevamente este procedimiento con la finalidad de eliminar todo el alcohol y cloro y así evitar daños a la semilla. En este instante la semilla esta lista para colocarla a germinar.
- Previo a este procedimiento, colocar papel filtro en cajas de petri de plástico y agregarles 2 ml de agua destilada estéril.
- Colocar 20 semillas en cada caja de petri, perfectamente distribuidas, todas con el embrión en una sola dirección y con la hendidura hacia abajo para evitar daños por entrecruzamientos de radículas y plúmulas al momento de la siembra.
- Sellar las cajas con parafilm cuidando no mover demasiado las semillas, colocarlas por 12 horas en una incubadora a 5 ° C para que rápidamente absorban humedad y después llevarlas a 20 °C durante 3 a 5 días.
- Cuando las raíces midan no más de 1.5 cm proceder a la siembra.

Nota: el procedimiento debe realizarse con el material previamente esterilizado.

b) Siembra o trasplante

El trasplante de la semilla previamente germinada, se realiza en tubos de polietileno de 1.25 de diámetro * 5 pulgadas de largo, pero antes debe realizarse lo siguiente:

- Utilizar como sustrato una mezcla en proporción de 1:1 de arena de río y peat most cernidos, la cual debe esterilizarse con vapor.
- Ya en el invernadero y cuando el sustrato esté frío, llenar los tubos dejando un espacio de un cm y colocarlos en charolas de plástico.
- Considerando que el sustrato aun está húmedo por el proceso de esterilización, con una pinza esterilizada extraer cada planta de las cajas de petri e ir las colocando en cada tubo, posteriormente cubrirlas con una pequeña cantidad de sustrato y esperar hasta el siguiente día para realizar un riego ligero.
- Por otra parte en charolas de plástico de 58.5 cm * 13 cm * 101.4 cm colocar una capa de 5 a 6 cm de espesor de sustrato perfectamente distribuido y sobre ellas una maya con orificios de 4 * 4 cm hecha de alambón entretejido, la cual servirá para sostener los tubos con sus respectivas plantas.
- Ocho días después del trasplante y cuando las plántulas ya estén completamente adaptadas distribuir las en las nuevas charolas acomodándolas dentro de los orificios de la malla y dejando un orificio entre tubos de acuerdo al diseño experimental.
- En este momento las plantas están listas para recibir la inoculación de nematodos (ver apartado 3.2b).

3.4 Extracción de nematodos de raíz de trigo

Los nematodos se extraen utilizando el principio del embudo de Baermann con algunas modificaciones hechas por Nicol (1996) conocida como técnica nebulizador.

- Una vez que las plantas de trigo hayan cumplido con el tiempo de experimentación proceder al lavado de raíces con agua simple y con la ayuda de una manguera haciendo presión para eliminar el suelo y otras impurezas.

- Colocar las raíces con su respectiva identificación en una pequeña bolsa de plástico y llevarlas al nebulizador.
- Colocar cada raíz por embudo, con su respectiva identificación cada muestra, trozar en segmentos de 2 cm de longitud y colocar estos últimos en los contenedores para introducirlos al nebulizador por un período de tres días.
- Tres días después coleccionar el agua que trae los nematodos por el extremo inferior de cada embudo en recipientes apropiados.
- Proceder al conteo de nematodos como se señala en la sección 3.2a.

3.5 Tinción de raíces de trigo

Con el objetivo de observar y determinar la penetración o multiplicación de los nematodos, se realiza la tinción de raíces.

- Hervir de uno a tres minutos cada raíz por separado en una solución de glicerol, ácido láctico, agua y fuccina ácida al 0.5 %.
- Posteriormente colocar cada raíz en cajas de petri u otro recipiente y cubrirla con una solución de glicerol, agua y ácido láctico (150 ml, 150 ml y 10 gotas respectivamente).
- Para observar los nematodos en la raíz utilizar un microscopio de disección. Las raíces se colocan entre dos portaobjetos y se hace un poco de presión para observar la raíz completa.

CAPÍTULO IV CULTIVO DE *Pratylenchus thornei* EN RODAJAS DE ZANAHORIA

4.1 Introducción

Pratylenchus thornei es un parásito importante de trigo en México, desde 1974, Van Gundy lo reportó en el estado de Sonora causando cuantiosas pérdidas. Para 1998, el Centro Internacional de Mejoramiento en Maíz y Trigo comenzó una línea de investigación que implicó ratificar o rectificar lo expuesto por el autor, sugiriendo una serie de experimentos donde se hizo necesario generar una fuente de inóculo del nematodo y proceder a otros estudios, sin embargo los primeros ensayos, para el cultivo de *P. thornei* en discos de zanahoria, no tuvieron éxito.

Se tienen una serie de registros que evidencian el éxito de dicha técnica para cultivar nematodos de esta especie. Los problemas más comunes en el cultivo de nematodos endoparásitos y migratorios es la contaminación bacteriana teniendo su punto de incidencia en la preparación del medio de cultivo y en la calidad de la zanahoria. Varios autores (Moody *et al.*, 1973; Lawn y Noel, 1986) han tenido la experiencia de encontrar una contaminación interna en la zanahoria utilizada como medio, lo cual reduce considerablemente el éxito del cultivo. Moody *et al.* (1973) recomiendan utilizar zanahorias frescas (recién cosechadas), ya que se reducen considerablemente las pérdidas por contaminación.

Ante los diferentes problemas que se tuvieron al realizar los primeros ensayos para multiplicar *P. thornei* y con la finalidad de generar una fuente de inóculo lo suficientemente limpia y con especímenes viables para investigación, se planteó conjugar diferentes elementos que pudieran influir y obtener mejores resultados, de esta manera se desarrolló el siguiente objetivo:

4.1.1 Objetivo

Determinar la densidad de inóculo y el período de incubación óptimos para cultivar *P. thornei* en rodajas de zanahoria libre de contaminación bacteriana.

4.2 Materiales y métodos

Utilizando la metodología de Moody *et al.* (1973) y con algunas modificaciones de Nicol (1996) se llevó a cabo durante 4 meses el siguiente experimento en el laboratorio de Fitopatología del Centro Internacional de Mejoramiento en Maíz y Trigo (CIMMYT). El cultivo se estableció en rodajas de zanahoria de 0.7 a 0.8 cm de grosor, en cajas de petri de 100 * 15 mm como recipientes de cultivo, las cuales se sellaron con parafilm y se incubaron bajo condiciones oscuras a una temperatura de 21 °C en promedio. La fuente de inóculo se extrajo de raíces de trigo inoculado en invernadero y de muestras de suelo de Cd. Obregón Estado de Sonora.

Se utilizó un diseño experimental factorial completamente al azar con 10 repeticiones y la organización del experimento fue como se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Organización del experimento: Cultivo de *P. thornei* en rodajas de zanahoria, considerando los factores origen de inóculo, tiempo de cosecha y densidades de inoculación.

FACTORES	NIVELES	
A: Origen del nematodo	1: De campo (Sonora)	2: De invernadero
B: Meses a cosecha	1: a los 2 meses	2: a los 4 meses
C: Densidades	1: 100 nem/rodaja,	2: 20 nem/rodaja

Las variables respuesta medidas fueron: número de nematodos por rodaja, número de huevecillos por rodaja y contaminación. La primera cosecha se realizó dos meses después y la segunda cuatro meses después de la inoculación, en cada cosecha se realizaron tres extracciones. Para determinar la contaminación se utilizó una escala arbitraria de 1-10 siendo el número 1, el menor grado de contaminación y el 10 el mayor. El color café oscuro y una consistencia aguanosa (putrefacción) de la zanahoria, fueron los indicadores de una mayor contaminación en las rodajas, causados por la invasión de bacterias, de esta forma determinamos que a mayor color oscuro y mayor putrefacción la contaminación fue más drástica.

El análisis de los resultados se hizo con el programa SAS para Windows (SAS Institute, 1998) se realizaron análisis de varianza y pruebas de comparación de medias para los casos con diferencias significativas dando mayor importancia a las interacciones para saber cuales fueron las mejores condiciones para la reproducción del nematodo.

4.3 Resultados

El análisis de varianza (cuadro 2) indica diferencias significativas entre meses a cosecha, densidades y la interacción meses a cosecha * densidades para la variable número de nematodos/rodaja; entre origen de la muestra, meses a cosecha, densidades, interacción origen de la muestra * meses a cosecha e interacción meses a cosecha * densidades para la variable número de huevecillos/rodaja y entre meses a cosecha y densidades para la variable contaminación.

Cuadro 2. Análisis de varianza de las fuentes de variación origen de la muestra, meses a cosecha, densidades y sus interacciones en las variables respuesta número de nematodos, número de huevecillos y contaminación; de el experimento cultivo de *P. thornei* en rodajas de zanahoria.

Número de nematodos		Número de huevecillos		Contaminación	
Descripción (FV)	Pr > F	Descripción (FV)	Pr > F	Descripción (FV)	Pr > F
A:Origen de la muestra	0.6990	A:Origen de la muestra	0.0024*	A:Origen de la muestra	0.0566
B:Meses a cosecha	0.0001*	B:Meses a cosecha	0.0001*	B:Meses a cosecha	0.0001*
C:Densidades	0.0001*	C:Densidades	0.0001*	C:Densidades	0.0150*
Interacción A*B	0.5854	Interacción A*B	0.0026*	Interacción A*B	0.7827
Interacción A*C	0.2136	Interacción A*C	0.1886	Interacción A*C	0.2342
Interacción B*C	0.0001*	Interacción B*C	0.0001*	Interacción B*C	0.7827
Interacción A*B*C	0.2048	Interacción A*B*C	0.1731	Interacción A*B*C	0.6459

* existen diferencias estadísticamente significativas, FV: Fuentes de variación

a) Número de nematodos y número de huevecillos por rodaja

Los meses a cosecha (periodo de incubación), la densidad de inóculo y la interacción de ambas, influyen en el número final de nematodos y de huevecillos. El mayor número de nematodos y de huevecillos se obtiene a los cuatro meses inoculando 100 nematodos (Figura 3 y 4). El origen de la muestra con los meses a cosecha (periodo de incubación) y su interacción también repercuten, aunque en este caso solamente en el número de huevecillos, en este caso el mayor número de huevecillos se obtiene a los cuatro meses cuando se inoculan nematodos extraídos del plantas de trigo de invernadero (Figura 5).

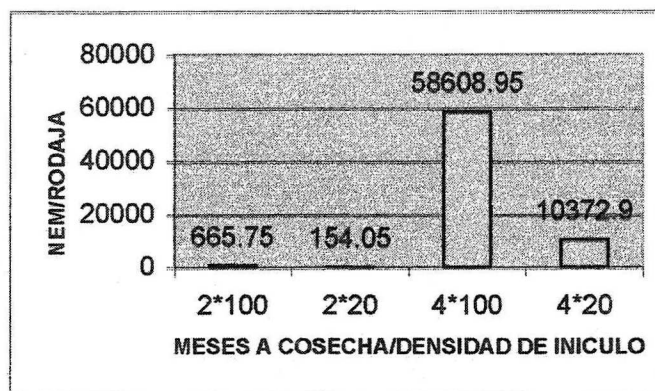


Figura 3. Comparación de medias según prueba de Tukey para la interacción meses a cosecha por densidad de inóculo, con una diferencia mínima significativa de 6795.4, de la variable número de nematodos por rodaja

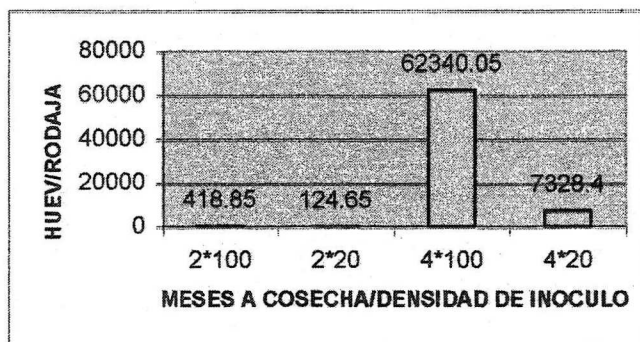


Figura 4. Comparación de medias según prueba de Tukey para la interacción meses a cosecha por densidad de inóculo, con una diferencia mínima significativa de 9132.4, de la variable número de huevecillos por rodaja

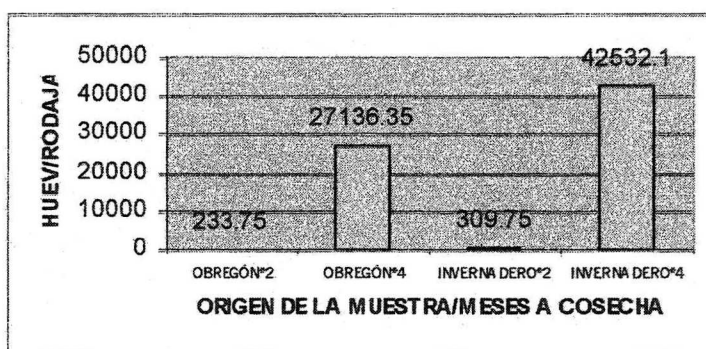


Figura 5. Comparación de medias según prueba de Tukey para la interacción origen de la muestra por meses a cosecha, con una diferencia mínima significativa de 9132.4, de la variable número de huevecillos por rodaja

Se determinó la tasa de multiplicación, considerando que los diferentes meses a cosecha (periodo de inoculación) y las densidades afectan de igual manera, tanto al número de nematodos como al número de huevecillos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tasa de multiplicación en las interacciones generadas a partir de los diferentes tiempos de cosecha (periodo de incubación) con las densidades de inoculación, para las variables número de nematodos y número de huevecillos, en el experimento Cultivo de *Pratylenchus thornei* en rodajas de zanahoria

Interacción	Número de nematodos	Número de huevecillos
	TM	TM
Dos meses * 100 nematodos	6.65	4
Cuatro meses * 100 nematodos	586	632
Dos meses * 20 nematodos	7.7	3.2
Cuatro meses * 20 nematodos	518	366

TM: tasa de multiplicación

El cuadro 3 muestra la similitud entre el número de nematodos y de huevecillos obtenidos, por ejemplo a los dos meses inoculando 100 nematodos, resultan alrededor de siete nematodos y cuatro huevecillos, así mismo inoculando 20 nematodos se obtienen casi ocho nematodos y tres huevecillos. A los cuatro meses los resultados son mayores en las dos variables, por lo tanto podemos observar que a mayor tiempo de cosecha (incubación) la reproducción se incrementa, independientemente de la densidad de inóculo.

c) Contaminación

Los meses a cosecha (periodo de incubación) y las densidades de inóculo sin interactuar con los demás factores, es decir individualmente, influyeron considerablemente en el grado de contaminación final del cultivo. Resultando mayor contaminación a los cuatro meses e inoculando 100 nematodos por rodaja (Figuras 6 y 7).

