



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**HISTOLOGÍA COMPARADA DE SITIOS DE ALIMENTACIÓN
INDUCIDOS POR NEMATODOS DE LA FAMILIA
HETERODERIDAE: *Meloidodera astonei*, *Globodera
mexicana*, *Globodera sp.*, *Punctodera chalcoensis*,
Cactodera rosae Y *Meloidogyne sp.***

Yolanda Gómez Hernández

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. MÉXICO

2015

La presente tesis titulada **“HISTOLOGÍA COMPARADA DE SITIOS DE ALIMENTACIÓN INDUCIDOS POR NEMATODOS DE LA FAMILIA HETERODERIDAE: *Meloidodera astonei*, *Globodera mexicana*, *Globodera sp.*, *Punctodera chalcoensis*, *Cactodera rosae* Y *Meloidogyne sp.*”** realizada por la alumna Yolanda Gómez Hernández bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

DR. IGNACIO CID DEL PRADO VERA

ASESOR

M. C. PETRA YÁÑEZ JIMÉNEZ

ASESOR

M. C. ANTONIO GARCÍA ESTEVA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Julio de 2015

HISTOLOGÍA COMPARADA DE SITIOS DE ALIMENTACIÓN INDUCIDOS POR
NEMATODOS DE LA FAMILIA HETERODERIDAE: *Meloidodera astonei*, *Globodera*
mexicana, *Globodera* sp., *Punctodera chalcoensis*, *Cactodera rosae* Y *Meloidogyne* sp.

Yolanda Gómez Hernández, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2015

RESUMEN

Estudios de histología fueron conducidos en algunas especies de nematodos de la familia Heteroderidae con los objetivos de comparar y describir los cambios en sus hospedantes causados por *Meloidodera astonei*, *Globodera mexicana*, *Globodera* sp., *Punctodera chalcoensis*, *Cactodera rosae* y *Meloidogyne* sp. *Solanum rostratum*, la planta hospedante de *Meloidodera astonei*, fue colectado en La Purificación, Texcoco, Estado de México. Las hembras de *M. astonei* inducen una sola célula gigante uninucleada en el floema secundario con citoplasma denso, núcleo hipertrofiado e hiperplasia en los tejidos adyacentes. *Solanum rostratum* y *Amaranthus hybridus*, fueron colectados en el Rancho Los Sauces Tecocac, Huamantla, Estado de Tlaxcala. En *S. rostratum*, *Globodera mexicana* induce un sincitio con denso citoplasma y núcleos y nucléolos hipertrofiados en las células del periciclo y en el tejido del cambium interfascicular, con hiperplasia de las células del alrededor. *Cactodera rosae* forma un sincitio con citoplasma denso, núcleos y nucléolos hipertrofiados en las células de la corteza, cambium y en el periciclo de *A. hybridus*. *Solanum stoloniferum* y *Zea mays* fueron colectados en el Ejido de San Diego Huehuecalco, Amecameca, Estado de México. El sincitio inducido por *Globodera* sp. fue en el periciclo aunque afectó al floema y corteza de *S. stoloniferum*, presentando un citoplasma denso y granuloso. El sincitio afecta tanto al floema como al xilema.

Punctodera chalcoensis induce un sincitio en el periciclo, las células de la endodermis y corteza son afectadas de *Z. mays*, con denso y granuloso citoplasma. Las raíces parasitadas con *Meloidogyne* sp. fueron colectadas de un árbol tropical en el humedal del Centro de Investigaciones Costeras La Mancha (CICOLMA) Actopan, Estado de Veracruz, perteneciente al Instituto de Ecología. Los cambios causados por *Meloidogyne* sp. fue la formación de células gigantes multinucleadas en las células del parénquima que forman los radios medulares entre los haces secundarios del xilema y floema, con hiperplasia de las células adyacentes.

Palabras clave: Nemata: Heteroderidae, histopatología, sincitio, células gigantes.

COMPARATIVE HISTOLOGY INDUCED FEEDING SITES NEMATODE
HETERODERIDAE FAMILY: *Meloidodera astonei*, *Globodera mexicana*, *Globodera* sp.,
Punctodera chalcoensis, *Cactodera rosae* AND *Meloidogyne* sp.

Yolanda Gómez Hernández, M. Sc.

Colegio de Postgraduados, 2015

ABSTRACT

Histological studies were conducted on some species of nematodes of the family Heteroderidae with the objectives of comparing and describing the changes in their hosts caused by *Meloidodera astonei*, *Globodera mexicana*, *Globodera* sp., *Punctodera chalcoensis*, *Cactodera rosae* and *Meloidogyne* sp. *Solanum rostratum*, host of *Meloidodera astonei*, was collected in La Purificación, Texcoco, Mexico State. The females of *M. astonei* induced a single uninucleate giant cell in the secondary phloem with dense cytoplasm, hypertrophied nuclei and hyperplasia of the adjacent tissues. *Solanum rostratum* and *Amaranthus hybridus* were collected in Rancho Los Sauces in Tecocac, Huamantla, Tlaxcala State. In *S. rostratum*, *Globodera mexicana* induced syncytia with dense cytoplasm and hypertrophied nuclei and nucleoli in the pericycle cells and interfascicular cambial tissue, with hyperplasia of the surrounding cells. *Cactodera rosae* established a syncytium with dense cytoplasm and hypertrophied nuclei and nucleoli in cells of the cortex, cambium and pericycle of *A. hybridus*. *Solanum stoloniferum* and *Zea mays* were collected at Ejido de San Diego Huehucalco, Amecameca, Mexico State. The syncytium induced by *Globodera* sp. in the pericycle even affected the phloem and cortex of *S. stoloniferum* had a dense, granular cytoplasm. The syncytia affected both phloem and xylem. *Punctodera chalcoensis* induced syncytia in the pericycle, endodermis and cortex cells are affected of *Z.*

mays with dense, granular cytoplasm. Roots parasitized by *Meloidogyne* sp. were collected from a tropical tree in a humid forest at the Research Center La Mancha, Actopan, Veracruz State, near the Institute of Ecology. The anatomical changes caused by *Meloidogyne* sp. were the formation of multinucleate giant cells in the parenchyma cells forming the medullary radius between secondary bundles of xylem and phloem, with hyperplasia of the adjacent cells.

Key words: Nematoda: Heteroderidae, histopathology, syncytium, giant cells.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y conocer lo maravilloso de la vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento de mis estudios de maestría.

Al Postgrado de Fitosanidad – Fitopatología del Colegio de Postgraduados, especialmente a los académicos que contribuyeron a mi formación académica.

A los integrantes de mi Consejo Particular: Dr. Ignacio Cid del Prado Vera, M. C. Petra Yáñez Jiménez y M. C. Antonio García Esteva por el apoyo, paciencia, consejos que me ayudaron en mis estudios de maestría, por su valioso tiempo y asesoramiento brindados para realizar y mejorar este trabajo de investigación.

Al M. C. Antonio Cortes Jiménez-Herbario del Área de Biología de Preparatoria, Chapingo, por su apoyo en la identificación de un ejemplar de los materiales trabajados.

Al M. C. Jorge Valdez Carrasco por el apoyo en tomar y editar las fotografías del presente trabajo.

A Marú Cano, José Cano, Domingo Gómez Gutiérrez, M. C. María de Lourdes Rodríguez Mejía y M. C. Alfonso Lucas, por el apoyo y consejos que brindan para mi vida profesional y personal. Gracias.

A la familia Velázquez Vera por hacerme parte de su familia. Gracias.

A mis amigos y compañeros: Elena, Mary, Lety, Licha, Inés, Marce, Roxy, Yesi, Diana, Paty, Claudia, Edgar, Marcos, Arturo, Gabriel. Gracias por compartir su vida conmigo y hacerme pasar momentos felices e inolvidables.

DEDICATORIA

A Sebastiana Hernández Intzin, María Intzin López, María de Jesús Ramírez Hernández: ni esperan recompensa de sus obras, ni se atribuyen la obra acabada, y por eso, su obra permanece con ellas “Lao Tse”. A mi abuelita, hermanita y Fernanda: miro al cielo y las estrellas siempre me hacen recordar y sonreír.

