



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGIA

CICLO DE VIDA DEL NEMATODO ENQUISTADOR

Cactodera torreyanae Cid del Prado y Subbotin, 2014

Y SU RELACIÓN PARASITO HUÉSPED.

Gregg Evans

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO**

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

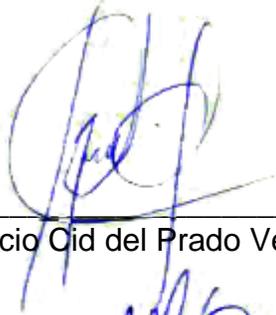
2014

La presente tesis titulada: “Ciclo de vida del nematodo enquistador *Cactodera torreyanae* y su relación parasito huésped” realizada por el alumno: Gregg Evans bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Ignacio Cid del Prado Vera

ASESOR



MC. Petra Yañez Jiménez

ASESOR



Dr. Roberto Noguez Hernández

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Octubre de 2014

CICLO DE VIDA DEL NEMATODO ENQUISTADOR
Cactodera torreyanae Cid del Prado and Subbotin, 2014

Y SU RELACIÓN PARASITO HUÉSPED.

Gregg Evans, MC.

Colegio de Postgraduados, 2014.

RESUMEN

El siguiente estudio se llevó a cabo para conocer la biología de *Cactodera torreyanae* y su interacción con su hospedante *Suaeda edulis*. Ambos son organismos recientemente descritos, se sabe poco acerca de la biología de ellos. Tanto patógeno como hospedante están bien adaptados a vivir en suelos salinos; Na 690 Mg.kg⁻¹, con una pH de 9.1. Para satisfacer los objetivos de esta investigación, el estudio se dividió en dos partes. Del primer capítulo, el principal objetivo fue determinar qué tipo de modificaciones celulares y estructuras de alimentación, se desarrollan en el tejido de la raíz como resultado de la interacción entre el hospedante y el patógeno. Se determinó que se forman sincitios multinucleados a partir de las células parenquimatosas del floema, ubicados en la región del tejido vascular del floema primario de la del sistema radical, generalmente son de gran tamaño y de forma irregular; perímetro 0.427 - 1.748(0.784±0.430) mm; área en mm² 0.012 - 0.105(0.032±0.026).

El objetivo del segundo capítulo fue determinar el ciclo de vida del nematodo y comprobar o refutar la hipótesis del Cid del Prado y Subbotin, 2014, quienes especulan que este nuevo nematodo, a diferencia de otros géneros y especies conocidas de la misma familia de Heteroderidae, no necesita penetrar por completo en la raíz de su hospedante, para completar su ciclo de vida, sino que se desarrolla fuera de ella.

Se concluyó que el ciclo de vida del patógeno se completa en 25 días, con un requerimiento de 447 días grado y que ningún estadio postembrionario no requiere penetrar completamente en las raíces de su hospedante para completar su ciclo de vida, por lo que esta especie es ectoparásito-sésil.

Palabras claves: Anatomía, *Cactodera torreyanae*, Ciclo de vida, Días grado, Sincitio, *Suaeda edulis*

LIFE CYCLE OF THE CYST FORMING NEMATODE

Cactodera torreyanae Cid del Prado and Subbotin, 2014

AND IT'S RELATIONSHIP WITH ITS HOST

Gregg Evans, MSc.

Colegio de Postgraduados, 2014.

ABSTRACT

The following study was carried out to examine the biology of *Cactodera torreyanae* and its interaction with its host *Suaeda edulis*. Both pathogen and host are recently described organisms, and little is known about them. Both pathogen and host are well adapted to soils with a very high salinity; Na 690 Mg.kg⁻¹, with a pH of 9.1. In the first chapter the main objective was to determine what type of cell modifications developed in the root tissue because of the interaction between the host and pathogen. *C. torreyanae* forms multinucleated syncytium from the parenchymatous cells located in vascular tissue of the phloem of the root, the syncytium were generally irregular in shape and size; perimeter 0.427-1.748(0.784±0.430) mm; area mm² 0.012-0.105(0.032±0.026) In the second chapter we examine the nematode's life cycle, and to prove or disprove the hypothesis of Cid del Prado and Subbotin, 2014 who speculated that this new nematode, unlike other known genus and species of the same family of Heteroderidae, does not need to completely penetrate the root of its host to complete its life cycle, but instead develops outside the root. The nematode completed its cycle in 25 days requiring 447 degree days, and none of the post embryonic stages need to completely penetrate its host's roots to complete its life cycle and that this species is a sessile ectoparasite.

Key words: Anatomy, *Cactodera torreyanae*, Life cycle, *Suaeda edulis*, syncytium

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para el estudio de maestría

El Colegio de Postgraduados

A las secretarías, especialmente a ***Veronica Romero***

El Dr. Carlos de León por su apoyo en los momentos difíciles

A cada uno de los integrantes de mi consejo particular

Dr. Ignacio Cid del Prado Vera

MC. Petra Yáñez Jiménez

Dr. Roberto Noguez Hernández

Gracias por el interés que mostró en mi formación, por su dedicación y guía y sobre todo por su amistad, al Dr. Cid no tengo suficiente palabras para agradecerte, usted y solo usted me apoyaba cuando yo estaba en mi punto más bajo en el Colegio y por esto siempre estaré en deuda con usted

A los compañeros y amigos logrados durante mi estancia en México con quienes compartimos buenos momentos pero sobre todo la fraternidad profesional lograda especialmente a ***Silvia Hernández, Fátima y Rafaela***

Sinceramente te agradezco a ti ***Celeste Moreno***, mi amiga, mi apoyo mi todo gracias

My mother thank you for giving me life, thank you for bringing me into this crazy but exciting world, I am forever indebted to you for your support more than you will ever know

DEDICATORIA

A dios por la vida la fuerza y salud

A mi familia por el cariño, el amor y apoyo

Mis futuros hijos

Celeste Elizabeth Moreno Manzano

INDICE

	PÁG.
RESUMEN	iii
ABSTRACT	v
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA	vii
ÍNDICE	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE CUADROS	xii
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
2. OBJETIVOS	2
3. HIPOTESIS	2
4. REVISION DE LITERATURA	3
4.1 Los Romeritos	3
4.1.1 Importancia	3
4.1.2 Descripción del género <i>Suaeda</i>	4
4.1.3 Descripción de la especie <i>Suaeda edulis</i> Flores Olv. & Noguez, 2013	5
4.2 Los nematodos enquistadores	6
4.2.1 Importancia	6

4.2.2 Penetración de J2 y formación de sitios de alimentación	6
4.2.3 Alimentación y desarrollo de nematodos enquistadores	11
4.2.4 Clasificación taxonómica de <i>Cactodera torreyanae</i> Cid del Prado y Subbotin, 2014	12
4.2.5 Características morfológicas de <i>Cactodera torreyanae</i>	12
5. LITERATURA CITADA	14
CAPITULO I	23
SITIOS DE ALIMENTACIÓN	23
RESUMEN	23
1.1 INTRODUCCIÓN	24
1.2 MATERIALES Y METODOS	26
1.2.1 Material vegetal utilizado	26
1.2.2 Cortes histológicos de las raíces.	29
1.3 RESULTADOS	31
1.3.1 Características del suelo	31
1.3.2 Descripción de los tejidos sanos de romerito.	32
1.3.3 Descripción de las anomalías anatómicas.	32
1.4 DISCUSIÓN	37
1.5 CONCLUSIÓN	39
1.6 LITERATURA CITADA	40

CAPITULO II	43
CICLO DE VIDA DE <i>Cactodera torreyanae</i>	43
RESUMEN	43
2.1 INTRODUCCION	45
2.1.1 Descripción de ciclo de vida de los nematodos formadores de quistes	45
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	47
2.2.1 Muestreo de suelo	47
2.2.2 Extracción de los estadios J2 avanzados, J3 y J4 y machos del suelo	47
2.2.3 Extracción de quistes mediante el Flotador de Fenwick	49
2.2.4 Material vegetal y desarrollo de los estadios juveniles	50
2.2.5 Fijación y deshidratación de nematodos.	51
2.3 RESULTADOS	52
2.4 DISCUSIÓN	60
2.5 CONCLUSIÓN	63
2.6 LITERATURA CITADA	64
Anexos	66

INDICE DE FIGURAS

		PÁG.
Figura : 1.1	Área de trabajo, Colegio de Postgraduados Campus Montecillos	26
Figura 1.2	Las partes de la planta de <i>Suaeda edulis</i> planta hospedante de <i>C. torreyanae</i> A; Hojas, B y C La inflorescencia; D; Semillas , E Plantas creciendo todo se retienen en su hábitat natural; F; Raíz de planta de <i>Suaeda edulis</i>	27
Figura : 1.3	A; Corte transversal de un raíz sano primario de <i>S. edulis</i> B; Corte transversal de una raíz secundario de <i>S. edulis</i>	32
Figura : 1.4	Corte longitudinal de una raíz sano <i>S. edulis</i>	33
Figura : 1.5	A; Corte transversal de raíz de <i>S. edulis</i> sana; B; células en hiperplasia; C; Células en hiperplasia con paredes disolviendo y núcleos amorfos; D; Nematodo próximo al sincitio; E y F; Nematodo dentro de la epidermis y corteza; Disolución de paredes celulares en hiperplasia; H; Nematodo próximo al sincitio, mostrando necrosis de la corteza. I; Nematodo próximo a la raíz mostrando citoplasma denso y granuloso de las células de los tubos cribosos J; nematodo alimentándose del sincitio	35
Figura 2.1	Ciclo de Vida de <i>Heterodera schachtii</i> , especie tipo del género	46
Figura : 2.2	A; Muestras de suelo del área del experimento; B; Frascos con nematodos extraídos en formol 8%	48
Figura 2.3	A; Flotador de Fenwick B) Residuos con materia orgánica y quistes después del proceso de extracción por el método de Fenwick; C) Quistes separados	50
Figura : 2.4	A; J4 Macho; B) J4 Hembra	54
Figura : 2.5	A; Corte longitudinal con un nematodo <i>C. torreyanae</i> adherido a la raíz de <i>S. edulis</i> . B) Corte transversal con nematodo adherido	54
Figura : 2.6	Los diferentes estadios en el desarrollo de <i>C. torreyanae</i> . A; Segundo estadio avanzado (J2A); B; J3; C; J4 Hembra; D; J4 Macho; E; Hembra joven; F; Hembra madura llena de huevos; G) Huevos; H) Quistes	55
Figura: 2.7	Hembras jóvenes con material gelatinoso de color amarillento a nivel de la cabeza y cuello	56
Figura: 2.8	<i>Cactodera torreyanae</i> A: J2; B: J3; C: J4 Hembra; D: J4 Macho; E: Hembra Madura con huevos; F: Macho	59

INDICE DE CUADROS

		PÁG.
Cuadro: 1.1	Resultados de análisis suelos procedente del campo experimental del Colegio de Postgraduados en Montecillos.	31
Cuadro 2.1	Los promedios de las temperaturas del suelo durante el transcurso del experimento y los días grados para que el nematodo terminar su ciclo de vida	57
Cuadro 2.2	Grafica con los promedios de las temperaturas del suelo durante el transcurso del experimento	58
Cuadro 2.3	Dimensiones de los varios estadios de <i>Cactodera torreyanae</i>	60

ANEXOS

	PÁG.
Preparación de FAA	66
Preparación de la Solución Madre Safranina	66
Preparación del verde rapida	66
Solution de aclaramiento	67
Fijadores	67
Soluciones de Seinhorst	68
Indices de Man	68

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México los quelites han sido parte de la comida mexicana por siglos y hoy siguen siendo una parte importante en la dieta. Este grupo de plantas forman parte de la gran familia Chenopodiaceae, la que contiene 1400 especies de plantas en 105 géneros (Watson y Dallwitz; 2014), dentro de los géneros más importantes se pueden mencionar: *Beta*, *Atriplex*, *Chenopodium* y *Suaeda*. Estas plantas se caracterizan por crecer en sitios salinos, litorales o estepáricos, muchas de ellas son consideradas como malezas de importancia cuando crecen junto con el maíz y hortalizas. Crecen en los manchones abiertos de los pastizales halófitos que cubren los fondos de varias cuencas grandes en México, pero se adaptan a sitios perturbados e incluso a cultivos anuales como arvenses.

Las plantas de romerito pertenecen al género *Suaeda* y se consumen en la parte centro del país, siendo los tallos y hojas tiernas las partes de interés, su comercialización mayor es en las festividades de Semana Santa y Navidad y forma parte de la cocina tradicional mexicana. Para los aztecas era un tesoro culinario debido a su gran contenido nutritivo y la facilidad de conseguirlo antes del deshierbe de la milpa (México Produce, 2013)

Las principales comunidades productoras de romeritos en la capital del país son: San Andrés Mixquic, San Nicolás Tetelco y San Juan Ixtayopan, en la delegación Tláhuac, y San Gregorio Atlapulco, Xochimilco (SAGARPA, 2013)

En el año 2013, Noguez *et al.* describieron una nueva especie de romerito *Suaeda edulis* que crece en los lagos salinos del centro de México, una especie que por mucho tiempo fue confundida por botánicos con *S. nigra* (*S. torreyana*), debido a que la nueva especie tiene características muy similares. Durante este mismo tiempo Cid del Prado y Subbotin, 2014 descubrieron una especie nueva de nematodo formador de quistes perteneciente al género *Cactodera*, en asociación parasítica con *S. edulis*. Después de un estudio detallado de morfología y con técnicas moleculares de este nematodo, la describieron como, *Cactodera torreyanae*.

A pesar de su importancia del romerito, especialmente, en el centro del país el cultivo ha sido poco estudiado y no se conocen mucho acerca de la plagas y patógenos que parasitan este cultivo. El presente trabajo se describe el ciclo de vida y los daños que induce este nematodo. Por esta razón los objetivos y la hipótesis de este trabajo fueron:

2. OBJETIVOS

1. Describir el ciclo de vida de *Cactodera torreyanae* Cid del Prado y Subbotin, 2014.
2. Describir los cambios histológicos que *C. torreyanae* causa en su hospedante.

3. HIPÓTESIS

1. El ciclo de vida de este nematodo es muy similar de otras especies descritas del mismo género, que van de 1.5 - 2 meses
2. El nematodo no requiere de entrar totalmente en las raíces de su huésped y por lo tanto puede vivir como ectoparásito sésil para completar su ciclo de vida

4. REVISION DE LITERATURA

4.1 Los Romeritos

4.1.1 Importancia

Los romeritos pertenecen a la familia Chenopodiaceae, son conocidos también como “Romerillo, romerito, romero y quelite salado” (Espinosa y Sarukhán, 1997; Calderón de Rzedowski, 2001; Zhu *et al.*, 2003). En Puebla en los alrededores del Lago Totolcingo, también son conocidos como “manguinillo”

Las plantas del género *Suaeda* al que pertenecen los romeritos se consumen en la parte central del país, siendo los tallos y hojas tiernas las partes de interés, forma parte de la cocina tradicional mexicana. Para los aztecas era un tesoro culinario debido a su gran contenido nutritivo y la facilidad de conseguirlo antes del deshierbe de la milpa (México Produce 2013), sin embargo los romeritos son considerados como maleza en algunos estados de México tales como en: Baja California Norte, Chihuahua, Distrito Federal, Jalisco, Estado de México, San Luís Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas y Zacatecas (Villaseñor y Espinosa, 1998). Según Meraz, (2009) y citado por Noguez *et al.*, en el 2013 en México existes por lo menos 12 especies de *Suaeda*

En las principales comunidades productoras de romeritos, se estima obtendrán un valor comercial superior a los 45 millones de pesos, por la venta de este tradicional alimento, el Distrito Federal es el principal productor de romerito a nivel nacional, con una superficie de 685 hectáreas y con una producción de 5,439 toneladas, con rendimiento de 7.94 toneladas por hectárea en el año 2012. (SAGARPA, 2013).

4.1.2 Descripción del género *Suaeda*

El género *Suaeda*, cuenta con unas 110 especies (Schütze *et al.*, 2003). Crece generalmente en zonas húmedas salinas o alcalinas. (Reed, 1979; Ferren y Schenk, 2004) así como en el interior en las partes bajas de cuencas endorreicas (Rzedowski, 1978), muchas de ellas son consideradas como malezas de importancia cuando crecen con maíz y hortalizas como compiten con ellos por espacio y nutrientes. El género comprende hierbas anuales o perennes y arbustos, con tallos erguidos o postrados, glabros o pubescentes, hojas sésiles, alternas u opuestas, enteras, carnosas aplanadas, flores inconspicuas con perianto actinomorfo o zigomorfo o irregular, de cinco segmentos, verdes, suculentos, persistentes y envolviendo al fruto, (1-2-) 5 estambres, 2-5 estigmas; flores arregladas en glómérulos en las axilas de brácteas foliares comúnmente arregladas en espigas o algunas veces racimos y utrículos con pericarpo membranáceo y semillas algunas veces dimórficas,(Ferren y Schenk, 2004).