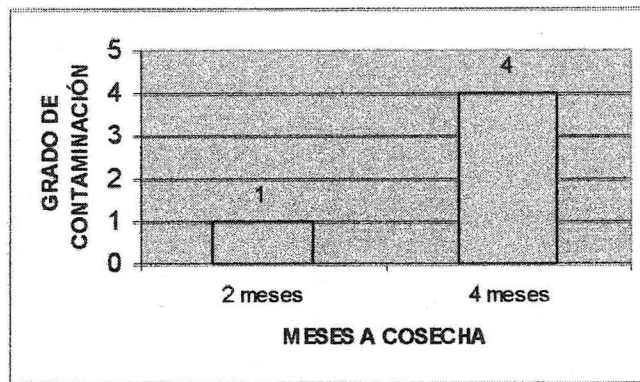


Figura 6. Comparación de medias según prueba de Tukey para el factor meses a cosecha (periodo de inoculación) con una diferencia mínima significativa de 1.08, en la variable contaminación

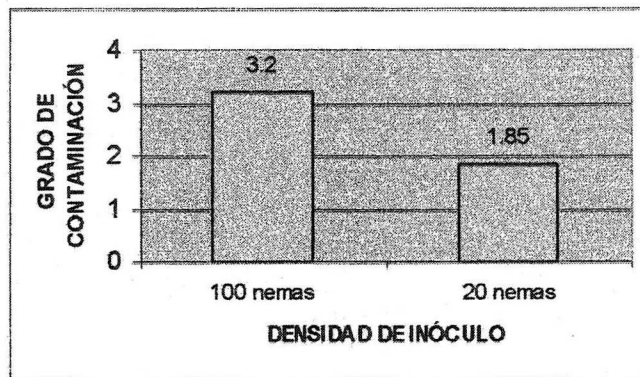


Figura 7. Comparación de medias según prueba de Tukey para el factor densidad de inóculo, con una diferencia mínima significativa de 1.08, en la variable contaminación

4.4 Discusión

a) Número de nematodos y el número huevecillos .

Los resultados más importantes de este experimento indican que el número de nematodos y el número de huevecillos, se ve afectado significativamente por la interacción de meses a cosecha (periodo de incubación) y densidades de inóculo. Las figuras 3 y 4 muestran los niveles más altos de población al cosechar a los cuatro meses y aún más cuando la inoculación inicial es de 100 nematodos por rodaja. Moody *et al.* (1973), recomiendan tiempos de incubación de 2 hasta 4 meses. Con los resultados obtenidos podemos añadir que a mayor periodo de incubación se obtienen poblaciones más grandes. Respecto a la densidad de inoculación, rectificamos que en México la densidad inicial de inóculo debe ser mucho mayor a la usada por Nicol (1996) en

Australia. Autores como Moody *et al.* (1973), Reise *et al.* (1987), Castillo *et al.* (1995) y O'Bannon y Taylor (1968) coinciden con este experimento en inocular 100 nematodos por rodaja. Por otra parte otros autores como Verdejo y Pinochet (1992) y Chitambar y Rasky (1985) recomiendan niveles de inoculación muy bajos (8 a 12 hembras), sin embargo su éxito radica en que las hembras inoculadas deben estar grávidas.

También la interacción origen de la muestra y meses a cosecha (periodo de incubación) fue significativa, sin embargo en esta ocasión sólo afecta al número de huevecillos por rodaja. En la figura 5 podemos observar que número de huevecillos es mayor a los cuatro meses de incubación y aun más cuando se trata de nematodos que fueron extraídos de raíces de trigo cultivado en invernadero.

De acuerdo al cuadro 3 donde se calcula la tasa de multiplicación (número de nematodos y huevecillos por rodaja) es mucho más importante los meses a cosecha (período de incubación) que las densidades de inoculación, pues el comportamiento de los resultados indica que a mayor tiempo de cosecha el número de nematodos y huevecillos es mayor, independientemente si se usa una densidad inicial de 20 ó 100 nematodos por rodaja.

c) Sobre la contaminación

En la presente investigación las densidades de nematodos inoculados y los meses a cosecha (período de incubación) repercutieron considerablemente en el grado de contaminación (figuras 6 y 7). En el primer caso los resultados indican que cuando se inoculan 100 nema hay mayor contaminación que cuando se inoculan sólo 20, por eso se hace hincapié en poner gran atención a la desinfección de los nematodos antes de inocular. Para tal efecto algunos autores recomiendan varias alternativas, por ejemplo Castillo *et al.* (1995) desinfectaron los nematodos con ethoxiyetil mercur al 0.02 % y estreptomycin al 1 % durante un período de 2 a 24 horas respectivamente; Verdejo y Pinochet (1992) usaron una solución de cloruro de mercurio al 0.01 % y estreptomycin al 1% por 5 minutos y posteriormente agua estéril para lavarlos; Moody *et al.* (1973) y Verdejo y Pinochet (1992) proponen diferentes técnicas muy efectivas para desinfectar superficialmente a los especímenes por inocular. En el segundo caso referente al tiempo de

cosecha, la contaminación se agravó cuando se cosecha a los 4 meses. A mayor periodo de incubación mayor grado de contaminación, sin embargo la contaminación depende de la calidad de la zanahoria. Autores como Moody *et al.* (1973) recomiendan estrictamente utilizar zanahoria fresca (recién cosechada), ya que las posibilidades de contaminación se reducen de una manera muy notoria. Al cultivar *P. vulnus* usó zanahorias frescas y obtuvo un bajo índice de contaminación por hongos y bacterias, pues en experimentos anteriores al igual que Lawn y Noel (1986) encontraron una contaminación completa que se convirtió en problema para el cultivo en desarrollo.

De acuerdo a Lawn y Noel (1986) la contaminación bacteriana es una de las limitantes más importantes de este medio de cultivo. Podrían considerarse las mejores recomendaciones para el buen éxito en establecimiento de un cultivo, pero si no se controlan las condiciones que pueden generar una contaminación, por ejemplo la desinfección de nematodos superficialmente y/o calidad fitosanitaria de la zanahoria, la técnica será un fracaso, porque a pesar de que los nematodos a menudo logran reproducirse, aún con la presencia de otros patógeno (bacterias principalmente), el porcentaje de mortalidad, influenciado por la competencia con otros patógenos, es muy alto. En nuestro caso fue sumamente difícil poder contar con zanahorias recién sacadas del campo, sin embargo el material que se utilizó, se consiguió en la central de Abastos D.F., lugar donde se infiere que ha tenido poco manipuleo. Aún así se considera que la zanahoria no fue de estricta calidad, lo cual aunado a un periodo de cosecha mayor, se da lugar a que las bacterias que logran permanecer aún con la desinfección, tienen suficiente tiempo para invadir por completo a la zanahoria. Por el contrario al darle un tiempo mas corto (2 meses por ejemplo) el grado de infección es menor, inclusive en muchas ocasiones las bacterias no logran su máximo desarrollo, sin embargo la producción de nematodos también es muy baja, lo cual es una desventaja para el cultivo.

4.5 Conclusiones

- a) Se obtiene un mayor número de nematodos y de huevecillos a los cuatro meses habiendo inoculado 100 nematodos por rodaja, sin importar el origen de la muestra del nematodo.
- b) Se obtiene un mayor número de huevecillos a los cuatro meses habiendo inoculado nematodos procedentes de muestras de raíces de trigo cultivado en invernadero.
- c) El grado de contaminación se incrementa cuando el período de cultivo se extiende a los cuatro meses y cuando se inoculan 100 nematodos/rodaja.

4.6 Recomendaciones

- a) Es preferible incrementar (dos o tres veces más) la densidad de inóculo y acortar el período de cultivo, de esta forma se promueve una tasa de multiplicación mayor y se reduce el riesgo de contaminación. De esta forma las bacterias no tienen el tiempo suficiente para alcanzar su máximo desarrollo y además se reduce el grado de mortalidad de nematodos. También es muy importante tratar de trabajar con zanahoria fresca, de preferencia recién cosechada, de esta forma se reducen los problemas de contaminación.

CAPÍTULO V CICLO DE VIDA DE *P. thornei* EN LÍNEAS DE TRIGO RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES

5.1 Introducción

La resistencia medida por la habilidad del nematodo para alimentarse, desarrollarse y reproducirse en un hospedante opera en algún momento del ciclo de vida. Los mecanismos de resistencia pueden estar relacionados a barreras físicas que impiden la entrada o desplazamiento del patógeno en el hospedante (Trudgill, 1991), o a la segregación de sustancias químicas (fitoalexinas, aminoácidos, hormonas, enzimas etc.) (Bailey *et al.*, 1976; Rich *et al.*, 1977; Veech, 1979; Kaplan *et al.*, 1979; Trudgill, 1991; Cepeda, 1996) que repelen y/o inhiben a los patógenos antes y/o después de haber invadido a la raíz. Cuando la resistencia a nematodos endoparásitos y migratorios no se manifiesta, el patógeno invade y lesiona los tejidos radicales incidiendo fuertemente en la entrada de otros microorganismos patógenos. Hay una gran ventaja cuando se trata de mecanismos de resistencia que se activan antes de que el nematodo invada la raíz, ya que se reducen las posibilidades de que la planta pueda ser afectada por otros patógenos.

El trigo AUS4930 provee resistencia a *P. thornei* (Nicol y Rivoal, 2001), sin embargo los mecanismos de resistencia que afectan el ciclo de vida del patógeno no son muy claros. De hecho no hay grandes evidencias que detallen el ciclo de vida de *Pratylenchus* (Chitambar y Raski, 1985). Autores como Siyanand *et al.*, (1982) y Chitambar y Raki, (1985) estudiaron los eventos más importantes del ciclo de vida de *Pratylenchus thornei* y *P. vulmus* respectivamente, sin embargo no retoman el efecto que pudiese generar la resistencia y/o susceptibilidad de los hospedantes en el mismo.

En el caso presente se estudiará la duración del ciclo de vida, el crecimiento del nematodo a través del tiempo en condiciones de resistencia (AUS4930 5.1) y susceptibilidad (Machete) en trigo. Los objetivos perseguidos en este experimento fueron los siguientes:

5.1.1 Objetivo general

Estudiar el ciclo de vida de *P. thornei*, en variedades resistentes y susceptibles de trigo

5.2 Relación densidad de inóculo / invasión de *P. thornei* sobre líneas resistentes y susceptibles de trigo.

5.2.1 Objetivos específicos

a) Determinar la densidad de huevecillos a inocular, para obtener cuando menos 20 nematodos juveniles por raíz de cada tratamiento, para usarlos como procedimiento estándar en la evaluación del ciclo de vida en líneas susceptibles y resistentes de trigo.

5.2.2 Materiales y Métodos

El presente ensayo tuvo una duración de ocho días, se llevó a cabo en invernadero (CIMMYT). La metodología empleada para realizar este experimento se señala en el apartado 3.3 del Capítulo II. La semilla de trigo se puso a germinar el día 27 de enero del 2001, 8 días después se realizó el trasplante en tubos de polietileno y once días después se llevó a cabo la inoculación y montaje del experimento. Para la inoculación se usaron huevecillos extraídos de rodajas de zanahoria con incidencia de bacterias, aunque no se tenía la certeza de tener éxito en la invasión de la raíz usando esta metodología, debido a que lo más viable es inocular juveniles 2. La extracción de estos últimos no se llevó a cabo por carecerse de las mallas específicas para discriminar estrictamente tamaños de los nematodos. Se inocularon 650 y 1300 huevecillos / planta en las líneas AUS4930 5.1 (parcialmente resistente) y Machete (susceptible).

El experimento se realizó en un diseño factorial completamente al azar con 5 repeticiones y la organización del experimento se expone en el cuadro 4.

Cuadro 4. Organización del experimento: Relación densidad de inóculo/invasión de *P. thornei* sobre líneas resistentes y susceptibles de trigo, los factores considerados y sus respectivos niveles

FACTORES	NIVELES
A: Variedades	1: AUS4930, 2: MACHETE
B: Densidad de inoculación	1: 650 huev/planta, 2: 1300 huev/planta
Total de huevecillos inoculados	19 500

La variable respuesta medida fue el número de J2 en la raíz a los ocho días después de haber inoculado. El conteo se realizó observando directamente en la raíz los nematodos que a los ocho días lograron penetrar, para lo cual fue necesario hacer tinción de raíces como se indica en el apartado 3.6 del capítulo III.

Utilizando SAS para Windows (SAS Institute, 1998) se realizó un análisis de varianza para determinar una posible diferencia entre las dos densidades de inóculo experimentadas así como entre las líneas evaluadas.

5.2.3. Resultados

a) Número de J2 a los ocho días después de haber inoculado huevecillos

Los resultados del análisis de varianza indican que hay diferencias estadísticas significativas entre las densidades de inóculo evaluadas (cuadro 6).

Cuadro 5. Análisis de varianza de la fuentes de variación: líneas, densidades y su interacción en la variable respuesta número de J2, a los ocho días después de haber inoculado huevecillos de *P. thornei* en el experimento: Relación densidad de inóculo/invasión de *P. thornei* sobre líneas resistentes y susceptibles de trigo.

Fuente	Descripción	Pr > F
A	Líneas: AUS4930 y Machete	0.7066
B	Densidades: 650 y 1300 huev/planta	0.0123 *
AB	Interacción	0.6567

* existen diferencias significativas

Ya con los resultados arrojados por el análisis de varianza se realizó una comparación de medias según Tukey entre densidades de inóculo, fuente de variación donde se lograron encontrar diferencias estadísticas (figura 8).

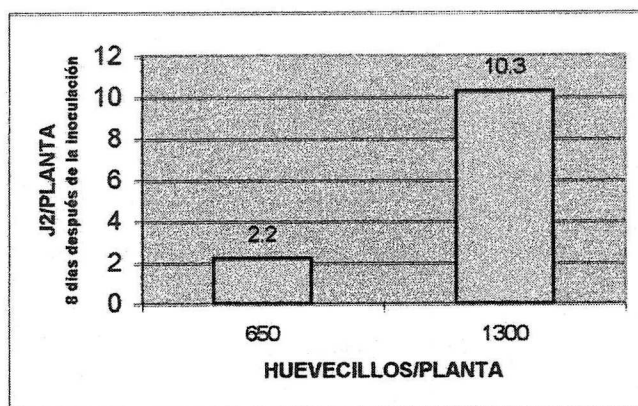


Figura 8. Comparación de medias según prueba de Tukey para densidades de inoculación con una diferencia mínima significativa de 6.08, en el experimento relación densidad de inóculo/invasión de *P. thornei* sobre líneas resistentes y susceptibles de trigo.

5.2.4 Discusión

Es evidente que no hay ninguna diferencia en la cantidad de J2 encontrados en la raíz entre la línea AUS4930 5.1 y Machete a los ocho días después de haberlas inoculado. Esto indica que la invasión de los nematodos a los diferentes sistemas radicales de la línea resistente y susceptible es distinta, al respecto, Taheri (1996), realizó un experimento donde midió la tasa de penetración en variedades resistentes y susceptibles y no encontró diferencia estadística significativa, sin embargo el número de nematodos en las variedades susceptibles fue mayor que en las resistentes después de cierto tiempo. Por su parte Southey (1978), menciona que la imposibilidad o falla de algunas larvas para penetrar las plantas resistentes se debe a la secreción de sustancias tóxicas producidas por la raíz. En lo que se refiere a la densidad de inoculación (número de huevecillos por raíz) es totalmente evidente que hay mayor penetración de J2 cuando se inoculan 1300 huevecillos por planta que cuando se inoculan solamente 650. De esta forma se sabe que entre mayor sea el número de huevecillos inoculados, mayor será el porcentaje de invasión a la raíz. Para los fines establecidos no se le puede conferir la mayor categoría a la densidad de 1300 huevecillos por planta, ya que solo se encuentran en promedio 10.3 J2 por planta, es decir la raíz es invadida apenas por un 0.7 % de lo inoculado, mientras que con 650 invade solo el 0.3 %, por lo tanto no se cubren los requerimientos deseados. Habrá necesidad de duplicar la densidad de inóculo más alta (1300 huev/planta) en el experimento definitivo, ya que se requieren por lo menos 20 nematodos por planta para determinar el crecimiento a través del tiempo, con diferentes

temperaturas. Estas últimas con la finalidad de observar el posible efecto que puedan tener sobre los materiales evaluados. Se consideraron niveles de 18-22 °C y 25-30 °C, ya que son rangos óptimos para la mayoría de nematodos.