A la familia Ramírez Hernández y Hernández Luna.

CONTENIDO

| | |
|---|------|
| RESUMEN | iii |
| ABSTRACT | v |
| AGRADECIMIENTOS | vii |
| DEDICATORIA | viii |
| LISTA DE CUADROS Y FIGURAS | xi |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 OBJETIVOS..... | 6 |
| 1.2 HIPÓTESIS..... | 6 |
| 2. REVISIÓN DE LITERATURA | 7 |
| 2.1 Establecimiento y tipos de sitios de alimentación inducidos por la familia Heteroderidae..... | 7 |
| 2.2 Clasificación taxonómica de <i>Meloidodera astonei</i> Cid del Prado y Rowe, 2000..... | 11 |
| 2.3 Aspectos generales de <i>Meloidodera astonei</i> | 12 |
| 2.4 Clasificación taxonómica de <i>Globodera</i> sp. (Skarbilovich, 1959) Behrens, 1975 y <i>Globodera mexicana</i> (Campos-Vela, 1967) Subbotin, Mundo-Ocampo y Baldwin, 2010..... | 13 |
| 2.5 Aspectos generales de <i>Globodera</i> sp. y <i>Globodera mexicana</i> | 13 |
| 2.6 Clasificación taxonómica de <i>Punctodera chalcoensis</i> Stone, Sosa Moss y Mulvey, 1976..... | 15 |
| 2.7 Aspectos generales de <i>Punctodera chalcoensis</i> | 16 |
| 2.8 Clasificación taxonómica de <i>Cactodera rosae</i> Cid del Prado y Miranda, 2008 | 17 |
| 2.9 Aspectos generales de <i>Cactodera rosae</i> | 18 |
| 2.10 Clasificación taxonómica de <i>Meloidogyne</i> sp. (Goeldi, 1892) | 19 |
| 2.11 Aspectos generales de <i>Meloidogyne</i> sp. | 20 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 22 |
| 3.1 Obtención de material vegetal..... | 22 |
| 3.2 Fijado de material vegetal | 22 |
| 3.3 Deshidratación e inclusión en parafina del material vegetal..... | 23 |
| 3.4 Bloques de parafina con material vegetal incluido | 23 |

| | |
|--|----|
| 3.5 Tinción de cortes histológicos..... | 24 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 25 |
| 4.1 Descripción de alteraciones histológicas causadas por <i>Meloidodera astonei</i> en <i>Solanum rostratum</i> | 25 |
| 4.2 Descripción de alteraciones histológicas causadas por <i>Globodera</i> sp. en <i>Solanum stoloniferum</i> | 30 |
| 4.3 Descripción de alteraciones histológicas causadas por <i>Globodera mexicana</i> en <i>Solanum rostratum</i> | 34 |
| 4.4 Descripción de alteraciones histológicas causadas por <i>Punctodera chalconensis</i> en <i>Zea mays</i> | 37 |
| 4.5 Descripción de alteraciones histológicas causadas por <i>Cactodera rosae</i> en <i>Amaranthus hybridus</i> | 40 |
| 4.6 Descripción de alteraciones histológicas causadas por <i>Meloidogyne</i> sp. en árbol tropical..... | 44 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 48 |
| 6. LITERATURA CITADA | 50 |
| ANEXOS | 63 |

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Sitios de alimentación causados por nematodos sedentarios del orden Tylenchida, parásitos en raíces de plantas (Subbotin, 1993). | 9 |
| Figura 1. Histopatología inducida por <i>Meloidodera astonei</i> en <i>Solanum rostratum</i> | 29 |
| Figura 2. Histopatología inducida por <i>Globodera</i> sp. en <i>Solanum stoloniferum</i> | 33 |
| Figura 3. Histopatología inducida por <i>Globodera mexicana</i> en <i>Solanum rostratum</i> | 36 |
| Figura 4. Histopatología inducida por <i>Punctodera chalconensis</i> en <i>Zea mays</i> | 39 |
| Figura 5. Histopatología inducida por <i>Cactodera rosae</i> en <i>Amaranthus hybridus</i> | 43 |
| Figura 6. Histopatología inducida por <i>Meloidogyne</i> sp. árbol tropical..... | 47 |

1. INTRODUCCIÓN

La palabra nematodo proviene del vocablo griego *nema* que significa hilo y *eides* que significa “con aspecto de”, estos organismos viven en agua dulce, ambientes marinos y ambientes terrestres, muchos son de vida libre; otros son parásitos de animales o plantas. El parasitismo en las plantas superiores está restringido por dos clases del Phylum Nemata, la clase Adenophorea y la Secernentea. Los parásitos de plantas de la Clase Enoplea están confinados en dos órdenes, el orden Dorylaimida con la familia Longidoridae y el orden Ditherophorida con la familia Trichodoridae. Todos los fitoparásitos de la clase Secernentea se encuentran en el suborden Tylenchina dentro del orden Tylenchida (Walker, 1969; Maggenti, 1981; Sharma, 2006). Las 4105 especies fitoparásitas descritas (Guzmán *et al.*, 2012) están ampliamente distribuidas en suelos naturales y cultivados, siendo las especies de algunos géneros de la familia Heteroderidae las más importantes en la agricultura a nivel mundial.

La familia Heteroderidae comprende a las subfamilias Heteroderinae Filip'ev & Schuurmans Stekhoven, 1941 y Meloidogyninae Skarbilovich, 1959. La subfamilia Heteroderinae incluye nematodos formadores y no formadores de quistes, son el grupo de mayor importancia económica en varios países, debido a que atacan muchos cultivos, entre los que destacan los cereales, hortalizas, ornamentales, oleaginosas, entre otros (Baldwin, 1992; Baldwin y Mundo Ocampo, 1991; Evans y Rowe, 1998; Subbotin *et al.*, 2001, 2003; Sharma, 2006; Guzmán *et al.*, 2012). En México los nematodos formadores de quistes están representados por varias especies: del género *Globodera* se han reportado a *G. rostochiensis*, *G. tabacum*, *G. solanacearum*, *G. virginiae*, *G. mexicana* y *G. bravoae* en papa, *Solanum rostratum*, *Nicotiana tabacum*, *S. carolinense*, *Jaltomata procumbens*, entre otras solanáceas y del género *Punctodera*, solamente se encuentra en el país a *P. chalcoensis*, especie ampliamente distribuida en el altiplano central y

otras regiones productoras de maíz. El género *Cactodera* está representado por varias especies, tales como: *Cactodera cacti* la cual se encuentra asociada a plantas de la familia Cactaceae, probablemente nativa de México y quizás Centro y Sur de América; *C. amaranthi* en espinaca y otras Chenopodiaceae y Amaranthaceae en la región central; *C. salina* en *Salicornia bigelovii* (Chenopodiaceae) en Sonora; *C. evansi* parasitando a clavel en Villa Guerrero, Estado de México; *C. galinsogae* en cebada, y en arvenses como *Galinsoga parviflora* y *Bidens odorata* en los Valles Altos del Estado de Hidalgo; *C. rosae* parasitando a cebada en Apan, Hidalgo y *C. torreyanae* parasitando a *Suaeda nigra* en Texcoco, México (Baldwin y Mundo-Ocampo; 1991; Baldwin *et al.*, 1997; Tovar-Soto, 2006; Cid del Prado y Subbotin, 2013).

Dentro de la subfamilia Meloidogyninae o nematodos agalladores; el género *Meloidogyne* es el más conocido debido a la amplia gama de hospedantes, incluyendo plantas cultivadas y malezas (Bird, 1974), las especies de este género, están presentes en todo el mundo pero son más frecuentes en zonas con climas tropicales y subtropicales y son relativamente escasas en zonas con inviernos severos, excepto en invernaderos (Walker, 1969; Sharma, 2006). Las especies más comunes del género *Meloidogyne* a nivel mundial y en México son: *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* y *M. hapla*; Cid del Prado *et al.* (2001) reportaron su distribución en 18 estados de la República Mexicana, en cultivos como hortalizas, frutales y ornamentales. Dichos investigadores encontraron que el 60.7% correspondió a *M. incognita* (raza 1 y 2), 21.4% para *M. arenaria*, 12.5% para *M. javanica* y 5.3% para *M. hapla*. Por ejemplo, en Sinaloa, este género afecta a cultivos como tomate (*Solanum lycopersicum* L.), chile (*Capsicum annuum* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.) y berenjena (*Solanum melongena* L.) (Carrillo-Fasio *et al.*, 2000). Detecciones recientes de *M. enterolobii* se realizó en plantas de sandía (*Citrullus lanatus*) procedentes de Tecolutla, Veracruz (Ramírez-Suárez *et al.*, 2014). *Meloidogyne incognita* es la especie con la

capacidad de reproducirse en más de 138 plantas registradas como hospedantes en el mundo (Rich *et al.*, 2008).