Según Cronquist (1981) y Schütze *et al.* (2003) la clasificación taxonómica del género *Suaeda* es la siguiente:

REINO: Plantae

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliopsida

SUBCLASE: Caryophyllidae

ORDEN: Caryophyllales

SUBORDEN: Chenopodineae

FAMILIA: Chenopodiaceae

SUBFAMILIA: Suaedoidae

GÉNERO: *Suaeda*

ESPECIE: *edulis* Flores Oliv. & Noguez

4.1.3 Descripción de la especie *Suaeda edulis* Flores Oliv. & Noguez

Plantas herbáceas, anuales de anual de la altura de la planta puede variar entre 15-110 cm, erecta a ascendente, plantas de color verde, glauco o rojizas, tornándose pardas con la edad; glabras. Tallos no ramificados o 1- 3 veces ramificados, en la base o a lo largo del tallo, más cortos o igualando al tallo principal; estriados con líneas de color verde, pardo o rojizo. Hojas alternas, suculentas, lineares o angostamente lanceoladas, más anchas en la base, margen membranáceo a todo lo largo, blanquecino; ápice apiculado. Inflorescencias en glomérulos axilares de 1-3 flores, a todo lo largo de las ramas o dispuestas en espigas de 1.0-3.0 cm de largo, algunas veces dando una apariencia paniculiforme por el acortamiento hacia la parte terminal de las ramas laterales; brácteas similares a las hojas superiores pero gradualmente más cortas, comúnmente, las que sostienen glomérulos angostamente lanceoladas, más anchas en la base, de 2.0-12.0 × 1.0-1.8 mm, margen membranáceo, base envolvente. Bractéolas hialinas de 0.75-1.75 × 1.0-2.5 mm, ovadas o triangulares, irregularmente eroso-dentadas con ápice agudo a caudado. Flores hermafroditas, zigomorfas, la parte más larga de 0.5-0.7 mm en antesis y de 0.8-3.0 mm en etapa madura. Segmentos del perianto suculentos, fusionados hasta la mitad, verde-glaucos, cóncavos, 1 a 3 provistos de cornículos distales, un segmento más grande con el cornículo más largo, cubriendo los dos laterales; en fruto son evidentemente nervados con alas abaxiales transversales. Estambres 2-3, 0.27-0.44 mm de largo, excertos. Ovario depresso-ovoide; estigmas 2, papilosos, surgiendo del ápice atenuado del ovario. Semillas dimórficas,

horizontales, negras o pardo claro, lenticulares, de 0.9-1.6 mm de largo. $2n = 54$ (Noguez *et al.*, 2013)

4.2 Los nematodos enquistadores.

4.2.1 Importancia

Los nematodos son una de los principales organismos fitopatógenos de la agricultura en regiones templadas y tropicales, pueden provocar pérdidas económicas de más de \$100 mil millones de dólares cada año, (Sasser y Freckman, 1987). El 80% de estas pérdidas se deben a dos grupos principales de nematodos: los nematodos enquistadores (*Globodera spp.* y *Heterodera spp.*) y los nematodos agalladores (*Meloidogyne spp.*).

Desde el año 1871 Schmidt reconoció que el nematodo enquistador *Heterodera schachtii* de la remolacha azucarera, tenía un efecto devastador sobre la cosecha. *Globodera rostochiensis* fue el siguiente nematodo formador de quiste, en ser considerado muy importante en el cultivo de la papa, fue descubierto por (Wollenweber, 1923). Hoy en día, la familia de los nematodos que forman quistes Heteroderidae incluye 8 géneros: *Heterodera*, *Globodera*, *Punctodera*, *Dolichodera*, *Paradolichodera*, *Betulodera*, *Vitatidera* y *Cactodera* (Subbotin y Franco, 2012).

4.2.2 Penetración de J2 y formación de sitios de alimentación

Para alimentarse, los nematodos endoparásitos deben penetrar a los tejidos del huésped, para esto los nematodos utilizan una serie de métodos mecánicos y bioquímicos. La pared celular en células vegetales está compuesta principalmente de celulosa, esto representa una barrera formidable contra los nematodos y otros

patógenos. Sin embargo, (Wyss y Zunke, 1986; Wyss, 1992; Sijmons, *et al.*, 1994; Hussey y Grundler, 1998; Sobczak *et al.*, 1999), mencionaron que el uso del estilete combinado con secreciones de las glándulas esofágicas, que incluyen un complejo de enzimático dirigido a la digestión de los polímeros de la pared celular, los nematodos son capaces de romper y atravesar la pared celular.

Los genes que codifican enzimas de la pared celular se han localizado en las glándulas esofágicas de los nematodos. Dentro de las enzimas que se producen están las que degradan los polisacáridos pécticas (pectato liasas y poligalacturonasas) que comprenden la lámina media entre las células vegetales (Popeijus, *et al.*, 2000, Jaubert, *et al.*; 2002) y enzimas que degradan la celulosa (endoglucanasas y hemicelulosa (xilanasas) componentes estructurales de la pared celular, (Davis. *et al.*, 2000; Hussey, *et al.*, 2002). Una vez dentro del tejido de la planta, las secreciones de la glándula esofágica dorsal y de las glándulas subventrales, se inyectan por el estilete del nematodo en el citoplasma de las células de la planta y cambian significativamente el metabolismo de la célula (Hewezi y Baum, 2013). Los nematodos inducen la modificación de las células para su alimentación en el tejido de la raíz. Las células modificadas se caracterizan por el aumento de tamaño de los núcleos (De Almeida Engler y Gheysen, 2013) con nucléolos hipertrofiados, la gran vacuola central se sustituye por varias pequeñas, se aumenta el número de plásmidos, mitocondrias, ribosomas y estructuras del retículo endoplasmático en general hay un enriquecimiento del contenido citoplasmático (Jones y Northcote, 1972; Bleve-Zacheo y Zacheo, 1987; Golinowski *et al.*, 1996). Estos cambios incrementan la actividad metabólica del protoplasto, la síntesis intensiva de nutrientes y el movimiento de nutrientes hacia estas

células modificadas desde los tejidos adyacentes, (Sijmons, *et al.*, 1994; Hussey y Grundler, 1998; Gheysen y Fenoll, 2002; Jasmer *et al.*, 2003; Szakasits *et al.*, 2009).

Estas modificaciones no sólo son vistas como la respuesta de la planta a la infección, sino también como un resultado de una larga coevolución entre el parásito y su huésped (Subbotin, 1993). Al eclosionar, el segundo estadio juvenil o estadio infectivo (J2), puede codificar genes de proteínas dentro de sus glándulas subventrales (Hussey, 1989). La mayoría de las secreciones de las glándulas subventrales están compuestas de enzimas degradadoras de pared celular como amilasas, pectinasas, invertasas y celulasas entre otros, que facilitan la invasión de raíces, (Jasmer *et al.*, 2003) otras proteínas de parasitismo sintetizadas en las glándulas subventrales, provocando la formación de las células de alimentación (Lambert *et al.*, 1999; Ding *et al.*, 1998; Ding *et al.*, 2000; Gao *et al.*; 2001; Gao *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2003).

En general los grupos más importantes de nematodos provocan la formación de sincitios o la formación de células gigantes. Células gigantes y sincitios tienen varias características en común. En ambos tipos de células, hay un aumento en la actividad metabólica y la densidad citoplásmica, la gran vacuola central se reduce a varias vacuolas más pequeñas, orgánulos tales como mitocondrias, plástidos, retículo endoplasmático y dictiosomas proliferan, la hipertrofia células individuales, paredes celulares se engrosan, y la aparición de protuberancias a lo largo de las paredes adyacentes a los vasos del xilema, las cuales aumentan el área superficial de las células modificadas para una mayor absorción de solutos. Aunque la función de las dos tipos de células es igual, existen marcadas diferencias. En el caso de las células gigantes el aumento de protoplasma se logra mediante la ampliación de una sola célula

modificada, esta célula generalmente tiene un núcleo hipertrofiado. En la formación de células gigantes, la célula individuo que está siendo modificada por el nematodo se encuentra en una división continua del contenido celular (mitosis) sin embargo, no resulta en la citocinesis mientras, los sincitios son multicelulares, son unidades multinucleadas que se forman como resultado de la disolución parcial y fusión de protoplastos de células vecinas (Bird, 1961, 1972, 1973, Jones y Payne, 1978; Subbotin 1992)

Los nematodos formadores de quistes de los géneros *Heterodera*, *Globodera* y *Cactodera* tienen el potencial de inducir la formación de estas células modificadas de alimentación llamadas “sincitios”, estas células de alimentación inducidas por este grupo de nematodos, ha sido objeto de numerosas investigaciones anatómicas (Endo, 1986), pero los procesos de transferencia funcionales que se producen entre el huésped y el patógeno, siguen siendo un tema de especulación (Sijmons *et al.*, 1994). Los sincitios son estructuras especiales de alimentación dentro del cilindro vascular de las raíces hospederas. Dependiendo de la especie, los juveniles infectivos (J2), seleccionan una célula sincitial inicial, los J2 de *Globodera spp*, por lo general seleccionan células de la corteza interna o las células endodérmicas, (Sobczak *et al.*, 2005; Lozano-Torres *et al.*; 2012), y en el caso de *H. schachtii* (Golinowski *et al.*, 1996; Sobczak *et al.*, 1999), las células del cambium o del procambium. De estas células se desarrolla un sincitio por la integración de las células vecinas. Durante este proceso se producen profundos cambios anatómicos. El nematodo es totalmente dependiente de la expansión de sincitios y retira nutrientes de estos a través de un tubo de alimentación, una estructura tubular unida al orificio del estilete que penetra profundamente en el

citoplasma del sincitio (Wyss, 1992). El J2 penetra en la raíz preferentemente en la zona de elongación o diferenciación. Los juveniles migran intracelularmente hacia el cilindro vascular. Se ha observado que prefieren células radicales no diferenciadas como punto de partida para la inducción de la modificación celular para su alimentación (Magnusson y Golinowski, 1991). Muy temprano en el desarrollo de estos sitios especializados de alimentación, se inician con la ruptura de la pared celular se produce un gradual fusión de plasmodesmos; más tarde, grandes aberturas se crean sin la participación de estos puentes de citoplasma naturales (Grundler *et al.*, 1998). La disolución progresiva de paredes celulares resulta en la expansión de la célula o sincitio de alimentación a lo largo de los vasos del xilema, los protoplastos se fusionan entre si resultando en un complejo celular multinucleado hipertrofiado, un sincitio puede incluir hasta 200 células (Jones, 1981).

La vacuola central de las células se sustituye por numerosas vacuolas pequeñas, secundarias y el citoplasma denso contiene numerosos organelos y núcleos grandes. Además se forman protuberancias extensas de la pared celular que están en contacto cercano con elementos del xilema. Estas protuberancias amplían en gran medida la superficie de la membrana plasmática, facilitando de ese modo el movimiento de los fotosintatos de forma masiva y eficiente. La célula de alimentación hipertrófica está rodeada por una pared celular engrosada para resistir la presión osmótica que puede llegar a 9.000 a 10.000 hPa (Jones y Northcote, 1972; Böckenhoff y Grundler, 1994)

Un estudio realizado por Böckenhoff *et al.* (1993) muestra claramente que los nematodos enquistadores pueden fomentar la acumulación de solutos derivados de

floema, en el sincitio actuando como un reservorio importante para los compuestos a base de carbono antes de su absorción por el nematodo.

4.2.3 Alimentación y desarrollo de nematodos formadores de quiste

La alimentación de estos nematodos, causa daños severos en el tejido vascular de la raíces y es manifestado por necrosis de las células, al llegar al tejido parenquimatoso éstos se detienen en el lugar y empiezan a alimentarse.

La hembra se adhiere y alimenta cerca del cilindro vascular, dando origen a unidades multinucleadas denominadas sincitios, cerca de la cabeza del nematodo, las que se forman por incorporación de un conjunto de las células adyacentes cuyas paredes se han disuelto. La formación del sincitio ocasiona una interrupción de los vasos cribosos y leñosos limitando notablemente la funcionalidad de las raíces. Las plantas que son atacadas por los nematodos enquistadores generalmente presentan crecimiento y rendimiento suprimidos, las hojas presentan un ligero amarillamiento y muchas veces se confunden estas síntomas por la falta de nutrientes especialmente el Nitrógeno (Kort, 1972)

La presencia de nematodos enquistados causa la reducción fotosintética por la desviación de los fotosintatos del floema y el agua del xilema hacia el sincitio, los cuales posteriormente forman los nutrimentos de estos nematodos. Otro síntoma notable es el incremento de la materia seca de las raíces, reducción del tamaño del tallo y de las hojas. Las altas densidades del nematodo reducen el rendimiento y la reducción del crecimiento de la planta, es causada por una reducción de la absorción, incrementando el contenido de materia seca, la necrosis del follaje y la muerte

temprana del mismo. El decremento de agua absorbida por las plantas altamente infestadas por el nematodo, es debido al mal funcionamiento del sistema radicular, se tiene como consecuencia el desprendimiento de las hojas. Finalmente la muerte ocurre cuando el nivel de agua continua decreciendo y se prolonga la resistencia estomática (Evans y Trudgill, 1992). Los daños causados por estos nematodos son más graves en suelos ligeros a moderados (Kort 1972). En 1971, en un estudio llevado a cabo por Meagher y Salas, demostraron que cuando un suelo presenta condiciones óptimas de humedad seguido por un periodo de sequía, el daño infligido por estos nematodos es más notable en las plantas.

4.2.4 Clasificación taxonómica de *Cactodera torreyanae* Cid del Prado y Subbotin, 2014

Clase: Nematoda

Subclase: Secernentea

Orden: Tylenchida

Suborden: Tylenchinae

Superfamilia: Tylenchoidea

Familia: Heteroderidae

Subfamilia Heteroderinae

Género: *Cactodera*

Especie: *torreyanae*

4.2.5 Características morfológicas de *Cactodera torreyanae*

Hembras blancas: Cuerpo ovalada o de forma de limón, el cono vulvar visible. La mayoría de las hembras blancas de esta especie son de color blanco perla. En el

extremo posterior de algunas hembras maduras se observó un saco gelatinoso que sobresale del cono vulvar, no tiene huevos. Anulación irregular. El estilete curvado ligeramente dorsal, con nódulos ligeramente dirigidos hacia atrás. Poro excretor situado en mismo nivel final del istmo. Los labios de la mayoría de las hembras con conos vulvares presentan labios que sobresalen ligeramente. Útero ovales o casi de forma esférica con pared gruesa.

Los quistes tienen forma de limón, de color café dorado a oscuro, con cono vulvar conspicuo. La vulva no se encuentra en una depresión. La superficie del quiste tiene un patrón de zigzag en la mitad del cuerpo y no son prominentes en la superficie del cono vulvar. Cono sin dentículos. El ano es un poro minuto y se encuentra en una pequeña depresión.

El segundo estadio (J2) tiene un cuerpo cilíndrico con la cola terminando en forma de punto de lápiz. Región cefálica ligeramente separada del cuerpo y con cuatro anillos. En vista frontal, el disco labial es ovalado a rodeado, con seis sectores, los seudolabios rectangulares, dos dorsales, dos pequeños labios laterales y dos ventrales. Los nódulos del estilete son redondeados. Campo lateral con cuatro líneas con aereolación parcial en las dos incisuras exteriores a lo largo del cuerpo. El poro excretor inmediatamente posterior a hemizonideo, o en algunos especímenes a tres anillos. El fasmidio es un poro diminuto a nivel del comienzo de la parte hialina de la cola. Los huevos presentan un corion liso, carecen de ornamentaciones.

LITERATURA CITADA

- Bird, A. F. (1961). The ultrastructure and histo.chemistry of a nematode-induced giant cell. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11:701-715.
- Bird, A. F. (1972). Cell wall breakdown during the formation of syncytia induced in plants by root-knot nematodes. *Int. J. Parasitol* 2: 431-432.
- Bird, A. F. (1972). Quantitative studies on the growth of syncytia induced in plants by root-knot nematodes. *Int. J. Parasitol* 2:157- 170.
- Bird, A. F. (1973). Observations on chromosomes and nucleoli in syncytia induced by *Meloidogyne javanica*. *Physiol. Plant Path.* 3:387-391,
- Bleve-Zacheo, T., and Zacheo, G. (1987).Cytological studies of the susceptible reaction of sugar beet roots to *Heterodera schachtii*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 30, 13–25. doi:10.1016/0885-5765(87)90079-8
- Böckenhoff A, Prior M, Florian M. W. Crundler, and Karl J. Oparka (1996). Induction of Phloem Unloading in *Arabidopsis thaliana* Roots by the Parasitic Nematode *Heterodera schachtii*. *Plant Physiol.* (1996) 112: 1421-1427
- Böckenhoff A., and Grundler, F. M. W. (1994). Studies on the nutrient uptake by the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* by *in situ* microinjection of fluorescent probes into the feeding structures in *Arabidopsi thaliana*. *Parasitology* 109:249-254.
- Calderón de Rzedowski G. y Rzedowski J. Eds. Flora Fanerogámica del Valle de México. (2005). Pp. 115-124, 2ª. Ed. Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro.

