

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

---

---

## MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

NEMATODO DEL GÉNERO *Aphelenchoides* ASOCIADO AL CULTIVO DE AJO EN LA REGIÓN BAJÍO EN EL ESTADO DE GUANAJUATO, MÉXICO.

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCION VEGETAL



PRESENTA:

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

Aguilar Granados Andrés



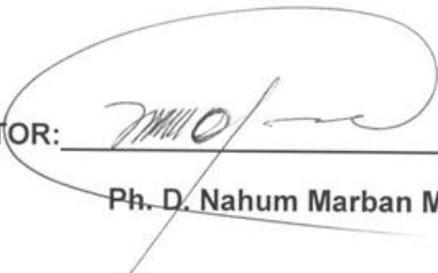
Chapingo, Estado de México, Junio 2011.

**NEMATODO DEL GÉNERO *Aphelenchoides* ASOCIADO AL CULTIVO DE  
AJO (*Allium sativum* L) EN LA REGIÓN BAJÍO EN EL ESTADO DE  
GUANAJUATO, MÉXICO.**

Tesis realizada por **Andrés Aguilar Granados** bajo la dirección del Ph. D. Nahúm Marbán Mendoza y aprobada por el Comité Asesor indicado, y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGTAL**

DIRECTOR:



\_\_\_\_\_

**Ph. D. Nahum Marban Mendoza**

Codirector:



\_\_\_\_\_

**Dr. Hilda Victoria Silva Rojas**

ASESOR:



\_\_\_\_\_

**Dr. Felipe Delgadillo Sánchez.**

## **AGRADECIMIENTOS:**

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Departamento de Parasitología Agrícola, por otorgar la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal.

Al pueblo de México, por mantener mis estudios por medio del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

A Nahúm Marbán Mendoza, Hilda Victoria Silva Rojas y Felipe Delgadillo Sánchez, por darme la oportunidad de trabajar conjuntamente esta investigación.

A Fundación Guanajuato Produce A. C. y al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, por su apoyo económico y disponibilidad para realizar el trabajo.

A los profesores del Programa en Protección vegetal por compartir su conocimiento, tiempo y experiencia.

## **DATOS BIOGRÁFICOS:**

Nombre: Aguilar Granados Andrés  
Fecha de nacimiento: 28 de Diciembre de 1984  
Lugar de Nacimiento: Irapuato, Guanajuato, México  
E-mail: [aguilargranados@hotmail.com](mailto:aguilargranados@hotmail.com)

**Ingeniero Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola.** Egresado en el año 2006 del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 Carretera México- Texcoco, Chapingo, Estado de México. C.P. 56230. **Tesis de Titulación:** Validación de la técnica de PCR para la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* en semillas de hortalizas.

## Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUCCIÓN:.....	1
2. OBJETIVOS:.....	3
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA: .....	3
3.1. Origen y distribución del Ajo:.....	3
3.2. Clasificación Taxonómica de Ajo:.....	3
3.3. Características morfológicas del ajo: .....	4
3.4. Importancia del cultivo:.....	5
3.5. Variedades de ajo sembradas en el Estado de Guanajuato: .....	5
3.6. Requerimientos climáticos: .....	6
3.7. Elección del terreno: .....	6
3.8. Época de siembra: .....	6
3.9. Selección de la semilla: .....	7
3.10. Desinfección de la semilla de Ajo:.....	7
3.11. Densidad de población:.....	7
3.12. Riegos: .....	8
3.13. Fertilización: .....	8
3.14. Cosecha:.....	8
3.15. Conservación de ajo para plantación:.....	9
3.16. Enfermedades que afectan el cultivo del ajo: .....	10
3.17. Generalidades del género <i>Aphelenchoides</i> : .....	13
3.18. <i>Aphelenchoides subtenuis</i> (Cobb, 1926) Steiner & Buhrer, 1932.....	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	16
4.1. Muestreo en campo: .....	16
4.2. Aislamiento, purificación e identificación de patógenos asociados:.....	16
4.3. Identificación morfométrica del nematodo del género <i>Aphelenchoides</i> aislados.....	18

4.4. Evaluación de la técnica de nebulización para la extracción de nematodos de bulbos de ajo: .....	19
4-5. Pruebas de patogenicidad: .....	20
4.6. Reaislamiento del patógeno: .....	22
4.7. Identificación filogenética de <i>Aphelenchoides subtenuis</i> :.....	22
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	24
5.1. Descripción de síntomas en campo: .....	24
5.2. Aislamiento, purificación e identificación de patógenos asociados:.....	26
5.3. Características morfológicas de nematodos aislados de bulbos de ajos: .....	29
5.4. Evaluación de la técnica de nebulización para la extracción de nematodos de bulbos de ajo:.....	33
5.5. Pruebas de patogenicidad: .....	34
5.6. Reaislamiento del patógeno: .....	37
5.7. Identificación filogenética de <i>Aphelenchoides subtenuis</i> :.....	37
6. CONCLUSIÓN.....	40
7. BIBLIOGRAFÍA:.....	41
Anexo1: .....	42
Anexo 2: .....	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

Extracción de nematodos de ajo con la técnica de incubación. . . . .	29
Dientes y catáfilas de bulbo de ajo separados con base a su índice de daño (índice 2, 3, 4 y 5). . . . .	30
Sintomas aéreos de plantas afectadas, marillamiento apical de la hojas baseles de ajo. . . . .	35
Plántulas de ajo donde se puede observar amarillamiento de las hojas y bulbos que muestran un gradiente de pigmentación púrpura, síntoma característico. .36	
Bulbos de ajos afectados y sanos. Gradiente de coloración de bulbos y dientes en ajo de bulbo blanco. . . . .	37
Planta de ajo mostrando una pigmentación purpura en las catáfilas externas del bulbo. Huevecillos y nematodos inmersos en el tejido vegetal (hojas de cobertura del bulbo) de ajo proveniente del estado de Guanajuato. . . . .	39
Síntomas en plantas de ajo afectadas por <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., y <i>Pectobacterium</i> sp. . . . .	41
Caracteres morfológicos de ejemplares de <i>Aphelenchoides subtenuis</i> aislados de bulbos de ajo, hembra y macho. Parte anterior del cuerpo de hembra y macho. Cola subcilíndrica de hembra (mucrón simple y ventral) y cola del macho (mucrón incospicuo). Espícula curvada ventralmente (en forma de hoz) del macho y campo lateral con tres estrías. . . . .	43
Promedio de nematodos extraídos de un gramo de tejido (catáfilas del bulbo y diente) de ajo durante una semana, empleando la técnica de nebulización. .	

Promedio de nematodos extraídos con la técnica de nebulización, de un gramo de tejido (catáfilas de cobertura del bulbo y dientes) de ajo durante una semana, tomando en cuenta el índice de daño. . . . .

Plantas de ajo inoculadas con 1 000, y 10 000 nematodos (*Aphelenchoides subtenuis*), y control positivo. Obsérvese pigmentación del bulbo, clorosis y secado de las hojas basales, además de degradación en las catáfilas. . . . .47

Gradiente de pigmentación en bulbos de ajo de la variedad Singapur inoculados con 0, 10, 100, 1 000 y 10 000 nematodos, y el control positivo (muestra de ajo infectado de forma natural). . . . .48

Electroforesis en gel de agarosa al 1.8%. MM; amplificación de 1 y 2 ejemplares de *Aphelenchoides subtenuis*; (-) = control negativo; (+)= control positivo (DNA de *Meloidogyne chitwoodi*). . . . . 49

Árbol filogenético construido con el método de Máxima Parsimonia utilizando 1000 repeticiones bootstrap. Las secuencias corresponden a las amplificaciones de el espacio transcrito interno (ITS por sus siglas en inglés) del rADN de *A. subtenuis*. *Steinernema carpocapsae* fue considerada como fuera de grupo. . . . . 50

## ÍNDICE DE TABLAS.

Tratamientos empleados para la reproducción de síntomas. . . . .	32
Relación de muestras analizadas con síntomas característicos y patógenos asociados. . . . .	38
Morfometría de <i>Aphelochoides</i> spp. aislados de bulbos de ajo provenientes del estado de Guanajuato. . . . .	41
Promedio de nematodos extraídos por día por índice de daño con la técnica de nebulización, de 1 gramo de tejido (catáfilas de cobertura del bulbo y dientes).	44
Evolución de incidencia y severidad, 60 días después de la inoculación de las platas de ajo con <i>A. subtenuis</i> . . . . .	46

## Nematodo del Género *Aphelenchoides* asociado al cultivo de ajo en la región Bajío en el Estado de Guanajuato, México.

Aguilar-Granados, A.<sup>1</sup>; Delgadillo-Sánchez, F.<sup>2</sup>; Marban-Mendoza, N.<sup>3</sup>; Silva-Rojas, H. V.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Tesista de Maestría en Ciencia en Protección Vegetal-UACH; <sup>2</sup>Investigador Titular del Programa de Fitopatología en el INIFAP-CEBAJ; <sup>3</sup>Profesor-Investigador del Departamento de Parasitología Agrícola-UACH; <sup>4</sup>Profesor Investigador Asociado del Colegio de Postgraduados-Montecillo.

**RESUMEN:** En los últimos seis años en el estado de Guanajuato se ha detectado la presencia de *Aphelenchoides* spp. en el cultivo de ajo. Además se cuenta con poca información al respecto, por tal motivo se planteó identificar la especie con caracteres morfométricos y filogenéticamente, y determinar la patogenicidad mediante los postulados de Koch. Se realizaron muestreos en la región bajío de Guanajuato, México. Los nematodos fueron extraídos con la técnica de incubación, para la caracterización morfométrica y/o establecimiento de pruebas de patogenicidad en ajo de la variedad Singapur.

*Aphelenchoides subtenuis* fue aislado en el 90% de las muestras. Sesenta días después de la inoculación, en plantas inoculadas con 10 000 nematodos se pudo observar síntomas tales como coloración rosada a púrpura en el bulbo seguida de una degradación, en la parte aérea se presentó una clorosis y secado de las hojas basales. Dichos síntomas no fueron tan marcados en las plantas con 100 y 1000 nematodos inoculados. El control negativo no mostró síntomas, en tanto el control positivo sí mostró una marcada pigmentación y degradación del bulbo.