Muchos investigadores han estudiado la morfología, bioquímica y fisiología de raíces infectadas por nematodos y el mecanismo que involucra su alimentación en las células de las plantas (Subbotin, 1993). De acuerdo con su tipo de parasitismo, los nematodos formadores de quistes (*Heterodera* spp., *Globodera* spp., *Cactodera* spp.), y el no formador de quiste (*Meloidodera* spp.) así como los nematodos agalladores (*Meloidogyne* spp.), se agrupan como endoparásitos sedentarios. Una característica de los nematodos que tienen este tipo de parasitismo, es la formación de sitios especializados de alimentación en las raíces de sus hospedantes; siendo la única fuente de nutrientes a lo largo de su vida, estos sitios de alimentación son conocidos como “sincitios” y “células gigantes” (Siddiqi *et al.*, 2012).

En general el ciclo biológico de los heteroderidos, se inicia cuando eclosionan los juveniles de segundo estadio (J2) e invaden las puntas de las raíces o donde emergen las raíces laterales o secundarias de su hospedante (Jones y Northcote, 1992; Holtmann *et al.*, 1999). El juvenil (J2) con su estilete atraviesa las paredes celulares, migran intercelular o intracelularmente y finalmente se establecen de forma permanente en el lugar de alimentación e inducen la formación de un sincitio o célula gigante (Dropkin, 1969; Wyss y Zunke, 1986; Bird y Koltai, 2000).

La palabra sincitio proviene del vocablo griego *syn* “junto” y *kytos* “caja, por ejemplo: célula”. Es una célula gigante multinucleada que puede resultar de múltiples fusiones de células hipertrofiadas por la disolución parcial de la pared celular de células uninucleadas. El sincitio es el sitio de alimentación más común inducido por los nematodos fitoparásitos sedentarios. La

célula gigante presenta hipertrofia, puede ser uninucleada o multinucleada debido a la presencia de mitosis sin división celular, se encuentran conectadas por plasmodesmos y sin disolución de la pared celular (Hussey, 1989; Subbotin, 1993; Fenoll y Del Campo, 1998).

Las investigaciones que se han realizado con el microscopio de luz, indican que los sincitios inducidos por los juveniles del género *Heterodera* spp. se forman después de que se ha inyectado la secreción de las glándulas del esófago dentro de las células del periciclo, endodermis y en la corteza de los hospedantes susceptibles (Cole y Howard, 1958; Endo, 1964). La disolución de la pared celular, la ruptura de la vacuola, la formación del citoplasma granular y la fusión de protoplastos vecinos, produce un sincitio con paredes de espesor irregular (Endo, 1964). Se han reportado núcleos y mitocondrias irregulares (Piegat y Wilski, 1963) y los trabajos histoquímicos han mostrado hiperactividad de las enzimas como fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, esterasa, peroxidasa, adenosina trifosfatasa, citocromo oxidasa excepto fenolasa (Veech y Endo, 1969). La técnica de radioautografía indica una mayor síntesis de ADN y ARN (Endo, 1971), y muestra el análisis directo el aumento del contenido de aminoácidos libres (Doney, Fife y Whitney, 1970).

En el caso de *Heterodera schachtii* Schmidt, el segundo estadio, selecciona una sola célula para inducir el sitio de alimentación. Las secreciones liberadas a través de su estilete contienen señales que inducen cambios en la célula seleccionada (Wyss, 1992). La célula inducida se fusiona con células circundantes por disolución parcial de la pared celular y la fusión de sus organelos del citoplasma, en la que se forma el sitio de alimentación conocido comúnmente como sincitio. Las células multinucleadas y sincitios se expanden a lo largo del cilindro vascular y se integran a las células del procambium, cambium y periciclo. Como los juveniles (J3 y J4) de nematodos pierden su capacidad de moverse, los sincitios son la única fuente de nutrientes para

su desarrollo. Con el fin de alimentarse, los nematodos introducen sus estiletes a través de la pared celular de la membrana plasmática. Las secreciones se liberan desde la abertura del estilete, cruzan la membrana plasmática y entran al citoplasma, donde se forman los tubos de alimentación, a través del cual son retirados los nutrientes del sincitio. Después de tres mudas los nematodos alcanzan su estado adulto. Los machos mantienen su forma vermiforme y son móviles para el apareamiento, mientras que las hembras se convierten en forma de limón y se vuelven sedentarias (Holtmann *et al.*, 1999). Estudios realizados con otros nematodos formadores de quistes como es el caso de *Cactodera galinsogae*, los sitios de alimentación abarcan el cilindro vascular y el tejido cortical, con disolución de paredes celulares internas y engrosamiento de células externas, con desorganización, desplazamiento y rompimiento del xilema y floema (Tovar-Soto *et al.*, 2007).

El nematodo no formador de quiste, *Rhizonema sequoiae*, induce la formación de células gigantes ovoides con un sólo núcleo gigante ovoide o esférico que contiene de uno a cuatro nucléolos grandes. Las células que rodean el cuerpo de la hembra presentan necrosis y la destrucción del tejido cortical después de la infección de juveniles del segundo estadio (Cid del Prado Vera y Lownsbery, 1984). Vovlas *et al.* (2013) señalan que *Meloidodera* sp. induce la formación de una célula gigante con un sólo núcleo. Estudios realizados por Cid del Prado y Cárdenas (1995), con *Meloidodera mexicana* y *Meloidodera zacanensis*, en Chile y tejocote respectivamente, reportan que se alimentan en la parte central del tejido vascular, en donde inducen la formación de una célula gigante con un sólo núcleo que se origina de células del parénquima vascular. Las células gigantes presentan el núcleo amorfo, un citoplasma denso con varias vacuolas e hipertrofia. Asimismo, las células que se encuentran en la periferia de la célula gigante presentan hiperplasia.

Las células gigantes inducidas por el género *Meloidogyne* spp. son multinucleadas con citoplasma denso, granuloso y paredes engrosadas, los núcleos y nucléolos presentan hipertrofia. Estas células se observaron principalmente en el tejido cortical, aunque algunas veces invaden el cilindro vascular (Medina-Canales *et al.*, 2011).

Debido a la creciente importancia de los nematodos de la familia Heteroderidae en México, las cuales parasitan tanto a plantas cultivadas como a malezas ya sean herbáceas o leñosas, se planteó realizar un estudio histológico de algunas especies de nematodos descritos en México, para observar los cambios celulares que ocurren en algunos tejidos de sus hospedantes conocidos comúnmente como sitios de alimentación.

1.1 OBJETIVOS

a) Comparar las diferencias que hay en los sitios de alimentación de algunos géneros y especies de nematodos de la familia Heteroderidae: *Meloidodera astonei* Cid del Prado y Rowe, 2000, *Globodera mexicana* (Campos Vela, 1967) Subbotin *et al.*, 2010, *Globodera* sp. (Skarbilovich, 1959) Behrens, 1975, *Punctodera chalcoensis* Stone, Sosa Moss y Mulvey, 1976, *Cactodera rosae* Cid del Prado y Miranda, 2008, y *Meloidogyne* sp. Goeldi, 1982.

b) Describir las alteraciones estructurales de células y tejidos producidas por los nematodos *Meloidodera astonei*, *Globodera mexicana*, *Globodera* sp., *Punctodera chalcoensis*, *Cactodera rosae* y *Meloidogyne* sp.