Cabe señalar que sería mucho más viable, realizar este tipo de experimento utilizando especímenes J2, sin embargo como ya se mencionó es mucho más difícil obtenerlos. Para fines de medición del ciclo de vida, es sumamente interesante usar huevecillos como inóculo inicial, ya que se parte inclusive desde la eclosión de los mismos, sin embargo hay que poner mucho cuidado y tratar de usar huevecillos con alta viabilidad. De hecho se especula que una de las causas más importante que repercutió en el bajo porcentaje de penetración, es haber utilizado huevecillos extraídos de cultivos contaminados con bacterias, las cuales se sabe repercuten considerablemente en la viabilidad de los mismos.

5.3 Infección y duración del ciclo de vida de *P. thornei* en trigo

5.3.1 Objetivos específicos

- a) Estudiar la capacidad de invasión de *P. thornei* en diferentes periodos de incubación durante su ciclo de vida.
- b) Detectar el cierre del ciclo de vida de *P. thornei* bajo condiciones controladas.
- c) Determinar la influencia de la temperatura y variedad en el porte de *P. thornei*.

5.3.2 Materiales y métodos

Este experimento se realizó en invernadero (CIMMYT). Se llevó a acabo mediante la metodología que se indica en el apartado 3.3 del capítulo III. Se evaluaron una línea de trigo resistente y una susceptible, dos rangos de temperaturas y cinco diferentes periodos de incubación. La semilla se puso a germinar el día 16 de febrero del 2001, 6 días después se realizó el trasplante en el invernadero, este mismo día se hizo el montaje del experimento y 8 días después se realizó la inoculación con huevecillos. Los huevecillos se extrajeron de cultivos monoxénicos de zanahoria y con base a los resultados obtenidos en el experimento previo a este,

se inocularon 2000 huevecillos/planta. Se realizaron extracciones de nematodos cada ocho días después de la inoculación usando la metodología que se indica en el apartado 3.4 del capítulo III.

Se utilizó un diseño experimental factorial completamente al azar con 3 repeticiones y la organización del experimento fue de la siguiente manera.

Cuadro 6. Organización del experimento: Infección y duración del ciclo de vida de *P. thornei* en trigo, factores considerados en el experimento y sus respectivos niveles.

FACTORES	NIVELES
A: Temperaturas (°C)	1:18-22 °C, 2: 25-30 °C
C: Variedades	1: AUS4930, 2: MACHETE
B: Dias a cosecha	8,16,24,40,48 (días)
Total de huevecillos inoculados	216 000

Las variables respuesta medidas fueron número de nematodos/raíz, número de huevecillos por raíz y largo y ancho de 20 nematodos por tratamiento. La primera variable nos indica la capacidad de invasión de *P. thornei* en diferentes tiempos durante su desarrollo, no indica propiamente la multiplicación del mismo, ya que hasta que aparezcan los huevecillos los nematodos se mantendrán en etapa juvenil y no pueden multiplicarse. La segunda variable (número de huevecillos por raíz) se evaluó con la finalidad de determinar la culminación del ciclo de vida (primera generación) pues la presencia de los huevecillos en el interior de las raíces sería el indicador y finalmente con la tercera variable (largo y ancho del nematodo) haciendo mediciones de la longitud y anchura de los nematodos, se determinará el porte (crecimiento) de *P. thornei* a través del tiempo, desde su emergencia hasta su etapa adulta. Como ya se mencionó, se hicieron extracciones de raíces cada ocho días, en todos los casos fue necesario teñirlas (como se indica en el apartado 3.6 del capítulo III) para contar el número de los nematodos y observar el momento de la aparición de los huevecillos, así como medir el crecimiento de los mismos durante su desarrollo. El número de nematodos y de huevecillos se determinó observando las raíces directamente en el microscopio como se indica en la sección 3.6 del capítulo III y en el caso de las dimensiones (largo y ancho) fue necesario disectar las raíces para extraer 20 nematodos de cada tratamiento. En mucho de los casos se obtuvieron especímenes de las tres repeticiones (plantas por cada tratamiento) para lograr la cantidad necesaria (20 nematodos). Una vez reunidos, se realizaron montajes permanentes colocando de 3 a 6 especímenes por

preparación. Las mediciones se realizaron en el laboratorio de nematología del Colegio de Posgraduados digitalizando las imágenes de los especímenes mediante el programa de cómputo Image pro plus.

El análisis de los resultados se hizo con el programa SAS para Windows (SAS Institute, 1998). Se realizaron análisis de varianza y pruebas de comparación de medias para los casos con diferencias significativas.

5.3.3 Resultados

El análisis de varianza (cuadro 7) muestra diferencias significativas entre período de incubación y la interacción temperaturas * variedades * período de incubación para la variable número de nematodos por raíz; entre temperaturas, período de incubación, la interacción temperaturas * variedades, la interacción temperaturas * período de incubación y la interacción temperaturas * variedades * período de incubación para la variable número de huevecillos; entre todas las fuentes de variación y sus interacciones de la variable largo de nematodos y entre variedades, período de incubación, la interacción temperaturas * período de incubación, la interacción variedades * período de incubación y la interacción temperaturas * variedades * período de incubación para la variable ancho de nematodos. Se practicaron pruebas de comparación de medias según Tukey, para los casos más relevantes y así ver a detalle las diferencias que se marcan entre los niveles de cada fuente.

Cuadro 7. Análisis de varianza para las variables número de nematodos, número de huevecillos, largo y ancho de nematodos en el experimento Infección y duración del ciclo de vida de *P. thornei* en una variedad de trigo resistente y otra susceptible realizado en CIMMYT. Estado de México, México 2001.

Número de nematodos		Aparición de huevecillos		Largo de nematodos		Ancho de nematodos	
Fuente de variación	Pr > F	Fuente de variación	Pr > F	Fuente de variación	Pr > F	Fuente de variación	Pr > F
A: Temperaturas	0.4564	A: Temperaturas	0.0006*	A: Temperaturas	0.0001*	A: Temperaturas	0.6410
B: Variedades	0.1091	B: Variedades	0.0676	B: Variedades	0.0001*	B: Variedades	0.0085*
C: Periodo de incubación	0.0006*	C: Periodo de incubación	0.0001*	C: Periodo de incubación	0.0001*	C: Periodo de incubación	0.0001*
Interacción A*B	0.0919	Interacción A*B	0.0429*	Interacción A*B	0.0001*	Interacción A*B	0.2166
Interacción A*C	0.2578	Interacción A*C	0.0005*	Interacción A*C	0.0001*	Interacción A*C	0.0001*
Interacción B*C	0.1368	Interacción B*C	0.1732	Interacción B*C	0.0001*	Interacción B*C	0.0001*
Interacción A*B*C	0.0075*	Interacción A*B*C	0.0147*	Interacción A*B*C	0.0001*	Interacción A*B*C	0.0001*

* existen diferencias significativas

a) Número de nematodos y número de huevecillos por planta.

De acuerdo a los resultados del análisis presente en el cuadro 7, las temperaturas (18-22 °C y 25-30 °C), las variedades (AUS4930 5.1 y Machete) y los periodos de incubación en interacción afectan significativamente al número de nematodos y número de huevecillos por raíz. La figura 10 muestra el resultado del número de nematodos para la interacción de los diferentes niveles de cada factor considerado. La Figura 11 indica la aparición y número de los primeros huevecillos del nematodo entre los 30 y 40 días, lo cual determina el cierre del ciclo de vida.

El periodo de incubación para número de nematodos por raíz e ignorando los otros factores, también muestra diferencias significativas. La figura 9 muestra los niveles más altos del número de nematodos entre los 16 y 24 días.

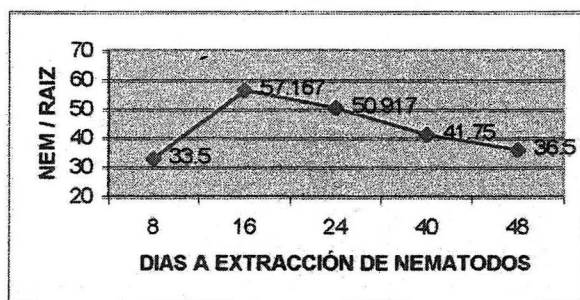


Figura 9. Comparación de medias según prueba de Tukey para periodo de incubación con una diferencia mínima significativa de 29.478, de la variable número de nematodos por raíz en el experimento infección y duración del ciclo de vida de *P. thornei* en trigo

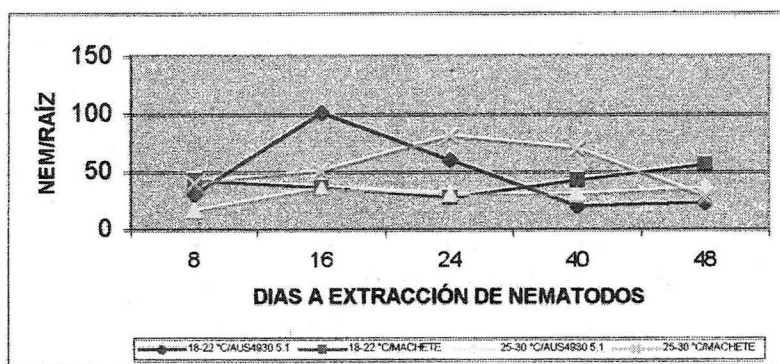


Figura 10. Comparación de medias según prueba de Tukey para la interacción temperatura*variedades*periodo de incubación, con una diferencia mínima significativa de 76.567, de la variable número de nematodos por raíz en el experimento infección y duración del ciclo de vida de *P. thornei* en trigo

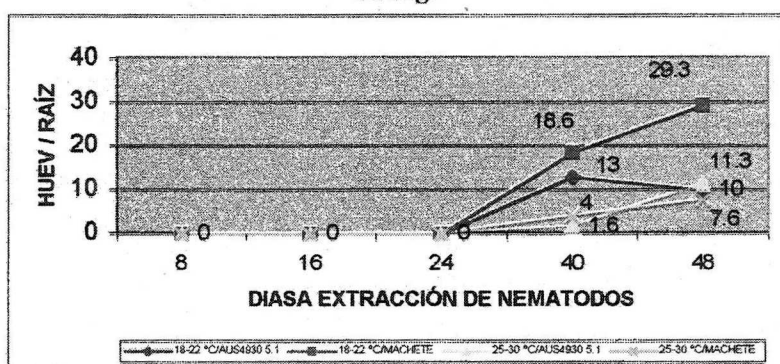


Figura 11. Comparación de medias según prueba de Tukey para la interacción temperatura*variedades*periodo de incubación, con una diferencia mínima significativa de 14.084, de la variable número de huevecillos por raíz en el experimento infección y duración del ciclo de vida de *P. thornei* en trigo

c) Largo y ancho de los nematodos

Aún cuando en el cuadro 7 se muestra diferencias significativas en la mayoría de los factores y sus interacciones en las variables largo y ancho de nematodos los resultados más importantes indican que los tres factores evaluados, las temperaturas (18-22 °C y 25-30 °C), las variedades (AUS4930 5.1 y Machete) y los periodos de incubación en interacción afectan significativamente las dimensiones del nematodo. La figura 12 y 13 muestran el comportamiento del crecimiento (en longitud y ancho respectivamente) a través del tiempo en las diferentes temperaturas y variedades evaluadas.

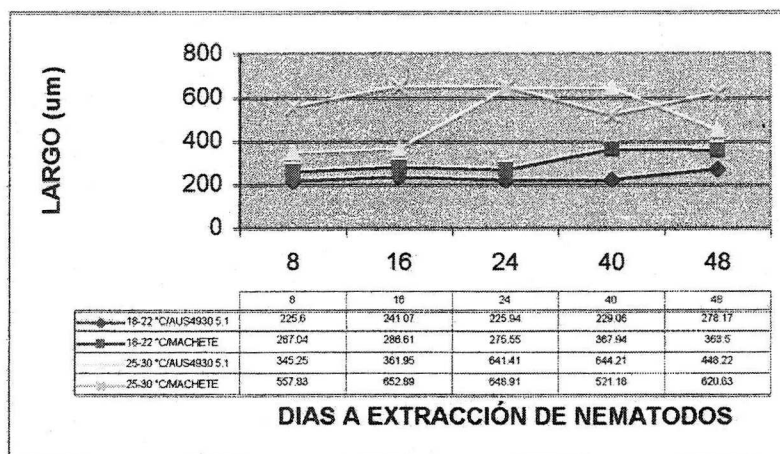


Figura 12. Comparación de medias según prueba de Tukey para la interacción temperatura*variedades*periodo de incubación, con una diferencia mínima significativa de 22.266, de la variable largo del nematodo en el experimento infección y duración del ciclo de vida de *P. thornei* en trigo

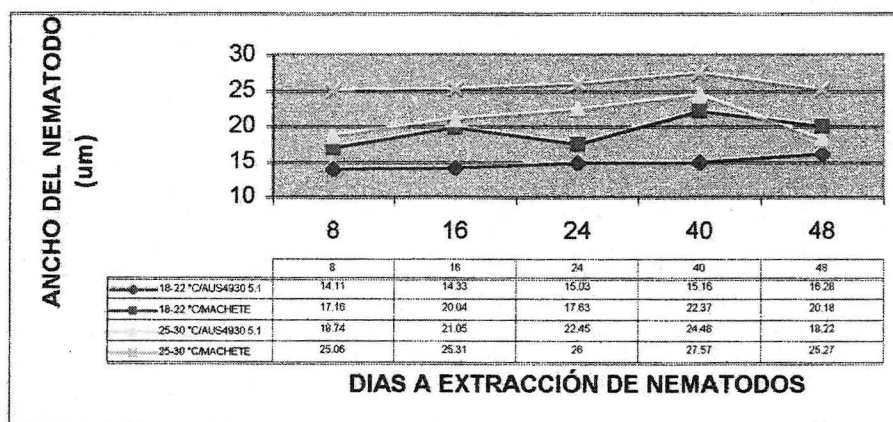


Figura 13. Comparación de medias según prueba de Tukey para la interacción temperatura*variedades*periodo de incubación, con una diferencia mínima significativa de 2.65, de la variable ancho del nematodo en el experimento infección y duración del ciclo de vida de *P. thornei* en trigo

5.3.4 Discusión

a) Sobre el número de nematodos y número de huevecillos por planta

Como ya se ha venido comentando en este experimento el número de nematodos en la planta no tiene nada que ver con la multiplicación del mismo, sino con el grado de infección a la raíces resistentes y susceptibles. El conteo de especímenes se realizó cada ocho días hasta observar la presencia de huevecillos, los cuales fueron el indicador del cierre del ciclo de vida del nematodo. En cada extracción (periodo de incubación) se realizó el conteo de los especímenes. De acuerdo a los resultados, este factor, al igual que la interacción del mismo con las temperaturas y variedades generó diferencias significativas. La figura 9 nos indica el número de nematodos que invaden la raíz a través del tiempo. La población comienza con un nivel de 33.5 nematodos por planta, se incrementa hasta un 57.167 a los 16 días y finalmente culmina disminuyendo con un 36.5 a los 48 días, donde los nematodos inician su reproducción. Al respecto Taheri (1996) dice que en algún momento del ciclo de vida del nematodo, debe operar la resistencia de la planta, la cual está medida por la habilidad del nematodo para penetrar, alimentarse y reproducirse en el hospedante. Los mecanismos de resistencia de variedades de trigo a algunos nematodos no son claros y actualmente no existen reportes sobre los mecanismos de resistencia a *Pratylenchus* en alguna planta.