- Cid Del Prado Vera I. and Subbotin S.A. (2014) A new cyst nematode, *Cactodera torreyanae* sp. n. (Tylenchida: Heteroderidae), parasitising romerito, *Suaeda torreyana*, in Texcoco, Mexico. *Nematology* 00 (2013) 1-12
- Cronquist A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York, U.S.A.
- Davis, E.L. *et al.* (2000). Nematode parasitism genes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38, 365–396,
- De Almeida Engler, J., and Gheysen, G. (2013). Nematode-induced endo reduplication in plant host cells :why and how? *Mol. Plant Microbe Interact.* 26, 17–24. doi: 10.1094/MPMI-05-12 0128-CR
- Ding, X. *et al.* (1998). A secretory cellulose-binding protein cDNA cloned from the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). *Mol. Plant Microbe Interact.* 11, 952–959
- Ding, X. *et al.* (2000). Molecular cloning and characterisation of a venom allergin AG5-like cDNA from *Meloidogyne incognita*. *Int. J. Parasitol.* 30, 77–81
- Dorhout R, Gommers FJ, Kolloffel C (1993). Phloem transport of carboxyfluorescein through tomato roots infected with *Meloidogyne incognita*. *Physiol Mo1 Plant Pathol* 43:1-10
- Espinosa G., F. J. y J. Sarukhán, (1997). Manual de malezas del Valle de México. Claves, descripciones e ilustraciones. Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

- European Plant Protection Organization (EPPO) (1992). Distribution of *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*
- Ferren W., R., and H. Schenk J. (2004). *Suaeda* in: Flora of North America Editorial Committee Ed. Flora of North America, North of Mexico. Oxford University Press, New York. Vol. 4, pp. 390-398.
- Gao, B. *et al.* (2001) Molecular characterization and expression of two venom allergen-like secretory proteins from the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. Int. J. Parasitol. 31, 1617–1625
- Gao, B. *et al.* (2003) The parasitome of the phytonematode *Heterodera glycines*. Mol. Plant Microbe Interact. 16, 720–726
- Gheysen, G. and Fenoll, C. (2002) Gene expression in nematode feeding sites. Annu. Rev. Phytopathol. 40, 191–219
- Golinowski, W., Grundler, F. M. W., and Sobczak, M. (1996). Changes in the structure of *Arabidopsis thaliana* during female development of the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii*. Protoplasma 194, 103–116. doi: 10.1007/BF01273172
- Grundler, F. M. W., Sobczak, M., and Golinowski, W. (1998). Formation of wall openings in root cells of *Arabidopsis thaliana* following infection by the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii*. Eur. J. Plant Pathol. 104:545-551.
- Heklau H., P. Gasson, F. Schweingruber and P. Baas. (2012). Wood anatomy of *Chenopodiaceae* (*Amaranthaceae* s.l.) IAWA J. 33: 205–232.

- Hewezi, T., and Baum, T.J. (2013). Manipulation of plant cells by cyst and root-knot nematode effectors Mol. Plant Microbe Interact. 26, 9–16. doi: 10.1094/MPMI-05-12-0106-FI
- Huang, G. *et al.* (2003). A profile of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Mol. Plant Microbe Interact. 16, 376–381
- Hussey, R.S. (1989). Disease-inducing secretions of plant parasitic nematodes. Annu. Rev. Phytopathol. 27, 123–141
- Hussey, R.S. and Grundler, F.M.W. (1998). Nematode parasitism of plants. In Physiology and Biochemistry of Free-Living and Plant- Parasitic Nematodes (Perry, R.N. and Wright, D.J., eds), pp. 213–243, CAB International Press Davis, E.L. *et al.* (2000) Nematode parasitism genes. Annu. Rev. Phytopathol. 38, 365–396
- Hussey, R.S., Davis, E L.; Baum T. J. (2002). Secrets in secretions: genes that control nematode parasitism of plants. Braz. J. Plant Physiol. 14, 183–194
- Jasmer DP, Goverse A, Smart G (2003) Parasitic nematode interactions with mammals and plants. Annu Rev Phytopathol 41: 245–270
- Jaubert, S., Laffaire J.B., Abad P. and Rosso M.N. (2002). A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. FEBS Lett. 522, 109–112
- Jones M. G. K. and Payne H. L. (1978). Early Stages of Nematode-induced Giant-cell formation in roots of *Impatiens balsamina*. Journal Nematology, Volume 10, No. 1. January 1978

- Jones, M. G. K. (1981). The development and function of plant cells modified by endoparasitic nematodes. Pages 255-279 in: Plant Parasitic Nematodes, Vol. III. B. M. Zuckerman and R. A. Rohde, eds. Academic Press, New York, U.S.A
- Jones, M. G. K., and Northcote, D. H. (1972). Nematode-induced syncytium A multinucleate transfer cell. *J. Cell Sci.* 10:789-809.
- Kort, J . (1972). nematode disease of cereals of temperate climates. Pages 97-126. In economic nematology. Ed webster , J.M 1972. Academic Press, London .
- Lambert, K.N. *et al.* (1999) Cloning and characterization of an esophageal-gland-specific chorismate mutase from the phytoparasitic nematode *Meloidogyne javanica*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12, 328–336
- Lozano-Torres, J. L., Wilbers, R. H. P., Gawronski, P., Boshoven, J. C. ,Finkers-Tomczak, A., Cordewener, J .H .G. (2012). Dual disease resistance mediated by the immune receptor C f- 2 in tomato requires a common virulence target of a fungus and a nematode. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 109, 10119–10124. doi:10.1073/pnas.1202867109
- Magnusson, C., and Golinowski, W. (1991). Ultrastructural relationships of the developing syncytium induced by *Heterodera schachtii* (Nematoda) in root tissues of rape. *Can. J. Bot.* 69: 44-52
- Meagher, J.W. (1972). Cereal cyst nematode (*Heterodera avenae* Woll) . studies on ecology and content in Victoria. Technical bulletin 24. Department of agriculture , Victoria.

- Meagher, J.W. and Chambers S.C. (1971). Pathogenic effects of *Heterodera avenae* and *Rhizoctonia soloni* and their interaction on wheat. Australian Journal of Agricultural Research. 22:89-194
- México Produce. (2013) Romeritos, protagonistas de la comida decembrina. <http://www.mexicoproduce.mx/articulos/romeritos.html> (consultado en enero de 2014).
- Noguez-Hernández R., Carballo-Carballo A., Flores-Olvera E. H., (2013). *Suaeda edulis* (Chenopodiaceae), una nueva especie de lagos salinos del centro de México. Florística y taxonomía. Botanical Sciences 91 (1): 19-25, 2013.
- Popeijus, H.E. *et al.* (2000). Degradation of plant cell walls by nematodes. Nature 406, 36–37
- Reed C.F. (1979). Chenopodiaceae. En: Correll D.S. y Johnston M.C. Eds. Manual of the Vascular Plants of Texas, pp. 527-551, Texas Research Foundation, Austin.
- Riggs, R.D. (1977). Worldwide distribution of the soybean cyst nematode and its economic importance. Journal of Nematology 9, 34-39.
- Rzedowski J. (1978). La Vegetación de México. Limusa, México, D.F
- Sasser, J.N. and Freckman, D.W. (1987) A world perspective on nematology: the role of the society. In Vistas on Nematology (Veech, J.A. and Dickerson, D.W., Eds). Hyattsville, USA: Society of Nematologists, pp. 7-14.
- Schmidt, A. (1871). *Heterodera schachtii* (A.S) Zoological version. 21, 1-19

- Schütze P., Freitag H. and Weising K. (2003). An integrated molecular and morphological study of the subfamily Suaedoideae Ulbr. (Chenopodiaceae). *Plant Systematics and Evolution* 239: 257-286.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2012). Anuarios estadísticos de la producción agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). México, D. F. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx> (consultado en enero de 2014).
- Sijmons PC, Grundler FMW, Von Mende N, Burrows PR, Wyss U (1991) *Arabidopsis thaliana* as a new model host for plantparasitic nematodes. *Plant J* 1: 245-254
- Sijmons, P.C. *et al.* (1994) Parasitic strategies of root nematodes and associated host cell responses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32, 235–259
- Sobczak, M., Golinowski, W.A., and Grundler, F. M. W.(1999). Ultra structure of Feeding plug sand feeding tubes formed by *Heterodera schachtii*. *Nematology* 1, 363–374. doi:10.1163/156854199508351
- Sobczak, M., Avrova ,A., Jupowicz, J., Phillips, M. S., Ernst, K., and Kumar, A. (2005). Characterization of susceptibility and resistance responses to potato cyst Nematode (*Globodera spp.*) infection of tomato lines in the absence and presence of the broad-spectrum nematode resistance Hero gene *Mol Plant Microbe. Interact.* 18, 158–168. doi:10.1094/MPMI-18-0158
- Spears, J. F. 1968. The Golden nematode handbook USDA Agric. Handbook. 353. U.S Government Print Office, Washington D. C.

- Subbotin, S.A. (1992) Evolution of modified food cells induced by sedentary nematodes in plant roots. *Russian Journal of Nematology*, 1993, 1, (1), 17-26
- Szakasits, D., Heinen, P., Wiczorek, K., Hofmann, J., Wagner, F., Kreil, D. P., *et al.* (2009). The transcriptome of syncytia induced by the cyst nematode *Heterodera schachtii* in *Arabidopsis* roots. *Plant J.* 57, 771–784. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03727.x
- Villaseñor R., J. L. y. Espinosa F. J. G., (1998). Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Watson, L. & Dallwitz, M. J. (1994). The Families of Flowering Plants. *Nordic Journal of Botany* Volume 14, Issue 5, page 486, December 1994. DOI:10.1111/j.1756-1051.1994.tb00638.x
- Wouts, W.M and Baldwin, J.G. (1998). Taxonomy and Identification. Pages 83-122, in *The Cyst Nematodes*. Edited by S.B Sharma. Published in 1998 by Chapman and Hall, London. ISBN 0 412 75530 0
- Wyss, U. (1992). Observations on the feeding behavior of *Heterodera schachtii* throughout development, including events during moulting. *Fund. Appl. Nematol.* 15, 75–89.
- Wyss, U., and Zunke, U. (1986). Observations on the behavior of second stage juveniles of *Heterodera schachtii* inside host roots. *Rev. Nématol.* 9, 153–165.

Zhu G., L., Mosyankin S L. and. Clemants S E. (2003). Chenopodiaceae. In: Wu Z., Y., P. Raven H. (eds) Flora of China. Science Press, Beijing, 5: 354–414. Calderón de Rzedowski G. 2001. Chenopodiaceae. Jones M. G. K. and Payne H. L. (1978). Early Stages of Nematode-induced Giant-cell formation in roots of *Impatiens balsamina*. Journal Nematology, Volume 10, No. 1. January 1978

CAPITULO I

SITIOS DE ALIMENTACIÓN FORMADAS POR *Cactodera torreyanae* EN LAS RAÍCES DE SU HOSPEDANTE *Suaeda edulis*

RESUMEN

La familia de Heteroderidae es una familia que contiene los nematodos formadores de quiste, dentro de esta misma familia se encuentra el género *Cactodera*, un grupos de nematodos que generalmente parasitan principalmente plantas miembros de Cactaceae, Chenopodiaceae, Amaranthaceae (Stoyanov, 1972, 1973; Paneque y Sampedro, 1986; Evans y Rowe, 1998;). La finalidad de este estudio es conocer qué tipo de modificaciones que *C. torreyanae* provoca en las células de las raíces de su hospedante *S. edulis*. La colecta de raíces de *S. edulis* infectadas por las hembras bancas y J2-avanzados del nematodo, fueron colectadas en Montecillos, durante la primavera, en el año 2014, en los campos experimentales con alta salinidad, del Colegio de Posgraduados. Después de procesar y observarlos los tejidos se determinó que este nematodo provoca cambios estructurales en las células del haz del floema; formando sincitios irregulares a partir de las células parenquimatosas del floema o de los mismos tubos cribosos; con células hipertróficas, núcleos hipertróficos amorfos y citoplasma denso y granuloso; también a nivel de pared celular *C. torreyanae* estimuló, la disolución y engrosamiento de las paredes celulares de las células que forman el sincitio. Los sincitios formados son irregulares en forma y tamaño: perímetro 0.427 - 1.748(0.784±0.430) mm; área en 0.012 - 0.105 mm² (0.032±0.026)

Palabras Claves: *Cactodera torreyanae*, *Suaeda edulis*, sincitio

1.1 INTRODUCCIÓN

Los nematodos de las familias Heteroderidae, Hoplolaimidae, Paratylenchidae, Tylenchulidae, Sphaeronematidae, Rotylenchulidae y Nacobbiidae entre otros han desarrollado la capacidad para inducir cambios morfológicos en las células de su hospedante para formar sitios especiales de alimentación. Los mecanismos usados por los diferentes nematodos para provocar estos cambios en las células hospedadoras varían según la especie, pero en términos funcionales los resultados finales son similares, o sea, estas células modificadas están adaptados para almacenar nutrientes desde el sistema vascular de las plantas huéspedes, y a su vez estos nutrientes se ingieren por los nematodos (Jones 1981). Las exigencias impuestas sobre las plantas por los nematodos deben estar bien equilibradas con las propiedades metabólicas y de transporte de las células modificadas: si este proceso, está dañado los nematodos morirán, ya que estas células modificadas son las únicas fuentes de nutrientes para el nematodo durante toda su vida (Bohlmann y Sobczak, 2014)

Estas células modificadas especializadas causadas por nematodos están formadas de células patológicas de la raíz de la planta y se convierten en mediador trófico entre los nematodos y plantas. Las células modificadas se caracterizan por un núcleo ameboideo de mayor tamaño con nucléolos hipertrofiados, numerosos orgánulos citoplasmáticos: mitocondrias, plástidos, un aumento en membranas de retículo endoplasmático, y los dictiosomas también en el desarrollo del sincitio, las vacuolas grandes se perdieron, estos cambios provocan una alta actividad metabólica del protoplasto, la síntesis intensiva y el transporte de los nutrientes de los tejidos adyacentes a las células modificadas, en lugares donde se observan contacto entre el sincitio y los tejidos del

sistema vascular, hay crecimiento de proyecciones de la pared celular hacia el xilema (Jones, y Northcote, 1972; Subbotin, 1992; Golinowski et al, 1996; Siddiqi et al, 2012))

En función del género del nematodo estas modificaciones comienzan generalmente con una célula llamada ISC (Initial Syncytial Cell), la célula sincicial inicial que normalmente se encuentra en la corteza interior, las células de la epidermis, el cambium o las células procambium dentro del cilindro vascular (Golinowski *et al*, 1996;. Sobczak, 1999; Sobczak et al 2005; Lozano Torres et al, 2012;)

Una vez que la célula inicial se ha modificado, más células se incorporan en el sincitio por la disolución de la pared celular, causada por la actividad de las enzimas que provocan un debilitamiento en los enlaces de hidrógeno entre los polisacáridos de la pared celular, hasta que cientos de células se unen (McQueen-Mason y Cosgrove , 1994).

1.2 MATERIALES Y METODOS

1.2.1 Material vegetal utilizado

Se colectaron raíces de *Suaeda edulis* infectadas con hembras blancas del nematodo *C. torreyanae* de forma natural y plantas obtenidas a partir de semillas también se establecieron de forma natural en el campo.



Figura: 1.1 Área de trabajo, Colegio de Postgraduados Campus Montecillos



A



B



C



D



E



Figura 1.2. A-F. Partes de la planta de *S. edulis* planta hospedante de *C. torreyanae*.

A) Hojas; B y C) La inflorescencia; D) Semillas; E) Plantas creciendo en su hábitat natural;

F) Raíz de la planta.

1.2.2 Cortes histológicos de las raíces.

Para realizar los cortes histológicos, se utilizaron raíces con hembras blancas jóvenes y maduras de *C. torreyanae* colectados en el área experimental ubicada en el Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, con las coordenadas latitud 19.46339, y longitud -98.90476 y a una altura de 2286 msnm, se colectaron muestras de suelo una vez cada semana y de raíces cada 7 días durante un mes la primera repetición, y cada 5 días, durante la segunda repetición y cada 3 días en el último experimento, durante el periodo de Enero hasta Abril del 2014. Las raíces colectadas fueron fijadas en formol ácido acético (FAA) durante 48 horas.

Posteriormente el material fue deshidratado, aclarado e infiltrado en un cambiador automático de tejidos de la marca Tissue-Tek® Rotary Tissue Processor, durante cuatro horas en cada una de las siguientes soluciones:

1. Etanol 50%
2. Etanol 70%
3. Etanol 95%
4. Etanol al 100%, tres cambios
5. Etanol-Xilol 50:50
6. Xilol al 100%, tres cambios
7. Parafina, dos cambios

Posteriormente los tejidos se incluyeron en parafina de marca Merck. Se hicieron cortes longitudinales y transversales con el micrótopo de rotación a 10 y 8 micras y montados en portaobjetos con adhesivo de Haupt en serie.

Posteriormente, la parafina de los cortes se removió con los siguientes reactivos:

1. Xilol al 100%, dos cambios
2. Etanol al 100%, dos cambios
3. Etanol al 95%
4. Etanol al 70%
5. Etanol al 50%

A continuación los cortes se tiñeron con safranina al 1.0% durante 24 horas, después se deshidrataron con los siguientes reactivos:

1. Etanol al 50%
2. Etanol al 70%
3. Se contrastaron con verde rápido al 0.03% en etanol al 95% durante 5 segundos
4. Se lavaron con etanol al 100%, dos cambios
5. Xilol al 100%, dos cambios.