1.2 HIPÓTESIS

Existe variación en las alteraciones estructurales celulares en los sitios de alimentación inducidos por los nematodos de la familia Heteroderidae.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Establecimiento y tipos de sitios de alimentación inducidos por la familia

Heteroderidae

Cuando eclosionan los juveniles de segundo estadio (J2) de la familia Heteroderidae, buscan a su hospedante y son atraídos por los exudados radicales compuestos básicamente de aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, compuestos fenólicos, mucílago, proteínas y otros metabolitos secundarios que libera el hospedante, los J2 invaden las puntas de las raíces; la penetración involucra acción mecánica (estilete) y enzimática (celulasas y pectinasas) (Lindford, 1942; Deubert y Rohde, 1971; Bird *et al.*, 1975; Jones y Northcote, 1992; Holtmann *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 2003; Sharma, 2006; Sumita y Bhagawati, 2014). El juvenil (J2) con su estilete atraviesa las paredes celulares, migran intracelular e intercelularmente y finalmente se establecen de forma permanente, alimentándose e inyectando secreciones de las glándulas esofágicas tales como: fosfatasa ácida, proteínas básicas como lisina, histidina y arginina, celulasa, pectinasa, glucosa, proteasas, superóxido dismutasa, péptido, endoglucanasas y comienzan los cambios bioquímicos y citológicos en las células del sistema vascular cerca de la región cefálica e inducen la formación de un sincitio o célula gigante (Dropkin, 1969; Wyss y Zunke, 1986; Hussey, 1989; Sharma, 2006; Curtis, 2007). Las secreciones pueden digerir parcialmente el citoplasma de la célula antes de la ingestión (Hussey, 1989). Existen dos tipos de células gigantes, una de ellas es la célula gigante con un solo núcleo que es formado por los siguientes géneros de la subfamilia Heteroderinae, no formadores de quistes: *Meloidodera*, *Rhizonema*, *Bellodera*, *Sarisodera*, *Hylonema* y *Rotylenchulus macrodoratus* (Hoplolaimidae). La cual presenta un sólo núcleo hipertrofiado, la pared de la célula gigante es engrosado sólo en la región de la cabeza del nematodo. Por otra parte, encontramos que la célula gigante multinucleada

inducida por *Meloidogyne* spp. es una estructura vascular que se desarrolla por la expansión de media docena de células del parénquima del cilindro vascular. Cada una de las células incorporadas llega a ser multinucleada por repetidas mitosis en ausencia de citocinesis (Subbotin, 1993; Sijmons *et al.*, 1994).

La formación del sitio de alimentación es una parte integral de la relación parásito – hospedante de los nematodos endoparásitos sésiles miembros de Tylenchulidae (*Tylenchulus*, *Trophotylenchulus*), Hoplolaimidae (*Rotylenchulus*), Pratylenchidae (*Nacobbus*) y Heteroderidae (*Globodera*, *Punctodera*, *Heterodera*, *Cactodera*, *Atalodera*, *Meloidodera*, *Rhizonema*, *Sarisodera*, *Meloidogyne*, etc.) (Cuadro 1). Los sitios de alimentación tienen una alta actividad metabólica del cual dependen los organismos (Endo, 1871; Subbotin, 1993). Se considera que las células modificadas no sólo es la respuesta de la planta a la infección, sino también como resultado de una larga coevolución que proporciona una relación equilibrada entre el parásito y su hospedante (Subbotin, 1993).

Los sitios de alimentación pueden ser de varias formas, el mejor conocido es el sincitio multinucleado característico de los géneros formadores de quistes *Afenestrata*, *Heterodera*, *Cactodera*, *Globodera* y *Punctodera*. Sin embargo, el sincitio también lo forman los nematodos no formadores de quistes como es el caso de *Atalodera* y *Verutus* (Mundo-Ocampo y Baldwin, 1983; Cohn *et al.*, 1984). Por otra parte, *Meloidodera* y *Sarisodera*, inducen una sola célula gigante con un núcleo hipertrofiado. En el caso de *Meloidogyne* es un grupo de células gigantes hipertrofiadas y multinucleadas debido a la repetida división nuclear sin división celular (Jones, 1981; Subbotin, 1993; Sijmons *et al.*, 1994; Caillaud, 2008). Durante la evolución de los nematodos sedentarios se originaron primero las células gigantes uninucleadas y posteriormente la formación de los sincitios (Subbotin, 1993). Los sincitios son multicelulares, multinucleados

producidos por la disolución parcial de pared celular y la fusión de protoplastos de las células adyacentes. En la formación de los sincitios, las células se fusionan y se agrandan en tamaño (Cohn *et al.*, 1984; Vovlas & Inserra, 1986; Baldwin *et al.*, 1989; Subbotin, 1989). La influencia patológica más compleja es causada por el género *Meloidogyne* spp. ya que induce células hipertrofiadas multinucleadas, debido a la repetida mitosis nuclear sin división celular. Este complejo de células gigantes están unidos por los plasmodesmos y funcionan como una sola unidad (Subbotin, 1993).

Las células gigantes que inducen los nematodos sedentarios se caracterizan por un núcleo agrandado con nucléolo hipertrofiado, numerosos organelos en el citoplasma, tales como: mitocondria, plástidos, membranas de retículo endoplásmico, dictiosomas. Estos cambios implican una alta actividad metabólica del protoplasto, síntesis intensiva y transporte de nutrientes desde los tejidos adyacentes a la célula modificada (Subbotin, 1993).

Cuadro 1. Sitios de alimentación causados por nematodos sedentarios del orden Tylenchida, parásitos en raíces de plantas (Subbotin, 1993).

| Especie | Tipo de sitio de alimentación | Autor (es) |
|---|-------------------------------|---|
| <i>Tylenchulus semipenetrans</i> | Células nutridoras | Cohn, 1965; Himmelhoch <i>et al.</i> , 1979 y otros. |
| <i>Trophotylenchulus floridensis</i> | Células nutridoras | Cohn & Kaplan, 1983. |
| <i>Meloidodera charis</i> , <i>M. floridensis</i> , <i>M. mexicana</i> y <i>M. zacanensis</i> | Célula gigante uninucleada | Ruehle, 1962; Mundo-Ocampo & Baldwin, 1983; Heald, 1984; Cohn <i>et al.</i> , 1984; Subbotin, 1989; Cid del Prado & Cárdenas, 1995. |
| <i>Rhizonema sequoiae</i> | Célula gigante uninucleada | Cid del Prado Vera & Lownsberry, 1984. |

| | | |
|---|----------------------------|--|
| <i>Bellodera utahensis</i> | Célula gigante uninucleada | Mundo-Ocampo & Baldwin, 1984. |
| <i>Sarisodera hydrophila</i> | Célula gigante uninucleada | Mundo-Ocampo & Baldwin, 1981, 1983. |
| <i>Hylonema ivorense</i> | Célula gigante uninucleada | Taylor <i>et al.</i> , 1978. |
| <i>Rotylenchulus macrodoratus</i> | Célula gigante uninucleada | Cohn, 1976; Vovlas & Inserra, 1976; Cohn & Mordechal, 1977; Inserra & Vovlas, 1979, 1980; Vovlas, 1983. |
| <i>Verutus volvigentis</i> | Sincitio | Mundo-Ocampo & Baldwin, 1983; Cohn <i>et al.</i> , 1984. |
| <i>Thecavermiculatus andinus</i> | Sincitio | Mundo-Ocampo & Baldwin, 1984; Baldwin <i>et al.</i> , 1989. |
| <i>Ekphymatodera thomasoni</i> | Sincitio | Baldwin <i>et al.</i> , 1989; Mundo-Ocampo & Baldwin, 1992. |
| <i>Atalodera ucra, A. Ionicerae</i> | Sincitio | Mundo-Ocampo & Baldwin, 1981, 1983. |
| <i>Afenestrata africana</i> | Sincitio | Baldwin & Bell, 1985. |
| <i>Sphaeronema rumicis</i> | Sincitio | Vovlas & Inserra, 1986; Subbotin, 1989. |
| <i>Meloidoderita sp.</i> | Sincitio | Andrews & Krusberg, 1981; Cohn & Mordechai, 1982; Subbotin, 1986. |
| <i>Nacobbus aberrans</i> | Sincitio | Schuster <i>et al.</i> , 1965; Jones & Payne, 1977. |
| <i>Rotylenchulus reniformis, R. borealis, R. parvus, R. macrosoma</i> | Sincitio | Birchfield, 1962; Cohn, 1973, 1976; Rebois <i>et al.</i> , 1975; Jones & Dropkin, 1975; Vovlas <i>et al.</i> , 1985. |

| | | |
|---|------------------------------|---|
| <i>Heterodera trifolii</i> , <i>H. avenae</i> | Sincitio | Mankau & Linford, 1960; Jones & Fushtey, 1966; Grymaszewskis & Golinowsin, 1987; Subbotin <i>et al.</i> , 1989, 1991. |
| <i>Cactodera eremica</i> | Sincitio | Baldwin & Bell, 1985. |
| <i>Punctodera chalconensis</i> | Sincitio | Suárez, 1985. |
| <i>Globodera pallida</i> | Sincitio | Endo, 1971; Jones & Northcote; 1972; Melillo <i>et</i> <i>al.</i> , 1990 y otros. |
| <i>Meloidogyne</i> spp. | Célula gigante multinucleada | Christie, 1936; Dropkin & Nelson, 1960; Bird, 1974 y otros. |