Las diferentes temperaturas, las variedades y el periodo de incubación en interacción, afectan significativamente a las variables número de nematodos y número de huevecillos (cuadro 7). Respecto al número de nematodos (figura 10) se puede observar la diferencia estadística de cada interacción. No existe algún efecto de la resistencia, susceptibilidad y niveles de temperaturas a través del tiempo en la población de nematodos. Aun así, podemos deducir que la activación del mecanismo de resistencia se da después de la penetración e inclusive después de la primera generación del nematodo, ya que tampoco hay diferencia alguna en el cierre del ciclo de vida. Los huevecillos aparecen en cualquiera de los casos (variedades, temperaturas y periodos de incubación: figura 11) alrededor de los 40 días después de la inoculación, aunque en niveles muy bajos. Esto reconfirma lo señalado por Taheri, (1996) quien afirma que la mayoría de la resistencia en plantas es inducida después de la invasión de los nematodos, dando como resultado una inhabilitación del nematodo para completar su desarrollo y reproducción. A lo 48 días se

determinó la presencia de los huevecillos y se detectó que en la mayoría de los casos, aunque en niveles muy bajos el número de huevecillos siempre fue mayor en la variedad susceptible (figura 11). De hecho Cotten (1979), no encontró diferencias significativas en la tasa de entrada de nematodos agalladores en plantas resistentes y susceptibles. El mismo autor dice que algunas variedades de cebada resistentes a enquistados no muestran diferencia entre las plantas resistentes y susceptibles en términos de penetración del nematodo, sin embargo el desarrollo dentro de las plantas resistentes es bajo. Posiblemente el mecanismo de resistencia afecte directamente la reproducción del nematodo, sin embargo el efecto es paulatino, pues en otros experimentos donde se incluyeron las mismas variedades (AUS4930 5.1 y Machete) la tasa de multiplicación final es más alta en la variedad susceptible (cuadro 11) en un periodo de incubación de 9 semanas.

Entonces pues en este experimento la duración del ciclo de vida de *P. thornei* no se ve afectado por las líneas evaluadas (resistente y susceptible) al menos en la primera generación por la temperatura, tampoco hay efecto en la duración del ciclo, pero en el número de huevecillos si difiere. En la temperatura de 18 - 22 °C en la variedad AUS4930 5.1 aparecen 13 - 10 huevecillos a los 40 y 48 días respectivamente. En esa misma temperatura, pero en la variedad Machete aparecen 18 y 29 huevecillos a los 40 y 48 días respectivamente. Por otro lado con la temperatura de 25 - 30 °C en la variedad AUS4930 aparecen 1 y 11 huevecillos a los 40 y 48 días y en la variedad Machete aparecen 4 y 7 huevecillos a los 40 y 48 días respectivamente (figura 11). Al respecto otros estudios del ciclo de vida de especies de *Pratylenchus* indican que la temperatura si es un factor importante en la duración del ciclo. En *P. penetrans* por ejemplo, el cierre del ciclo se da a los 46 días a una temperatura de 17 °C, a los 38.5 días a 20 °C, a los 28 días a 25 °C, a los 26 días a 27 °C y a los 22 días a 30 °C (Mizukubo and Adachi, 1997). En plántulas de maíz a una temperatura de 30 °C el ciclo de vida de *P. thornei* se completa de los 25 a 29 días (Siyand et al. 1982). Por otro lado Larson (1953), asegura que *P. thornei* cierra su ciclo de vida a los 40 días a temperaturas de 27 °C. Autores como Chitambar y Raski (1985) y Castillo et al., (1995), aseguran que el ciclo de vida del nematodo se acorta alrededor de 30 días a temperatura promedio de 25 °C en rodajas de zanahoria. Cuando las condiciones son óptimas para la reproducción del nematodo, la multiplicación final después de siete a nueve semanas, será más baja en las variedades resistentes. Usualmente también se obtiene menor población final que

la población inicial inoculada, aún cuando en la tasa de penetración inicial y la duración del ciclo de vida no haya diferencia. En el cuadro 11 de otros experimentos se puede comprobar como después de 9 semanas de haber inoculado, la población de nematodos se reduce en las líneas resistente. Una vez más podemos inferir que posiblemente el mecanismo de resistencia a *P. thornei* en la variedad utilizada se activa después de penetración afectando directamente la etapa de reproducción del nematodo.

c) Sobre el largo y ancho del nematodo

Como se puede observar en los resultados obtenidos, las dimensiones del nematodo (largo y ancho) se vieron influenciadas por la interacción de los diferentes niveles evaluados (temperatura, variedades y periodos de incubación); esto significa que no sólo se pudo observar el crecimiento normal a través del tiempo, sino la influencia en el mismo de las líneas (AUS4930 5.1 y Machete) de las temperaturas (18-22 °C y 25-30 °C).

Chitambar y Raski (1985) realizaron un estudio con *P. vulnus* donde a través del tiempo fueron detectando las etapas de desarrollo del nematodo y haciendo una comparación entre experimentos, en el presente encontramos que a los ocho días el nematodo tuvo en promedio 230.4 um de longitud mientras que los autores, determinaron que el juvenil 2 midió entre 190 y 250 um; A los 16 días los especímenes midieron en promedio 276.8 um y el estudio de Chitambar y Raski (1985) ubica al juvenil 3 en un rango de longitud de 270 a 360 um; Se determinó que a los 24 días los especímenes midieron 359.9 u y los autores ubican al cuarto estado juvenil en un rango de 410 a 650 um; Finalmente en nuestro experimento a los 40 días los especímenes midieron 579.2 um y a los 48 días 610.9 um de longitud (figura 12), fechas en las cuales se infiere que los nematodos estaban ya en estado adulto dada la presencia de huevecillos en estas dos fechas.

El ancho de los nematodos también se vio influenciado por el efecto de las temperaturas, variedades y periodo de incubación. La figura 13 nos muestra como el nematodo va cambiando su espesor, comenzando con 14.6 u de ancho a los ocho días y terminando con 26.0 u a los 48 días. Al realizar una comparación con el trabajo que realizó Chitambar y Raski (1985), podemos

inferir que en este experimento a los ocho días el nematodo se ubicaba en su etapa de desarrollo j2, a los 16 días en j3, a los 24 en j3 ó j4 y a los 40 y 48 días ya era un adulto, ya que en estas fechas comenzaron a parecer los huevecillos.

Finalmente podemos inferir que en este experimento el crecimiento del nematodo se ve afectado de tal forma que, el menor potencial de crecimiento (largo y ancho) se da en las temperaturas de 18 a 22 °C con la variedad AUS4930 5.1 en sus diferentes niveles de extracción, por otro lado el mayor potencial de crecimiento (largo y ancho) se da a los 25 a 30 °C con la variedad Machete en sus diferentes niveles de extracción. (figura 12).

La tendencia de los resultados indica una activación del mecanismo de resistencia después de la invasión del nematodo, mediante la obstrucción del crecimiento del nematodo y por lo tanto en la viabilidad del mismo para ovipositar (reproducirse) . A este tipo de resistencia, Johnson y Fushley, 1966, la llaman activa y postinfeccional. Sustancias tóxicas como terthienils, cucurbitacinas y alleloquímicos o bien fitoalexinas como: coumestrol y glyceolin (Cepeda 1996) pueden interferir en este tipo de mecanismo, en donde la producción de las misma se da en respuesta a la presencia de cuerpos extraños dentro de la raíz.

5.4 Conclusiones

- a) Las líneas evaluadas (AUS4930 5.1 y Machete) no definen la cantidad de J2 que invaden al sistema radical de trigo después de ocho días de haber inoculado.
- b) Resulta haber mayor cantidad de J2 en las raíces donde inicialmente se inocularon 1300 huevecillos, sin embargo no se obtienen los 20 nematodos necesarios para la determinación de las dimensiones de los especímenes es estudio.
- c) Biológicamente la tasa de penetración y/o capacidad de invasión de *P. thornei* no se ve afectada durante el desarrollo de *P. thornei* e inclusive en su primera generación por la temperatura y variedades evaluadas.

- d) Con la aparición de un promedio de 9.3 huevecillos por raíz, el ciclo de vida de *P. thornei* en trigo se cumple alrededor de los 40 días en los dos niveles de temperaturas y variedades evaluadas.
- e) El número de huevecillos, así como las dimensiones del nematodo, tiende a ser menor en la variedad resistente con temperaturas de 18 y 22 °C.
- f) Posiblemente el mecanismo de resistencia en la variedad AUS4930 5.1 se activa después de la penetración e inclusive después de la primera generación, donde se obstruye el crecimiento del nematodo y así mismo su viabilidad de oviposición (reproducción).
- g) El crecimiento y porte del nematodo se ven favorecidos por el rango de temperatura más alto (25-30 °C) y por la variedad susceptible (Machete).

5.5 Recomendaciones

Se sugiere repetir este experimento para ratificar o rectificar los resultados, poniendo mayor atención en la viabilidad del material utilizado así como un especial cuidado al momento de la inoculación. El inóculo deberá estar estrictamente formado por juveniles (J2). Para realizar el conteo, se recomienda teñir inmediata y cuidadosamente las raíces después de ser lavadas, con la finalidad de atrapar el mayor número de nematodos dentro de la raíz y así obtener resultados más verídicos. De esta forma se comprobará si en realidad el mecanismo de resistencia es post penetración.

CAPÍTULO VI CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA DE DIFERENTES MATERIALES DE TRIGO (*T. aestivum*) Y *Aegilops geniculata* ANTE LA MULTIPLICACIÓN DE *Pratylenchus thornei*.

6.1 Introducción

Las variedades resistentes, medida de combate que actualmente se ha utilizado con mucha frecuencia en el control fitosanitario, es una de las opciones mas viables para el control de enfermedades, específicamente en trigo las investigaciones se encaminan al mejoramiento genético para obtener materiales que sean resistentes a fitopatógenos.

En CIMMYT el programa de cruza amplias tiene como tarea la creación de materiales que en su progenie resulte por herencia el carácter que confiere la resistencia a ciertos patógenos. Para cada caso específico, deben de realizarse pruebas de multiplicación y/o comportamiento, así como el efecto en la planta. En ocasiones es posible evaluar en conjunto enfermedades de diferente naturaleza patogénica, sin embargo cuando por condiciones externas las evaluaciones no pueden ser ejecutadas hay que hacerlo en forma individual.

Actualmente el CIMMYT ha creado una serie de líneas que prometen altas bondades a los agricultores de trigo, obviamente previo a su liberación se hace necesaria una evaluación fitosanitaria. El objetivo de esta investigación fue medir el comportamiento de *P. thornei* en estos materiales, comparándolos con testigos de trigos resistentes y susceptibles al patógeno. En esta evaluación se incluyeron varios ejemplares de *Aegilops geniculata*, colectados en diferentes países (Francia, Bulgaria, Marruecos, Tunisia, Libia, Jordania, Libano, Siria, Chipre, Portugal, España, Italia y Grecia) los cuales se han comportado como resistentes a enfermedades tales como Roya (amarilla, del tallo y de la hoja), nematodos enquistados de los cereales (*Heterodera avenae* y *H. latipons*) y al virus del enanismo amarillo de la cebada (Zaharieva *et al.*, 2000) (ver cuadro 11). En esta ocasión se pretende conocer el comportamiento de *P. thornei* en diferentes materiales de *Aegilops geniculata* en México, para determinar si puede usarse como fuente de resistencia para el mejoramiento de variedades de trigo. Estos materiales fueron previamente seleccionadas por la Dra. Nicol y Dra. Zaharieva en CIMMYT, utilizando como criterio general la respuesta a nematodos enquistados de los cereales (*Heterodera avenae*).

Aunado a este procedimiento se hizo un ensayo durante ocho días incluyendo sólo algunas líneas (cuadro 8), con la finalidad de determinar si la invasión inicial del nematodo a la raíz influye en la multiplicación final del mismo. En base a las necesidades y propuestas de investigación se han planteado desarrollar los siguientes objetivos:

6.1.1 Objetivo general

Caracterizar diferentes materiales de trigo (*Triticum aestivum*) así como de *Aegilops geniculata* en base a la multiplicación de *Pratylenchus thornei*.

6.1.2. Objetivos específicos

a) Determinar la penetración inicial de *P. thornei* en líneas de comportamiento ya conocido con la finalidad de ratificar o rectificar la multiplicación final del nematodo en una segunda prueba.

b) Caracterizar diferentes materiales de trigo (*Triticum aestivum*) así como de *Aegilops geniculata* en base a la multiplicación de *Pratylenchus thornei*.

6.2. Materiales y métodos

Este experimento se realizó en invernadero (CIMMYT) utilizando la metodología que se señala en el capítulo III apartado 3.3. El 30 de octubre se puso a germinar la semilla de las líneas consideradas y de los materiales de *Aegilops geniculata*, cuyas características se señalan en el cuadro 9. El 6 de noviembre se realizó el trasplante a tubos de polietileno y cinco días después se montaron los dos experimentos, en el primero sólo se incluyeron seis líneas (cuadro 8) y en el segundo se incluyeron los materiales de trigo, *Aegilops geniculata* y los testigos resistentes y susceptibles (cuadro 9), además en esta misma fecha se llevó a cabo la inoculación. Esta se hizo con nematodos cultivados monoxenicamente en rodajas de zanahoria. Con base a la experiencia previa de la Dra. Julie Nicol se inocularon 400 nematodos por planta. El primer ensayo culminó ocho días después de haberse inoculado, fecha en que se extrajeron y tiñeron las raíces de trigo como se señala en los apartados 3.4 y 3.6 del capítulo III, con la finalidad de determinar el

número de nematodos que invadieron la raíz en los primeros ocho días. El segundo experimento concluyó nueve semanas después de haberse inoculado, fecha en que se extrajeron las raíces como se señala en la metodología del apartado 3.4 del capítulo III, en este caso se determinó el número final de nematodos por raíz.

6.3 Experimento: Invasión inicial de *P. thornei* en variedades resistentes y susceptibles de trigo.

Para el primer experimento se realizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones cuya organización se detalla en el cuadro 8.

Cuadro 8. Características de los materiales evaluados en el experimento invasión inicial de *P. thornei* en líneas resistentes y susceptibles de trigo.

GERMOPLASMA	CID	SID	RESPUESTA A <i>P. thornei</i>
302-5	221383	0	Moderadamente Susceptible
Goldmark (Cre 1)	167910	0	Moderadamente Resistente
(2-49).3	377152	2	Susceptible
AUS4930-12.1 (white+awn4) (JN)	390521	-44	Moderadamente Resistente
GS50a T34.8 rep 2 (JT)	390520	18	Moderadamente Resistente
SNI//CAR422/ANA/3/KAUZ*2/TRAP//KAUZ	160296	271	Moderadamente Susceptible

CID: IDENTIFICACIÓN DE CURZA, SID: IDENTIFICACIÓN DE SELECCIÓN

Las variables respuesta que se midieron en el experimento invasión inicial del *P. thornei* a la raíz fueron, número de nematodos y número de huevecillos por raíz. La determinación se hizo a los ocho días observando las raíces previamente teñidas, a través del microscopio de disección (Apartado 3.4 y 3.6 del capítulo III).