Finalmente fueron montados con resina sintética y colocada sobre una platina de calentamiento para secarlos durante cinco días, después, se observaron al microscopio compuesto de marca American Optical Company, Spencer.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Características del Suelo

Las características del suelo donde se desarrolla el nematodo y las plantas de romerito se observen en el cuadro 1.1.

Cuadro 1.1 Resultados de análisis suelos realizados a una muestra procedente de los campos del Colegio de Postgraduados en Montecillos

Determinación	Valor Analítico	Unidades	Determinación	Valor Analítico	Unidades
N (total)	0.075	%	DA	1.46	g.cm-3
Mo	1.15	%	CE	18.33	dS.m-1
CaCO3	2.24	%	Arena	46.8	
Na	690	Mg.kg-1	Limo	22.0	%
K	90	Mg.kg-1	Arcilla	31.2	%
Ca	125	Mg.kg-1	CT	Franco Arcillo Arenoso	-
Mg	40	Mg.kg-1	CC	28.9	%
			PMP	17.6	%

(DA: Densidad Aparente; CE: Conductividad Eléctrica; CT: Clase Textural; CC: Capacidad del Campo; PMP: Punto de Marchitez Permanente)

1.3.2 Descripción de los tejidos sanos de romerito.

En cortes transversales de raíces sanas con crecimiento primario Figura: 1.3 se observa una epidermis uniestratificada de células parenquimatosas de forma isodiamétrica, sin espacios intercelulares entre ellas con cutícula delgada. La corteza presenta seis estratos de células parenquimatosas con grandes espacios intercelulares. La endodermis formada de células isodiamétricas sin espacios intercelulares, en el cilindro central se observa el periciclo dos haces vasculares de xilema lo mismo que de floema.

En crecimiento secundario en corte transversal Figura. 1.4 se observa una peridermis formada de células parenquimatosas originada por el felógeno, en la parte interna se

observa gran cantidad de haces vasculares formados por xilema, floema, fibras y parénquima de relleno. Estos tejidos son formados por un cambium vascular anómalo. Esto es para la raíz principal, las raíces secundarias y terciarias que están formadas de los mismos tejidos solo que estos se observan en menor proporción.

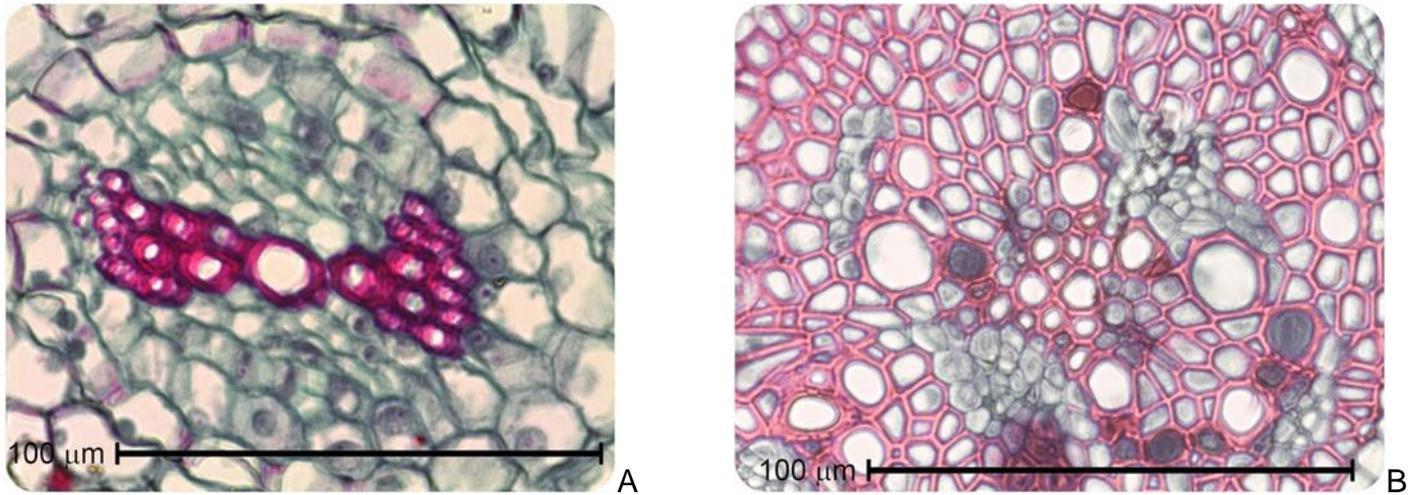


Figura: 1.3. A.) Corte transversal de una raíz sana primaria de *S. edulis*, B.)Corte transversal de una raíz secundaria sana de *S. edulis*

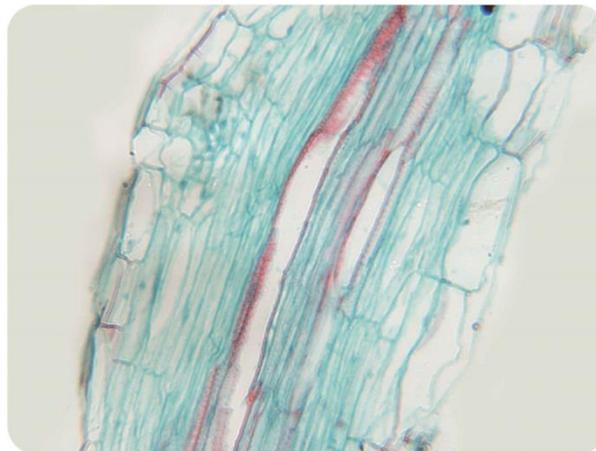
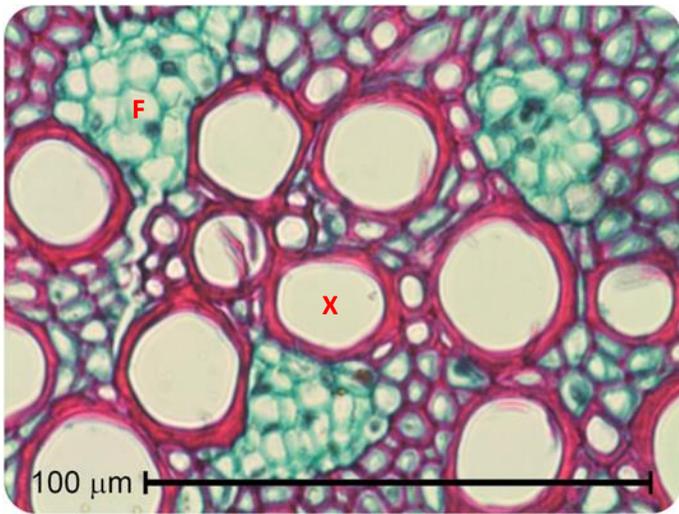


Figura: 1.4 Corte longitudinal de un raíz sana de *S. edulis*,

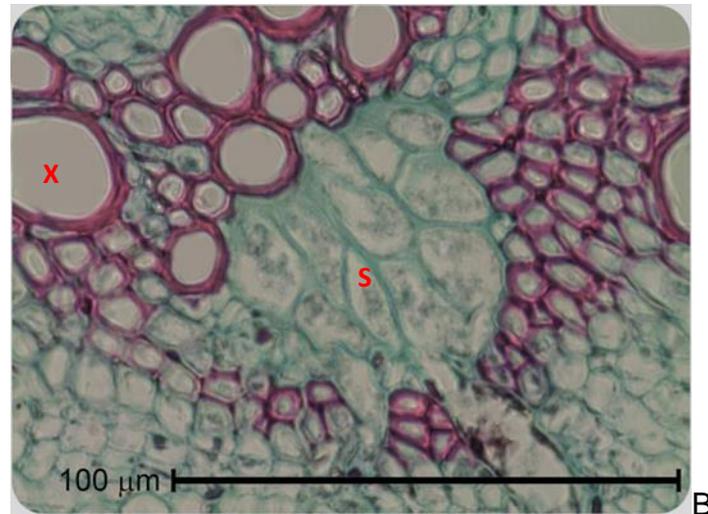
1.3.3 Descripción de las anomalías anatómicas.

En primer lugar se observa al nematodo adherido a las raíces (Figura 1.5 E y F) en una etapa de su ciclo en donde penetra parcialmente a través de la epidermis y corteza, en busca del haz vascular del floema. Causando daño a las células parenquimatosas ya que estas muestran necrosis y colapsa mientras al ir penetrando en busca de los haces vasculares del floema (Figura 1.5 A). Las células parenquimatosas del haz del floema en crecimiento primario muestran hiperplasia (Figuras 1.5 B y C) no observando formación de sincitios en floema secundario. El xilema, y fibras no son dañados. La absorción de nutrimento lo hace en las células del parénquima y tubos cribosos del floema primario, induciendo a la formación de células de gran tamaño con abundante citoplasma y núcleos prominentes (Figura 1.5 B). Posteriormente estas células pierden sus paredes celulares formando huecos que interrumpen al haz vascular del floema primario, de tal manera que el sincitio está bien delimitado (Figura 1.5 D), posiblemente estas células son las que transfieren los fotosintatos al sincitio, que el nematodo utiliza para alimentarse. En estos sincitios el haz vascular no es afectado totalmente ya que algunos tubos cribosos pasan a lo largo del sincitio. Los elementos cribosos inferiores al sincitio se mantienen en buen estado, posiblemente los fotosintatos nuevamente sean translocados del sincitio a los tubos cribosos inferiores. Las células de menor tamaño próximas al sincitio sean las encargadas de la translocación de los fotosintatos. El número de sincitios formados en las raíces dependerá de la incidencia del nematodo. Posiblemente estas alteraciones anatómicas inducidas* son una respuesta de la planta a dicha invasión del nematodo, (Figura 1.5 H), estas células muestran un citoplasma denso (Figuras 1.5 I y J). El xilema, las fibras y el tejido parenquimatoso de relleno, no

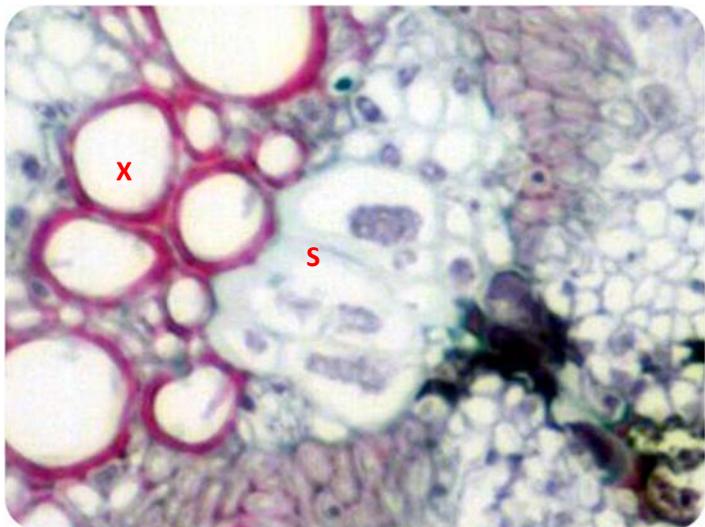
son dañados. Al conjunto de estas células les llamaremos sincitios formados por dos o más células en hiperplasia, (Figuras 1.5 B y C). Las dimensiones de éstas células modificadas son: perímetro $0.427 - 1.748(0.784 \pm 0.430)$ mm; área en mm^2 $0.012 - 0.105(0.032 \pm 0.026)$. Los tubos cribosos próximos a los nematodos, muestran un protoplasma denso (Figura 1.5 I). Los nematodos tienen preferencia por los haces vasculares de floema primario (Figura 1.5 A).



A



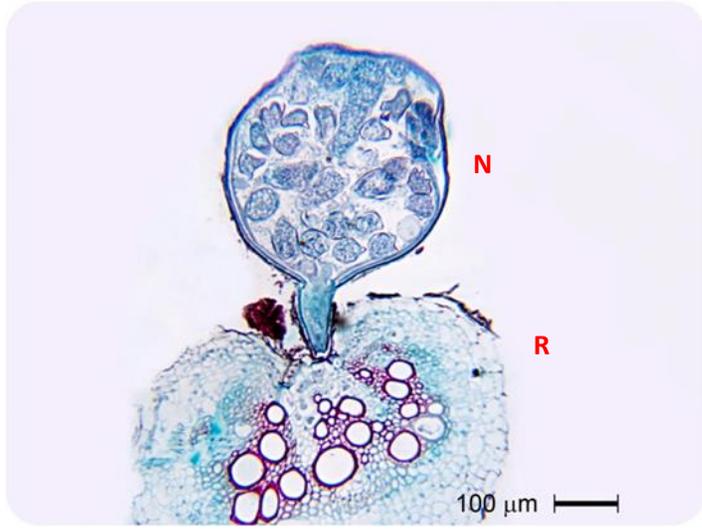
B



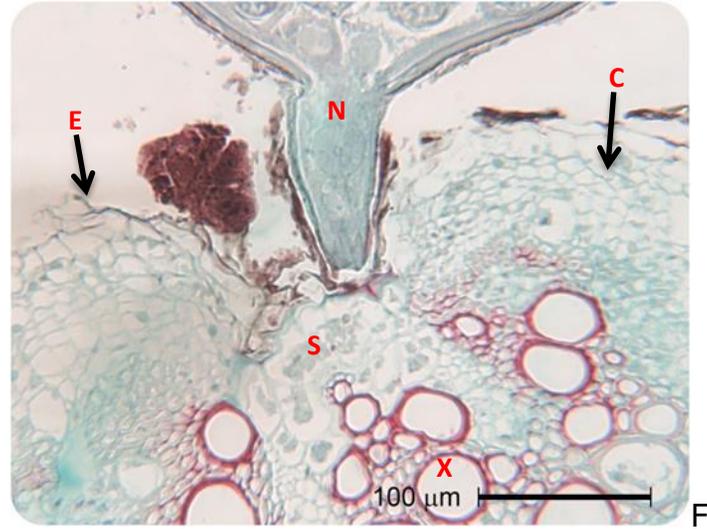
C



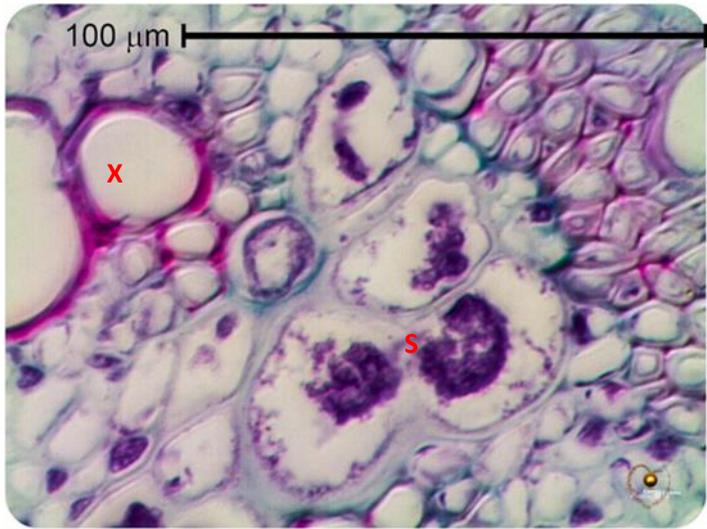
D



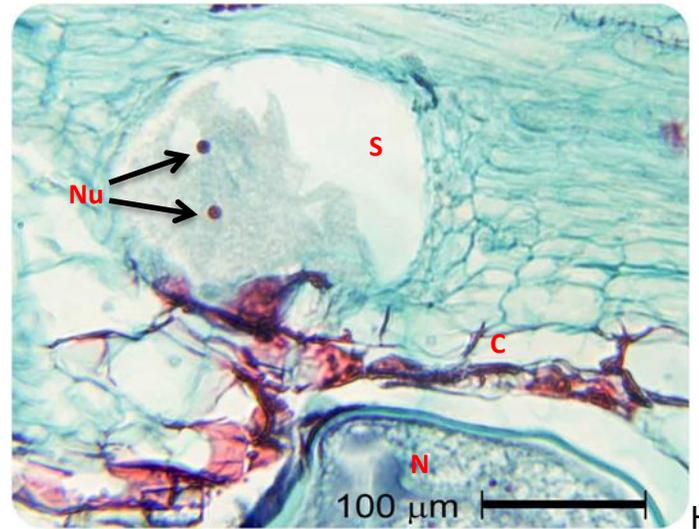
E



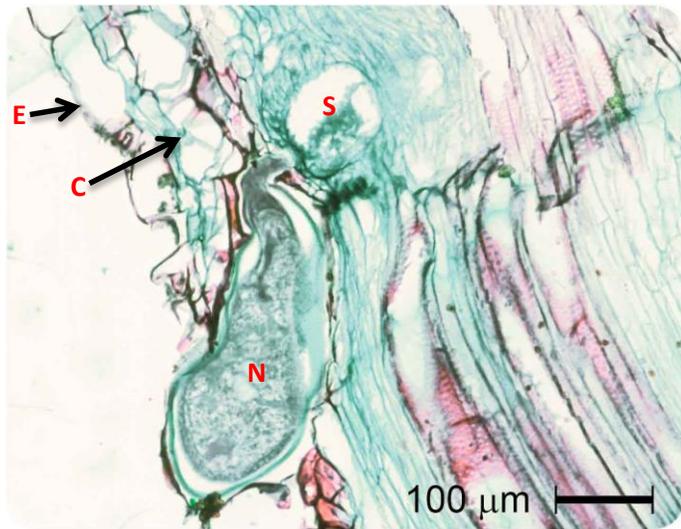
F



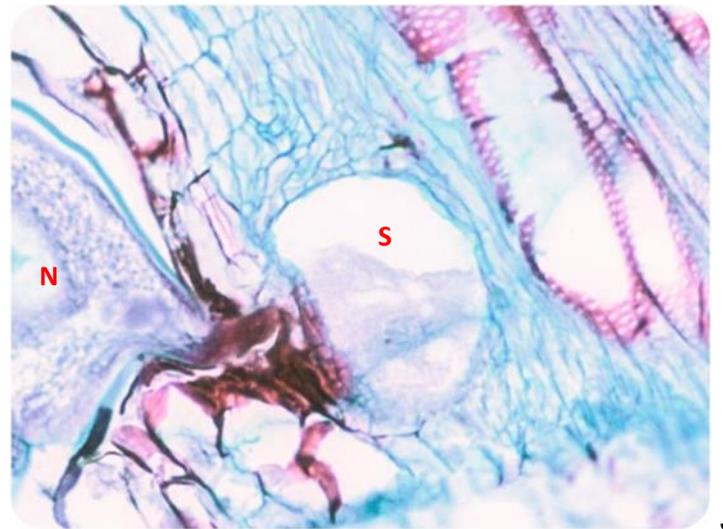
G



H



I



J

Figura: 1.5 A Corte transversal de raíz de *S. edulis* sana; b células en hiperplasia; C Células en hiperplasia con paredes disolviendo y núcleos amorfos; D Nematodo próximo al sincitio; e y f Nematodo dentro de la epidermis y corteza; G Disolución de paredes celulares en hiperplasia; H Nematodo próximo al sincitio, mostrando necrosis de la corteza; I Nematodo próximo a la raíz mostrando citoplasma denso y granuloso de las células de los tubos cribosos y J nematodo alimentándose del sincitio