**Palabras clave;** Alliaceae, *Allium sativum* L, *Aphelenchoides subtenuis*, ITS, Nematodo, Patogenicidad, PCR.

**ABSTRACT** During the last six years or so, in the state of Guanajuato, Mexico garlic crops nematode of the genera *Aphelenchoides* were founded with not knowledge about its role in the pink to purple color in the bulb as primary disease symptom. The work was done to determine both the species name of nematode associated to the above symptoms and the role in the pathogenicity following to the Koch's postulates.

Garlic bulb samplings were conducted in the Bajío region of Guanajuato, Mexico, incubated in nest chambers for nematode extraction, set and mounted for morphometric studies and/or inoculations to young seedlings to demonstrate pathogenicity.

*Aphelenchoides subtenuis* was the main nematode associated with above symptoms in about 90 % of samples. plants inoculated with 10 000 nematodes (all stages) showed also chlorosis, bulb degradation and drying of lower leaves.

Sixty day after inoculation pigmentation and bulb degradation were more corresponding in these plants as compared with plants inoculated the 1000 and 100 nematodes. no symptoms plants were observed in the non-inoculation check plants.

**Key Words;** Alliaceae, *Allium sativum* L, *Aphelenchoides subtenuis*, ITS, Nematodes, Pathogenicity, PCR.

## 1. INTRODUCCIÓN:

El ajo (*Allium sativum* L.) es una especie que pertenece a la familia Alliaceae, y su origen se reporta en la regiones de Asia Central, en la actualidad el ajo es una especie hortícola cultivada en todo el mundo, y su reproducción es vegetativa, a través de bulbillos o dientes.

A nivel mundial México ocupa el lugar 19 en producción de ajo, con 56 999 ton en 2007 (FAO, 2007<sup>1</sup>). El ajo se cultiva en 25 estados de la República Mexicana, los estados productores más importantes son: Zacatecas, Guanajuato, Puebla, Baja California, Sonora y Aguascalientes; en su conjunto, estas entidades producen el 88% del total nacional (SIAP, 2009<sup>2</sup>). Su importancia económica está basada en el alto valor de la producción que se obtiene y su importancia social se fundamenta en la mano de obra que genera. Dentro de los problemas fitopatógenos que afectan al cultivo del ajo se encuentra los ocasionados por hongos (*Sclerotium cepivorum*, *Fusarium oxysporum*, *Peronospora destructor*, *Alternaria porri*, *Sclerotium rolfsii*, y *Penicillium* spp.), bacterias (*Pectobacterium carotovorum* y *Pseudomonas* sp.) y nematodos (*Ditylenchus dipsaci* y *Pratylenchus penetrans*).

En años pasados en el estado de Guanajuato se detectó la presencia de un nuevo problema fitosanitario en ajo, las plantas de ajo afectadas presentan

---

<sup>1</sup>FAO. Base de datos estadística FAOSTAT (2007). <http://faostat.fao.org/site/612/default.aspx#ancor> (consulta Abril, 2011).

<sup>2</sup> SIAP. Base de datos estadística(2007). <http://www.siap.gob.mx/ventana.php?idLiga=1043&tipo=1> (consulta Marzo 2011).

degradación de las catáfilas externa, y una coloración rosada de las catáfilas internas. Al analizarse en el laboratorio se detectó la presencia de nematodos del género *Aphelenchoides*. Este género agrupa por lo general a especies saprófitas, sin embargo existen especies que pueden vivir como ectoparásitos y endoparásitos en hojas, bulbos y yemas.

La identificación de las especies de *Aphelenchoides* no es tarea fácil, además de las dificultades inherentes al ser un grupo muy amplio, con especies muy semejantes, hay que añadir que muchas de las descripciones originales o son inaccesibles o son muy incompletas, por lo cual es difícil la identificación de las especies (HUNT, 1993).

Para la identificación de especies del género *Aphelenchoides* se toman en cuenta caracteres tales como número de estrías en el campo lateral, longitud del saco postuterino, forma de la región caudal y forma del mucrón (Escuer, 2000).

## 2. OBJETIVOS:

En México se cuenta con poca información respecto a la presencia del género *Aphelenchoides* en el cultivo del ajo, por lo que en este trabajo se plantea identificar morfométricamente y filogenéticamente la especie de *Aphelenchoides* spp. asociada al cultivo, y determinar el papel que juega este nematodo en la presencia de la enfermedad mediante los postulados de Koch.

## 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:

**3.1. Origen y distribución del Ajo:** Se considera que el centro de origen del ajo esta en las regiones de Asia Central (Vavilov, 1951). Desde el años 3 000 a.C. los egipcios lo consideraban especie sagrada. El ajo fue introducido a América Latina a finales del siglo XIV, en el segundo viaje de Colón al Nuevo Mundo, y con las subsecuentes reintroducciones procedentes de España, Islas Canarias e Italia (Jaramillo, 1994). La mayoría de las especies domesticadas de *Allium* que existen en América Latina provienen de Asia.

**3.2. Clasificación Taxonómica de Ajo:** En 1754 Carl Linnaeus dio el nombre de *Allium sativum* al ajo. En la clasificación taxonómica hecha por Hanelt (1990) el género *Allium* y sus parientes cercanos fueron incluidos en la familia Alliaceae con la siguiente jerarquía:

**Clase:** Monocotyledonea

**Superorden:** Lilliflorae

**Orden:** Asparagales

**Familia:** Alliaceae

**Tribu:** Allieae

**Género:** *Allium*

**Especie:** *A. sativum* L.

Hanelt (1990) reporta que el género *Allium* abarca más de 500 especies, las cuales son perennes y principalmente son plantas con bulbos protegidos por capas membranosas, fibrosas o coráceas.

**3.3. Características morfológicas del ajo:** El ajo es una planta herbácea erecta de 30 a 60 cm de altura, de raíces adventicias superficiales, con poca ramificación. Bulbos compuestos por un tallo discoidal, hojas escamosas secas y delgadas (denominadas catáfilas) que constituyen la base de las hojas fotosintéticamente funcionales, y bulbillos o dientes formado de las yemas axilares de las hojas funcionales más jóvenes. Hojas funcionales aplanadas, sólidas, con 2.5 cm de ancho y plegadas en forma longitudinal, distribuidas de forma alterna, generalmente no son menos de diez. En algunos clones pueden desarrollar escapo floral, sin embargo rara vez llegan a formar semillas (flores raramente fértiles) (Purseglove, 1985).

El bulbo de ajo consiste de una serie proximal de hojas escamoso-membranosas de protección que no cubren las yemas, otra serie de hojas similares cubre cada una de ellas a determinado número de yemas axilares, y más distante un número de hojas funcionales. Los dientes son producidos en las axilas de las hojas. Cada bulbillo (diente) consiste de una envoltura

protectora, una hoja de almacenamiento engrosada, y una pequeña yema central (Purseglove, 1985).

**3.4. Importancia del cultivo:** En México en el año de 2009 se sembraron 5 686.21 ha de ajo, obteniendo una producción de 56 088.22 ton, esto represento \$ 414 868.77 de pesos. El principal productor de ajo a nivel nacional es el estado de Zacatecas, seguido por Guanajuato, en este último la producción se concentra en el área del Bajío. El ajo se ubica dentro de las principales especies de hortalizas cultivadas en el ciclo de cultivo otoño-invierno, con una superficie sembrada de 1 390.5 ha en el estado de Guanajuato, y una producción de 14 930.8 ton (SIAP, 2009<sup>3</sup>). Desde el punto de vista socioeconómico, el cultivo de ajo es un importante generador de empleos, se estima que se ocupa cerca de 120, 000 jornales al año en las diversas actividades inherentes de la producción (Heredia y Delgadillo, 2000).

**3.5. Variedades de ajo sembradas en el Estado de Guanajuato:** Las variedades de ajo que se siembran en Guanajuato son; Taiwán, Tacátzcuaro, Tingüindín, Chapingo-94, Huerteño, INIFAP-94, Texcoco, Tocumbo, Celayence, Tacátzcuaro Especial, Pebeco, Probajío 1, 2 y 3, Blanco de Zacatecas, Blanco de Durango, Blanco de Ixmiquilpan, Criollo de Aguascalientes, Cristal y Perla (Heredia, 2007).

---

<sup>3</sup> SIAP. Base de datos estadística(2007). <http://www.siap.gob.mx/ventana.php?idLiga=1043&tipo=1> (consulta marzo 2011).

**3.6. Requerimientos climáticos:** Los bulbos de ajo recién recolectados se encuentran en estado latente, esto es, son incapaces de germinar y formar una nueva planta, este periodo está en función de la variedad y de la temperatura de conservación. Los ajos sometidos a temperatura de 0°C o superiores a 18 °C prolongan el estado de latencia de los bulbos, con temperaturas cercanas a los 7°C por un periodo de tiempo variable (dependiendo de la variedad de ajo) se rompe la dormancia (Messiaen, 1974).

Las plantas de ajo para diferenciar las yemas axilares en dientes y formar el bulbo requiere de acumular una cierta cantidad de hora frío. De forma general se considera que entre 5 y 10°C las plantas de ajo son capaces de desarrollar bulbos. Para un desarrollo vigoroso de la planta de ajos es necesario que las temperaturas nocturnas sean superiores a 16 °C, o aun gradiente térmico entre 13 y 24 °C (Messiaen, 1974).

**3.7. Elección del terreno:** Las plantas de ajo se adaptan a los diferentes tipos de suelo, siempre que estos presenten un buen drenaje. Por este motivo los suelos excesivamente arcillosos pueden tener ciertas limitaciones (problemas de formación de bulbo y problemas de encharcamiento). Los terrenos ligeros y bien drenados, con un pH entre 6 y 7, son los óptimos para dicho cultivo (García, 1998).

**3.8. Época de siembra:** La época de siembra óptima para los ajos morados y jaspeados es del 20 de agosto al 20 de septiembre. La mejor fecha de siembra para los ajos blancos es la primera quincena de noviembre, aunque se puede

sembrar desde el 1° de octubre hasta el 30 de noviembre (Heredia y Delgadillo, 2000).