6.3.1 Resultados.

a) Número de nematodos y numero de huevecillos por raíz

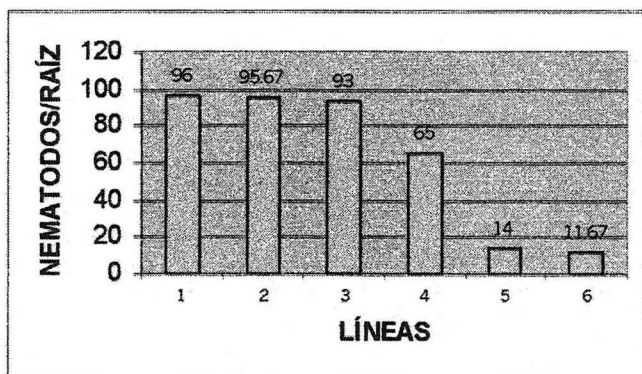
De acuerdo al análisis de varianza, existen diferencias significativas entre las primeras 6 líneas evaluadas para las dos variables (cuadro 9).

Cuadro 9. Análisis de varianza para las variables número de nematodos y número de huevecillos por raíz de las líneas implícitas en el experimento invasión inicial de *P. thornei* en variedades resistentes y susceptibles de trigo.

LÍNEAS	Pr > F (No. de nematodos)	Pr > F (No. de huevecillos)
SIN//CAR422/ANA/3/KAUZ*2/TRAP//KAUZ	0.0001*	0.0007*
GS50a T34.8 rep 2 (JT)		
AUS4930-5.1 (black-awn1) (JN)		
(2-49).3		
Goldmark (Cre 1)		
302-5		

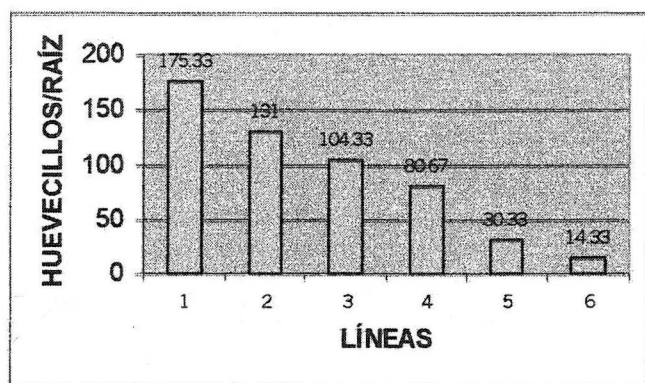
*existen diferencias significativas

Se realizó una comparación de medias según Tukey por las diferencias significativas entre las líneas evaluadas, los resultados se muestran en la figuras 14 y 15.



- 1: SIN//CAR422/ANA/3/KAUZ*2/TRAP//KAUZ (MS)
- 2: (2-49).3 (S)
- 3: 302-5 (MS)
- 4: Goldmark (Cre 1) (MR)
- 5: GS50a T34.8 rep 2 (JT) (MR)
- 6: AUS4930-12.1 (white+awn4) (JN) (MR)

Figura 14. Comparación de medias según prueba de Tukey para las líneas evaluadas con una diferencia mínima significativa de 52.065, de la variable número de nematodos por raíz en el experimento invasión inicial de *P. thornei* en variedades resistentes y susceptibles de trigo. (MS=Moderadamente susceptible, S=Susceptible, R=Resistente, MR=Moderadamente resistente)



- 1: SNI//CAR422/ANA/3/KAUZ*2/TRAP//KAUZ (MS)
- 2: (2-49).3 (S)
- 3: 302-5 (MS)
- 4: Goldmark (Cre 1) (MR)
- 5: GS50a T34.8 rep 2 (JT) (MR)
- 6: AUS4930-12.1 (white+awn4) (JN) (MR)

Figura 15. Comparación de medias según prueba de Tukey para las líneas evaluadas con una diferencia mínima significativa de 93.678, de la variable número de huevecillos por raíz en el experimento invasión inicial de *P. thornei* en variedades resistentes y susceptibles de trigo. (MS=Moderadamente susceptible, S=Susceptible, R=Resistente, MR=Moderadamente resistente)

6.3.2 Discusión

En el primer experimento las líneas SNI//CAR422/ANA/3/KAUZ*2/TRAP//KAUZ (moderadamente susceptible), 302-5 (moderadamente susceptible) y (2-49).3 (susceptible), estadísticamente se ubicaron en los niveles más altos del número de nematodos por raíz y no mostraron diferencias entre ellas. Se sabe que la tasa de penetración en variedades de trigo resistente y susceptible en la mayoría de las veces es la misma y la reproducción de los nematodos se retrasa o delimita solo en plantas de trigo resistentes (Thaeri, 1996). Hay algunos casos donde las larvas fallan en penetrar plantas resistentes u otros donde secreciones de la raíz son tóxicas para los nematodos (Southey, 1978) o bien plantas resistentes y susceptibles pueden ser igualmente invadidas por los nematodos sin embargo, las plantas resultan con mayor número de larvas (Cook, 1974). Trudgill (1991) menciona que los tejidos gruesos de la cubierta exterior de algunas plantas son una barrera ante la posible invasión de nematodos endoparásitos como *P. thornei*. En este experimento podemos deducir que posiblemente la corteza de las raíces es muy blanda lo cual permitió una fácil invasión del nematodo (figura 14). Además se pudo ver que en estos materiales se dan las condiciones óptimas para la reproducción del nematodo, pues si las comparamos con los valores de la multiplicación final en el segundo experimento, ésta se incrementó ubicándolos dentro de los grupos susceptibles y moderadamente susceptibles a *P. thornei* (cuadro 11). Respecto al número de huevecillos ratificamos el comportamiento de las líneas, ya que los niveles más altos los encontramos en estos mismos materiales (figura 15), lo

cual finalmente da origen a una tasa de multiplicación más alta. Por otro lado las líneas Goldmark (Cre 1) (moderadamente resistente), GS50a T34.8 rep 2 (JT) (moderadamente resistente) y AUS4930-5.1 (barbas negras1) (JN) (moderadamente resistente) se ubican en los niveles más bajos del número de nematodos y huevecillos por raíz; de esta forma al haber pocos nematodos, así como un número menor de huevecillos, la multiplicación será menor. Lo anterior es aplicable solamente en los casos AUS4930 5.1 y GS50a (figura 14 y cuadro 11). Cabe señalar que en el capítulo V de esta investigación se relacionó la acción del mecanismo de resistencia a *P. thornei* después de la penetración, donde las plantas resistentes obstruyen considerablemente el crecimiento del nematodo y así mismo su capacidad reproductiva (mediante las variables repuesta largo y ancho del nematodo y número de huevecillos).

Comparando los resultados de éste experimento con el ensayo indicado en la sección 5.2, donde también se mide la penetración a los ocho días después de haber inoculado, confirmamos una mayor penetración, habiendo inoculado con especímenes J2, J3 y adultos y no con huevecillos como se hizo en dicho ensayo, la invasión del nematodo fue relativamente mayor, ya que en los dos casos se experimentó con variedades resistentes y susceptibles.

6.4 Experimento: Multiplicación de *P. thornei* en *T. aestivum* y *A. Geniculata*

En este experimento, “Caracterización de la resistencia presente en diferentes materiales de trigo (*Triticum aestivum*) y *Aegilops geniculata* basado en la multiplicación de *P. thornei*”, se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar con 12 repeticiones. Los materiales evaluados tanto de trigo como de *Aegilops geniculata* se señalan en el cuadro 11. La variable respuesta que se midió fue número de nematodos por raíz y la extracción de nematodos se hizo en ocho etapas por la capacidad del nebulizador; los nematodos se contaron observando las muestras a través del microscopio de disección.

Con la ayuda del programa estadístico SAS para Windows (SAS Institute, 1998) se realizó un análisis de varianza y un análisis logarítmico, el cual no mejoró los resultados respecto al análisis original. Se trabajó con la salida del ANOVA original y se realizó una comparación de medias según Tukey para determinar las posibles diferencias estadísticas entre los materiales evaluados.

6.4.1 Resultados

a) Número de nematodos por raíz.

De acuerdo al ANOVA realizado, los resultados indican que existe diferencias altamente significativas en los diferentes materiales evaluados (cuadro 10).

Cuadro 10. Análisis de varianza para las variables número de nematodos por raíz de las líneas implícitas en el experimento multiplicación de *P. thornei* en *T. aestivum* y *Aegilops geniculata*.

Fuente	Descripción (ver cuadro 10)	Pr > F
A	Líneas: 1, 2, 3, 4, 5.....65	0.0001*

*existen diferencias significativas

Dados los resultados en el análisis de varianza se hizo necesaria una comparación de medias según Duncan (con $\alpha = 0.05$). El cuadro 11 muestra a detalle el comportamiento de cada material evaluado, como se agrupan las líneas respecto a los testigos susceptibles y/o resistentes. De igual manera se puede observar el comportamiento de las diferentes selecciones de *Aegilops geniculata*.

Cuadro 11. Agrupación de medias de los materiales de trigo y *Ae. geniculata* según Duncan en el experimento multiplicación de *P. thornei* para la caracterización de germoplasma de *T. aestivum* y *Ae. geniculata*.

GERMOPLASMA	RESPUESTA A OTROS PATOGENOS	NEM/PL (MEDIA)	CLASIF.
CROC_1/ <i>Ae.squarrosa</i> (205)//KAUZ	EFBCI	1990.08	S
GS50A T37.10 Rep 3 (JT)	NLR1MFE2	1971.75	S
ALTAR 84/ <i>Ae.squarrosa</i> (221)//3*BORL95	BPRI	1946.41	S
(2-49).3 (TESTIGO SUSCEPTIBLE)	FG1MFE2, BS3MFE2, EFBCI, SNLR	1760	S
Batavia.3 (TESTIGO SUSCEPTIBLE)	BS1MFE2	1684.25	S
2-49	FG3MFE1, EFBCI	1669.16	S
MZ149 (<i>Ae. geniculata</i>)	RBYDV, RSM	1211.58	S
WUH1/VEE#5//CRBD	NLR1MFE1	1209.16	S
MAYOOR//TKSN1081/ <i>Ae.squarrosa</i> (222) CASS94Y000095-51PR-2B-OH-1Y	BS1MFE3, BFCI	1197.25	S
AUS4930-12.1 (white+awn4) (JN)	NLR6MFE2	1194.33	S
SABUF/3/BCN//CETA/ <i>Ae.squarrosa</i> (895) CASS94Y00043S-5PR-2B-H-1Y	BS2MFE3, FG5MMFE3, BPRI	1154.41	S
MZ124 (<i>Ae. geniculata</i>)	RCCN,RSM	1152.33	S
MZ20 (<i>Ae. geniculata</i>)	RBYDV, RRT	1124.83	S
Ning Mai 96040 CBSME2HR Y99-00 #20	BS2MFE4, BBCI	1071.16	S
AUS4930- 6.5 (black-awn2) (JN)	NLR3MFE2	1034.58	S
MZ1 (<i>Ae. geniculata</i>)	RCCN, RRA	1004	S
VM 272	RRT, RRH	994.58	S
Sunco.2 (TESTIGO SUSCEPTIBLE)	FG2MFE2,BFCI	990.83	S
MZ91 (<i>Ae. geniculata</i>)	RCCN, RRA, RSI	980.75	S
MZ79 (<i>Ae. geniculata</i>)	RCCN, RRH, RRA, RSM	964.5	S
VK 237	RRT, RRH	948.33	S
TSI/VEE#5//KAUZ	NLR5MFE5	931.25	S
302-5	FG1MFE3	873.66	MS
4930-14.5 RS2 (black+awn2) (JN)	NLR14MFE2	847.16	MS
SABUF/7/ALTAR 84/ <i>Ae.squarrosa</i> (224)//YACO/6/CROC_1/ <i>Ae.squarrosa</i> (205)/5/BR12*3/4/IAS55*4/C114123/3/IAS55*4/EG,AUS//IAS55*4/ALD Goldmark (Cre 1)	RH, EFBCI	825.33	MS
AUS4930-13.5 (black+awn1) (JN)	FG3MFE2, BS2MFE2, BPRI, SNLR	806.25	MS
THB/KEA//2*CLC89	NLR2MFE2	802	MS
MZ77 (<i>Ae. geniculata</i>)	NLR3MFE1	785.75	MS
PRINIA/WEAVER//STAR/3/WEAVER	RCCN, RRH, RSI	774.08	MS
QT4118	NLR12MFE4	765.25	MS
Ning Mai 6415.16 CBSME2HR Y99-00 #15	FG4MFE3, EFBC	764.75	MS
MZ67 (<i>Ae. geniculata</i>)	BS1MFE4, BPRI	750.08	MS
90RneHS1.7#84	RCCN, RSI	735.66	MS
MZ39 (<i>Ae. geniculata</i>)		730.16	MS
YAV79//DACK/RABI/3/SNIPE/4/ <i>Ae.squarrosa</i> (460)	RRA, RRH	699.75	MS
SN1//CAR422/ANA/3/KAUZ*2/TRAP//KAUZ	RF, EFBCI	697.58	MS
CROC_1/ <i>Ae.squarrosa</i> (224)//OPATA	NLR2MFE1, BS3MFE1, RNLR	692.5	MS
MZ116 (<i>Ae. geniculata</i>)	NLR1MFE5	671.41	MS
MZ63 (<i>Ae. geniculata</i>)	RCCN, RSM	663.33	MS
BARBET1	RCCN, RSI	658	MS
MZ21 (<i>Ae. geniculata</i>)	NLR15MFE4	636.75	MS
84.40023/WEAVER//BORL95	RCCN, RBYDB, RRT RSM	627.75	MS
	NLR10MFE4	576.25	MS

VI 184*75	MRRT, RRH, RPTPN	571	MS
FRAME		570.16	MS
SHE-83 DOY1/Ae. SQ (458) CIGM92, 1727	FG2MFE3, BPRCI	555	MS
CROC_1/ <i>Ae.squarrosa</i> (224)//OPATA	NLR2MFE5	552.25	MS
QT 8343 (TESTIGO MODERADAMENTE RESISTENTE)		544.33	MR
MZ61 (<i>Ae. geniculata</i>)	RCCN, RRT, RRH, RRA	480.41	MR
AUS4930 6.14 (black-awn2) (JN)	NLR7MFE2	475.08	MR
CROC_1/ <i>Ae.squarrosa</i> (224)//OPATA	NLR4MFE5	468.91	MR
MZ96 (<i>Ae. geniculata</i>)	RCCN, RRT, RRH, RRA, RSI	434.91	MR
QT 9048 (TESTIGO MODERADAMENTE RESISTENTE)		413.5	MR
MZ10 (<i>Ae. geniculata</i>)	RCCN, RRT, RRH, RRA, RSM	408	MR
AUS4930-5.1 (black-awn1) (JN) (TESTIGO MODERADAMENTE RESISTENTE)	NLR10MFE2, RNLR	404.41	MR
ALTAR 84/ <i>Ae.squarrosa</i> //2*OPATA	NLR3MFE5	402.75	MR
BH1146*3/ALD//BUC/3/BAU (M8HRWYT #. MXI 98-99 in BV)	FG2MFE1, BPRCI	365.75	MR
T.TAU.83.2.30		340.33	MR
MZ144 (<i>Ae. geniculata</i>)	RRT, RRH, RSM	322	MR
90RneHS1.7#16		303.33	MR
QT6258 - do not know pedigree	NLR5MFE2	285.83	MR
GS50a T34.8 rep 2 (JT) (TESTIGO MODERADAMENTE RESISTENTE)	NLR8MFE2, RNLR	285.75	MR
TAM 930442 durum	NLR17MFE2	273.08	MR
GS50a T41.1rep 1 (JT)	NLR9MFE2	270.25	MR
RR350 (Iraq 12)	NLR4MFE2	215.66	MR

S: Susceptible

MS: Moderadamente Susceptible

MR: Moderadamente Resistente

RCCN: Resistente a nematodos enquistados de cereales

RRH: Resistente a roya de la hoja

RRT: Resistente a roya del tallo

RRA: Resistente a roya de amarilla

RSI: Resistente a sequia intensa

RSM: Resistente a sequia moderada

RBYDV: Resistente al virus del enanismo amarillo

RH: Resistente a Helminthosporium

RF: Resistente a Fusarium

SNLR: Susceptible a nematodos lesionadores de la raíz

FG3MFE2: La 3ra mejor fuente a *F. graminearum* en exp. 2

FG1MFE3: La 1ra mejor fuente a *F. graminearum* en exp. 3

FG2MFE2: La 2da mejor fuente a *F. graminearum* en exp. 2

FG5MFE3: La 5ta mejor fuente a *F. graminearum* en exp. 3

EFBC: Excelente vs. *Fusarium* y *Bipolaris* en campo

EFBCI: Excelente vs. *Fusarium* y *Bipolaris* en campo e invern.