1.4 DISCUSIÓN

Los resultados indican en raíces sana (testigo) en cortes transversales y longitudinales no presentan daño en las células de la corteza tampoco en el tejido vascular de raíces con crecimiento primario y en crecimiento secundario. Sin embargo en los cortes transversales y longitudinales de las raíces infectadas con *C. torreyanae* se observó en una necrosis severa al nivel de la epidermis y también en las células de la corteza por penetración del nematodo en busca de los haces del floema primario, en cambio los haces de floema secundario en todas las observaciones observadas no se observó formación de sincitios (Figura 1.5 A). En las células que forman parte del haz vascular del floema se observa un área de células modificadas de mayor tamaño o en hipertrofia con núcleos más grandes a los de las células normales. Se observaron en algunos cortes, el desdoblamiento de paredes celulares fusionándose el citoplasma de varias de estas células modificadas, que después se tornó denso y granuloso y finalmente se forma un hueco grande que interrumpe parcialmente al haz del floema primario (Figuras 1.5 E, G, H). Estos cambios son similares a los que describen Hernández-López *et al.*, 2006 para *C. galinsogae*. De acuerdo con Hernández-López *et al* 2006, en los cortes longitudinales, los sincitios ocuparon principalmente células del cilindro vascular en su mayoría células parenquimatosas del floema. Las modificaciones antes mencionadas no se observaron en los testigos. En las raíces procesadas y examinadas bajo el microscopio, se observaron todos los estadios fuera de la raíz, ningún estadio entra por completo a las raíces. Conforme a la literatura Hernández-López *et al.* (2006), Baldwin y Bell (1985) y Suárez *et al.* (1985) los sincitios provocados por otros géneros de nematodos de esta familia, por lo general tuvieron forma irregular y tamaño variable.

Otra observación interesante es el aumento en el número de células pequeñas en los extremos del sincitio posiblemente las secreciones del nematodo inducen la división celular en estas zonas del sincitio, este aumento en el número de células pequeñas puede conducir un aumento en la tasa metabólica y con este aumento es muy probable que esto podría conducir la creación de una área de muy alta presión osmótica, y por tanto conduciendo el flujo de material (fotosintatos, agua y otros metabolitos) hacia estas células que más tarde dirigir su contenido hacia el sincitio, en concordancia con autores, (Itaya *et al.*, 1988; Puthoff *et al.*, 2003., 2005; Hammes *et al.*, 2005, Szakasits *et al.*, 2009) que concluyeron que el consumo de los fotosintatos por estos nematodos formadores de sincitios, provocan reordenaciones morfológicas extensas de las células de las plantas afectadas y por tanto sugieren el aumento de biosíntesis y la actividad metabólica vinculada a una alta demanda de energía.

Al ser interrumpido el haz vascular del floema observamos que no todos los elementos cribosos son afectados por la formación del sincitio o sitio de alimentación inducida por el nematodo, posiblemente estas modificaciones anatómicas sean una respuesta de la planta a su sobrevivencia sin decir que se trata de una coevolución como lo muestran algunos autores, en estos casos no se ve cuál es el beneficio de la planta por el nematodo *Cactodera torreyanae*.

1.5 CONCLUSIÓN

El nematodo *Cactodera torreyanae* al igual que otro miembro del genero *Cactodera* ya estudiado *C. galinsogae* Tovar-Soto *et al.* (2007), causa varios cambios anatómicos/histológicos en las células de los haces vasculares del floema de las raíces. Formación de sincitios multicelulares.

El nematodo *Cactodera torreyanae*, es selectivo de tejido. Solo modifica las células los haces vasculares del floema primario. Posiblemente. Aun formándose haces vasculares de floema secundario estos ya no son preferidos o atacados debido a la presencia de gran cantidad de fibras y de xilema secundario con paredes secundarias gruesas.

Al interrumpir o afectar al haz del floema no todos los tubos cribosos son afectados ya que algunos evaden al sincitio. Además si observamos los cortes longitudinales de la raíz los tubos cribosos inferiores al sincitio no son dañados.

LITERATURA CITADA

- Baldwin, G. J. and Bell, A. H. (1985). *Cactodera eremica* n. sp., *Afenestrata africana* (Luc, et al., 1973) n. gen., n. comb. and an emended diagnosis of *Sarisodera* Wouts and Sher, 1971. (Heteroderidae)". *Journal of Nematology*, 17:187-201.
- Bohlmann, H. and Sobczak, M. (2014). The plant cell wall in feeding sites of syst nematodes. *Frontieres in Plant Science*. March 2014, Vol 5. Article 5
- Evans, K., and J. A. Rowe. 1998. Distribution and economic importance. Pp. 1-30 in S. B. Sharma, Ed. *The Cyst Nematodes*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Golinowski, W., Grundler, F. M. W., and Sobczak, M. (1996). Changes in the structure of *Arabidopsis thaliana* during female development of the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *Protoplasma* 194, 103–116. doi: 10.1007/BF01273172
- Hammes, U.Z., Schachtman, D.P., Berg, R.H., Nielsen, E., Koch, W., McIntyre, L.M. and Taylor, C.G. (2005) Nematode-induced changes of transporter gene expression in *Arabidopsis* roots. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18, 1247–1257.
- Hernández-López, J., Tovar-Soto, A., Carvajal-Sandoval, A., Torres-Coronel, R. (2006) Alteraciones anatómicas inducidas por *Cactodera galinsogae* (Nemata: Heteroderinae) en miembros de Asteraceae Polibotánica, núm. 22, noviembre, 2006, pp. 1-8, Departamento de Botánica México
- Itaya, A., Woo, Y.-M., Masuta, C., Bao, Y., Nelson, R.S. and Ding, B. (1988) Developmental regulation of intercellular protein trafficking through plasmodesmata in tobacco leaf epidermis. *Plant Physiol.* 118, 373–385.

- Jones M. G. K. (1981). Host cell responses to endoparasitic nematode attack: structure and function of giant cells and syncytia. *Ann. appl. Biol.* (1981), 91, 353-312
- Jones, M. G. K. & Northcote, D. H. (1972). Nematode induced syncytium a multinucleate transfer cell. *Journal of Cell Science* 10, 789-809
- Lozano-Torres, J. L., Wilbers, R. H. P., Gawronski, P., Boshoven, J. C., Finkers-Tomczak, A., Cordewener, J. H. G., et al. (2012). Dual disease resistance mediated by the immune receptor Cf-2 in tomato requires a common virulence target of a fungus and a nematode. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 10119–10124. doi:10.1073/pnas.1202867109
- McQueen-Mason, S., and Cosgrove, D. J. (1994). Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 6574–6578. doi:10.1073/pnas.91.14.6574
- Paneque, M., y J. Sampedro. (1986). Reporte del nematodo cistogeno *Cactodera cacti* en la provincia de Holguin, Cuba. *Ciencia Técnica Agrícola* 9:123-129.
- Puthoff, D.P., Nettleton, D., Rodermel, S.R. and Baum, T.J. (2003) Arabidopsis gene expression changes during cyst nematode parasitism revealed by statistical analysis of microarray expression profiles. *Plant J.* 33, 911– 921.
- Siddiqi, S., Sobczak, M., Tenhaken, R., Grundler, F. M., and Bohlmann, H. (2012). Cell wall ingrowths in nematode induced syncytia require UGD2 and UGD3 *PLOS ONE* 7:e41515. doi:10.1371/journal.pone.0041515

- Sobczak, M., Avrova, A., Jupowicz, J., Phillips, M. S., Ernst, K., and Kumar, A. (2005). Characterization of susceptibility and resistance responses to potato cyst nematode (*Globodera spp.*) infection of tomato lines in the absence and presence of the broad-spectrum nematode resistance Hero gene. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18, 158–168. doi:10.1094/MPMI-18-0158
- Sobczak, M., Golinowski, W. A., and Grundler, F. M. W. (1999). Ultra structure of feeding plugs and feeding tubes formed by *Heterodera schachtii*. *Nematology* 1, 363–374. doi:10.1163/156854199508351
- Stoyanov, D. (1973). *Heterodera amaranthi* ciclo biológico, hospedantes y distribución. Serie Poeyana N° 111:1-17. Instituto de Zoología, Academia de Ciencias de Cuba.
- Suárez, Z., Sosa-Moss, C. and Inserra, N. R. (1985). Anatomical changes induced by *Punctodera chalconensis* in corn roots. *Journal of Nematology*, 17:242-244
- Subbotin, S.A. (1992) Evolution of modified food cells induced by sedentary nematodes in plant roots *Russian Journal of Nematology*, 1993, 1(1): 17-26
- Szakasits, D., Heinen, P., Wieczorek, K., Hofmann, J., Wagner, F., Kreil, D.P., Sykacek, P., Grundler, F.M.W. and Bohlmann, H. (2009). The transcriptome of syncytia induced by the cyst nematode *Heterodera schachtii* in *Arabidopsis* roots. *Plant J.* 57, 771–784.
- Tovar-Soto, A., Ignacio Cid del Prado-Vera, I., Margaret-Nicol, J., Evans, K., José Sandoval-Islas, S., Martínez-Garza, A y Cárdenas-Soriano, E. (2007) Anatomical changes on barley roots (*Hordeum vulgare L.*) induced by *Cactodera galinsogae*.

CAPÍTULO II

CICLO DE VIDA DE *Cactodera torreyanae*

RESUMEN

Se desconoce la biología de *C. torreyanae*; en este estudio el objetivo fue determinar el tiempo que requiere el nematodo para completar su ciclo de vida, su requerimiento de temperatura y describir los cambios morfológicos que ocurren en cada estadio del ciclo. Para cumplir con los objetivos, se obtuvieron plantas sanas de *S. edulis* a partir de semillas, las que posteriormente fueron trasplantadas en el sitio donde en forma natural se encuentra *C. torreyana* y su hospedante *S. edulis*. Se repitió tres veces el experimento, en el primer ensayo se muestreó cada siete días, en el segundo cada 5 y en el tercero y último ensayo cada dos días. Un data logger fue enterrado en el sitio durante el tiempo de los experimentos, para determinar a qué temperaturas se desarrolla el nematodo. Bajo las condiciones de campo, el diámetro del nematodo segundo estadio juvenil (J2) aumento el ancho del cuerpo tres días después de la eclosión de 50 μm a 63 μm , pasando del estadio J2 a segundo estadio avanzado (J2A), y siguió aumentando hasta que alcanzó la madurez; el tercer estadio (J3) se incrementó a 167 μm , el cuarto estadio (J4) a 371 μm y las hembras maduras a 663 μm de ancho, además se observó una gradual engrosamiento de la hipodermis y la exocutícula con cada muda o cambio de estadio. Las dos células centrales del primordio genital, muestran núcleos grandes en J2A. En el estadio juvenil (J3) el número de células aumentó dramáticamente a un clúster de más de 20 células y no fue posible diferenciar entre los machos y hembras en este estadio. Desde el tercer estadio, el

estilete sólido del J2, se reemplazó por un estilete delgado y flexible, también fue posible diferenciar claramente entre machos y hembras en el cuarto estadio (J4); la forma vermiforme del macho podría verse a través de la cutícula, mientras que las hembras mantuvieron su forma ovalada. La vulva de las hembras jóvenes en esta etapa fue notable aunque no estaba completamente formado el cono vulvar, y las células del primordio aumentaron a más de 100 células. En la región de la vulva se observó secreciones gelatinosas, también en el cuello de las hembras se observó secreciones de color amarillento, posiblemente secretadas por los anfidios o el poro excretor. Las primeras hembras jóvenes se detectaron a los 18 días, a los 320 días grado y a los 25 días a los 447 días grados se observaron hembras maduras con huevos y los primeros quistes. La temperatura media durante el desarrollo del nematodo fue 17 °C, la mínima de 16 °C la máxima de 20 °C.

Palabras Claves: *C. torreyanae*, ciclo de vida, días grado, temperatura

2.1 INTRODUCCION

2.1.1 Descripción de ciclo de vida de los nematodos formadores de quistes

Los nematodos de la familia Heteroderidae pasan la mayor parte de su vida dentro de la raíz de su hospedante (Williamson and Hussy, 1996). Según Wallace, 1955, la eclosión del segundo estadio juvenil (J2) del quiste es una respuesta a una serie de estimulantes externos, la temperatura, la humedad del suelo, y sobre todo en respuesta a los exudados de sus plantas hospederas como como en el caso del nematodo enquistador de la papa, *Globodera* spp. Al eclosionar los J2 con el uso de su estilete y enzimas (Golinowski et al., 1996; Goverse et al., 2000) penetran a las raíces (Bird y Kaloshian, 2003) donde se alimentan de las células de la raíz y dependiendo de género, el nematodo provoca la formación de células gigantes o sincitios. El nematodo pasa por dos estadios más, los juveniles J3 y el J4 hasta que el cuerpo hinchado de las hembras, rompe el tejido y salen afuera de las raíces de manera que las hembras adultas tienen la parte posterior del cuerpo expuesta en la superficie de la raíz, con la cabeza y el cuello incrustado en la raíz. Las hembras adultas son de color blanco o amarillo claro, conservan la mayor parte de los huevos dentro de sus cuerpos y algunos se producen una masa gelatinosa. Cuando las hembras están completamente maduras, o cuando se interrumpe su alimentación, la pared del cuerpo se somete a un proceso de curtido y cambia a un color café. En esta etapa el cuerpo de la hembra muerta con huevos retenidos dentro (entre 300 a 500 huevos) se le llama quiste. Los quistes se desprenden de la raíz y permanecen en el suelo, los huevos contenidos permanecen viables durante al menos 6 años, los machos adultos generalmente aparecen cuando hay hembras maduras, son atraídos por las feromonas secretadas

por las hembras (Thorne, 1923; Sabbotin y Franco, 2013). Los ciclos típicos de nematodos formadores de quistes se completan en aproximadamente en 30 días (Koenning y Sipes, 1988)