**3.9. Selección de la semilla:** Debido a que el ajo es una especie que se reproduce vegetativamente, se debe tener especial cuidado al seleccionar los dientes o "semilla", ya que los tamaños del bulbo y diente influyen directamente sobre el rendimiento y calidad de la cosecha. Se recomienda empezar a desgranar los bulbos de 5 a 10 días antes de la siembra y separar los dientes por tamaño: grandes (6 gramos), medianos (3 gramos), chicos (1.5 gramos) y muy chicos (0.5 gramos). Para la siembra, se recomienda utilizar los de tamaño grande y mediano (Heredia y Delgadillo, 2000).

**3.10. Desinfección de la semilla de Ajo:** La semilla de ajo es portadora de fitopatógenos y fitoparásitos como hongos, bacterias y nematodos, los cuales pueden provocar pérdidas hasta del 100 % si no se elimina antes de la siembra, por ello la desinfección de la semilla es una práctica indispensable (Heredia, 2000).

El tratamiento recomendado para el control de nematodos (*Ditylenchus dipsaci*) en diente-semilla de ajo es el método californiano el cual consiste en someter la semilla en agua caliente de 30 a 45 minutos a 38 °C, 20 minutos a 49 °C y finalmente en agua a 18 - 20 °C por 10 a 20 minutos (Schwartz, 1995).

**3.11. Densidad de población:** La cantidad de semilla para sembrar una hectárea varía de 600 a 1 500 kg, dependiendo de la variedad, del tamaño del

diente utilizado y de la densidad de población deseada. La cantidad de plantas por hectárea varía de 234 000 a 250 000 de acuerdo con la separación entre surcos y plantas (Heredia y Delgadillo, 2000).

**3.12. Riegos:** El ajo es una planta rústica que aunque prefiere una humedad relativa elevada, es adaptable a otras condiciones. No es muy exigente desde el punto de vista hídrico por lo que se adapta muy bien a cultivo de secano, con el apoyo de riegos de auxilios. Sin embargo si es muy sensible a la asfixia radicular e incluso pueden presentarse pudriciones en raíz (García, 1998). Es recomendable mantener niveles bajos de humedad durante la etapa vegetativa, y durante la formación y desarrollo vegetativo del bulbo se recomienda altos niveles de humedad aprovechable residual. El último riego debe ser ligero y aplicarlo de 20 a 25 días antes de la cosecha (Losano, 1979).

**3.13. Fertilización:** El ajo es un cultivo que puede responder en forma favorable o desfavorable a la aplicación de fertilizantes, o sea, es una planta muy sensible a los excesos o deficiencias de nutrimentos. Se ha determinado como adecuada la fórmula de fertilización 180-80-100. La mitad del nitrógeno, todo el fósforo y todo el potasio se debe aplicar al momento de la siembra o antes del primer riego de auxilio y el resto del nitrógeno a los 50 o 60 días después de la primera aplicación (Macías , Valadez y López. 2000).

**3.14. Cosecha:** La cosecha de los ajos precoces, entre los que se encuentran los morados Taiwán y Chileno, es a mediados de Marzo. Los tardíos, como el

Perla, es del 1º al 30 de Mayo, sin embargo, es importante determinar el momento preciso de la cosecha, ya que prescindir de un riego disminuiría los rendimientos. Los mejores indicadores son cuando los tallos de las plantas estén muy flojos y no presenten resistencia al doblarlos, los bulbos tengan bien marcados los dientes periféricos, las últimas envolturas de los dientes estén secas y cuando las capas protectoras de los dientes individuales muestren una apariencia de papel. Esto puede observarse fácilmente al hacer un corte transversal y vertical de los bulbos en varios puntos del campo que esté por cosecharse (García, 1998).

**3.15. Conservación de ajo para plantación:** la conservación de los ajos seleccionados para la plantación tiene una serie de consideraciones que la hacen especial. Hay que tener en cuenta que tienen que llegar en buenas condiciones sanitarias y con el vigor germinativo intacto, después de pasar por una conservación entre 5 y 6 meses. El prolongar la latencia es sumamente decisivo, en lo posible hay que evitar el intervalo de 5 a 7 °C. Se recomienda el almacenamiento de las cabezas completas (preferentemente planta completa) en lugares con buena ventilación. El conservar las hojas permite dar protección por daños mecánicos y además ayuda a mantener una temperatura adecuada, además de permitir una deshidratación más adecuada e impide la penetración de los patógenos. Cuando la siembra está próxima la semilla puede someterse a temperatura de 5 a 6 °C y romper la latencia (García, 1998).

### **3.16. Enfermedades que afectan el cultivo del ajo:**

**3.16.1. Pudrición del bulbo por *Fusarium*:** Esta enfermedad producida por *F. oxysporum* Schlechtendahl emend. Snyder & Hansen es común detectarla en muchos lotes a nivel comercial. Los síntomas que manifiestan las plantas afectadas por este patógeno se caracterizan por presentar un amarillamiento y muerte regresiva de las puntas de las hojas, las raíces afectadas son de color café oscuro a rosa oscuro. Normalmente se observa el crecimiento de micelio de color blanco en la base de los bulbos infectados, al cortar el bulbo transversalmente se nota una decoloración café de la base del bulbo, posteriormente el bulbo sufre una pudrición seca. El hongo se transmite por diente-semilla de ajo, en el suelo sobrevive indefinidamente en forma de clamidosporas. La temperatura óptima para su desarrollo va de 25 a 28 °C (Schwart, 1995).

**3.16.2. Mancha púrpura:** El agente causal de la mancha púrpura es *Alternaria porri* (Ellis) Cif. los síntomas en las hojas del ajo son muy característicos, al iniciar esta enfermedad aparecen un gran número de pequeños puntos blanquecinos, en el transcurso de 2 a 4 días siguientes, se van tornando de un color rojo vino para después quedar de color púrpura en su parte central. En este momento se inicia el desarrollo del hongo sobre los tejidos de la hoja. A los 10 ó 15 días posteriores las manchas púrpuras toman un color café oscuro el cual, finalmente se tornan en negro debido a la formación de abundantes conidióforos con sus conidiosporas en la superficie de la hoja. A partir de la zona donde se inicia el ataque, las hojas se van secando hasta morir. Las condiciones que favorecen el desarrollo de la mancha púrpura son; presencia

de lluvia, 90 % de humedad relativa, temperatura de 25 a 27 °C y suelos con alto contenido de nitrógeno (Schwart, 1995).

**3.16.3. Mildiú:** Esta enfermedad es producida por *Peronospora destructor* (Berk.) Casp. in Berk. Los síntomas se inician con la presencia de una capa fina de micelio vellosa de color gris a violáceo sobre la superficie de las hojas las cuales se ponen cloróticas, se amarillan, se colapsan y la planta muere. Las condiciones que favorecen el establecimiento del mildiú son humedad relativa de 90 a 100 % y temperaturas de 4 a 25 °C con óptima de 13 °C. Los esporangios se reproducen durante la noche y se dispersan durante el día por el viento. (Schwart, 1995).

**3.16.4. Marchitez:** Es ocasionada *Sclerotium rolfsii* Sacc. en la parte aérea de la planta se observa una clorosis, marchitez y necrosis del follaje, en el suelo distinguen daños en las raíces y presencia de micelio de color blanco en el bulbo que dan origen a la formación de esclerocios esféricos de color café. El hongo es diseminado como micelio y como esclerocios. La temperatura óptima para el crecimiento del patógeno es de 25 a 30 °C. Los esclerocios pierden fácilmente su viabilidad con calor y suelo húmedo pero sobreviven algunos meses en materia orgánica. Este hongo tiene un amplio rango de hospedantes como solanáceas, leguminosas y cucurbitáceas. (Delgadillo, 1998).

**3.16.5. Pudrición blanda por bacterias:** Esta enfermedad es poco frecuente. Los síntomas de la enfermedad se pueden observar en el follaje a manera de tejido acuoso y en el bulbo se presenta una pudrición blanda que puede presentarse en campo después de condiciones de excesos de humedad y temperaturas altas (25 a 30 °C). El agente causal de esta enfermedad es la

bacteria *Pectobacterium carotovorum*. La fuente de inóculo es suelo contaminado y residuos de cosecha. La alta humedad y la presencia de insectos como diabroticas y la mosca *Delia antiqua* así como daños mecánicos dispersan la bacteria. La temperatura óptima para el crecimiento de la bacteria es de 20 a 30 °C y condiciones de alta humedad relativa. La infección puede continuar en almacén (Delgadillo, 1998).

**3.16.6. Pudrición del bulbo por nematodos:** El nematodo *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev se transmite por diente-semilla de ajo. Cuando el ajo se establece en suelo altamente infestado las plantas presentan achaparramiento, manchas de color amarillo claro, ruptura longitudinal del follaje y disminución de enraizamiento. La mayoría de las hojas basales pierden rigidez, las puntas sufren muerte descendente y se debilitan a tal grado que no pueden mantener su posición erecta y caen al suelo. Los bulbos infectados pueden fragmentarse, abrirse y puede ocurrir una pudrición blanda debida a los la entrada de organismos saprófitos. En las primeras etapas de la infección los nematodos permanecen dentro de las catáfilas. En las últimas etapas de la infección los nematodos pasan de una catáfila a otra e invaden a una mayor cantidad de ellas. El avance de la infección en el interior del bulbo prosigue en el campo y durante el almacenamiento hasta que todo el bulbo es afectado. La diseminación del nematodo es por diente-semilla de ajo, materia orgánica contaminada, a través del agua de riego o maquinaria contaminada (Schwart, 1995).

**3.16.7. Pudrición blanca:** Esta enfermedad es causada por *Sclerotium cepivorum* Berk., y es la de mayor importancia en ajo en México por los daños

severos que causa en su rendimiento y calidad. Las plantas afectadas por este hongo presentan un amarillamiento de las hojas aéreas, seguido de una marchitez y muerte del follaje, posteriormente se presenta la degradación del bulbo. En el bulbo se puede ver la presencia de micelio de color blanco con esclerocios de color negro (Delgadillo, 2000).

**3.17. Generalidades del género *Aphelenchoides*:** Se considera en el género *Aphelenchoides* 141 especies válidas, por lo general son nematodos saprofitos que viven en el suelo, se alimentan en su inmensa mayoría de hongos, aunque algunas especies pueden vivir como ecto y endoparásitos sobre hojas, bulbos y yemas. Las especies fitoparásitas raramente se encuentran en el suelo, donde son incapaces de completar el ciclo biológico o sobrevivir al invierno, solo se encuentran sobre restos de hojas, bulbos, estolones y semillas de las plantas hospedadoras (Escuer, 2000).