NLR1MFE2: La 3ra mejor fuente a NLR en exp. 1

RNLR: Resistente contra nematodos lesionadores de la raíz

NLR3MFE1: La 3ra mejor fuente a NLR en exp. 1

NLR2MFE2: La 2da mejor fuente a NLR en exp. 2

NLR14MFE2: La 14va mejor fuente a NLR en exp. 2

NLR5MFE5: La 5ta mejor fuente a NLR en exp. 5

NLR3MFE2: La 3ra mejor fuente a NLR en exp. 2

NLR6MFE2: La 6ta mejor fuente a NLR en exp. 2

NLR1MFE1: La 1ra mejor fuente a NLR en exp. 1

NLR2MFE1: La 2da mejor fuente a NLR en exp. 1

NLR1MFE5: La 1ra mejor fuente a NLR en exp. 5

FG3MFE1: La 3ra mejor fuente a *F. graminearum* en exp. 1

FG1MFE2: La 1ra mejor fuente a *F. graminearum* en exp. 2

NLR15MFE4: La 3ra mejor fuente a NLR en exp. 1

NLR12MFE4: La 3ra mejor fuente a NLR en exp. 1

BS3MFE1: La 3ra mejor fuente a *Bipolaris* en exp. 1

BS3MFE2: La 3ra mejor fuente a *Bipolaris* en exp. 2

BS1MFE2: La 1ra mejor fuente a *Bipolaris* en exp. 2

BS1MFE3: La 1ra mejor fuente a *Bipolaris* en exp. 3

BS2MFE3: La 2da mejor fuente a *Bipolaris* en exp. 3

BS2MFE4: La 2da mejor fuente a *Bipolaris* en exp. 4

BS2MFE2: La 2da mejor fuente a *Bipolaris* en exp. 2

BS1MFE4: La 1ra mejor fuente a *Bipolaris* en exp. 4

BPRI: Buena vs. pudriciones de la raíz en invern.

EFBCI: Buena vs. *Fusarium* en campo e invernadero

BBBCI: Buena vs. *Bipolaris* en campo e invernadero

NLR: Nematodos lesionadores de la raíz

6.4.2 Discusión

Respecto al segundo experimento (cuadro 11) se observa el comportamiento de cada uno de los materiales evaluados respecto a los testigos incluidos. Los valores van desde 215 nematodos/ raíz correspondientes a las líneas con menor multiplicación, hasta 1990 en las líneas con el mayor índice. Como se recordará se inoculó una mezcla de diferentes estadios de 400 nematodos/planta, lo cual también puede ser un parámetro de ayuda para definir, el comportamiento de las líneas. Es

importante comentar que el rango de penetración inicial (primer experimento) fue de 3 % (12 nemas) a 24 % (96 nemas), en promedio 15 % (60 nemas). De acuerdo al comportamiento de cada ejemplar y con base al parámetro dado por cada testigo los materiales se caracterizaron como moderadamente resistentes, moderadamente susceptibles y susceptibles a *P. thornei* (cuadro 11).

Se han catalogado como moderadamente resistentes a *P. thornei* a los materiales comprendidos entre 215 a 544 nematodos por raíz (AUS4930 6.14, CROC_1/*Ae. squarrosa*(224)//OPATA, ALTAR 84/*AE. squarrosa*/2*OPATA, BH1146*3/ALD//BUC/3/BAU, T.TAU.83.80, 90RneHS1.7#16, QT6258, GS5A T41, TAMD 930442 DURUM y RR350: ver cuadro 11), pues es un rango que comprende el valor más bajo en el experimento y el valor más alto dado por uno de los testigos con resistencia al nematodo (QT 8343). En este caso la resistencia puede estar condicionada por varios factores internos y externos que influyen para reducir el grado de infección. En algunas ocasiones las plantas poseen una resistencia natural por medio de sustancias que son repelentes, tóxicas e inhibitorias al nematodo (Cepeda 1996). La hipersensibilidad, algunos reguladores de crecimiento, las fitoalexinas y ciertos aminoácidos juegan un papel muy importante dentro de los mecanismos de resistencia a patógenos por plantas. Recordemos que los mecanismos de resistencia en trigo no son muy claros, por ello en este caso lo más recomendable es realizar un estricto estudio sobre los mecanismos implícitos en la resistencia de estos materiales.

Materiales como AUS4930 5.1 y GS50a muestran un grado de resistencia que se manifiesta impidiendo la entrada de los nematodos (j2, j3 y adultos) (figura 14) y obstruyendo la reproducción del nematodo que finalmente se manifiesta en la reducción de la población de los mismos (figura 15), los materiales que finalmente se definen como moderadamente resistente, quizá hayan tenido el mismo comportamiento que los testigos que se indican; éstos últimos en el primer ensayo dejan ver una reducción en la producción de huevecillos lo cual indica una baja multiplicación en los materiales.

Es sumamente interesante resaltar que los materiales evaluados poseen resistencia a una serie de patógenos (cuadro 11), excluyendo *P. thornei*, motivo por el cual en esta ocasión fueron

sometidos a una inoculación con el nematodo, el objetivo final es determinar materiales con la capacidad de resistencia a distintas enfermedades, los cuales serían la mejor opción para ser cultivados comercialmente o bien para emplearlos en mejoramiento genético.

Por otra parte es importante comentar que muchos de los materiales evaluados portan resistencia a enfermedades relacionadas comúnmente a la presencia de *P. thornei*, enfermedades como Fusarium y resistencia a sequía; el cuadro 11 muestra los ejemplares que aparte de ser resistentes a estas enfermedades también lo son a *P. thornei*.

Algunos materiales evaluados poseen el gen Cre1, el cual da resistencia a nematodos enquistados (*H. Avenae*: RCCN en cuadro 11), pero podemos detectar que en este caso no hay una relación directa con la resistencia a *P. thornei*, recordemos que son dos especies de biología totalmente distinta, *H. avenae* es un nematodos sedentario y *P. thornei* es migratorio, lo cual puede ser causa de una respuesta distinta al mecanismo de resistencia atribuido a Cre1. Sin embargo sería muy importante poner atención en líneas como T.TAU.83.2.30, la cual posee el gen Cre3 que da resistencia al patotipo Ha13 (*H. avenae*) de Australia, así mismo la línea 90RNeHS1.7#16 que resultó ser resistente a poblaciones de *H. avenae* en Francia; pues de acuerdo a este experimento (cuadro 11) también muestran una respuesta de resistencia moderada a *P. thornei*. Estamos hablando de una fuente de resistencia diferente, que quizá también tenga efecto en *P. thornei*, como la que posee AUS4930.

Los materiales de *Aegilops geniculata* que resultan con el menor índice de multiplicación son: MZ61 (Tunisia), MZ96 (Chipre), MZ10 (Bélgica) y MZ144 (Italia). Investigaciones sobre *Aegilops geniculata* muestran las bondades de esta especie como fuente de resistencia a patógenos de trigo (Romero *et al.*, 1998; Zaharieva, *et al.* 2000). De esta forma se determinó que estos materiales son los más indicados para realizar cruza con trigo para transmitir la resistencia a *P. thornei*. Actualmente la Dra. María Zaharieva, investigador del CIMMYT, ha creado anfiploides de la cruza de estos materiales con trigo duro (Kucuk y Sooty 9/Rascon37) y trigo harinero (Baviacora y Prinia), los cuales son de alto rendimiento y susceptibles a *P. thornei*, esperando obtener una transferencia de la resistencia al germoplasma de alto rendimiento.

6.5 Conclusiones

- a) En las líneas: SNI//CAR422/ANA/3/KAUZ*2/TRAP//KAUZ (moderadamente susceptible), 302-5 (moderadamente susceptible), (2-49).3 (susceptible), GS50a T34.8 rep 2 (JT) (moderadamente resistente) y AUS4930-5.1 (black-awn1) (JN) (moderadamente resistente), la multiplicación final es directamente proporcional a la invasión inicial de *P. thornei*.
- b) En los primeros 8 días de incubación, las variedades resistentes: AUS4930 5.1 y GS50a reducen la entrada de *P. thornei* a la raíz, lo cual tiene repercusión directa en una pobre multiplicación del nematodo en la planta.
- c) Las mejores líneas de trigo, ante el comportamiento de *P. thornei* son: AUS4930 6.14, CROC_1/*Ae. squarrosa*(224)//OPATA, ALTAR 84/*Ae. squarrosa*/2*OPATA, BH1146*3/ALD//BUC/3/BAU, T.TAU.83.80, 90RneHS1.7#16, QT6258, GS5A T41, TAMD 930442 DURUM y RR350 (Iraq. 12).
- c) Los ejemplares MZ61, MZ96, MZ10 y MZ144 de *Aegilops geniculata* fueron caracterizados como fuente de resistencia a *P. thornei* la cual puede ser transferida a trigo de alto rendimiento susceptible al nematodo.

CAPÍTULO VII POSIBILIDAD DEL CONTROL GENÉTICO DE *P. thornei* CON UNA POBLACIÓN DE HAPLOIDES DOBLADOS DERIVADAS DEL CRUZAMIENTO DE LAS VARIEDADES AUS4930 5.1 * SPEAR

7.1 Introducción

La creación de variedades con resistencia a las enfermedades más destructoras figura entre las contribuciones más importantes al mejoramiento de trigo. El uso de variedades resistentes reduce considerablemente los costos de producción, lo que se transforma en un ahorro, que con el control directo no sería posible, así el uso de híbridos o líneas vegetales resistentes es la mejor opción para reducir las pérdidas de rendimiento causadas por nematodos, y a costos muy bajos.

Como se comentó en el apartado 2.10 del capítulo II la resistencia heredada se ha encontrado en diversas variedades de especies cultivadas, así como también el modo de transmitir el carácter de resistencia a plantas susceptibles, por medio de hibridación o cruza recíprocas. La resistencia puede estar dada por un gen (monogénica) o por un grupo de genes (poli génica) además el hecho de manifestarse en condiciones homocigóticas recesivas limita mucho el que se pueda heredar resistencia a plantas susceptibles (Cepeda, 1996).

Actualmente, la resistencia heredable a nematodos ha sido incorporada a muchos cultivos, incluyendo cereales, forrajes, hortalizas, frutales, ornamentales, tabaco, algodón y soya. EL caso que nos ocupa, la herencia de plantas resistentes a *P. thornei*, puede ser simple debido a un gen simple (dominante o recesivo), o compleja controlado por muchos genes (Bingefors, 1982).

La cruza entre trigo (*Triticum aestivum*) y maíz es un medio efectivo en la producción de trigos poliapoides. La polinización con maíz aunado a un tratamiento posterior con 2-4D da como resultado un embrión de trigo inmaduro capaz de generar una planta haploide, los cromosomas del maíz son eliminados por el efecto del medio artificial. La planta haploide resultante se somete a un tratamiento de doblamiento (colchicina) para obtener los haploides doblados. La aplicación del procedimiento de la haploidía es útil en programas de fitomejoramiento, análisis genético, mapeo cromosómico y en programas de cruza amplias (Mujeeb-Kazi, 1998).

El trigo AUS4930 5.1 provee resistencia a *P. thornei* y a 13 patotipos australianos de *Heterodera avenae* (Nicol y Rivoal 2001), sin embargo los mecanismos y/o genética de resistencia no son muy claros, por esta razón, en la presente investigación se ha evaluado una población de haploides doblados derivada del cruzamiento de la F1 de AUS4930 5.1* SPEAR con maíz. La finalidad específica de este experimento es seleccionar las líneas que hayan heredado el carácter resistente, así como determinar el número mínimo de genes implícitos en la resistencia a *Pratylenchus thornei* del progenitor AUS4930 5.1. Para lograr lo antes señalado se planteó desarrollar el siguiente objetivo:

7.1.1 Objetivos

Estudiar la resistencia presente en la línea AUS4930 5.1 a partir de una población de haploides doblados.

7.2 Materiales y métodos

a) Condiciones y localización del experimento.

El experimento se llevó a cabo en invernadero (CIMMYT). La metodología que se usó se detalla en el capítulo III apartado 3.3. El 27 de enero del 2001 se pusieron a germinar las semillas de las líneas y variedades evaluadas (capítulo III, sección. 3.3). Cinco días más tarde se llevó a cabo el trasplante de plántulas a los tubos de polietileno (capítulo III, sección 3.3b), se efectuó el montaje del experimento y posteriormente se llevó a cabo la inoculación. El inóculo se extrajo de cultivos monoxénicos en discos de zanahoria. Se inocularon 400 nematodos por planta en 1 ml de agua. El experimento duró alrededor de 7 semanas a partir de la inoculación y durante este período se realizaron riegos ligeros cada tercer día; Se hizo una aplicación de pirimor a razón de 2 g/ l de agua contra áfidos. La temperatura en el invernadero fue de 20 °C en el día y 15 °C durante la noche.

Además de incluir los progenitores de la cruza (AUS4930 5.1 y Spear) se evaluaron otras líneas susceptibles a *P. thornei* que sirvieron como referencia adicional para determinar el comportamiento en los haploides doblados (cuadro 12).

Se utilizó un diseño experimental factorial en bloques completamente al azar con 8 repeticiones.

Cuadro 12. Organización del experimento: Posibilidad del control genético de *P. thornei* con una población de haploides doblados derivados del cruzamiento de las variedades AUS4930 5.1*SPEAR.

TRAT	GERMOPLASMA	NEM/UE	REPETICIONES	NEMATODOS INOCULADOS
1...48	AUS4930.51*SPEAR	400	8*48	19200
49	AUS4930 5.1 *	400	8	3200
50	AUS4930 5.1 *	400	8	3200
51	AUS4930 5.1 *	400	8	3200
52	AUS4930 5.1 *	400	8	3200
53	SPEAR **	400	8	3200
54	SPEAR **	400	8	3200
55	SPEAR **	400	8	3200
56	SPEAR **	400	8	3200
57	MACHETE ***	400	8	3200
58	MACHETE ***	400	8	3200
59	GATCHER ****	400	8	3200
60	GATCHER ****	400	8	3200
TOTAL				176000 nemas
* Progenitor resistente		*** Testigo susceptible		
** Progenitor susceptible		**** Testigo susceptible		

La variable respuesta fue: número de nematodos por planta. El experimento concluyó 9 semanas después de la inoculación (capítulo III, sección 3.3).

Las raíces se lavaron y la extracción de nematodos se hizo en cinco etapas, dada la capacidad del nebulizador, la duración de extracción por etapa duró tres días, en cada ocasión al tercer día se hizo la recolección de nematodos (capítulo III, sección 3.3) y se procedió al conteo (capítulo III, sección 3.2).

b) Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con la ayuda del programa SAS para Windows (SAS Institute, 1998). Se realizaron análisis de varianza y así se determinaron las posibles diferencias en el comportamiento del nematodo en cada una de líneas y variedades experimentadas. También se realizó un análisis de logarítmico, sin embargo las salidas no mejoran los resultados respecto al análisis original.