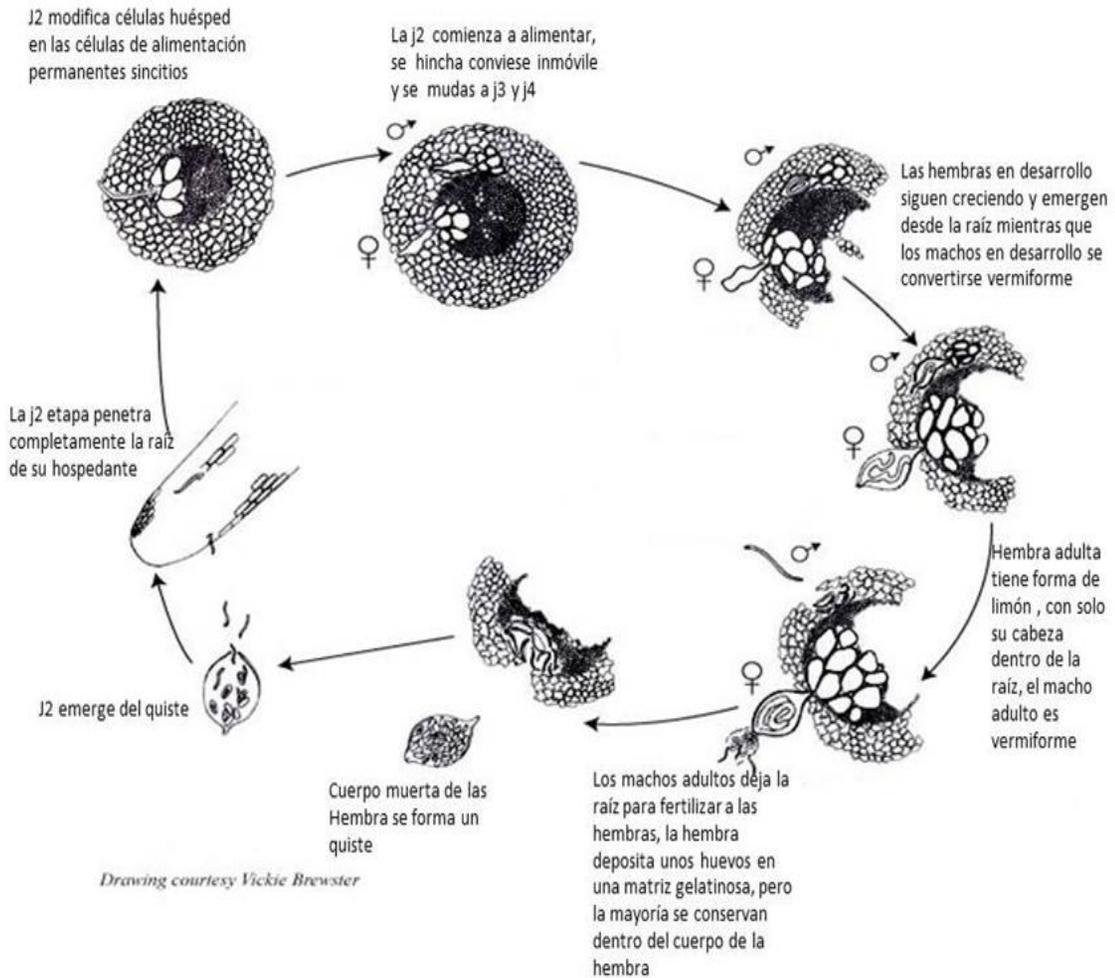


Figura 2.1 Ciclo de Vida de *Heterodera schachtii* , especie tipo de los formadores de quistes

Feunte: <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/Nematodes/PublishingImages/SoyCystNemadiscycle.jpg>

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Muestreo de suelo

En el área de estudio, se tomaron cinco muestras de suelo cada semana (1 kg cada/una, durante el transcurso del experimento de enero a mayo del año 2014. Las muestras se tomaron de los primeros 10 cm de profundidad, con pala recta, eliminando la materia orgánica superficial. Cada muestra se etiquetó con los datos de la fecha de la toma de la muestra. En el laboratorio, las muestras fueron procesadas para la extracción de nematodos con la metodología siguiente.

2.2.2 Extracción de los estadios J2 avanzados, J3 y J4 y machos del suelo

Se colocó la muestra de suelo en una jarra plástica y se llenó la jarra con agua. Utilizando otra jarra del mismo tamaño se homogenizó la mezcla de suelo y agua. Se pasó la mezcla desde una jarra a la otra hasta que se mezcló perfectamente. Se dejó reposar aproximadamente 45 segundos, luego se vertió la suspensión de agua y suelo en una cubeta, pasándola por un tamiz de 20 y después a solución que se obtuvo se pasó de la misma manera por un tamiz de 60, con el fin de eliminar piedras, restos de materia orgánica y partículas grandes presentes en el suelo.

El material colectado en la cubeta se re-suspendió y se dejó nuevamente en reposo por 45 segundos transcurrir nuevamente 45 segundos, posteriormente se pasó la suspensión por el tamiz de 100 mallas hacia otra cubeta y se eliminó el material retenido en dicho tamiz se eliminó

La suspensión de suelo que quedaba en la cubeta nuevamente se agitó y se repitió el punto anterior. La suspensión de suelo se pasó por los tamices de 200, 325 y 400 mallas. El material retenido en el tamiz de 400 mallas se colectó y se colocó en un frasco usando una piceta. Una vez que se colectó todo el material retenido en el tamiz de 400 mallas, este se distribuyó en tubos de centrifuga de 50 ml, y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min. Una vez transcurrido este tiempo, el sobrenadante de cada tubo se descartó y la fracción sedimentada se resuspendió en una solución de sacarosa de gravedad específica de 1.18° Boume y luego se centrifugó a 1500 rpm durante 50 segundos, el sobrenadante se colectó en un tamiz de 400 mallas y se lavó inmediatamente con agua para eliminar el exceso de azúcar.

Una vez que se enjuagó la muestra, esta se colectó en cajas de Petri de 10 ml con el fin de revisarla en el microscopio estereoscópico, una vez que se pescaron los diferentes estadios se preparó la muestra para el proceso de fijación, deshidratación y posteriormente montaje permanente.



A



Figura: 2.2 a) Muestras de suelo del área del experimento; b) Frascos con nematodos extraídos en formol 8%

2.2.3 Extracción de quistes mediante el Flotador de Fenwick

Se utilizó esta técnica para obtener quistes presentes en una muestra de suelo (Shepherd, 1986).

Primero se lavó bien el Flotador de Fenwick con agua corriente para eliminar la posibilidad de contaminación de muestras. Después el flotador se tapó en su parte inferior y se llenó, con agua hasta el borde. Posteriormente se colocó la muestra de suelo, previamente secada al ambiente, sobre un cernidor que se encuentra en la parte superior del flotador. En la salida del collar del flotador se colocaron los tamices de 20, 60 y de 100 mallas para recibir los quistes y la materia orgánica. La muestra de suelo se expuso a una corriente de agua hasta que esta se desbordó para que los quistes que flotaron se deslizaran hacia el cuello del aparato. El material que se retuvo en el en el tamiz de 100 mallas se colectó y se dejó secar a la sombra sobre papel filtro protegido de corrientes de aire. Una vez que se secó el material, se separaron los quistes de la materia orgánica usando un microscopio estereoscópico.

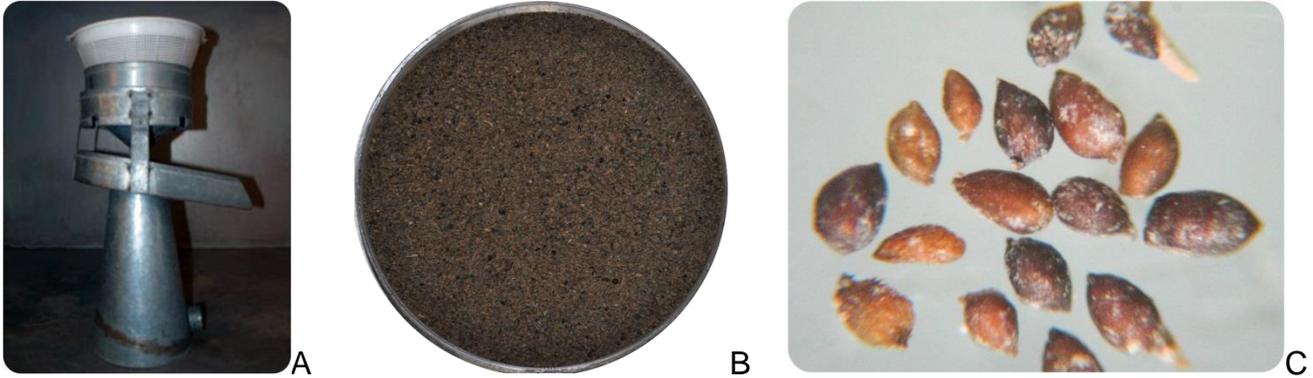


Figura: 2.3 A) Flotador de Fenwick B) Residuos con materia orgánica y quistes después del proceso de extracción por el método de Fenwick; C) Quistes separados

2.2.4 Material vegetal y desarrollo de los estadios juveniles

Para determinar y describir el ciclo de vida de esta especie de nematodo se utilizaron plantas de *Suaeda edulis*, las que se establecieron a partir de semillas. En cada orificio de un semillero se colocaron cinco semillas, se utilizaron dos semilleros por cada experimento, cada uno con 128 compartimentos. Se utilizó un sustrato estéril de peat moss para asegurar el establecimiento de plántulas sanas, las plantas germinaron cinco días después de la siembra y se regaron cada dos días y se fertilizaron cada cinco días con un fertilizante foliar 20:30:10 de la marca Macroflor Plus. Dos semanas después de la germinación de las plántulas se removieron tres plantas dejando las dos plantas más vigorosas. Cuando las plantas alcanzaron una altura de cinco centímetros se trasplantaron en la localidad tipo de *C. torreyanae*, sitio del campus Montecillo del Colegio de Postgraduados donde crece en forma natural *Sueada edulis* y el nematodo enquistador *C. torreyanae*. Una vez trasplantadas se enterró un data logger de la marca “El –USB-1” en el suelo junto con las plantas para registrar los cambios de la temperatura. El data logger se programó para tomar cuatro lecturas al día durante el transcurso del experimento. En el campo se regaron las plantas tres veces cada

semana. El experimento se repitió tres veces. En el primer ensayo de campo se sacaron 10 plantas cada siete días, en el segundo diez plantas cada cinco días y en el último ensayo 10 plantas cada tres días, al final de cada ensayo de campo se recuperó el data logger y se guardaron los datos

Una vez en el laboratorio las raíces se lavaron cuidadosamente para que no se desprendieran los nematodos, después se observaron bajo de un microscopio estereoscopio de marca Spencer para observar el desarrollo del nematodo.

Las raíces con los nematodos adheridos se cortaron y se fijaron en F.A.A., para luego realizar cortes histológicos de las raíces, y nematodos en los diferentes estadios se mataron en calor y se fijaron en formaldehído al 8% para luego deshidratar y montar los nematodos en preparaciones permanentes.

2.2.5 Fijación y deshidratación de nematodos.

Después de matar a los nematodos en un horno microondas por siete segundos a 50 °C, se fijaron en formaldehído al 8% por un tiempo mínimo de ocho días. Al cumplir los ocho días en el fijador se eliminó con una pipeta, la mayor parte del fijador y se agregó la “Solución A”, la cual es una mezcla de Etanol al 96%, 20 partes, glicerol una parte y agua destilada 79 partes. Las cajas Petri con los nematodos y la solución A, se colocaron dentro de una campana con etanol al 96%, las cuales posteriormente se colocaron en una estufa con una temperatura de 46°C, por 48 horas. Al cumplir los 48 horas en la campana con etanol, se eliminó cuidadosamente con una pipeta, el exceso de etanol, y se agregó la “Solución B” la cual es una mezcla de Etanol al 96%, 93 partes y glicerina siete partes, se colocaron nuevamente en la estufa pero esta vez sin

la campana con etanol, al cumplir 24 horas, se agregó la solución final, la “Solución C”, la cual es una mezcla de etanol al 96% 80 partes y glicerina 20 partes, de nuevo se colocaron las cajas de Petri con nematodos en la estufa por 24 horas y finalmente se agregó glicerina pura para terminar el proceso de deshidratación.

2.3 RESULTADOS

Después de proceso de extracción del suelo se encontró solamente los estadios J2, J2 avanzados (J2A) y machos. El J2 o el estadio infeccioso que sale del quiste, a diferencia de los demás J2 de la familia Heteroderidae, no penetra por completo las raíces, sin embargo se desarrolla todo su vida fuera de la raíz (Figura 2.6 A-F), la cabeza y el cuello del nematodo penetran las raíces jóvenes y se alimentan de las células parenquimatosas cerca de los haces vasculares. Al igual que los demás especies del género *Cactodera*, *C. torreyanae*, también provoca la formación de sincitios. El nematodo pasa por dos estadios más, el juvenil J3 y el juvenil J4 y a partir de este último estadio, se puede diferenciar los machos y las hembras (Figura 2.4 A-B). El cuerpo de las hembras sigue hinchado, sin embargo los machos empiezan a retomar su forma vermiforme, dentro de la muda del J4. Las hembras adultas, que son de color blanco, conservan todos sus huevos dentro de sus cuerpos. Las hembras jóvenes secretan una matriz gelatinosa (Fig. 2.6 E), la cual no contiene huevos. Cuando las hembras están completamente maduras, o cuando se interrumpe su alimentación, la pared del cuerpo se somete a un proceso de curtido y se vuelve de color café, formándose el quiste (Fig. 2.6 H).

El estilete del J2 y el J2A es robusto y sólido. El procorpus del J2 es estrecho y largo, el metacorpus es de forma oval y las glándulas esofágicas forman un largo lóbulo, la cola termina en punta de lápiz y tiene una porción hialina. Se puede ver las dos células primordiales. La cutícula, así como la hipodermis es muy delgada. Los cambios más sobresalientes del J2A se observan en ancho del cuerpo, de 49- 76(63 ± 31) μm vs 42- 58 (50 ± 1.9) μm , y el índice $a=$ de 17- 24(20 ± 0.7) vs 13- 21(16 ± 0.9) en el J2. Las glándulas esofágicas son también más anchas y el tamaño de las células del primordio genital son más prominentes, especialmente las dos células internas, cuyos núcleos son más grandes y más evidentes.

En los estadios J3, el ancho mide $164 \mu\text{m} \pm 12.9$ con un rango de 97-265 μm y el índice $a=$ 3-10 (6 ± 0.5) y en el J4 el ancho mide 277- 486 (371 ± 17) μm y el índice $a=$ 2-3. (2.7 ± 0.1). El estilete ya no es robusto y sólido, el cono es delgado y flexible, la procorpus se ensancha y se deforma, debido a la abundante producción de enzimas, que son necesarias para modificar las células de la planta de la que se alimenta el nematodo. El metacorpus es ahora muy evidente y más redondo (circular) ocupa una gran parte de la región del cuello; la porción hialina de la cola ya no está presente. Un grupo de cerca de 4-6 células grandes se encuentran en el extremo posterior de algunos de los J3, estas células posiblemente darán lugar a la vulva y la vagina. La cutícula y la hipodermis continúan engrosándose con cada muda.

En las hembras maduras el estilete es flexible y largo, el procorpus distorsionado, y en esta etapa el metacorpus es circular y ocupa la mayor parte o en algunos casos la totalidad de la región del cuello. La cutícula y la hipodermis son más gruesas y más visibles en este estadio que en los estadios anteriores. El ancho de las hembras adultas

en promedio es de $663 \mu\text{m} \pm 34.5$ con un rango de 486- 971 μm y el índice a ; 2.07 ± 0.1 , con un rango de 1.5- 2.6. La vulva en este estadio, está completamente formada y una sustancia gelatinosa es secretada por la vulva, principalmente por las hembras jóvenes, en ocasiones se observaron machos adultos 'atrapados' en esta matriz gelatinosa, también a nivel de la cabeza y cuello de las hembras jóvenes se observó un material gelatinoso de color amarillento (Figura 2.7)

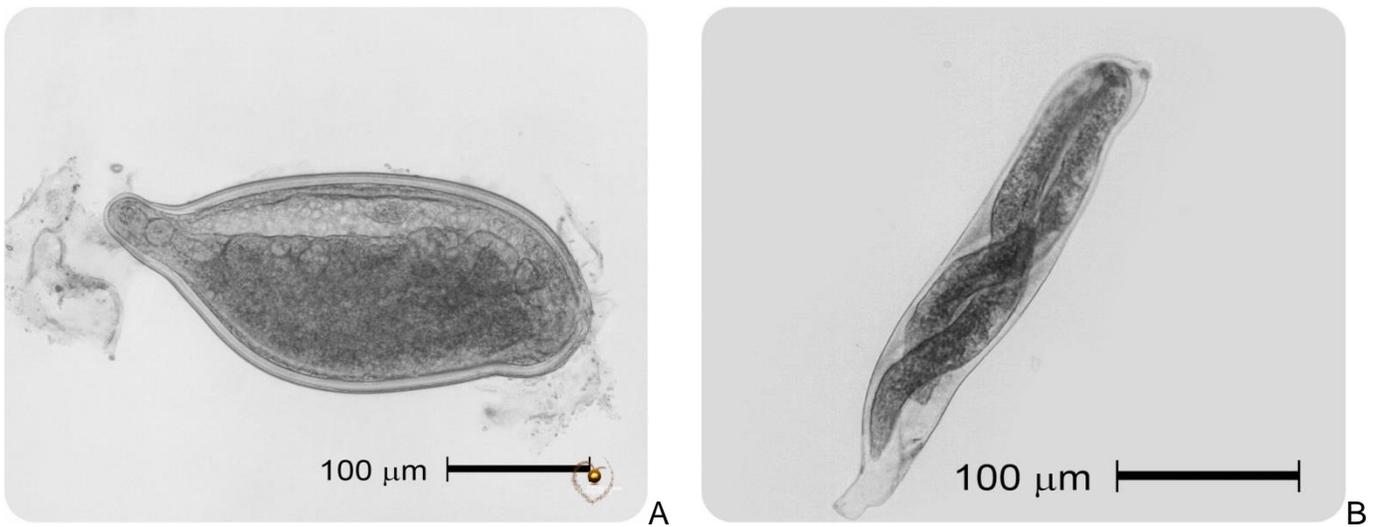


Figura: 2.4 A) J4 Hembra B) J4 Macho.