El género *Aphelenchoides* se caracteriza por presentar un bulbo medio cuadrangular que ocupa casi toda la cavidad del cuerpo; región labial redondeada y ligeramente saliente del contorno del cuerpo; estilete delgado de 10-17  $\mu\text{m}$  de largo, con nódulos poco desarrollados; vulva usualmente entre 60-75 % de la longitud del cuerpo. Saco post-uterino bien desarrollado; región caudal redondeada, conoide con la terminación digitada, bifurcada con o sin mucrón terminal, que puede tener forma variable (Escuer, 2000).

Los *Aphelenchoides* parásitos de plantas se desplazan en la película de agua que recubre las hojas hasta que alcanza los tejidos susceptibles de ser infestados, la penetración del patógeno en el parénquima de la hoja se produce

a través de los estomas cuando está cubierta por una fina película de agua, o a través de la epidermis en el envés de la hoja. La infestación, reinfestación y dispersión del nematodo se facilita por las salpicaduras de agua y por el contacto entre hojas (Escuer, 2000).

### **3.18. *Aphelenchoides subtenuis* (Cobb, 1926) Steiner & Buhner, 1932:**

Allen en 1952 redescubre a *A. subtenuis*, y proporciona las siguientes características morfométricas para separarlas de otras especies:

**Hembras:** L= 0.87-1.15mm; a= 44-57; b=12-17; c= 24 – 28; V= <sup>58-44</sup>67-71<sup>12-16</sup>

**Machos:** L= 0.87-0.95mm; a= 57-68; b= 12-14; c= 21-28; Testículos= 62-70%.

Cuerpo delgado, marcado con finas estrías transversales, campo lateral con cuatro incisuras longitudinales. Estiletos de 11 µm de longitud con nódulos basales moderadamente desarrollados. Anillo nervioso ancho y localizado en la parte posterior del bulbo medio. Saco post uterino largo. Cola sub-cilíndrica con terminación roma, mucrón simple localizado en la parte ventral. Los machos presenta espícula ventralmente curvada (Allen, 1952).

Para la identificación de especie del género *Aphelenchoides* Deimi (2006) cita a Hockland quien recomienda el uso 6 caracteres, tales como; tamaño del saco postuterino, forma de la cola, forma del mucrón, tamaño de estilete, número de líneas en el campo lateral, y posición del poro excretor en relación al anillo guía.

Se ha reportado a *Aphelenchoides subtenuis* afectando bulbos y follaje de *Narcissus*, en *Paeoni*, en hojas y tallos de *Trifolium pratense* L, en *Tulipa* sp., en

*Crocus* sp, en *Pandanus* sp. y en bulbos de ajo (*Allium sativum* L.) (Goodey, 1935; Yokoo and Matsusaki, 1967; Caubel, 1976; Windrich, 1976; Vigodky-Haas *et al.*, 1985; Mot and Spiegel, 1993; Gandarilla Basterrechea, 2003 y Ramirez *et al*, 2010).

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Muestreo en campo:**

Se realizaron muestreos en lotes de producción de ajo en los municipios de Abasolo, Salamanca, Apasea el Grande, Celaya y San Miguel Allende (en la región bajío del estado de Guanajuato) en el ciclo agrícola 2008-2009. Se observaron las características generales del cultivo y los síntomas que mostraban las plantas en campo. Un grupo de plantas fue colectado y etiquetado para su análisis en el laboratorio. Se analizaron un total de 22 muestras.

### **4.2. Aislamiento, purificación e identificación de patógenos asociados:**

Las muestras fueron analizadas en el laboratorio de fitopatología del INIFAP-CEBAJ para aislamiento, purificación e identificación de patógenos.

#### **4.2.1. Aislamiento, purificación e identificación a nivel género de Hongos:**

Se tomaron muestras de bulbo, tallo y raíz, se cortaron en fragmentos de 1 cm aproximadamente, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3 % durante 3 minutos, fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril, se eliminó el exceso de humedad, y se sembraron en medio de cultivo PDA acidificado, e incubaron a 27 °C, durante 72 hrs. Cada 24 hrs se observó el desarrollo de las colonias.

Una vez que el hongo se desarrolló sobre el tejido vegetal, de las cepas que no mostraban contaminación, se tomó una muestra, se colocó en un porta objetos

con una gota de agua destilada estéril, y se observó en el microscopio compuesto. Y se identificaron a nivel de género.

#### **4.2.2. Aislamiento, purificación e identificación a nivel género de**

**Bacterias:** Se tomaron muestras de bulbo, tallo y raíz, se cortaron en fragmentos de 1 cm aproximadamente, fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 1 % durante 3 minutos, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, se dejaron escurrir, se colocaron en un tubo de ensaye con agua destilada estéril, y se mantuvieron en agitación por 10 minutos. Con un asa bacteriológica se sembró por estría cruzada en medio de cultivo CPG y BK. Y se dejaron incubar por 72 horas a 27 ° C. Cada 24 hrs se observó el desarrollo de las colonias.

Las colonias aisladas y puras se transfirieron a medio de cultivo CPG. Y se dejaron incubar durante 72 horas. Para su identificación se realizaron pruebas bioquímicas y fisiológicas propuestas por Schaad (1980).

#### **4.2.3. Aislamiento (extracción) e identificación de nematodos:**

Para la extracción de nematodos se empleó la técnica de incubación. Se tomaron muestras de bulbo, tallo y raíz, se cortaron en fragmentos de 1 cm aproximadamente, en cajas petri que contenía 5 ml de agua destilada estéril, se colocaron las muestras y se dejaron incubar por 72 horas, a temperatura ambiente (Figura 1). Cada 24 horas se tomó 1 ml, se observó y cuantificó la presencia de nematodos. Para su identificación a nivel de género se empleó la clave taxonómica de Mai (1996).

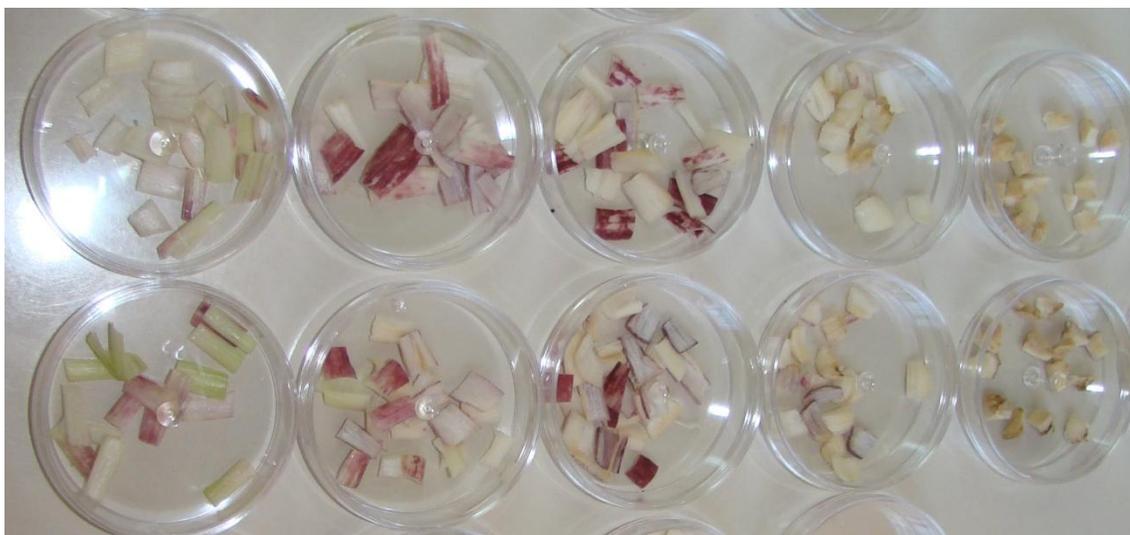


Figura 1. Extracción de nematodos de ajo con la técnica de incubación.

#### 4.3. Identificación morfométrica del nematodo del género

##### ***Aphelenchoides* aislados de bulbos de ajos:**

Los ejemplares fueron montados en agua-agar al 2 % y en microscópio compuesto de luz se observaron las siguientes características; longitud total del cuerpo (L), ancho máximo del cuerpo, longitud del esófago, longitud de la cola, ancho del cuerpo a la altura de la cola, posición de la vulva en % (V) respecto a la longitud total el cuerpo, longitud del estilete, número de estrías en el campo lateral, forma de la cola, forma y posición del mucrón, longitud de la espícula (de la punta al base dorsal), longitud del saco post-uterino respeto la distancia entre vulva y ano. Las observaciones obtenidas fueron comparadas con las mediciones reportadas por Shahina (1996) para identificación de especies de *Aphelenchoides*, y posteriormente con la descripción que Allen (1952) y la información que Deimi (2007) reportan para *A. subtenuis*.

#### 4.4. Evaluación de la técnica de nebulización para la extracción de nematodos de bulbos de ajo:

En el laboratorio de nematología del Departamento de Parasitología Agrícola, de la Universidad Autónoma Chapingo, se evaluó la técnica de nebulización para la extracción de nematodos, a partir de bulbos de ajo infectados con *A. subtenuis*, con el objetivo de obtener nematodos con buena viabilidad para la reproducción de síntomas.

Los bulbos infectados de ajo se separaron en base al índice de daño (Índice 1, 2, 3, 4 y 5) propuesto por Delgadillo (2001) (anexo 1). Por cada índice de daño se realizaron de 5 a 6 repeticiones. Todas la catáfilas del bulbo y de los dientes fueron removidas y cortadas en pedazos de 2 cm (Figura 2), se tomó 1 gramo de tejido y se colocó en la cámara de nebulización durante 7 días.