2.2 Clasificación taxonómica de *Meloidodera astonei* Cid del Prado y Rowe, 2000

Clase: Nematoda

Subclase: Secernentea

Orden: Tylenchida

Suborden: Tylenchina

Superfamilia: Tylenchoidea

Familia: Heteroderidae

Subfamilia: Heteroderinae

Género: *Meloidodera*

Especie: *M. astonei*

2.3 Aspectos generales de *Meloidodera astonei*

Entre los nematodos no formadores de quistes encontramos al género *Meloidodera* con 13 especies. Las especies de *M. floridensis* Chitwood, Hannon & Esser, 1956; *M. armeniaca* Poghossian, 1960; *M. belli* Wouts, 1973; *M. charis* Hooper, 1960; *M. eurytyla* Bernard, 1981; *M. hissarica* Krall & Ivanova, 1992; *M. sikhotealiniensis* Eroshenko, 1978; *M. tadjikistanica* Kirjanova & Ivanova, 1966; *M. tianschanica* Ivanova & Krall, 1985; *M. ulni* Turkina & Chizcov, 1986; estas especies son ampliamente distribuidas en Europa, Asia, Alaska y USA. La mayoría son parásitas de plantas leñosas incluyendo árboles forestales. Sin embargo, *M. eurytyla* parasita pastos en Alaska y *M. charis* se encuentra frecuentemente en el mezquite, pero parasita también a plantas herbáceas como el maíz, sorgo, okra (*Abelmoschus esculentus*) y césped (Heald y Golden, 1969; Heald *et al.*, 1984). Una de las especies que se puede considerar de importancia agrícola es *M. charis* ya que afecta al maíz (*Zea mays* L.) con amplia distribución en Nebraska (Heald *et al.*, 1984).

En México se han encontrado tres especies de *Meloidodera*, *M. mexicana* Cid del Prado, 1991 que parasita cultivos agrícolas como chile (*Capsicum annuum* L.); *M. zacanensis* Cid del Prado, 1998 que se encontró parasitando raíces de árboles de tejocote (*Crataegus pubescens* Steud), en el estado de Michoacán y *Meloidodera astonei* Cid del Prado y Rowe, 2000 parasitando a *Solanum rostratum* Dunal en la localidad de La Purificación, Texcoco, Estado de México. Se realizaron estudios histopatológicos en *M. mexicana* en raíces de chile y *M. zacanensis* en raíces de tejocote, encontrando la formación de una célula gigante uninucleada, originándose de una célula del parénquima vascular. Las células gigantes tienen el citoplasma denso, varias vacuolas y un núcleo hipertrofiado y amorfo (Cid del Prado y Cárdenas, 1995).

2.4 Clasificación taxonómica de *Globodera* sp. (Skarbilovich, 1959) Behrens, 1975 y *Globodera mexicana* (Campos-Vela, 1967) Subbotin, Mundo-Ocampo y Baldwin, 2010

Clase: Nematoda

Subclase: Secernentea

Orden: Tylenchida

Suborden: Tylenchina

Superfamilia: Tylenchoidea

Familia: Heteroderidae

Subfamilia: Heteroderinae

Género: *Globodera*

Especie: *Globodera* sp.

G. mexicana

2.5 Aspectos generales de *Globodera* sp. y *Globodera mexicana*

Actualmente el género *Globodera* cuenta con 10 especies y la especie tipo es *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Skarbilovich, 1959; el resto de las especies son: *G. artemisiae* (Eroshenko & Kazachenko, 1979) Behrens, 1975; *G. bravoae* Franco, Cid del Prado & Lamonthe-Argumedo, 2000; *G. leptonepia* (Cobb & Taylor, 1953) Skarbilovich, 1959; *G. mali* (Kirjanova & Borisenko, 1975) Behrens, 1975; *G. mexicana* (Campos-Vela, 1967) Subbotin, Mundo-Ocampo y Baldwin, 2010; *G. millefolii* (Kirjanova & Krall, 1965) Behrens, 1975; *G. pallida* Stone, 1973; *G. tabacum tabacum* (Lownsbery & Lownsbery, 1954)

Skarbilovich, 1959 y *G. zelandica* Wouts, 1984 (Subbotin *et al.*, 2010). El género *Globodera* abarca especies de gran importancia agrícola y económica, algunas son consideradas con menos importancia ya que su ubicación es restringida a ciertas zonas o su hospedante no es de importancia económica. Sin embargo, este género tiene dos especies con un significativo impacto económico debido a su distribución mundial, las cuales son: los nematodos formadores de quistes de la papa *G. rostochiensis* y *G. pallida*. La identificación de estas dos especies es esencial para las estrategias de manejo tales como el uso de cultivares resistentes. La especie *G. tabacum tabacum*, es menos importante que los nematodos formadores de quistes de la papa (Baldwin y Mundo-Ocampo, 1991). Las especies de *G. tabacum tabacum*, *G. leptonepia*, *G. mexicana*, y *G. millefolii*, se han observado atacando a diversas plantas solanáceas silvestres y únicamente en inoculaciones artificiales en invernadero se ha comprobado que se reproducen y causan daño a plantas cultivadas (Quiñones, 1979; Subbotin *et al.*, 2010). El género *Globodera* es ampliamente distribuido en malezas tanto en México como en América Central (Baldwin y Mundo-Ocampo, 1991).

En el ejido de San Diego Huehuecalco, Municipio de Amecameca, Estado de México, se encontró una población de *Globodera* en *Solanum stoloniferum* por lo que se procedió a coleccionar material para estudiar su histopatología. Aunque se desconoce la importancia de este nematodo ya que no se conoce su rango de hospedantes, debido a que solamente se ha encontrado en una población silvestre de papa no cultivada.

La especie *Globodera mexicana* Campos Vela, 1967, se colectó en raíces de *Solanum rostratum* Dunal, en el poblado de Tecocac, Municipio de Huamantla, Tlaxcala. En condiciones de invernadero se reproduce y causa fuertes daños a tomate, pero no completa su ciclo de vida en papa, *Solanum tuberosum* L. y especies de *Nicotiana* incluyendo *N. tabacum*, su ciclo de vida se

completa de 23-24 días a 20 °C (Quiñones, 1979; Campos-Vela, 1967 citado por Subbotin *et al.*, 2010). Años después, Golden y Ellington (1972), consideraron a *G. mexicana* como un *nomen nudum*, porque la descripción del nematodo fue presentado en una tesis doctoral, la cual no se consideró como una publicación válida. Por otra parte, Golden y Ellington (1972), examinaron el nematodo formador de quistes de origen mexicano y concluyeron que está relacionado (conespecífico) con *G. tabacum virginiae*. Sin embargo, se han realizado estudios por análisis de electroforesis bidimensional de proteínas (Bossis & Mugniéry, 1993), PCR-RFLP-ITS (Thiéry & Mugniéry, 1996) e ITS-rRNA (Subbotin *et al.*, 2010), en donde muestran que *G. mexicana* está más cercana a *G. pallida* que a *G. tabacum* o *G. rostochiensis*. Asimismo, Subbotin *et al.* (2010) realizaron la validación de la especie como *G. mexicana* sp. n.