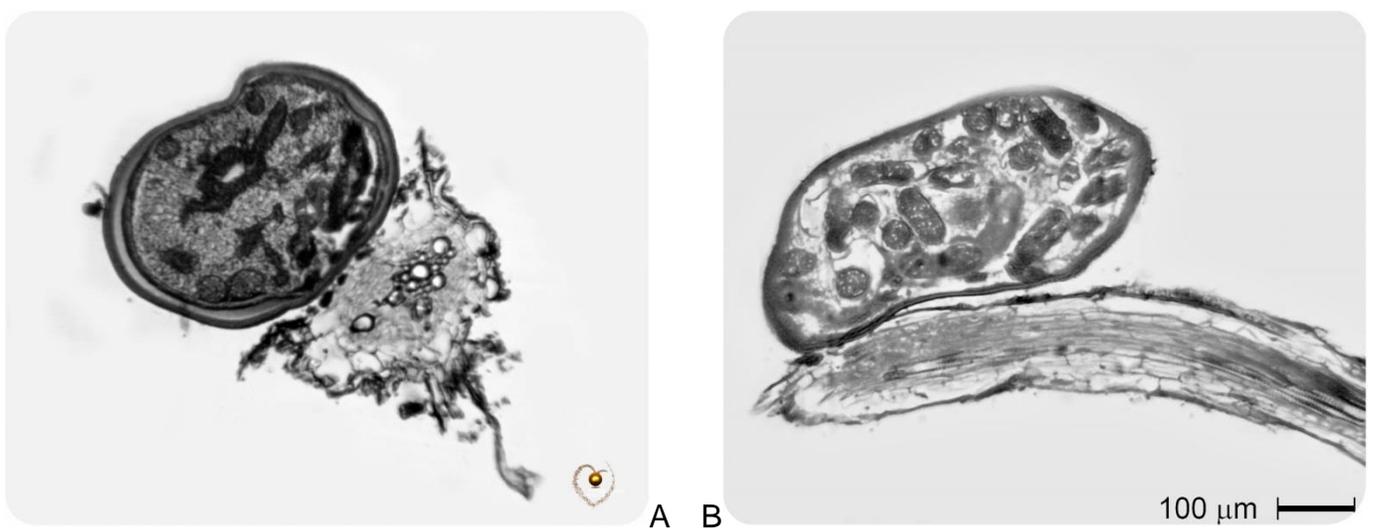
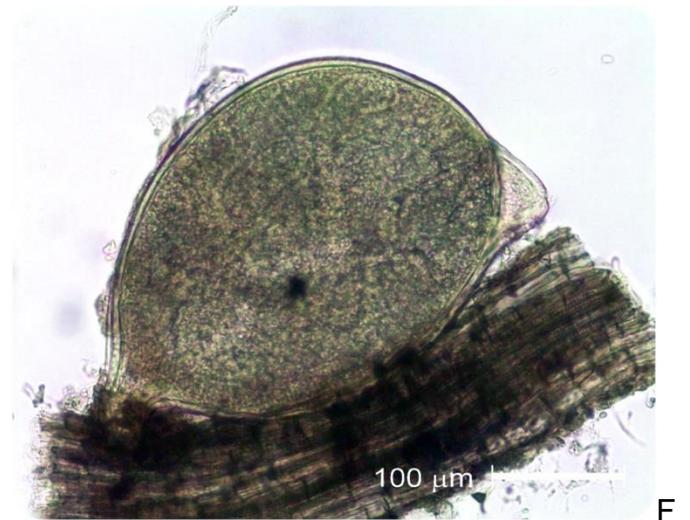
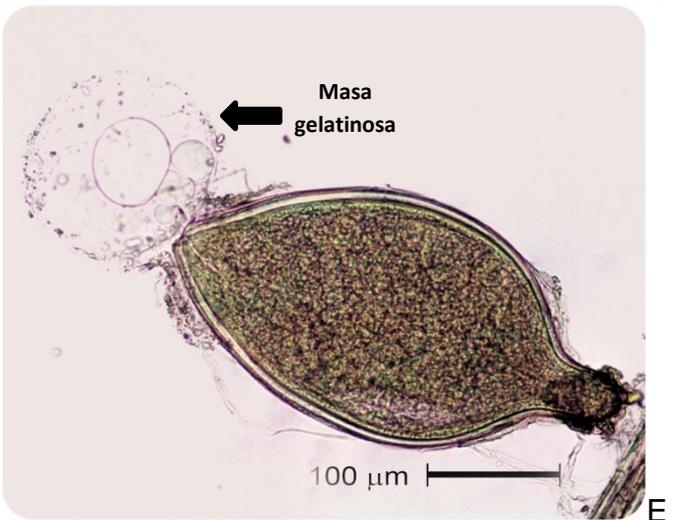
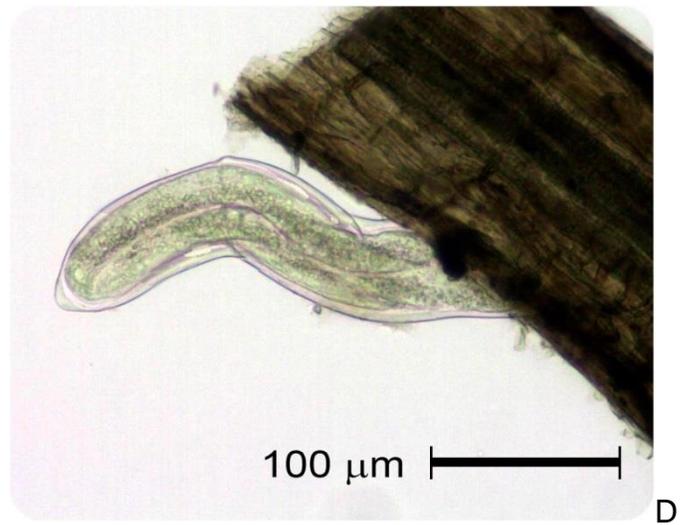
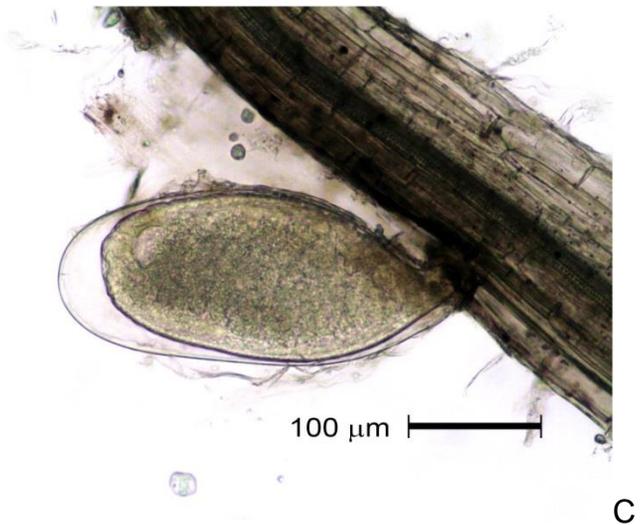
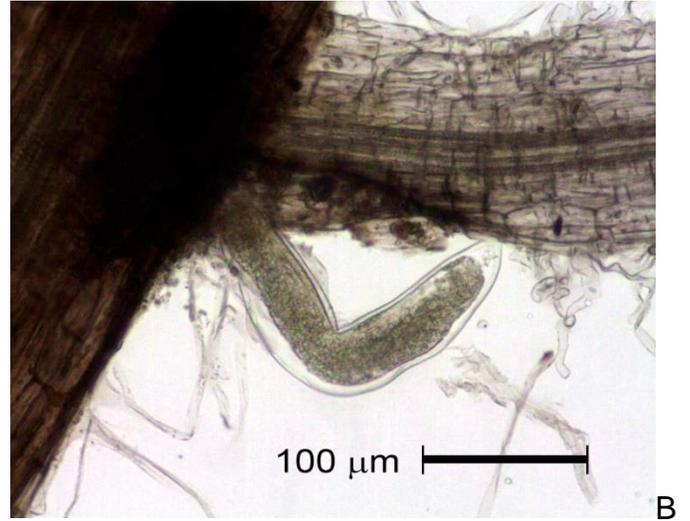
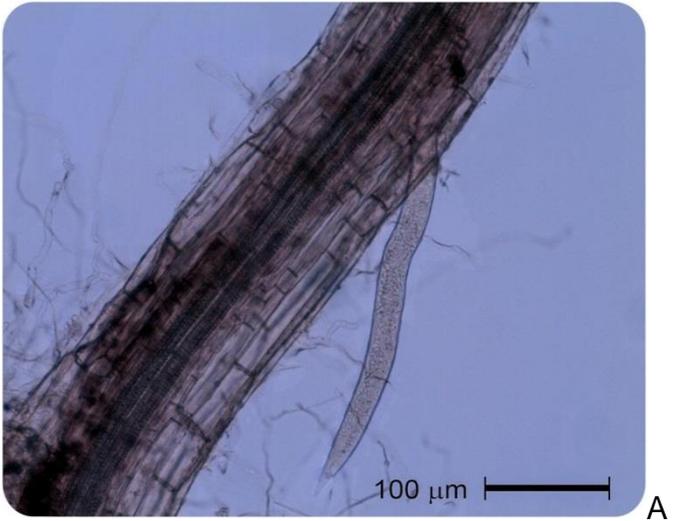


Figura: 2.5 A) corte transversal con hembra joven adherida a la raíz. B) corte longitudinal con hembra madura de *C. torreyanae* adherida a una raíz de *S. edulis*.





G



H

Figura: 2.6 Los diferentes estadios en el desarrollo de *C. torreyanae*. A: J2A; B: J3; C: J4 hembra; D: J4 Macho; E: Hembra Joven; F: Hembra Madura llena de huevos; G: Huevos; H: Quistes



A



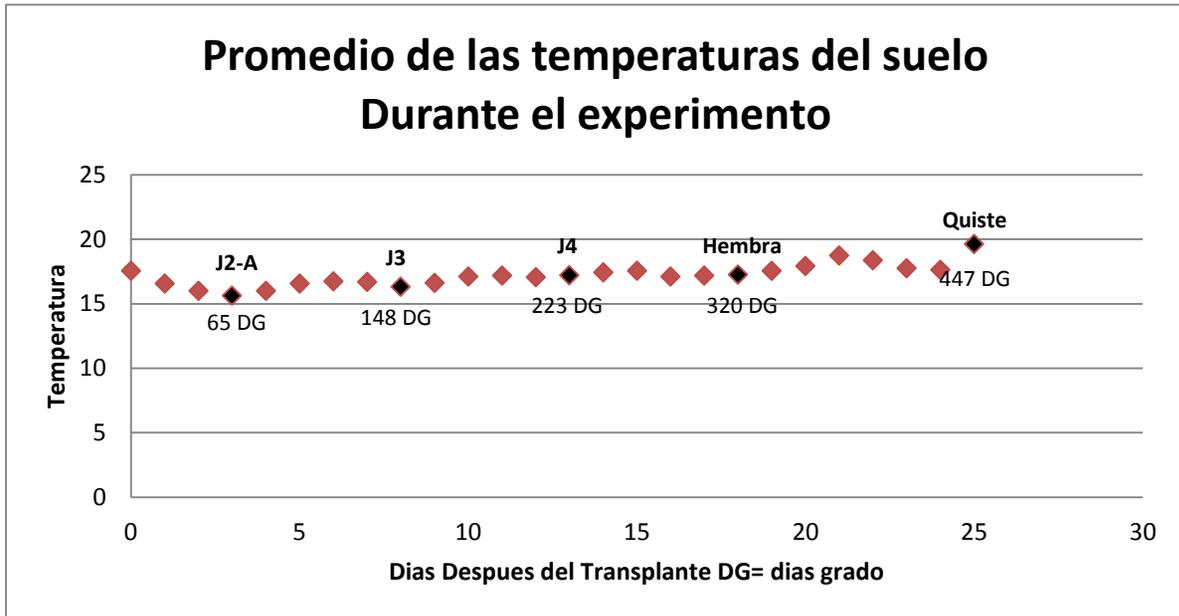
B

Figura: 2.7 A y B: Hembras jóvenes con una material gelatinoso de color amarillento a nivel de la cabeza y cuello

Cuadro 2.1 Los promedios de las temperaturas del suelo durante el transcurso del experimento y los días grados que requiere el nematodo para terminar su ciclo de vida

DDT	Temperatura	Días Grados	Estadio adherido al raíz
0	18	18	
1	16	34	
2	16	50	
3	16	66	J2-A
4	16	83	
5	17	98	
6	17	11	
7	17	132	
8	16	148	J3
9	17	165	
10	17	183	
11	17	199	
12	17	216	
13	17	234	J4
14	17	251	
15	18	268	
16	17	285	
17	17	303	
18	17	320	Hembra Blanca
19	18	337	
20	18	355	
21	19	374	
22	18	392	
23	18	410	
24	18	428	
25	20	447	Quiste

Cuadro 2.2 Promedios de las temperaturas del suelo durante el transcurso del experimento



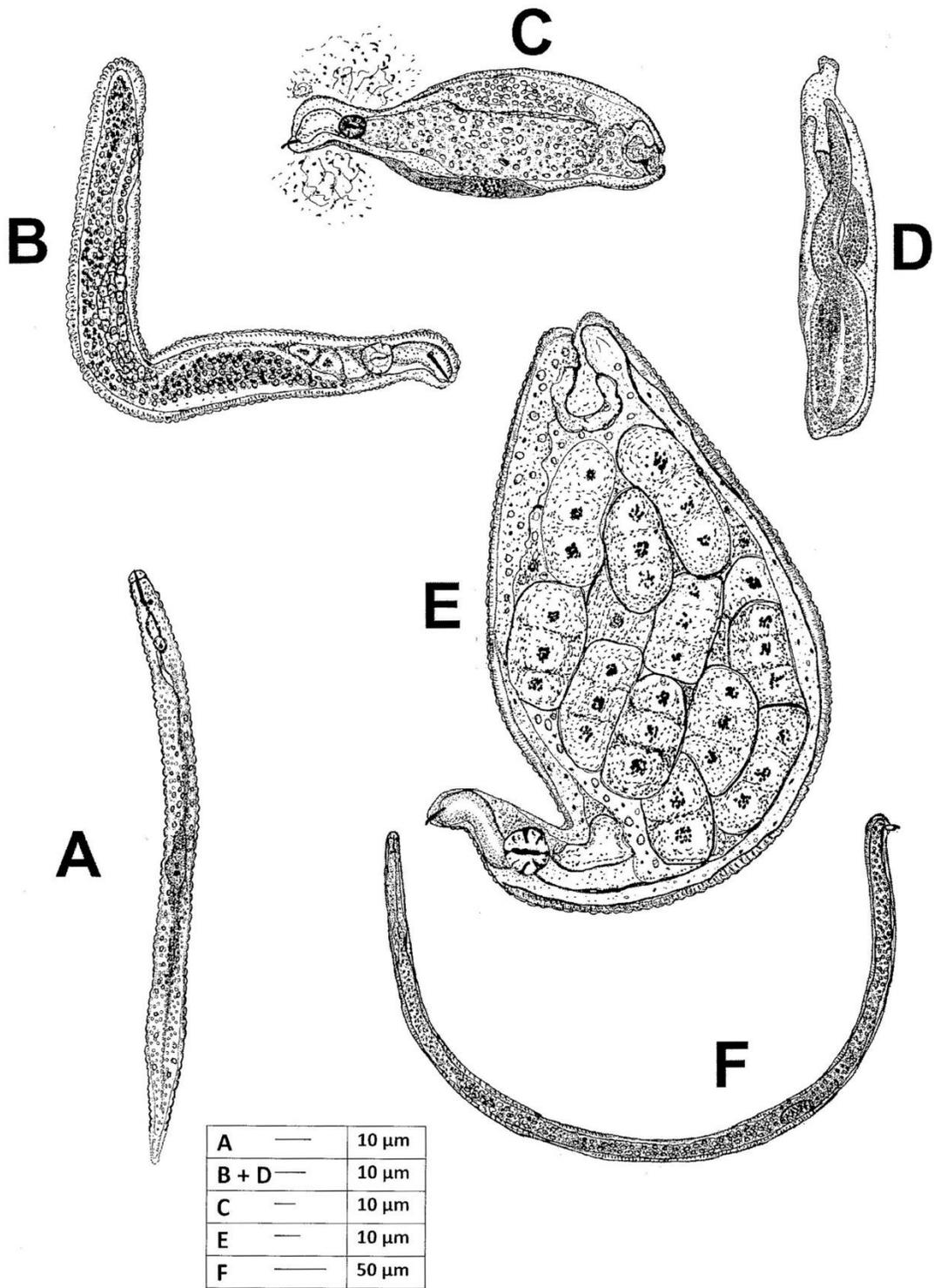


Figura: 2.8 *Cactodera torreyanae* A: J2; B: J3; C: J4 Hembra; D: J4 Macho; E: Hembra Madura con huevos; F: Macho

Cuadro 2.3 Dimensiones de los varios estadios de *Cactodera torreyanae*

Factor	J2	J2-A	J3	J4♀	J4♂	Hembra Madura
n	10	9	12	14	10	17
L	908-1093 (997± 18)	814-1089 (1017 ± 29)	613 – 1080 (922 ±35)	871 – 1126 (998±21)	864 - 923 (898 ± 17)	1121 – 1942 (1351± 54)
Ancho del cuerpo	42-58 (50±1.9)	49 -76 (63 ±3.1)	97 – 265 (164 ±12.9)	277-486 (371 ±17)	156-165 (160 ±2.7)	486 – 971 (663 ±34.5)
Esófago	194-372 (273±15.9)	219 -400 (283±21.9)	222 – 281 (251±7.7)	209 – 307 (270±9.7)	-	300 – 345 (320±9.5)
a	17-24 (20±0.7)	13 – 21 (16±0.9)	3 – 10 (6±0.5)	2 – 3 (2.7±0.1)	5.2 - 5.8 (5.6±0.12)	1.5 - 2.6 (2.07±0.1)
b	2.9-4.9 (3.746±0.2)	2.6 - 4.7 (3.826±0.2)	3.0 - 4.4 (3.867±0.2)	3.0 - 4.1 (3.616±0.1)	-	3.2- 4.1 (3.7±0.2)
Porción Hialina de la cola	45-91 (64± 5.2)	49 - 90 (64± 4.6)	0	0	-	0

2.4 DISCUSIÓN

C. torreyanae, fue descrito por la primera vez por Cid del Prado y Subbotin (2014). La mayoría de la biología de este patógeno a esa fecha era desconocida; lo que se sabe es que este nematodo parásito de plantas, puede tolerar los suelos con un pH de 9.1 y altos niveles de sal (Na 690 Mg.kg⁻¹) (Cuadro: 1.1). La otra especie del género *Cactodera* capaz de tolerar suelos con alta salinidad es *Cactodera salina* descrita por Baldwin *et al.* (1997) en Sonora México parasitando al hospedante *Salicornia bigelovii*. La temperatura del suelo fue tomada a una profundidad de 15 cm durante la realización del experimento y osciló entre 15.6 ° C y 19.6 ° C, con una temperatura media de 17.5 ° C.