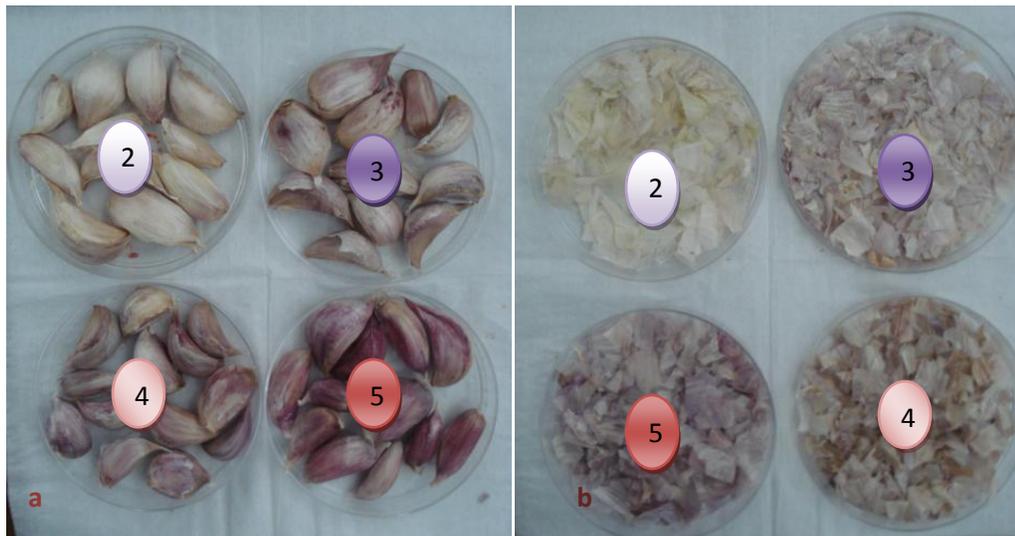


Figura 2. a) Dientes y b) catáfilas de bulbo de ajo separados con base a su índice de daño (índices 2, 3, 4 y 5).

Los nematodos fueron colectados en tubos de ensaye y se evaluó su concentración diariamente. Se sacaron las muestras (tubos de ensaye) de la cámara nebulizadora y se dejaron reposar por 2 horas (para permitir la sedimentación de los nematodos) se eliminó el sobrenadante de los tubos de ensaye por succión (procurando no tocar el fondo del tubo) hasta dejar 10 ml en la parte inferior del tubo, se homogenizó la muestra y se tomó 1 ml el cual fue colocado en una cámara cuadrículada para el conteo en el microscopio estereoscópico.

#### **4-5. Pruebas de patogenicidad:**

En 105 macetas de 1 L de capacidad, se colocó suelo estéril (procedente de lotes de producción de ajo de la región bajío, del estado de Guanajuato). En 90 macetas se colocó 1 diente de ajo (semilla agronómica) de la variedad Singapur libre de patógenos (proporcionado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Bajío - INIFAP-CEBAJ). Y en 15 macetas se colocó 1 diente de ajo infectado de forma natural con *A. subtenuis*, este tratamiento fue tomado como control positivo.

A los 15 días después de la brotación se realizó la inoculación con nematodos juveniles (J3) de *A. subtenuis*, extraídos mediante la técnica de nebulización, tratados con hipoclorito de sodio al 0.1 % por 1 minuto y lavados tres veces con agua destilada estéril. Por cada maceta se le aplicó 10 ml de agua

destilada estéril que contenían una suspensión de 10, 100, 1000 y 10 000 nematodos, según el tratamiento (tabla 1). Para el control negativo y positivo empleamos 10 ml de agua destilada estéril.

Tabla 1. Tratamientos empleados para la reproducción de síntomas.

---

Tratamiento:

---

- 1) Control (-), diente de ajo sano
  - 2) Diente de ajo sano + 10 nematodos.
  - 3) Diente de ajo sano + 100 nematodos.
  - 4) Diente de ajo sano + 1 000 nematodos.
  - 5) Diente de ajo sano + 10 000 nematodos.
  - 6) Control (+), diente de ajo infectado con *A. subtenuis* de forma natural.
- 

Los materiales vegetales de ajo (bulbos) sanos e infectados fueron proporcionados por el INIFAP-CEBAJ.

Después de la inoculación las plantas fueron trasladadas al invernadero, en donde se distribuyeron al azar, cada grupo de 5 plantas se consideró como tratamiento, empleándose 3 repeticiones.

A los 60 días después de la inoculación se tomaron las plantas para observar los síntomas y la respuesta de la planta al nematodo, mediante los parámetros de incidencia y severidad, con base al índice de daño (anexo 1), apariencia general de la planta, coloración y degradación del bulbo.

#### **4.6. Reaislamiento del patógeno:**

Para corroborar que los síntomas observados en ajo correspondían al efecto ocasionado por *A. subtenuis*, las plantas fueron analizadas para hongos, bacterias y nematodos (técnicas descrita anteriormente).

#### **4.7. Identificación filogenética de *Aphelenchoides subtenuis*:**

Para la identificación filogenética se emplearon ejemplares de *A. subtenuis* lavados tres veces con agua destilada estéril, fueron triturados y colocados en un tubo de microcentrífuga en una solución que contenía 8 µl de agua destilada estéril, 1.5 µl de Buffer de PCR 10X y 0.5 µl de proteinasa K (5mg/ml). Los tubos se incubaron a 65 °C por una hora seguido de 95 °C por 15 minutos (McCuiston, 2007). Sobre el tubo de microcentrífuga (que contiene el DNA del nematodo) se agregó 15 µl de mezcla de reacción (1.5 µl de Buffer de PCR 10x, 2.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.5 µl de dNTP's 10 mM, 1 µl de cada iniciador 10 pM, 0.25 µl de Taq polimerasa 5u/ µl y 8.25 µl de agua didestilada estéril). Posteriormente se colocaron en un termociclador bajo las siguientes condiciones de amplificación; 95 °C por 4 minutos de desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 55 °C por 1 minuto y 72 °C por 1 ½ minutos, y desnaturalización final de 10 minutos a 72 °C. Los iniciadores empleados fueron TW81 (5'GTTTCCGTAGGTGAAC-CTGC3') y AB28 (5'ATATGCTTAAGTT-CAGCGGGT3') quienes amplifican regiones ITS ribosomales (McCuiston, 2007). Se realizó una electroforesis con el producto de

PCR en gel de agarosa al 1.8 % teñido con bromuro de etidio, a 100 volts por 60 minutos en Buffer TAE1x, y se expuso a luz Ultra Violeta (esto para ver si se presentó una amplificación y para cuantificar aproximadamente el tamaño del fragmento amplificado). Adicionalmente a la confirmación taxonómica se utilizó la secuenciación de algunos productos de PCR. Para esto, se purificaron los amplicones del ADN de aproximadamente 725 bp que a su vez fueron limpiados con el kit QIAQUICK (QIAGEN, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se enviaron a secuenciar al Colegio de Postgraduados en ambas direcciones mediante el *kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (PE Applied Biosystems, Foster City, EEUU) y su análisis en un secuenciador 3130 *Applied Biosystems*) de la compañía Macrogen (Corea del Sur). Las secuencias obtenidas fueron ensambladas con el *software* BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), y comparadas con la base de datos del *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) utilizando el programa BLAST, para determinar si en efecto se trataba del patógeno *A. subtenuis*.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Descripción de síntomas en campo:

En campo se puede observar un amarillamiento y secado de las hojas basales, iniciando del ápice de la hoja hacia la parte basal (Figura 3), conforme el nematodo se introduce entre las catáfilas del bulbo, las hojas más jóvenes se ven afectadas.



Figura 3. a) Síntomas aéreos de plantas afectadas, b) marillamiento apical de las hojas baseles de ajo.

Posteriormente las catáfilas afectadas inician un proceso de degradación, pudiendo ser colonizadas por hongos saprófitos. En las variedades de bulbo blanco se puede apreciar claramente un gradiente de pigmentación que va del rosa al púrpura, según el índice de daño, cabe destacar que dicha pigmentación es irregular y puede o no presentar un patrón uniforme (Figura 4). Cuando las plantas llegan a la madurez comercial las catáfilas de cobertura se degradan completamente y quedan expuestos los dientes de ajo, las catáfilas de dichos dientes también muestran un patrón de pigmentación púrpura irregular (figura 5). Esto permite que la planta esté expuesta a factores bióticos y abióticos demeritando el rendimiento y calidad de los bulbos.



Figura 4. a) plántulas y b) bulbos de ajo donde se puede observar amarillamiento de las hojas, y un gradiente de pigmentación púrpura, síntoma característico.



Figura 5. a) Bulbos de ajos afectados y sanos, obsérvese la degradación de las catáfilas externas, y la pigmentación de los dientes expuestos. b) Gradiente de coloración en ajos de bulbo blanco. c) Gradiente de coloración de dientes de ajo de un bulbo afectado.

## 5.2. Aislamiento, purificación e identificación de patógenos asociados:

Los organismos aislados de las 22 muestras de ajo analizadas fueron; *Aphelenchoides* spp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., y *Pectobacterium* sp. (Tabla 2).

Tabla 2. Relación de muestras analizadas con síntomas y patógenos asociados.

Clave de Muestra	Municipio de colecta (Edo. Guanajuato)	Patógeno(s) aislado(s)
081127-1	No determinado	<i>Aphelenchoides</i> spp. y <i>Fusarium</i> sp.
081204-2	Salamanca	<i>Aphelenchoides</i> spp. y <i>Penicillium</i> sp.
081204-3	Salamanca	<i>Aphelenchoides</i> spp.
081204-4	Apaseo	<i>Aphelenchoides</i> spp.
081208-5	No determinado	<i>Aphelenchoides</i> spp.
081215-6	Celaya	<i>Aphelenchoides</i> spp. y <i>Fusarium</i> sp.
081215-7	Celaya	<i>Aphelenchoides</i> spp. <i>Fusarium</i> sp. , <i>Penicillium</i> sp. y <i>Pectobacterium</i> sp.
081216-8	Celaya	<i>Aphelenchoides</i> spp. y <i>Penicillium</i> sp.
081216-9	Celaya	<i>Pectobacterium</i> sp.
081216-10	Celaya	<i>Aphelenchoides</i> spp. y <i>Fusarium</i> sp.
081216-11	Apaseo	<i>Aphelenchoides</i> spp. y <i>Fusarium</i> sp.
081217-12	Celaya	<i>Aphelenchoides</i> spp.
081217-13	Celaya	<i>Aphelenchoides</i> spp.
081218-14	Celaya	<i>Aphelenchoides</i> spp.
081219-15	Celaya	<i>Aphelenchoides</i> spp.
081219-16	Celaya	<i>Aphelenchoides</i> spp. y <i>Penicillium</i> sp.
081229-17	Salamanca	<i>Aphelenchoides</i> spp.
081229-18	Salamanca	<i>Aphelenchoides</i> spp.
081229-19	Apaseo	<i>Aphelenchoides</i> spp.
080310-20	San Miguel Allende	<i>Aphelenchoides</i> spp.
080303-21	San Miguel Allende	<i>Aphelenchoides</i> spp.
101000-22	Abasolo	<i>Aphelenchoides</i> spp.