La heredabilidad se determinó con los resultados arrojados por el análisis de varianza y con la ayuda del método de Singh y Chaudhary (Singh y Rajaram, 1995):

La fórmula que se aplica es la siguiente:

$$h = \sigma^2g / \sigma^2p$$

donde:

h = es la heredabilidad

σ^2g = la varianza genética y se calcula: $\sigma^2g = (\sigma^2L - \sigma^2E)/r$, siendo:

σ^2L = la varianza de líneas y variedades evaluadas

σ^2E = la varianza del error

r = número de repeticiones

σ^2p = la varianza genética mas la varianza del error: $(\sigma^2g + \sigma^2E)$

Por otra parte, también se determinó el número mínimo de genes que controlan la resistencia a *P. thornei* con el método de Wright con modificaciones de Cockerman (Singh y Rajaram, 1995). La fórmula modificada es:

$$n = (GR)^2 / 4.27\sigma^2g$$

donde:

n = es el número mínimo de genes efectivos

GR = rango genotípico (es el rango de las medias de las líneas)

σ^2g = la varianza genética de las líneas evaluadas

7.3 Resultados

a) ANOVA

El análisis de varianza obtenido para la variable número de nematodos se muestra en el cuadro 13. Las líneas evaluadas fueron estadísticamente diferentes, por lo cual se asume que existe comportamiento diferente en la población en cuanto a la resistencia al nematodo. Estadísticamente no se observan diferencias significativas por el efecto de bloques, sin embargo biológicamente puede existir efecto, ya que el nivel 0.0588 de $Pr > F$ no rebasa considerablemente al nivel de α de 0.05 (cuadro 13).

Cuadro 13. Análisis de varianza de la variable número de nematodos en el experimento: Posibilidad del control genético de *P. thornei* con una población de haploides doblados derivados del cruzamiento de las variedades AUS4930 5.1*SPEAR.

FV	GL	SC	CM	Fcal	Pr>F
BLOQUE	7	487665.88	69666.55	1.97	0.0588
VARIEDAD	54	96209981.10	178166.32	5.03	0.0001*
ERROR	378	13400457.37	35450.99		
TOTAL	439	23509122.35			

*existen diferencias estadísticamente significativas

b) Comparación de medias

En el cuadro 14 se señala la caracterización de la resistencia de las líneas evaluadas con respecto a los progenitores. Al respecto se pueden hacer varias agrupaciones de acuerdo a los niveles de tukey (383.4) y a los testigos resistentes y susceptibles.

Cuadro 14. Comparación de medias según Tukey de la variable número de nematodos por material evaluado, con una diferencia mínima significativa de 383.4, en el experimento: Posibilidad del control genético de *P. thornei* con una población de haploides doblados derivados del cruzamiento de las variedades AUS4930 5.1*SPEAR.

VARIEDAD	NOMENCLATURA (TRIGO)	MEDIA	GRUPO	RESPUESTA A <i>P. thornei</i>
43	LÍNEA DH	84.75	E	RESISTENTE
30	LÍNEA DH	111.63	E	RESISTENTE

Continuación...

46	LÍNEA DH	121	E	RESISTENTE
47	LÍNEA DH	126.38	E	RESISTENTE
25	LÍNEA DH	130.25	E	RESISTENTE
3	LÍNEA DH	130.88	E	RESISTENTE
1	LÍNEA DH	138.38	ED	RESISTENTE
32	LÍNEA DH	152.13	ED	RESISTENTE
40	LÍNEA DH	155.88	ED	RESISTENTE
10	LÍNEA DH	157.25	ED	RESISTENTE
9	LÍNEA DH	158.88	ED	RESISTENTE
35	LÍNEA DH	163.13	ED	RESISTENTE
45	LÍNEA DH	167.13	EDC	RESISTENTE
11	LÍNEA DH	171.75	EDC	RESISTENTE
26	LÍNEA DH	172.5	EDC	RESISTENTE
13	LÍNEA DH	184.75	EDC	RESISTENTE
23	LÍNEA DH	185.5	EDC	RESISTENTE
50	AUS4930 5.1 (resistente)	186	EDC	RESISTENTE
51	AUS4930 5.1 (resistente)	186.88	EDC	RESISTENTE
28	LÍNEA DH	192.63	EDC	RESISTENTE
24	LÍNEA DH	196.75	EDC	RESISTENTE
2	LÍNEA DH	201.38	EDC	RESISTENTE
52	AUS4930 5.1 (resistente)	201.88	EDC	RESISTENTE
14	LÍNEA DH	205.5	EDC	RESISTENTE
49	AUS4930 5.1 (resistente)	208.63	EDC	RESISTENTE
18	LÍNEA DH	226.13	EDC	MODERADAMENTE RESISTENTE
17	LÍNEA DH	226.88	EDC	MODERADAMENTE RESISTENTE
6	LÍNEA DH	229.13	EDC	MODERADAMENTE RESISTENTE
19	LÍNEA DH	234.63	EDC	MODERADAMENTE RESISTENTE
15	LÍNEA DH	245.38	EDC	MODERADAMENTE RESISTENTE
21	LÍNEA DH	246.25	EDC	MODERADAMENTE RESISTENTE
34	LÍNEA DH	250.88	EDC	MODERADAMENTE RESISTENTE
31	LÍNEA DH	263.63	EDC	MODERADAMENTE RESISTENTE
7	LÍNEA DH	264.25	EDC	MODERADAMENTE RESISTENTE
33	LÍNEA DH	272.25	EDC	MODERADAMENTE RESISTENTE
8	LÍNEA DH	281.38	EDCB	MODERADAMENTE SUSCEPTIBLE
38	LÍNEA DH	286.63	EDCB	MODERADAMENTE SUSCEPTIBLE
27	LÍNEA DH	297.75	EDCB	MODERADAMENTE SUSCEPTIBLE
37	LÍNEA DH	300.5	EDCB	MODERADAMENTE SUSCEPTIBLE
12	LÍNEA DH	301.25	EDCB	MODERADAMENTE SUSCEPTIBLE
48	LÍNEA DH	303.63	EDCB	MODERADAMENTE SUSCEPTIBLE
5	LÍNEA DH	306	EDCB	MODERADAMENTE SUSCEPTIBLE
42	LÍNEA DH	307.38	EDCB	MODERADAMENTE SUSCEPTIBLE
29	LÍNEA DH	309.13	EDCB	MODERADAMENTE SUSCEPTIBLE
41	LÍNEA DH	358.5	EDCB	MODERADAMENTE SUSCEPTIBLE
4	LÍNEA DH	373.63	EDCB	MODERADAMENTE SUSCEPTIBLE
53	SPEAR (susceptible)	415.13	EDCB	SUSCEPTIBLE
55	SPEAR (susceptible)	440.75	EDCB	SUSCEPTIBLE
56	SPEAR (susceptible)	443.38	EDCB	SUSCEPTIBLE
54	SPEAR (susceptible)	445.25	EDCB	SUSCEPTIBLE
44	LÍNEA DH	548.63	CBA	SUSCEPTIBLE

DH: haploide doblado.

c) Heredabilidad

De acuerdo a la metodología propuesta para la evaluación de la heredabilidad y con la ayuda de un análisis de varianza, se calculó del porcentaje de la resistencia heredada como se indica a continuación.

$$h = \sigma^2g/\sigma^2p$$

$$\sigma^2g = (178166.31675084 - 35450.99303752)/8 = 17839.41546$$

$$\sigma^2p = 17839.41546 + 35450.99303752 = 53290.40849$$

$$h = 17839.41546/53290.40849 = 0,33 \text{ (33 \% de heredabilidad)}$$

d) Número mínimo de genes

De acuerdo a la fórmula de Cockerman modificada:

$$n = (GR)^2/4.27\sigma^2g$$

$$GR = 548.63 [L44 DH] - 84.75 [L43 DH] = 463.88$$

$$\sigma^2g = 17839.41546$$

$$n = [(463.88)^2/(4.27*17839.41546)]/[0.33] = 0.932 = 1 \text{ GEN}$$

el número de genes calculados es igual a 1.

7.4 Discusión

Con base en los resultados obtenidos sabemos que hay diferente comportamiento en la población de haploide doblados respecto a *P. thornei*. En el Cuadro 14 se puede ver, cuales líneas son estadísticamente iguales a la variedad susceptible (Spear) y a la variedad resistente (AUS4930 5.1). Por las agrupaciones que resultan en la comparación de medias y por la similitud y/o acercamiento con los testigos (resistentes y susceptible) catalogamos a cada uno de los haploides doblados en: resistentes, moderadamente resistentes, moderadamente susceptibles y susceptibles a *P. thornei*. De esta forma se obtuvieron veintiún haploides doblados resistentes (43 DH, 30 DH, 46 DH, 47 DH, 25 DH, 3 DH, 1 DH, 32 DH, 40 DH, 10 DH, 9 DH, 35 DH, 45 DH, 11 DH, 26 DH, 13 DH, 23 DH, 28 DH, 24 DH, 2 DH, 14 DH); diez haploides doblados moderadamente resistentes (18 DH, 17 DH, 6 DH, 19 DH, 15 DH, 21 DH, 34 DH, 31 DH, 7 DH y 33 DH); once haploides doblados moderadamente susceptibles (8 DH, 38 DH, 27 DH, 37 DH, 12 DH, 48 DH, 5 DH, 42 DH, 29 DH, 41 DH, 4 DH) y uno susceptible (44 DH). De acuerdo con los resultados del análisis de varianza no hay diferencias significativa entre los bloques, sin embargo podría existir alguna diferencia biológicamente hablando, ya que el nivel de $Pr > F$ (0.0588) no rebasa por mucho el nivel de α (0.05), por lo cual se sugiere una repetición de este experimento con la finalidad de ratificar o rectificar estos resultados.

El número genes efectivos, que confieren la resistencia a *P. thornei*, es igual a 1, esto indica que la resistencia a *P. thornei* por AUS4930 5.1 se controla monogénicamente. La mayoría de las resistencias genéticas identificadas usadas en programas de fitomejoramiento son controladas por un gen mayor dominante simple (O'Brien *et al.*, 1980; Sidhu y Webster, 1981). En Queensalnd (Thompson, 1990) reportó que la resistencia de trigo a *P. thornei* es controlada por un gen dominante simple. En este experimento se encuentra una heredabilidad baja (0.33), lo que indica que el comportamiento de susceptibilidad y/o resistencia de los haploides doblados, se debe en un 33 % a las características heredadas por sus progenitores, el porcentaje restante fue influencia de factores externos, una vez más se sugiere que este experimento sea repetido.

7.5 Conclusiones

- a) Las líneas 43 DH, 30 DH, 46 DH, 47 DH, 25 DH, 3 DH, 1 DH, 32 DH, 40 DH, 10 DH, 9 DH, 35 DH, 45 DH, 11 DH, 26 DH, 13 DH, 23 DH, 28 DH, 24 DH, 2 DH, 14 DH se comportan como resistentes a *P. thornei*.
- b) Las líneas 18 DH, 17 DH, 6 DH, 19 DH, 15 DH, 21 DH, 34 DH, 31 DH, 7 DH y 33 DH se comportan como moderadamente resistentes a *P. thornei*.
- c) Las líneas 8 DH, 38 DH, 27 DH, 37 DH, 12 DH, 48 DH, 5 DH, 42 DH, 29 DH, 41 DH, 4 DH se comportan como moderadamente susceptibles a *P. thornei*.
- d) La línea 44 DH se comporta como susceptible a *P. thornei*.
- e) La heredabilidad en la cruce AUS4930 5.1*SPEAR, que genera resistencia a *P. thornei* es de 33 %.
- f) La resistencia a *P. thornei* heredada por la cruce AUS4930 5.1*SPEAR a la población de haploides doblados esta controlada monogenicamente.

CAPÍTULO VIII. LITERATURA CITADA

- Agrios, G.N. 1998. Fitopatología. Editorial Limusa. Tercera Edición. Plant Pathology, Academic Press, Inc. 839 páginas.
- Ammati, M. 1987. Nematode status on food legumes in Morocco. In: Nematodes Parasitic to Cereales and Legumes in Temperate Semi Arid Regions. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Aleppo, Syria. Pp. 196-172.
- Anderson, R.V y L.J Townshed. 1976. *Pratylenchus neglectus* C.I.H Descriptions of Plant Parasitic Nematodes Set 6, no.82.
- Bailey, J.A., Carter, G.A and Skkip, R.A. 1976. The use and interpretation of bioassays for fungitoxicity of phytoalexins in agar media. *Physiol. Pl. Path.* 8:189-194
- Baxter, R.I and Blake, C.D. 1968. *Pratylenchus thornei*: A cause of root necrosis in wheat. *Nematológica*, 14: 351-361.
- Bendixen, L.E. 1988. Weeds Host of *Heterodera*, the Cyst, and *Pratylenchus*, the root-lesion, nematodes. The Ohio State University Ohio Agricultural Research and Development Center Wooster. 117:1-52.
- Bingefors, S. 1982. Nature in inherited nematode resistance in plants. In: Pathogens Vectors and Plant Diseases: Approaches to Control (Harris, H.K. and K. Maramorosch editors), Academic Press, New York, pp. 188-219.
- Brown, R.H. and Kerry, B.R. 1987. Principles and Practices of Nematode Control in Crops. Academic Press Australia. 421 páginas.
- Castillo, P.J., Casas, T.L. y Jiménez, D.R.M. 1995. Effect of Time, Temperature and Density on Reproduction of *Pratylenchus thornei* in Carrot Disc Cultures. *J. of Nematology* 27 (1): 120-124.

Cepeda, M.S. 1996. Nematología Agrícola. Ed, Trillas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México, D.F. 305 páginas.

Colbran, R.C. y J.S. McCulloch. 1965 Nematodes associated with wheat in Queensland. Old. J. Agric. Anim. Sci. 22: 353-356.

Cook, R. 1974. Nature and inheritance of Nematode Resistance in Cereals. J. of Nematology, 6(4):165-174.

Corbett, D.C.M. 1970. Cereal *Pratylenchus* spp. in England and Wales and their recognition. Pl. Path., 19:6-10.

Corbett, D.C.M. 1972. The effect of *Pratylenchus fallax* on wheat, barley and sugar beets roots. Nematológica 18: 303-308.

Cotten, J. 1979. Some Aspects of breeding for cereal root eelworm (*Heterodera avenae* Woll). Resistencia in barley. Proc.IX Int. Nematol. Symp. Pp. 231-237.

Chen, T. and Rich, A.E. 1963. Attraction of *Pratylenchus penetrans* by plant roots. Phytopathology, 53:348.

Chitambar, J.J. y Raski, D.J. 1985. Life History of *Pratylenchus vulnus* on Carrot Discs. J. of Nematology. 17 (2):235-236.

Christie, J.R. 1988. Nematodos de los vegetales, su ecología y control, Limusa, México, pp. 275.

Dalmasso, A., Castangone-Sereno P. Bingiovanni, M., De Jonck, A. 1992. Acquired virulence in the phytophagous nematode *Meloydogyne incognita* II. Bidimensional analysis of isogenic isolates. Rev. Nematol.. 14:305-308.