A pesar que las plantas estuvieron infectadas por el nematodo, no se observaron síntomas aéreos físicos en las plantas afectadas. Esta observación coincide con las observaciones de Baldwin y Mundo-Ocampo (1991), que también afirmaron que los daños causados a la planta hospedera de nematodos de este género, no son de mucha importancia comercial, sin embargo por el daño físico ocasionados en las raíces puede dar lugar a una infección secundaria, además existen otros géneros de nematodos detectados en la misma zona como *Pratylenchus*, que induce lesiones en la raíz. (Comunicación personal del Dr. Cid del Prado).

Durante el muestreo y el procesamiento de suelo se observó que los J2 avanzados (J2A) y machos maduros en el suelo desde el primer muestreo de suelo y estuvo presente en los muestreos siguientes. La presencia de estos nematodos en el suelo durante todo el experimento puede significar lo siguiente: primero, la presencia de estos J2A puede ser considerada como una forma de coevolución entre los nematodos y su planta huésped, esto también fue observado por Tovar-Soto *et al.* (2008), y es una característica en otros miembros de la familia Heteroderidae para asegurar que su ciclo de vida coincida con la de su hospedante, para aumentar así la supervivencia de su especie, en segundo lugar la presencia de la J2A es una clara indicación de que este nematodo no entra en la raíz de su huésped para completar su ciclo de vida, a diferencia de todos los otros miembros conocidos de esta familia de nematodos, esta observación fue primeramente hecha por Cid del Prado y Subbotin (2014), a partir de nuestras observaciones podemos confirmar sin duda alguna, que todas las etapas de este nematodo se realizan fuera de la raíz de su huésped (Figura 2.6 A-H). Después de la eclosión el J2 permanece en el suelo hasta que encuentra una raíz adecuada,

posteriormente el nematodo penetra la raíz, e inserta su cuello en la raíz joven hasta que llega a las células parenquimatosas no diferenciadas de los haces vasculares. En cuanto a la razón por la que no penetran a las raíces, podemos postular que las raíces que los nematodos atacan son demasiado pequeñas para que entren en ellas, (Figura 2.5), por lo que solo las utilizan para satisfacer su nutrición, lo que significa que han evolucionado o coevolucionado junto con su planta huésped, o simplemente perdieron la capacidad o necesidad de penetrar al tejido de la raíz. Una vez que todo el cuello del nematodo se ha insertado en las raíces de la planta comienza el proceso de modificación de células, y permanece inmóvil al alimentarse. Una vez que el J2-A encuentra la raíz adecuada y comienza a alimentarse muda tres veces hasta que completa su ciclo de vida a hembras, estas después de la fecundación inician, con formación de huevos y luego la conversión a un quistes, (se midieron las diferentes fases del nematodo y un resumen de estos valores puede ser observado en el cuadro 2.3. La mayoría de los quistes permanecen adheridos a las raíces, pero caen rápidamente a medida que se desintegra la raíz o si esta es perturbada. De los resultados de nuestro experimento hemos determinado que este nematodo completa su ciclo de vida en un mínimo de 25 días, sin embargo, puede llegar a los 28 días, estos resultados están en concordancia con las observaciones formuladas por Koenning y Sipes (1998), quienes concluyeron que los nematodos del género *Cactodera* completan su ciclo de vida en 30-35, sin embargo en una publicación más reciente de Tovar-Soto *et al.* (2008) en otra especie de *Cactodera* (*Cactodera galinsogae*) determinaron que esta especie completa su ciclo de vida en 56 días.

Al final de la fase de J4 los machos comienzan a recuperar su forma de gusano o vermiforme, y se desprenden de las raíces en búsqueda de hembras maduras para aparearse.

Se observaron a las hembras jóvenes producir una matriz gelatinosa cerca de la región de la vulva. A diferencia de los otros nematodos del género Heteroderidae que descargan algunos huevos en esta matriz gelatinosa, este nematodo no los deposita en esta, sin embargo solo se observó la presencia de nematodos machos 'atrapados' en esta masa gelatinosa, podemos plantear que esta sustancia puede contener feromonas que atraen a machos maduros a las hembras.

2.5 CONCLUSIÓN

El desarrollo de *Cactodera torreyanae* es completamente diferente a los demás géneros de la familia Heteroderidae que son formadores de quistes, generalmente estos nematodos entran por completo los raíces jóvenes donde se desarrollan, hasta que las hembras blancas y gordas rompen el tejido o el macho adulto forma su cuerpo vermiforme y salen de las raíces en búsqueda de hembras. *Cactodera torreyanae* no entra las raíces, los J2A que se encuentran en el suelo se adhieren a las raíces jóvenes y se inserten sus cuellos hasta que se alcancen las células parenquimatosas del floema y se alimentan, con la mayor parte de su cuerpo en el suelo, *C. torreyanae* es un ectoparásito-sésil.

Este nematodo tiene un ciclo de vida corto, de 25 días, con un requerimiento de 447 días grado.

La masa gelatinosa segregada por las hembras maduras es muy común y esta, no contiene huevos, todos los huevos se retienen dentro del quiste, los machos se encuentran con frecuencia dentro de esta masa gelatinosa.

Las hembras aparentemente prefieren adherirse a las raíces que son muy delgadas, esta posible podría explicar por qué no pueden entrar en las raíces

LITERATURA CITADA

- Bird, DMc.K and Kaloshian, I. (2003) Are roots special? Nematodes have their say
Physiological and Molecular Plant Pathology 62 (2003) 115–123.
doi:10.1016/S0885-5765(03)00045-6
- Cid Del Prado Vera I. and Subbotin S.A. (2014) A new cyst nematode, *Cactodera torreyanae* sp. n.(Tylenchida: Heteroderidae), parasitising romerito, *Suaeda torreyana*, in Texcoco, Mexico. Nematology 16 (2014) 163-174
- Baldwin, J.G., Mundo-Ocampo, M., McClure, M. 1997. *Cactodera salina* n.sp. From the estuary plant, *Salicornia bigelovii*, in Sonora, Mexico. J. Nematology 29:465-473.
- Brewster, V. (2014). Soya bean Cyst Nematode cycle. The American Phytopathological Society, consultado, jueves, 31 de julio de 2014.
<https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/Nematodes/PublishingImages/SoyCystNemadiscycle.jpg>
- Golinowski, W., Grundler, F.M.W., and Sobczak, M. (1996). Changes in the structure of *Arabidopsis thaliana* during female development of the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii*. Protoplasma,
- Goverse, A. Overmars, J. Engelbertink, J, Bakker, J. and Helder, J. (2000). Both Induction and Morphogenesis of Cyst Nematode Feeding Cells Are Mediated by Auxin. MPMI Vol. 13, No. 10, 2000, pp. 1121–1129. No. M-2000-0727-01R
- Goverse, A., Davis, E.L., and Hussey, R.S. (1994). Monoclonal anti- Bodies to the esophageal glands and stylet secretions of *Heterodera glycines*. J. Nematol. 26, 251-259

- Koenning, R.S., and Sipes, S. B. (1988). Biology. Pp. 157-190 in B.S. Sharma, Ed. The Cyst nematode. Kluwer Academic Publishers Dordrecht. The Netherlands.
- Manzanilla-Lopez R., H. (2012) Methodology and Symptomatology. Pp 89-127. In Manzanilla-Lopez, R.H y Marban-Mendoza, N. Eds. Practical Plant Nematology . Mundi-Prensa España.practical plant nematology .
- Subbotin S.A. y Franco, J , (2013). Cyst Nematodes. Pp. 299-353. In Manzanilla-Lopez, R.H y Marban-Mendoza, N. Eds. Practical Plant Nematology . Mundi-Prensa España.
- Shephard ,A.M. (1986). Extraction and estimation of cyst nematodes. In Southey , J.F. (ED.) laboratory methods for work with plant and soil nematode. London, UK Ministry of agriculture, fisheries and food. Reference book 402. Her Majesty's Stationary Office , pp. 1-4
- Tovar-Soto, A., Cid Del Prado Vera I, Gutiérrez-Aguilar, M., García-Zuñiga, J. y Evans K. (2008). Desarrollo postembrionario de *Cactodera galinsogae* (Tylenchida: Heteroderinae) en cebada (*Hordeum vulgare* L.) y el papel de malezas como hospedantes. Nematropica Vol. 38, No. 2, 2008
- Thorne, G. (1923). The length of the dormancy period of the sugar-beet nematode in Utah . United States Department of Agriculture . Department Circular 262.
- Wallace, H.R. (1955).Factors influencing the emergence of larvae from cyst of the beet eelworm, *Heterodera schachtii* Schmidt. Journal of Helminthology, Vol. XXIX; Nos.1/2, 1955, pp. 3-16

Williamson, V. M. and. Hussey R. S. (1996) Nematode Pathogenesis and Resistance in Plants The Plant Cell, Vol. 8, 1735-1745. American Society of Plant Physiologists

Anexos

Preparación de FAA (500mL)

- etanol (50%) 250mL
- ácido acético glacial (5%) 25mL
- formalina (10%) 50mL
- agua destilada 175mL

Preparación de la Solución Madre de safranina:

- 4g safranina disuelto en 200mL de metil cellosolve (2- methoxyethanol)
- 100mL EtOH
- 100mL dH₂O
- 4g acetato de sodio
- 8mL • formalina

Preparación del verde rapida:

- 0.23g verde rápido FCF (disuelto 150 de metil cellosolve
- 150mL 100% EtOH,
- 150mL salicilato de metilo).

Nota: esta solución se debe hacerse por lo menos varios días antes de su uso para permitir la maduración del colorante.

Solution de aclaramiento

- 200mL salicilato de metilo,
- 100mL 100% EtOH,
- 100mL xileno

Fijadores

4% formaldehído:

- formaldehído 40% 10ml
- agua destilada 90 ml

FAA: formaldehído-alcohol - ácido acético glacial

- Etanol 96%100ml
- Formaldehído 40% 30ml
- Ácido acético glacial 5ml
- Agua destilada 200ml

F A 4:1 formaldehído - ácido acético glacial

- Formaldehído 40% 10ml
- Ácido acético 1ml
- Agua destilada 89ml

TAF trietanolamina - formaldehído).

- Formalina (40% formaldehído) 7ml
- Ácido acético glacial (ácido propiónico) 1ml
- Agua destilada 100ml

Solutions de Seinhorst

Seinhorst 1(Solution A): 20 partes de etanol 96%, 1 parte de glicerol, agua destilada 79 partes.

Seinhorst 2(Solución B): 5 partes de glicerol y 95 partes de etanol 96%

Seinhorst 3(Solución C): Etanol 96% 80 partes de glicerol y 20 parte

Índices de Man

L= La longitud total del cuerpo

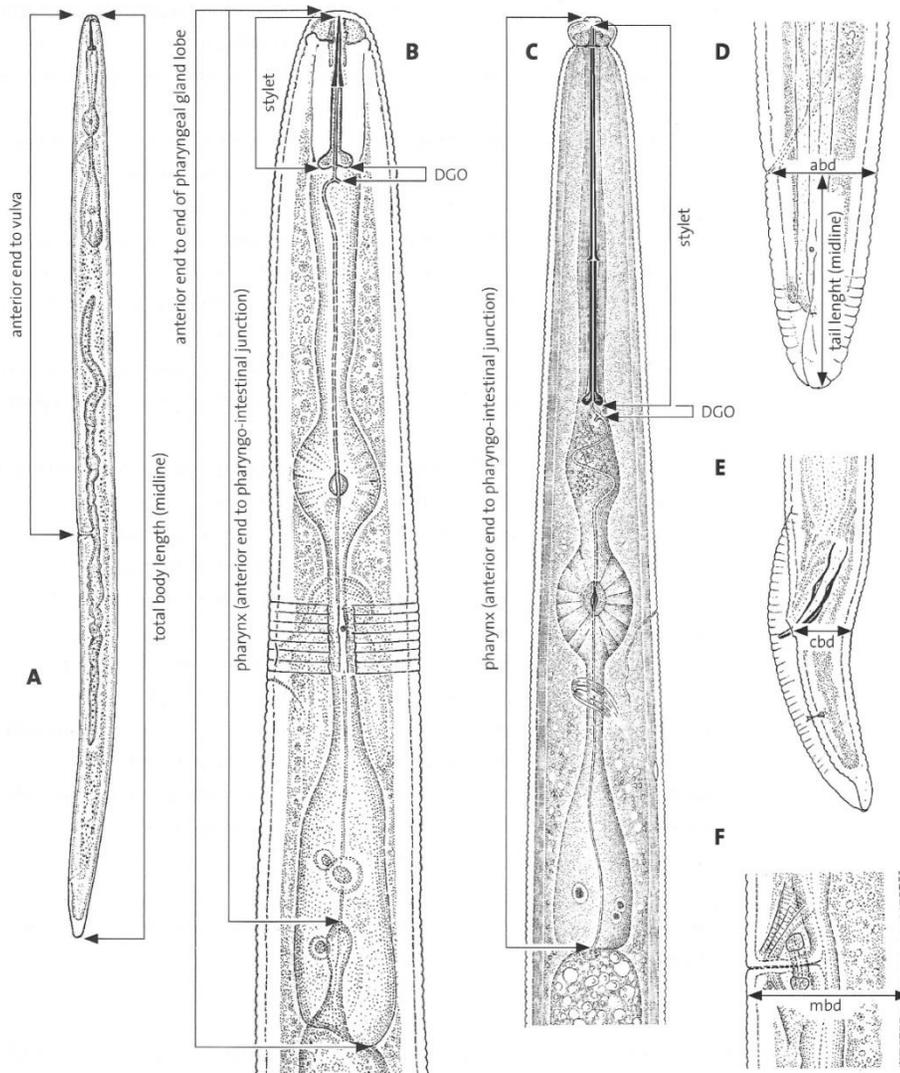
a= Largo total del nematodo dividido por el máximo ancho de cuerpo.

b= Largo total cuerpo dividido por la longitud del esófago o faringe.

b'= El largo total del esófago dividido por la distancia desde el extremo anterior del cuerpo al extremo posterior de las glándulas esofágicas

c= El largo total del cuerpo dividido por el largo de la cola

c'= El largo de la cola dividido por el ancho del cuerpo a nivel del ano



How to take the basic measurements of a nematode. A: Entire nematode showing how to measure total body length along the mid-line from anterior end to tail tip, and distance of vulval aperture from the anterior end, also measured along the mid-line; B, C: Pharyngeal region showing how to measure stylet length, distance of dorsal gland orifice (DGO) from basal knobs, pharynx length (anterior end to pharyngo-intestinal junction) and anterior end to tip of pharyngeal gland lobes (this is not the same as the true pharynx length, but is usually taken in species where the glands overlap the intestine, the pharyngo-intestinal junction itself often being obscure); D: Female tail region showing how to measure tail length, and anal body diameter (abd) by extrapolating a line at 90 degrees to the longitudinal axis; E: Male tail region showing corresponding measurement for body diameter at the cloacal aperture (cbd). Spicule length is measured from tip to tip along the curved median line; F: Mid-body region showing how to take the maximum body diameter (mbd), again at 90 degrees to the longitudinal body axis. Figure digitally compiled from line drawings by Orton Williams (1974) and Siddiqi (1974). © Cortesía Manzanilla-Lopez