2.6 Clasificación taxonómica de *Punctodera chalcoensis* Stone, Sosa Moss y Mulvey, 1976

Clase: Nematoda

Subclase: Secernentea

Orden: Tylenchida

Suborden: Tylenchina

Superfamilia: Tylenchoidea

Familia: Heteroderidae

Subfamilia: Heteroderinae

Género: *Punctodera*

Especie: *P. chalcoensis*

2.7 Aspectos generales de *Punctodera chalcoensis*

El género *Punctodera* tiene tres especies, *P. punctata* (Thorne, 1928) Mulvey and Stone, 1976; *P. chalcoensis* Stone, Sosa Moss and Mulvey, 1976 y *P. matadorensis* Mulvey and Stone, 1976; la más importante en México es el nematodo enquistador del maíz (*P. chalcoensis*) que fue observado por primera vez por Vázquez (1976) en maíz (*Zea mays* L.) en campos de Huamantla, Tlaxcala, a finales de 1950, denominándolo como *Heterodera punctata*. A principios de 1960 se observaron daños por nematodos formadores de quistes en cultivos de maíz en el valle de México como en Chalco y posteriormente en los estados de Puebla y Tlaxcala, identificándose como *H. punctata* (Sosa-Moss y González, 1973; Vázquez, 1976).

P. chalcoensis es un nematodo endoparásito sedentario, que ataca al maíz (*Zea mays*) y teocintle (*Zea mexicana*); el cual causa daños económicos a cultivos de maíz en México; que pueden llegar a reducir el rendimiento cerca del 100% (Balwin y Mundo-Ocampo, 1991). *P. chalcoensis* está ampliamente distribuida en zonas templadas productoras de maíz. Este nematodo formador de quiste se ha reportado en los siguientes estados: Jalisco, México, Michoacán, Puebla, Querétaro, Tlaxcala, Veracruz (Vázquez, 1976; Sosa-Moss, 1986; Baldwin y Mundo-Ocampo, 1991).

Los daños que se observan en campos infestados con *P. chalcoensis* son machones con plantas cloróticas, achaparramiento y marchitez. En suelos arenosos, se observan los síntomas de manera drástica. Dos meses después de la siembra, se encuentra una gran cantidad de hembras blancas que se observan adheridas a la superficie de la raíz de las plantas infestadas. El daño es más severo durante la temporada de lluvias, ya que estimula la eclosión de los juveniles y favorece la invasión de las raíces. *P. chalcoensis* sobrevive y se reproduce bien en todo tipo de suelos, pero el daño es más severo en los suelos arenosos volcánicos. Estudios realizados en invernadero,

reportan que las heridas causadas por *P. chalcoensis* permiten la entrada de patógenos como los hongos, la asociación de dichos patógenos pueden llegar a causar pérdidas del rendimiento de hasta el 90% (Sosa-Moss 1987; Baldwin y Mundo-Ocampo, 1991).

En condiciones experimentales, el ciclo de vida se completa aproximadamente de 30 a 50 días. Las hembras forman un quiste globoso o en forma de pera, pálido a marrón oscuro, puede contener de 200 a 400 huevos. Los juveniles de segundo estadio emergen de los quistes, penetran a las raíces de su hospedante y establecen un sitio de alimentación especializado (sincitio) en los tejidos de la raíz (Mundo-Ocampo y Baldwin; 1984). Suárez *et al.* (1985), mencionan que *P. chalcoensis* inducen la formación de sincitios en la endodermis y adyacente a las células del periciclo. Las células del periciclo se hipertrofian, el citoplasma se vuelve denso y el núcleo hipertrofiado.

2.8 Clasificación taxonómica de *Cactodera rosae* Cid del Prado y Miranda, 2008

Clase: Nematoda

Subclase: Secernentea

Orden: Tylenchida

Suborden: Tylenchina

Superfamilia: Tylenchoidea

Familia: Heteroderidae

Subfamilia: Heteroderinae

Género: *Cactodera*

Especie: *C. rosae*

2.9 Aspectos generales de *Cactodera rosae*

El género *Cactodera* es nativo del hemisferio occidental. Actualmente, el género *Cactodera* cuenta con 14 especies, tales como: *C. cacti* (Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941) Krall & Krall, 1978 como especie tipo y probablemente nativa de México y quizás en el centro y sur de América, se encuentra distribuida ampliamente. Aunque está mejor adaptado a subtrópicos áridos, se ha dispersado ampliamente por las plantas ornamentales y en climas fríos se encuentra comúnmente en invernaderos (Krall and Krall, 1978 citado por Baldwin y Mundo-Ocampo, 1991); *C. acnidae* (Schuster & Brezina, 1979) Wouts, 1985; *C. amaranthi* (Stoyanov, 1972) Krall & Krall, 1978; *C. eremica* Baldwin & Bell, 1985; *C. estonica* (Kirjanova & Krall, 1963) Krall & Krall, 1978; *C. evansi* Cid del Prado & Rowe, 2000; *C. galinsogae* Tovar Soto, Cid del Prado, Nicol, Evans, Sandoval & Martínez, 2003; *C. milleri* Graney & Bird, 1990; *C. radicale* Chizhov, Udalova & Nasonova, 2008; *C. rosae* Cid del Prado & Miranda, 2008; *C. salina* Baldwin, Mundo-Ocampo & McClure, 1997; *C. torreyanae* Cid del Prado & Subbotin, 2013; *C. thornei* (Golden & Raski, 1977) Wouts, 1985 y *C. weissii* (Steiner, 1949) Krall & Krall, 1978 (Sturhan, 2002; Tovar-Soto *et al.*, 2003; Cid del Prado y Miranda, 2008; Subbotin *et al.*, 2010; Cid del Prado y Subbotin, 2013).

Las especies de *Cactodera* se encuentran asociadas a miembros de Cactaceae, Amaranthaceae, Chenopodiaceae Caryophyllaceae, Portulacaceae y Polygonaceae principalmente (Stoyanov, 1972; Krall & Krall, 1978; Evans y Rowe, 1998; Sthuran, 2002). Las especies que se encuentran en México, son: *C. amaranthi*, encontrándose en espinaca y otras Chenopodiaceae y Amaranthaceae en la región central; *C. cacti* se encuentra asociada a Cactaceae (Tovar-Soto *et al.*, 2006); *C. galinsogae* en *Galinsoga parviflora*, cebada (*Hordeum vulgare*), *Bidens odorata* y *Avena fatua* en los Valles Altos del estado de Hidalgo; *C. evansi* parasita al clavel en Villa

Guerrero, Estado de México; *C. salina* en *Salicornia bigelovii* (Chenopodiaceae) en Sonora (Baldwin *et al.*, 1997; Cid del Prado y Rowe, 2000; Tovar-Soto *et al.*, 2006); *C. rosae* parasitando a cebada en Apan, Hidalgo y *C. torreyanae* parasitando al romerito (*Suaeda nigra*) en Texcoco, Estado de México (Cid del Prado y Miranda, 2008; Cid del Prado y Subbotin, 2013). *C. rosae* se encontró en cebada en Apan, Hidalgo y en esta ocasión se encontró en *Amaranthus hybridus* en el Rancho Los Sauces en Tecocac, Huamantla (Cid del Prado, com. pers.).

Los sitios de alimentación inducidos por *Cactodera* son sincitios. En el caso de *C. galinsogae* indujo un sincitio de forma irregular, ubicados principalmente en el cilindro vascular y córtex de las raíces de *Galinsoga parviflora*, *Bidens odorata* y *Hordeum vulgare*. Las alteraciones celulares fueron citoplasma denso y granuloso, engrosamiento y ruptura de células corticales por la penetración del nematodo, desorganización, desplazamiento y rompimiento del xilema y floema (Hernández *et al.*, 2006; Tovar-Soto *et al.*, 2007).

2.10 Clasificación taxonómica de *Meloidogyne* sp. (Goeldi, 1892)

Clase: Nematoda

Subclase: Secernentea

Orden: Tylenchida

Suborden: Tylenchina

Superfamilia: Tylenchoidea

Familia: Heteroderidae

Subfamilia: Meloidogyninae

Género: *Meloidogyne*

Especie: *Meloidogyne* sp.