***Aphelenchoides* spp.;** este nematodo estuvo presente en el 90.9% de las muestras analizadas. Las plantas afectadas por este organismos presentan una ligera clorosis en la parte apical de la hojas seguida de un secado, en el bulbo las catáfilas externas muestran una pigmentación purpura de forma irregular. Conforme se remueven las catáfilas estas presentan un nivel de pigmentación menor (Fig. 6).



Fig. 6. a) Plata de ajo mostrando una pigmentación purpura en las catáfilas externas del bulbo. b) Remoción de catáfilas externas, las catáfilas internas muestran un menor nivel de pigmentación. c) Huevecillos y nematodos inmersos en el tejido vegetal (hojas de cobertura del bulbo) de ajos provenientes del estado de Guanajuato, México (40X de magnificación).

***Fusarium sp.***; este hongo se detectó en el 22.7% de las muestras, las plantas afectadas por este patógeno mostraban una degradación de catáfilas de externas y pigmentación (rosa) irregular de los bulbos (figura 7). Similar a la ocasionada por *A. subtenuis*, sin embargo en las catáfilas internas no se muestra la coloración púrpura característica, y al observar el tejido directamente al microscopio no se observa la presencia de nematodos.

***Penicillium sp.***; este hongo se presentó en el 18.1% de las muestras, las hojas más vieja de la plantas presentaban una clorosis y secado en la parte apical.

Sobre los bulbos se puede observar el desarrollo del hongo de color verde grisáceo (figura 7).

***Pectobacterium sp.***; esta bacteria se detectó en el 9 % de las muestras analizadas. Las plantas afectadas por dicho patógeno mostraron una pudrición, además solo se presentó en plantas pequeñas (figura 7).



Figura 7. Síntomas en plantas de ajo afectadas por a) *Fusarium sp.*, b) *Penicillium sp.*, y c) *Pectobacterium sp.* Dichos síntomas son diferentes a los ocasionados por *Aphelenchoides spp* en bulbos de ajo.

### 5.3. Características morfométricas de nematodos aislados de bulbos de ajos:

Las características morfométricas observadas en los ejemplares de nematodos aislados de bulbos de ajo del estado de Guanajuato (tabla 3) corresponden a las de *Aphelenchoides subtenuis*, según la descripción dada por Allen en 1952 y a las características morfométricas reportadas por Shahina en 1996.

Tabla 3; Morfometría de *Aphelechooides subtenuis*. aislados de bulbos de ajo provenientes del estado de Guanajuato.

<b>Índices</b>	<b>Hembras</b>	<b>Machos</b>
n	<b>20</b>	<b>20</b>
L	856.40 (614.72-967.35)	835.17 (593.65-992.29)
a	43.02 (38.43-47.84)	49.542 (40.73-63.24)
b	14.56 (11.58-16.37)	13.26 (10.87-14.6)
c	28.36 (24.64-33.99)	24.647 (20.43-30.33)
c`	2.64 (2.18-2.94)	2.56 (2.27-2.82)
V	71.61 (68.1-74.38)	-----
Longitud del estilete (µm).	11.88 (11.09-13.9)	11.57 (10.75-12.04)
Diámetro máximo del cuerpo (µm).	19.49 (14.54-21.59)	18.17 (13.16-20.58)
Longitud de la cola(µm).	28.13 (23.92-33.85)	29.90 (25.26-36.99)
Longitud del mucrón(µm).	2.81 (1.27-2.26)	-----
Diámetro del cuerpo a la altura del ano (µm).	10.73 (8.95-13.49)	11.71 (9.85-12.95)
Espícula (Línea recta del vértice a la extremidad dorsal) (µm).	-----	16.46 (14.46-17.53)

n= Número de ejemplares; L= Longitud total del cuerpo (µm); a= L/ diámetro máximo del cuerpo; b= L/ tamaño del esófago; c= L/ longitud de la cola; c`= longitud de la cola / diámetro del cuerpo a la altura del ano; V= posición del la vulva respecto a la longitus del cuerpo (%).

Las hembras aisladas de los bulbos de ajo muestran cuerpo delgado, cuando se encuentran relajadas presentan una ligera curvatura ventral, cola sub-cilíndrica con un mucrón ventral y simple, campo lateral (visto en microscopio simple de luz) con tres estrías, cutícula finamente anulada, anillo nervioso

localizado justo después del bulbo medio, saco postuterino prominente ocupando del 60 a 70 % de la distancia entre la vulva y el ano. Los machos con campo lateral igualmente de tres estrías, cuando están relajados la curvatura de la cola va de 45 al 90 °, mucrón inconspicuo, espícula larga y curvada, sin bursa y sin gobernáculo (figura 8).

Dichas características son similares con las reportadas por Deimi (2007) quien sugiere el uso de las siguientes características para separar a *A. subtenuis* de otras especies; hembra con cola subcilíndrica y mucrón simple en la parte ventral; campo lateral con tres estría (vista en microscopio de luz); y macho con cola conoide y mucrón incospicuo.

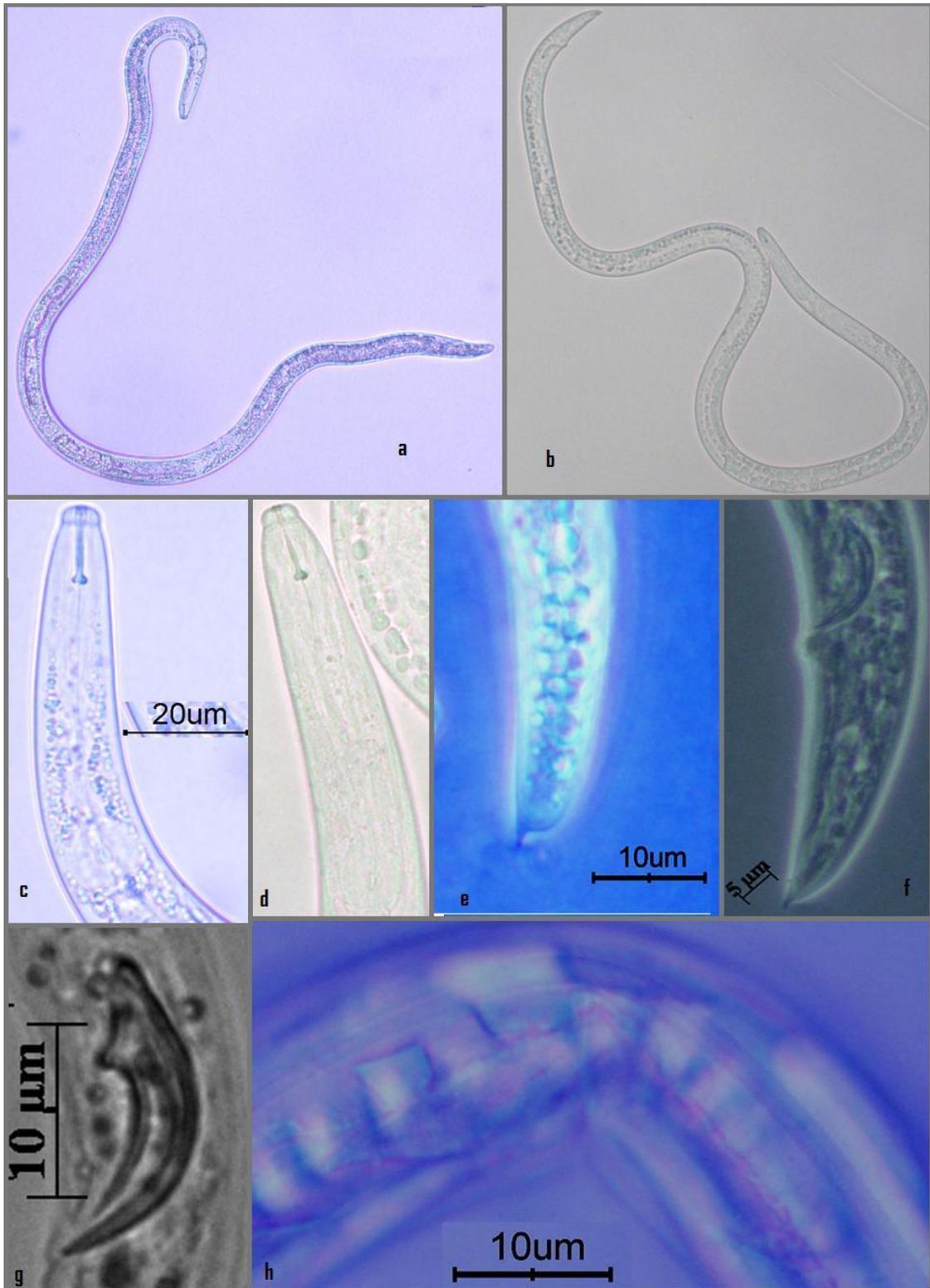


Figura 8. Caracteres morfológicos de ejemplares de *Aphelenchoides subtenuis* aislados de bulbos de ajo. a) Hembra y b) Macho. Parte anterior del cuerpo de c) hembra y d) macho. e) Cola subcilíndrica de hembra (mucrón simple y ventral) y f) cola del macho (mucrón incospicuo). g) Espícula curvada ventralmente (forma de hoz) y d) campo lateral con tres estrías.

#### 5.4. Evaluación de la técnica de nebulización para la extracción de nematodos de bulbos de ajo:

Durante los primeros días se extrae la mayor cantidad de nematodos, al cuarto día se extrae el 83.4 % de los nematodos presentes en el tejido de la muestra (tabla4).

Tabla 4. Promedio de nematodos extraídos por día por índice de daño con la técnica de nebulización, de 1 gramo de tejido (catáfilas de cobertura del bulbo y dientes).