- Demeure, Y. y Freckman, D.W. 1981. Recent advances in the study of anhydrobiotic nematodes. Plant parasitic nematodes, Volume 3, Chapter 8. pp 205-226.
- Doyle, A.D., McLeod, R.W., Wong, P.T.W., Hetherington, S.E. and Southwell, R.J. 1987. Evidence for the involvement of the root lesion nematode *Pratylenchus thornei* in wheat yield decline in northern New South Wales. Aust. J. Expt. Agric. 27: 563-570
- Eastwood, R., Smith, A. and Wilson, J. 1994. *Pratylenchus thornei* is causing yield losses in Victorian Wheat crops. Australasian Nematology Newsletter. 5(2):10-13.
- Esparrago, G., y Nava, A. 1995. Phytoparasitic nematodes associated to vegetables crops and tobacco in irrigated lands in Extremadura. Boletín de Sanidad Vegetal. 21:303-317.
- Evans, K. y R.M. Webb. 1989. Nematode problems in oilseed rape. Annuals of Applied Biology 23:303-310.
- Evans K, Trudgill, D.L y Webster, J.M. 1993. Plant Parasitic Temperate Agriculture. Printed and bound in the UK at the university Press, Cambridge. CAB International. 649 páginas.
- Farsi, M, Vanstone, V.A., Fisher, J.M. and Rathjen, A.J. 1995. Genetic variation in resistance to *Pratylenchus tornei* in wheat and triticales. Australian Journal of Experimental Agriculture, 35:597-602.
- Fassuliotis, G. 1987. Genetic basis of plant resistance to nematodes. See Ref. 137, pp. 364-71.
- Fortuner, R. 1977. *Pratylenchus thornei*. CIH. Descriptions of Plant Parasitic Nematodes. Set 7, No. 93.
- Fulton, J. P., D.A. Slack, N.D. Fulton, J. L. Dale, M.J. Goode and G. E. Templeton. 1960. Plant Pathology Laboratory Manual, Second Edition. Burgess Publishing Company, Minneapolis.

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

Grandison, G.S. and H.R. Wallace. 1974. The distribution and abundance *Pratylenchus thornei* in fields of strawberry clover (*Trifolium fragiferum*). *Nematológica*. 20:283-290.

Greco, N., Di Vito, M., Reddy, M.V. and Saxena, M.C. 1984 . A preliminary report survey of plant parasitic nematodes of leguminous crops in Syria. *Nematología Mediterranea*, 12: 87-93

Greco, N., Di Vito, M., Reddy, M.V. and Saxena, M.C. 1988. Investigation on the root lesion nematode *Pratylenchus thornei* in Syria. *Nematología Mediterranea*. 16: 101:105.

Hashim, Z. 1983. Plant parasitic nematodes associated with olive in Jordan. *Nematología Mediterranea*, 11:27-32.

Heyns, J. 1971. A guide to the plant and soil nematodes of south Africa. Balkema Academic and Technical Publications. The Plant and Soil Nematodes of S.A. 233 Pp.

Hollaway, G. and Eastwood, R. 1997. Root lesion nematode: tolerant, resistance y management strategies: what did we learn in 1996. Newsletter of The Crop Science Society of S.A. Inc. No. 157.

INEGI. 1995. El sector alimentario en México. Aguascalientes, México. 316 p.

Janssen, R. 1990. Genetic of virulence in potato cyst nematodes. PhD. thesis, Agric. Univ., Wageningen, The Netherlands, 71 pp.

Inserra, R. N. and O'Bannon J.H. 1975. Rearing migratory endoparasitic nematodes in citrus callus and root produced from citrus leaves. *J. of Nematology*, 7(3): 261-263.

- Jenkins, W.R y Taylor, D.P. 1967. Plant nematology. Reinhold Publish. Corp., Estados Unidos, pp. 229.
- Johnson, P.W. and Fushley, S.G. 1966. The biology of oat cyst nematode, *Heterodera avenae*, in Canada 11. Nematode development and related anatomical changes in roots of oats and corn. *Nematológica* 12:630-636.
- Jones, F.G.W. 1975 Host parasite relationship of potato cyst nematodes: A speculation arising from the gene for gene hypothesis. *Nematológica* 20:437-43
- Kaplan, D.T., Thomason, I.J and Van Gundy, S.D. 1979. Histological study of the compatible interaction of soybeans and *Meloidogyne incognita*. *J. of Nematol.* 11:338:343.
- Klein, T.A., McLeod, R.W. and Marshall D.R. 1987. Northern wheat yield decline in relation to *Pratylenchus thornei*. Australasian Plant Patology Society Six Conference, Adelaide, pp. 109.
- Krusberg, L.R. and Sardanelli S. 1984. Technique for Axenizing Nematodes. *J. of Nematology*. Pag. 348.
- Lamberti, F. 1981. Plant nematode problems in Mediterranean region. *Helminthological Abstract*, 50: 145-166.
- Larson, J.E. 1953. The biology of *Pratylenchus thornei*. Ph.D. Thesis. University of California Davis.
- Lawn, D.A. and Noel, G.R. 1986. Gnotobiotic culture of *Pratylenchus scribneri* on carrot discs. *Nematológica*, 16 (1): 29-90.
- Loof, 1978. Genus *Pratylenchus* Filipjev, 1936. (Nematoda: Pratylenchidae). A review of its anatomy, morphology, distribution, systematic and identification. Swedish University of Agricultural Sciences. Research Information Center, Jordbruk pp. 5-49.

- Loof, P.A.A. 1991. The family Pratylenchidae Thorne, 1949. (Nickle, W.R. editor). In: Manual of Agricultural Nematology. Marcel Dekker Inc., New York, Basel and Hong Kong, pp. 363-421.
- Luc, M., Sikora, R.A., Bridge, J. 1990. Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. CAB International 1990, pp 109-119.
- Mankau, R., 1980. Biocontrol: fungi as nematode control agents. J. of Nematol. 12 pags. 244-252.
- Maqbool, M.A. 1987. Present status of research on plant parasitic nematodes in cereals and forage legumes in Pakistan. In: Nematodes Parasitic to Cereals and Legumes in Temperate Semi Arid Regions, International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Aleppo, Syria. pp.173-180.
- Mizukubo, T. and Adachi, H. 1997. Effect of temperature on *Pratylenchus penetrans*. J. of Nematology. 29(3):306-314.
- Moody, E. H., Lownsbery B. F and Ahmed, J.H. 1973. Culture of the Root-Lesion Nematode *Pratylenchus vulmus* on Carrot Disks. J. of Nematology. 5(3):225-226.
- Mujeeb-Kazi, A. 1998. An Analysis of the use of Haploidy in Wheat Improvement. In: Application Biotechnologies to the Wheat Breeding. CIMMYT-INIA, La Estanzuela Colonia Uruguay, pp.33-48.
- Nicol, J.M. 1996. The significance of the root lesion nematode, *Pratylenchus thornei* (Sher & Allen, 1953) on wheat productivity in South Australia. Departament of Crop Protection (Plant Pathology). Waite Agricultural Research Institute. Glen Osmond, South Australia. 236 pages.
- Nicol, J.M., Davies, K.A., Hancock, T.W., and Fisher, J.M. 1999. Yield loss caused by *Pratylenchus* on Wheat in South Australia. J. of Nematolgy, 31:367-376.

- Nicol, J.M. Important Nematode Pest of Cereals. In: Curtis, B.C (eds) Wheat Production and improvement. FAO Publication. FAO Plant Production and Protection pp. 27 pages. In press.
- Nicol, J.M. and Ortiz, M.I. 2001. Effect of the root lesion nematode, *Pratylenchus thornei* on wheat yield loss and plant susceptibility in Mexico. XX Congreso de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. X Congreso latinoamericano de Fitopatología. pp. 291.
- Nicol, J.M., and Rivoal, R. 2001. Development of AUS4930: A source of resistance against both root lesion nematode (*Pratylenchus thornei*) and the cereals cyst nematode (CCN) complex for global breeding. Proceedings of the second australasian soilborne diseases symposium. Australia. 2 Pp.
- O'Bannon, J.H and Taylor, A.L. 1968. Migratory Endoparasitic Nematodes Reared on Carrot Discs. Phytopathological Notes. Pag 385.
- O'Brien, P.C., Fisher, J.M. and Rathjen, A.J. 1980. Inheritance of resistance in two wheat cultivars to an Australian population of *Heterodera avenae*. Nematológica, 26:69-74.
- Odihirin, R.A. 1971. Effects of root-knot nematodes and lesion nematodes on transpiration and water utilization by tobacco plants. J. of Nematology, 3:321-2.
- Orion, D., J. Krikun and M. Sullami, 1979. The distribution, pathogenecity and ecology of *Pratylenchus thornei* in the Northern Negev. Phytoparasitica 7(1):3-9.
- Orion, D., Amir, J. And Krikun, J. 1984. Fields observations on *Prtatylenchus thornei* and its effects on wheat under arid conditions. Revue nematol, 7(4): 341-345.
- Oteifa, B.A., Rushdi, M. y Salem, A. 1963. Vertical distribution of some nematodes associated with sugar cane. *Bulletin of Science and Technology Assiut University (Egypt)*. 6:265-270.

Reise, R.W., Huettel, R.N. and Sayre, R.M. 1987. Carrot Callus Tissue for Culture of Endoparasitic Nematodes. J. of Nematology, 19 (3): 387-389.

Rich, J.R., Keen, N.T. and Thomason, I.J. 1977 Association of coumestans with the hypersensitivity of Lima bean roots to *Pratylenchus scribneri*. Physiol. Pl. Path. 10:105-116.

Romero, M. D., Montes, M.J., Sin, E., Lopez, B.I., Duce, A., Sánchez, J. A., Andres, M.F and Delibes, A. 1998. A cereal cyst nematode (*Heterodera avenae* Woll) resistance gene transferred from *Aegilops triuncialis* to hexaploid wheat. Theor Appl Genet 96: 1135-1140.

Sasser, J.N., Hartman, K.M., Carter, C.E. 1987. Summary of preliminary crop germplasm evaluation for resistance to root-knot nematodes. NC State Univ./US Agency Int. Dev., Raleigh, NC. 88 pp.

SAS Institute. 1998. SAS® Language guide of personal computers, release. 6.03 Edition SAS Institute, Cary, N.C. USA.

Sauerborn, J., Saxena, M.C., Masri, H. 1990. Control of faba bean nematodes by solarization in Syria. Arab. Journal of Plant Protection. 8:38-40.

Schroeder, D.H. and Jenkins, W.R. 1963. Reproduction of *Pratylenchus penetrans* on root tissues grown on 3 Media. Nematológica, 9: 327-331.

Sidhu, G.S. and Webster, J.M. 1981. Genetic of plant-nematode interactions. Plant Parasitic Nematodes, Vol. 3. New York: Academic. pp. 61-87.

Singh, R and Rajaram S. 1995. Genetic Analysis of resistance to Scab in Spring Wheat Cultivars Frontana. Plant Diseases, 79(3): 238-240

Siyanand, A.R. Seshardi y Dasgupta, D.R., 1982. Investigation on the life cycles of *Tylenchohynchus vulgaris*, *Pratylenchus thornei* and *Hoplolaimus indicus* individually and in combined infestations in Maize. Indian J. Nematology 12(2): 272-276.

Southey, J.F. 1978. Plant Nematology. Ministry of Agriculture , Fisheries and food, London. 433 pages.

Taheri, A. 1996. Interaction between root lesion nematode, *Pratylenchus neglectus* and root-rotting fungi of wheat. Ph. D. Thesis, Dept of Crop Protection, University of Adelaide, South Australia, pp. 1-22.

Talavera, M. and Tobar, A. 1997. Plant parasitic nematodes from unirrigated fields in Alhama South Eastern Spain. Nematologia Mediterranea. 25:73-81.

Taylor, S.P., Vanstone, V.A., Ware, A.H., Mc Kay, A.H., Szot, D. and Russ M.H. 1999. Measuring yield loss in cereals caused by root lesion nematode (*Pratylenchus neglectus* and *P. thornei*) with and without nematicides. Australian Journal of Agricultural Research 50:617-622.

Thompson, J.P., Mackenzie, J. and McCulloch, Janet 1980. Nematodes: A major factor in crop sequence effects on Darling Downs wheat, Proceedings Australian Agronomy Conference, Lawes pp. 194.

Thompson, J.P., Mackenzie, J., McCulloch, Janet and Clewett, T.G. 1982. Nematode research: Integrated control of root-lesion nematode. Queensland Wheat Research Institute Biennial Report for 1980-82, 31-32.

Thompson, J.P. 1984. Sources of tolerance and resistance to root-lesion nematode (*Pratylenchus thornei*). Proceedings of the Fourth Assembly of the wheat Breeding Assembly of Australia, Toowoomba. pp. 35-37.

Thompson, J.P. 1987. Effects of root-lesion nematode (*Pratylenchus thornei*) on nitrogen nutrition of wheat. International Symposium on Advances in Nitrogen Cycling in Agricultural Ecosystems, Poster Abstracts, 163-165.

Thompson, J.P., Clewett, T.G. and Fiske M. 1989. Occurrence of root lesion nematode. In: Queensland Wheat Research Institute Biennial Report. 1984-1986. Qld. Dept. Primary Industries, Toowoomba, Qld., pp. 44.

Thompson, J.P. and Clewett, T.G. 1989. Research on root-lesion nematode: occurrence and wheat varietal reaction. Queensland Wheat Research Institute Biennial Report for 1984-86, pp. 32-34.

Thompson, J.P. and Clewett, T.G. 1990. Root-lesion Nematodes. En Queensland Wheat Variety Trials 1990, Qld. Dept. Primary Industries, Qld Govt., Qld. Wheat Research Institute, Toowoomba, Qld., pp. 35-39.

Thorne, G. 1961. Principles de Nematology . McGraw Hill Book Company, New York.

Tobar, A., Valor, H., and Talavera, M. 1995. Effect of different cultivars, mainly of wheat, on the population densities of *Pratylenchus thornei* and *Merlinius brevidens* in dry soils in Spain. Nematológica, 41:642-644.

Troccoli, A. Lamberti, F. y Greco, N. 1992. *Pratylenchus* species occurring in Algeria (Nematoda, Pratylenchidae). Nematología mediterránea. 20: 97-103.

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

Van Gundy, S. D., Perez, B.J.G, Stolzy, L.H y Thopson, I.J. 1974. A pest management approach to the control of *Pratylenchus thornei* on wheat in Mexico. J. of Nematology, 6:107-116.

Veech, J.A. 1979. Histochemical localization and nematotoxicity of terpenoid aldehydes in cotton. J. of Nematol. 11:240-246.

Verdejo, S.L y Pinochet, J. 1992. Population Densities of Five Migratory Endoparasitic Nematodes in Carrot Disk Cultures. J. of Nematology. 24(1):96-98.

Villaseñor, M.H. y Espitia, E. 2000. Características de las áreas productoras de trigo de temporal: problemática y condiciones de producción. In: Villaseñor M.H y Espitia, E. (eds). El trigo de temporal en México, Chapingo Edo. de México. pp. 85-95

Webster, J.M. 1972. Economic Nematology, Academic Press, Londres, 1972

Whitehead, A.G. 1998. Plant Nematode Control. CAB International. Pp. 108-145.

Wiese, M.V. 1977. Root Lesion Nematode. Compendium of Wheat Diseases. Second edition. The American Pytopathological Society. Minnesota, USA. Pag. 22

Zaharieva, M., Monneveux P., Henry M., Rivoal R., Valkoun J y Nachit M. M. 2000. Evaluation a collection of wild wheat relative *Aegilops geniculata* Roth and identification of potential sources for useful traits. 6th International Wheat Conference, 4-9 June 2000, Budapest, Hungary.

Zuckerman, B. M., W.F. Mai y L.R. Krushberg, 1985. Plant Nematology Laboratory Manual. Revised edition. Agricultural Experiment Station, Amherst.