2.11 Aspectos generales de *Meloidogyne* sp.

Las agallas de los nematodos agalladores se registraron por primera vez en 1855 por Berkeley quien encontró raíces de pepino infectadas por nematodos dentro de un invernadero en Inglaterra (Buhner, 1938). Los nematodos agalladores (*Meloidogyne* spp.) son de importancia económica como parásitos de plantas y se distribuyen a nivel mundial. Son parásitos obligados y parasitan a más de 2000 especies de plantas incluyendo monocotiledóneas, dicotiledóneas, herbáceas y plantas leñosas. Las especies de *Meloidogyne* parasitan los principales cultivos agrícolas, hortalizas, frutales y plantas ornamentales cultivadas en climas tropicales, subtropicales y templadas (Walker, 1969; Eisenback y Hitschmann, 1991; Sharma; 2006). La mayoría de las plantas atacadas pertenecen a las familias Solanaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Liliaceae, Chenopodiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Brassicaceae y Malvaceae las cuales sufren daños considerables por los nematodos agalladores en zonas subtropicales y en el Mediterráneo. Las pérdidas de rendimientos estimadas van de 5 al 60% en los diferentes cultivos (Sharma, 2006). *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla* son las especies de gran importancia por su amplia distribución en áreas agrícolas a nivel mundial.

El género *Meloidogyne* afecta el sistema radical, causando anomalías o malformaciones en los tejidos de la raíz, alterando la absorción y conducción de agua y minerales, afectando la floración y fructificación del cultivo y la reducción del rendimiento. Cuando la infección es severa provoca la muerte en las plantas (Sharma, 2006). Los juveniles pueden encontrarse a una

profundidad de 68 cm y ocasionalmente a 249 cm en raíces de árboles en suelos arenosos (Walker, 1969).

El parasitismo se desarrolla con la formación de células gigantes causando hipertrofia e hiperplasia a las células adyacentes resultando la formación de agallas en las raíces. Las agallas son inducidas por reguladores de crecimiento como auxinas y citocininas secretadas por los J2 de *Meloidogyne*. Las células gigantes son esenciales en la relación parásito–hospedante. Su metabolismo activo se mantiene por las secreciones de la glándula esofágica dorsal o por la extracción de solutos por la hembra adulta. Las células gigantes son esenciales para la transferencia de nutrientes hacia los nematodos. Los fotosintatos son movilizados a las células gigantes de las raíces causando síntomas como reducción en el crecimiento, clorosis, amarillamiento, pérdida de vigor, defoliación prematura, marchitez en regiones cálidas y secas (Bird, 1968; Walker, 1969; Jones y Northcote, 1972; Jones, 1981; Bird y Koltai, 2000; Sharma, 2006; Curtis, 2007) ya que la planta no cuenta con los fotosintatos necesarios para realizar su actividad metabólica. Las células gigantes son multinucleadas por repetida mitosis sin citocinesis (Subbotin, 1993).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Obtención de material vegetal

Se colectó material vegetal en campo para obtener muestras de raíces parasitadas con las diferentes especies de nematodos estudiadas, las raíces (secundarias y terciarias) colectadas fueron: *Solanum rostratum* la cual es hospedante de *Meloidodera astonei*; de *S. rostratum* parasitada por *Globodera mexicana*, de *Amaranthus hybridus* hospedante de *Cactodera rosae* colectadas en el Rancho Los Sauces en Tecocac, Huamantla, Estado de Tlaxcala; de *S. stoloniferum* parasitada por *Globodera* sp., de maíz (*Zea mays*) hospedante de *Punctodera chalcoensis* colectadas en el ejido de San Diego Huehucalco, Amecameca, Estado de México y de un árbol tropical parasitadas por *Meloidogyne* sp., colectadas en el humedal del Centro de Investigaciones Costeras La Mancha (CICOLMA) Actopan, Estado de Veracruz, perteneciente al Instituto de Ecología.

3.2 Fijado de material vegetal

Se procedió a lavar las raíces de cada especie vegetal colectada en campo, posteriormente se realizó una búsqueda y observación detallada revisando las raíces en un microscopio estereoscópico para seleccionar las partes con presencia de quistes o hembras blancas, las cuales fueron cortadas en fragmentos de 1 cm de longitud para facilitar la penetración del fijador, posteriormente se colocaron en el fijador FAA (formaldehído 10%, ácido acético 5%, alcohol 50% y agua destilada 35%) (López, *et al.*, 2005). Según Pulido *et al.* (2002) los tiempos de fijación que requiere cada órgano (tallos, raíces u hojas) son diferentes en función de su grosor y dureza. Así, se requieren dos horas para hojas y flores, mientras que los tallos leñosos y las raíces de 24-48 horas en el fijador; por lo que los materiales trabajados se dejaron en el fijador un mínimo de 48 horas.

3.3 Deshidratación e inclusión en parafina del material vegetal

El material vegetal de cada especie vegetal previamente fijado en FAA se procedió a lavarlo con agua corriente durante tres minutos, se colocaron las muestras en un porta muestras previamente identificadas para llevarlos a un cambiador automático de tejidos de la marca Tissue-Tek® para su deshidratación, infiltración e inclusión en parafina por lo que se realizaron los cambios graduales de la siguiente manera: alcohol 50%, 70%, 95% (un cambio), 100% (tres cambios), alcohol absoluto-xilol 1:1, xilol al 100% (tres cambios) y parafina (dos cambios); cada una con una duración de cuatro horas excepto en el último cambio de parafina (Merck) que permaneció como mínimo 48 horas.

3.4 Bloques de parafina con material vegetal incluido

Para formar los bloques de parafina con raíces incluidas, se utilizaron cajas de aluminio etiquetadas, éstas se colocaron en una platina caliente (Thermostat-Lab-Line), se vació parafina sólida, cuando la parafina pasó al estado líquido se colocaron las raíces en el fondo de la caja, orientándola con una aguja de disección previamente calentada y se dejó solidificar. Los bloques de parafina con material vegetal incluido se separaron de las cajas de aluminio y se pegaron en una base de madera. Con la navaja de un filo se formó una pirámide truncada que incluye la muestra. Se colocó la muestra en el micrótopo rotatorio y se realizaron los cortes seriados a 8 y 10 micrómetros de grosor, teniendo cortes longitudinales y transversales. Se montaron en serie en portaobjetos con adhesivo de Haupt agregándole unas gotas de formaldehído al 3.7%, para extender los cortes se pusieron en una platina de calentamiento por 10 segundos, se eliminó el exceso de formaldehído y se dejaron secar los portaobjetos con los cortes adheridos; finalmente los portaobjetos se colocaron en la platina caliente a una temperatura de 33 °C durante aproximadamente 12 horas.

3.5 Tinción de cortes histológicos

Para teñir los cortes, se procedió a la eliminación de la parafina de los cortes adheridos en los portaobjetos, por lo que se tomaron los portaobjetos con los cortes previamente calentados y se pasaron a xilol al 100% dos cambios, alcohol al 100%, 96%, 70% y 50% durante tres minutos cada uno. Posteriormente los cortes se tiñeron con safranina al 1% en etanol con un mínimo de duración de 24 horas, transcurrido el tiempo se procedió a lavar y deshidratar con alcohol al 50%, 70%, se contrastó con verde rápido al 0.03% en etanol al 96% durante unos segundos, lavando el exceso de verde rápido con alcohol al 100%, se continuaron deshidratando en dos cambios de alcohol al 100%, se aclararon con dos cambios de xilol puro y finalmente se montaron en resina sintética (Hycel) colocando el cubreobjetos (Yáñez, 1977). El material se observó y analizó en un microscopio compuesto American Optical; las fotografías fueron tomadas con un fotomicroscopio III de Karl Zeiss con cámara digital PAXcam3 y Microscopio Rossbach con cámara canon EOS50D.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Descripción de alteraciones histológicas causadas por *Meloidodera astonei* en *Solanum rostratum*

Los resultados de este trabajo muestran que en los cortes transversales de las raíces sanas de *Solanum rostratum*, en crecimiento primario presenta una epidermis formada por células parenquimatosas de forma isodiamétrica sin espacios intercelulares entre ellas; la corteza formada por células de parénquima de forma isodiamétrica con espacios intercelulares pequeños constituida por cuatro estratos de células parenquimatosas, siendo las más internas la endodermis formada por una capa de células especializadas que delimita la corteza y el cilindro vascular. El cilindro vascular formado por dos haces vasculares (diarca) en crecimiento primario (Fig. 1. A). Las raíces en crecimiento secundario se observa que los haces del xilema y floema secundario son originados por el cambium.