Índice de Daño	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día7
índice 1	1.8	0.6	0.6	0	0.4	0.2	0
índice 2	32.2	16	7.4	7.6	6.6	4	3.2
índice 3	105.8	95.8	34	48.8	32.1	18.1	12.8
índice 4	170.83	193.5	73.8	68	59.5	28.5	16.3
Índice 5	423.8	214.4	133.4	142.2	99.8	47.4	21.6
Promedio / Día	734.4	520.3	249.2	266.6	198.4	98.2	53.9
Total extraídos	2121.36667						

Conforme pasan los días la cantidad de nematodos extraídos va disminuyendo (Figura 9). Pasado los 7 días, las muestras de ajo presentan un fuerte proceso de descomposición lo que imposibilita seguir evaluando.

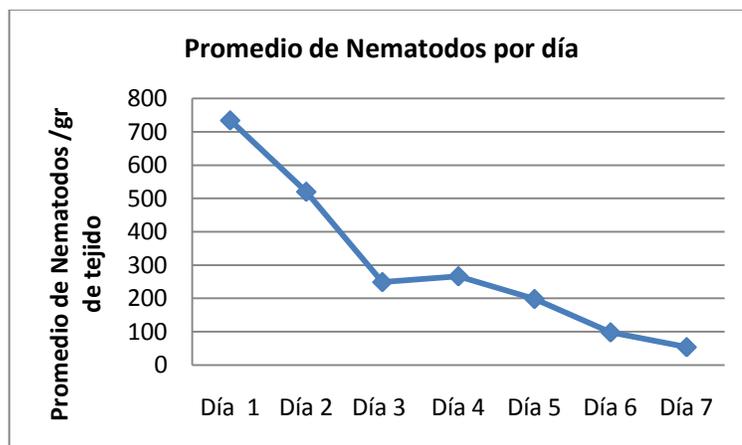


Figura 9. Promedio de nematodos extraídos de un gramo de tejido (catáfilas del bulbo y diente) de ajo durante una semana, empleando la técnica de nebulización.

Se determina que existe una relación directamente proporcional entre el índice de daño y el la cantidad de nematodos presentes en el tejido de ajo. Esto es, a mayor el índice de daño (mayor pigmentación) mayor es la cantidad de nematodos presentes en el tejido (figura 10).

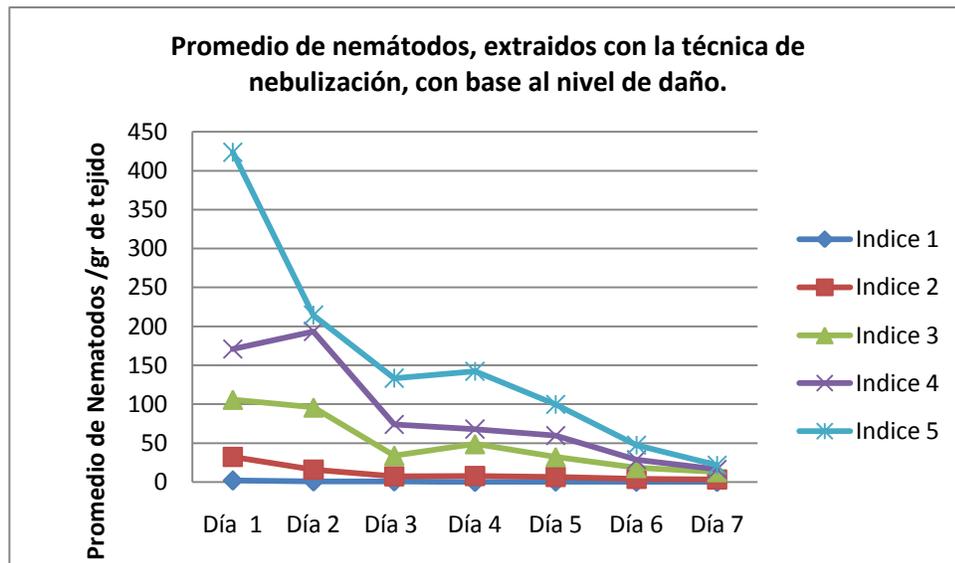


Figura 10. Promedio de nematodos extraídos con la técnica de nebulización, de un gramo de tejido (catáfilas de cobertura del bulbo y dientes) de ajo durante una semana, tomando en cuenta el índice de daño.

### 5.5. Pruebas de patogenicidad:

A los 60 días después de la inoculación de *A. subtenuis* en plántulas de ajo se pudo evaluar incidencia (0= ausencia, 1= presencia de síntomas) y severidad (índice de daño del 1 al 5) (tabla 5).

Tabla 5. Evolución de incidencia y severidad, 60 días después de la inoculación de las platas de ajo con *A. subtenuis*.

Tratamiento	Repetición	*Incidencia	**Severidad
Control (-), diente de ajo sano	1	0	1
	2	0	1
	3	0	1
Diente de ajo sano + 10 nematodos.	1	0	1
	2	1	1
	3	1	1
Diente de ajo sano + 100 nematodos.	1	1	1
	2	1	1
	3	1	2
Diente de ajo sano + 1 000 nematodos.	1	1	3
	2	1	3
	3	1	3
Diente de ajo sano + 10 000 nematodos.	1	1	5
	2	1	5
	3	1	5
Control (+), diente de ajo infectado con <i>A. subtenuis</i> de forma natural.	1	1	5
	2	1	5
	3	1	5

\*Incidencia: 0= ausente, 1= presente.

\*\*Severidad: 1 = Bulbo sano ó sin síntomas, 2 = 10 % del área del bulbo con síntomas, 3 = 25 % del área del bulbo con síntomas, 4 = 50 % del área del bulbo con síntomas y 5 = 100 % del área del bulbo con síntomas.

En el control positivo se observó un secado de las hojas basales de la planta, en tanto, las hojas intermedias muestran una clorosis apical seguido de una necrosis, las hojas más jóvenes no muestran daño y el índice de daño en el bulbo es de 5.

El tratamiento con 10 000 nematodos inoculados muestra en la hoja basal una clorosis seguido de una necrosis, y las hojas intermedias presentaron una ligera necrosis del tejido en la parte distal, el bulbo muestra un nivel de daño 5. El tratamiento inoculado con 1 000 nematodos mostró una ligera clorosis en parte

distal de las hojas basales, en el bulbo muestra un índice de daño 3 (Figura 11 y figura 12).

Los tratamientos con 10 y 100 nematodos inoculados no mostraron daño en las hojas basales, sin embargo si se observó una ligera pigmentación en el bulbo, en el área donde fue inoculado con nematodos (figura 12).



Figura 11. Plantas de ajo inoculadas con a) 1 000, y b) 10 000 nematodos (*Aphelenchoides subtenuis*), y c) control positivo. Se puede observar pigmentación del bulbo, clorosis y secado de las hojas basales, además de degradación en las catáfilas.

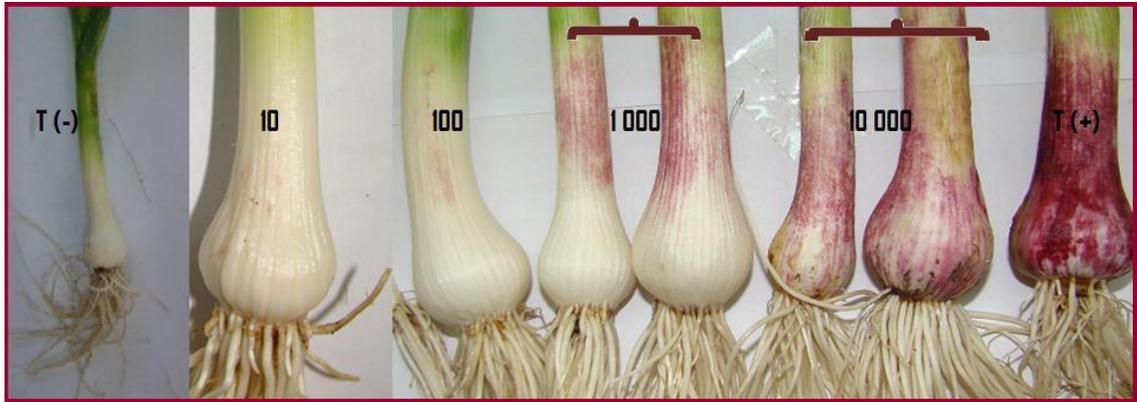


Figura 12. Gradiente de pigmentación de los bulbos de ajo de la variedad Singapur inoculados con 0, 10, 100, 1 000 y 10 000 nematodos, y el control positivo (infectado de forma natural).

### 5.6. Reaislamiento del patógeno:

Las plantas de ajo que mostraron síntomas de ajos tocados fueron positivas a *Aphelenchoides subtenuis*, lo que demuestra que este nematodo está estrechamente relacionado con el problema. En plantas del control positivo, en las que se observó una mayor degradación de las catáfilas de cobertura del bulbo, además de *A. subtenuis* también se aisló al *Fusarium oxysporum*, *F. equiseti* y *F. chlamydosporum* lo que sugiere que la asociación nematodo-hongo intensifican el daño en el cultivo y el manejo de la enfermedad.

### 5.7. Identificación filogenética de *Aphelenchoides subtenuis*:

Con los iniciadores TW81 (5'GTTTCCGTAGGTGAACCTGC3') y AB28 (5'ATATGCTTAAGTTCAGCG-GGT3') se logró amplificar un fragmento de

aproximadamente 725 pb. (Figura 13). En la secuenciación las amplificaciones realizadas de los genes ribosomales ITS, se llevaron a cabo exitosamente, se obtuvieron fragmentos de 652 pb aproximadamente (anexo2). La secuencia consenso cotejada en la base de datos del GenBank, nos muestra que el nematodo aislado de bulbos de ajo procedentes de Guanajuato está emparentado filogenéticamente con *Aphelenchoides subtenuis* con un 94% de identidad (figura 14).

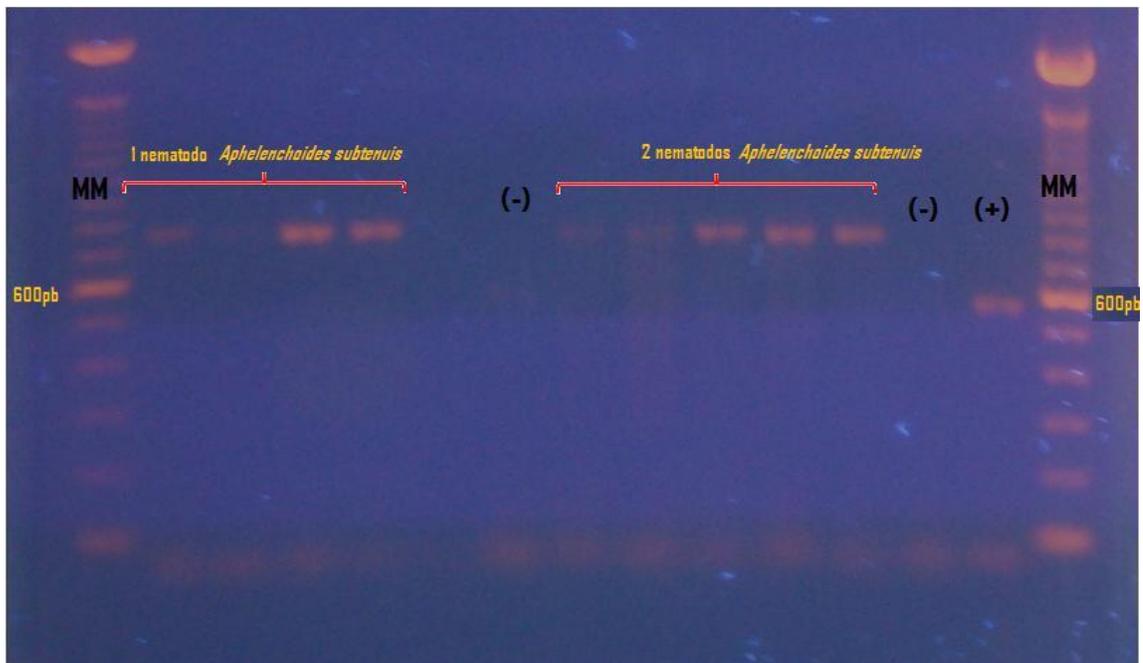


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1.8%. MM=Marcador Molecular de 100 pb; amplificación de 1 y 2 ejemplares de *Aphelenchoides subtenuis*; (-) = control negativo; (+)= control positivo (DNA de *Meloidogyne chitwoodi*).

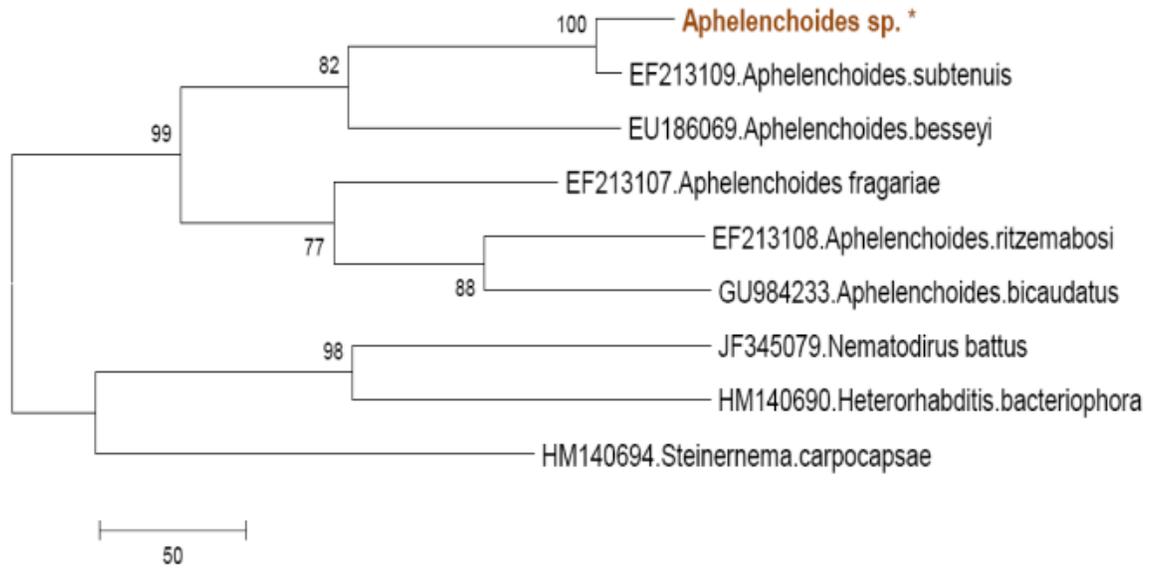


Figura 14. Árbol filogenético construido con el método de Máxima Parsimonia utilizando 1000 repeticiones bootstrap. Las secuencias corresponden a las amplificaciones de el espacio transcrito interno del rADN de *A. subtenuis*. *Steinernema carpocapsae* fue considerada como fuera de grupo.

## 6. CONCLUSIÓN

*Aphelenchoides subtenuis* genera en plantas de ajo una coloración rosada a púrpura en el bulbo seguida de una degradación de las catáfilas de cobertura, en la parte aérea se presenta una clorosis y secado de las hojas basales. Cuando las plantas llegan a la madurez comercial las catáfilas de cobertura se degradan completamente y quedan expuestos los dientes de ajo, las catáfilas de dichos dientes también muestran un patrón de pigmentación purpura irregular. Esto permite que la planta esté expuesta al ataque de factores bióticos y abióticos demeritando el rendimiento y calidad de los bulbos. Este nematodo es transmitido por material vegetal propagativo (catáfilas de cobertura del bulbo y de los dientes), lo que permite que se disemine a otras áreas de producción agrícola. Además se ha encontrado en *A. subtenuis* en asociación con *Fusarium oxisporum*, *F. equiseti* y *F. chlamydosporum*. Lo que intensifica el daño en el cultivo y dificulta el manejo del problema en campo.

Resulta importante establecer una línea de investigación que nos permita conocer y/o evaluar las pérdidas que *A. subtenuis* genera cuando afecta al cultivo de ajo tanto a nivel de campo como en almacén, determinar el ciclo biológico, conocer el rango de plantas hospedantes y las interacciones que establece con otros organismos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA:

Allen M. W. 1952. Taxonomic status of the bud and leaf nematodes related to *Aphelenchoides fragariae* (Ritzema Bos, 1891). Proceedings of the Helminthological Society of Washington 19, 108-120.

Deimi A. M., Maafi Z. TPalomares R, J. E.. and Castillo P. 2007. *Aphelenchoides subtenuis* (Cobb, 1926) Steiner & Buhrer, 1932 (Nematoda: Aphelenchoididae) from Iran with morphological and morphometric characterization. Nematology 8(6):903-908.

Delgadillo S. F. 2000. Estudio de evaluación de la efectividad biológica del nematocida Nema-cur 240 CS para el control de nematodo *Ditylenchus dipsaci* Filipjev en el cultivo del ajo (*Allium sativum* L.). INIFAP/CEBAJ-SAGAR. Informe técnico

Delgadillo S. F. 1998. Control integrado de la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) en el Cultivo del ajo (*Allium sativum* L.). Tesis de Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 86 p.

Escuer M. y Bello A.. 2000. Nematodos del género *Aphelenchoides* de interés Fitopatológico y su distribución en España. Boletín Sanidad Vegetal, 26: 47-63, 2000. España.

Hanelt P. 1990. Taxonomy, evolution and history. *in*: Onions and allied crops I Rabinowitch, H. D. and J.L. Brewster (eds.). Florida, CRC Press. P. 1-26.

Hunt D. L. 1993. *Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae: their systematics and bionomics*. CAB International Wallingford, UK. pp. 352.

Jaramillo J. V. 1994. *Allium* genetic resources in Latin America: situation and perspectives. Acta Horticulturae 358:147-149.

McCuiston J. L., Hudson L. C., Subbotin S. A., Davis E. L., and Warfield C. Y. 2007. Conventional and PCR Detection of *Aphelenchoides fragariae* in Diverse Ornamental Host Plant Species. Journal of Nematology 39(4):343–355.

Mai W. F., and Mullin P. G., Lyon H. H., and Loeffler K. 1996. Plant-parasitic nematodes: A pictorial key to genera. Ithaca,

Schwartz H. F. y Krishna M. S. 1995. Compendium of Onion and Garlic Diseases. American Phytopathological Society U.S.A. 54 p.

Shahina F. 1996. A diagnostic compendium of the genus *Aphelenchoides* Fischer, 1894 (Nematoda: Aphelenchida) with some new records of the group from Pakistan. Pakistan Journal of Nematology 14: 1-32.

### Anexo1:

Tabla 6: Índice de daño con base en el porcentaje del área afectada del bulbo. (Delgadillo, 2000).

INDICE	ÁREA DE BULBO DAÑADA
1	Bulbo sano / sin síntomas
2	10 % del área del bulbo con síntomas
3	25 % del área del bulbo con síntomas
4	50 % del área del bulbo con síntomas
5	100 % del área del bulbo con síntomas

### Anexo 2:

Secuencia consenso de *A. subtenuis* aislado de bulbos de ajo;

```
TGGTTGGCGCATAACGACCGAGGGACGCACCGAACAAGCAAGCGACCAACGAAATTCGCG  
AATAAGATTCATTGAAAATCGTTCGACCGTCACAAGTCCGGCTCATACTTGCAGCGCCCC  
TCTACTCAGTCACGCCTCAATTGGAATCTCTCCAATGGTTGTTGCGATTCCGAAGAGATCG  
CGACAAAGGTAGCCCGATCCCAAATGATGGATCGTGGGCTAATGAAGCACACCCTGAATC  
GAATATACCGATGGGCAGAGACCACCGATGCGATATGCGATCGAAAACACACCACTCCGAA  
TATCTGTAATTCGTGGCTATTAACGCAATTCCTGCGTTCTTCTTCGATCTACGAGCCAAGT  
GATCCACCGATATAGCTTTATCTCGCTTTCATTGTTTCTAAAAAATGTGAATGTGTTGATATG  
TGTCTGGGCGGCGACATCGGCTCATCAATCCTCACACCACCGAGGGGGGGAGGTGG  
TCTACAGTCTTCTCCGGAATCTCGGACATTCACAACAACACTACACGGACCGCCATAGGAAAC
```

CACAGAGAGCCGATAAATGTGAAACTGAAACCCCAAACGAGGGGGCCAGCACTTTGTGTC  
CGCGAAATCACCAACGCTTCTCTGGCTCCTTACGAAGCGAAAC