En cortes transversales de raíces dañadas por el nematodo *Meloidodera astonei*, se observaron hembras adultas adheridas a las raíces, con la parte posterior de su cuerpo fuera de las raíces y la parte anterior embebida en éstas. Se observó que *M. astonei* penetra a través de las células de la epidermis y la corteza, causando células colapsadas y necrosadas (Fig. 1. B, C) (Conh *et al.*, 1984; Heald, 1984; Cid del prado y Cárdenas, 1995), el nematodo sigue introduciéndose hasta llegar a las células del floema secundario en donde se forma el sitio de alimentación ya que las células o célula parenquimatosas próximas al floema secundario sufren hipertrofia en donde se observa una célula modificada con un solo núcleo y nucléolo hipertrofiado (Fig. 1. B, D). El daño del nematodo es tan severo que se observan los sitios de alimentación con muy poco contenido citoplasmático y en su mayoría se observan huecos vacíos (Fig. 1. B, C). Las dimensiones de las células gigantes van de 20-234 μm de largo \times 13-220 μm de ancho. Esta

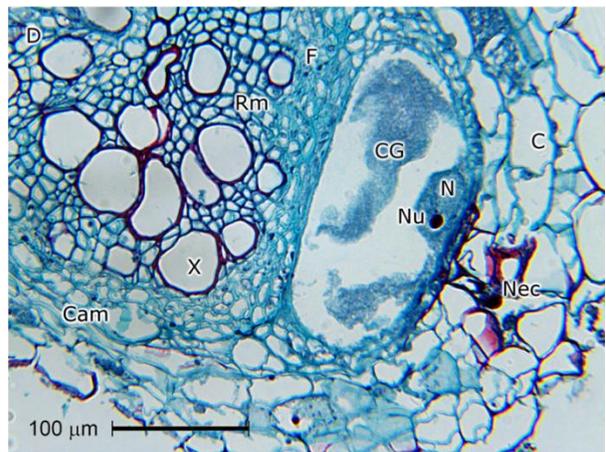
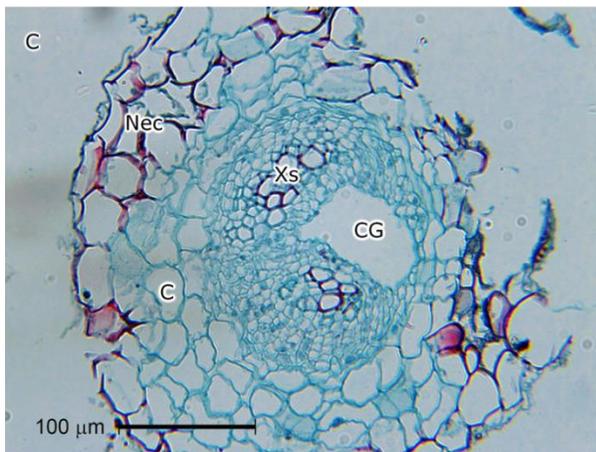
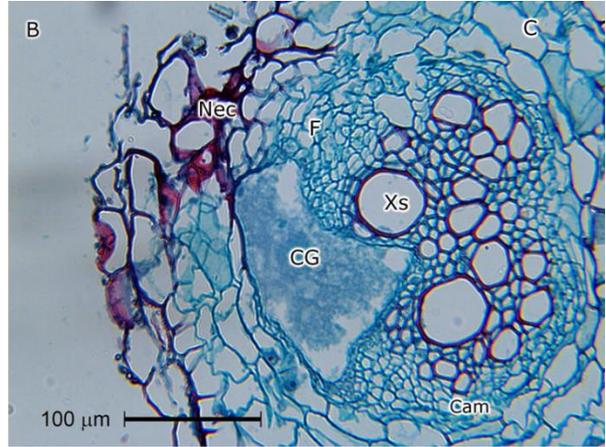
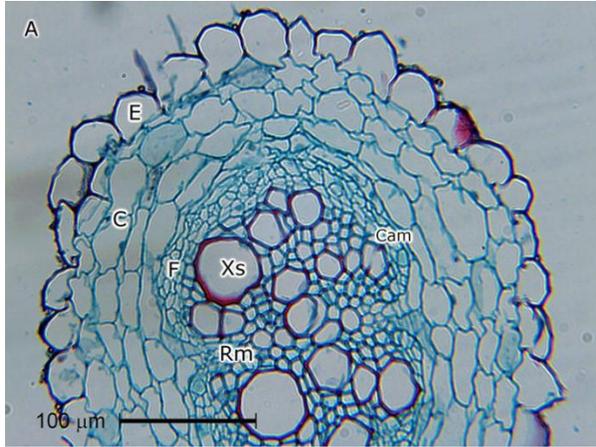
célula gigante uninucleada presenta en su periferia una división celular abundante con células pequeñas y un núcleo prominente (Fig. 1. D). Algunos sitios de alimentación se forman entre un haz vascular y otro, en el parénquima secundario del floema presentando hiperplasia (Fig. 1. B, C). En algunas raíces con crecimiento primario se observa que la célula gigante se origina a partir del periciclo y abarca casi la totalidad del cilindro vascular (Fig. 1. E).

Se observa que algunos de los tubos cribosos confluyen al sitio de alimentación por lo que se considera que abastecen a la célula gigante uninucleada, aunque otros pasan lateralmente al sitio de alimentación permitiendo a la planta evadir los daños ocasionados por *M. astonei*, por lo que se considera que existe una coevolución entre *S. rostratum* y *M. astonei* ya que aparentemente las células del floema no están dañadas (Fig. 1. F, H).

En cortes longitudinales se observa que los sitios de alimentación se encuentran a nivel del floema secundario dentro del cilindro vascular, presentando un núcleo muy grande con su respectivo nucléolo, se forman huecos grandes y además la corteza se necrosa y se colapsa. Las células del floema secundario se agrandan y presentan un citoplasma con contenido denso, posteriormente estas células se observan completamente vacías. El tamaño de estas células gigantes es de 63-360 μm de largo \times 28-158 μm de ancho. Las células circunvecinas muestran división celular excesiva con un citoplasma denso y núcleos prominentes (Fig. 1. F, G, H).

Meloidodera astonei indujo células gigantes básicamente en el floema secundario; similar a lo indicado por Heald (1984), en donde reporta que *M. charis* induce la célula gigante en el protofloema y en algunas ocasiones en el metaxilema en *Abelmoschus esculentus* y *Euphorbia glyptosperma*. A diferencia de lo reportado por Mundo Ocampo y Baldwin (1983) en donde induce su sitio de alimentación en el periciclo en *Paeonia californica*. Las especies como *M.*

floridensis en *Pinus taeda*, *P. clausa* y *P. elliottii*; *M. belli* en *Artemisia tridentata*, *M. mexicana* en *Capsicum annuum* y *M. zacanensis* en *Crataegus pubescens* indujeron la célula gigante en el periciclo, aunque básicamente el sitio de alimentación lo establecen en el cilindro vascular de sus respectivos hospedantes. Las células gigantes inducidas por las especies del género *Meloidodera* presentan citoplasma denso, uninucleadas con nucléolos hipertrofiados, excepto *M. charis* en *Abelmoschus esculentus* y *Euphorbia glyptosperma* que fueron multinucleados y en *M. astonei* en *S. rostratum*, presentaron poco contenido citoplasmático e inclusive en la mayoría se observaron vacíos. Las especies estudiadas de *Meloidodera* al igual que *M. astonei*, las células adyacentes que rodean a la célula gigante presentan hiperplasia, a diferencia de *M. charis* y *M. belli* que presentaron tanto hipertrofia como hiperplasia y en *M. astonei* las células tienen núcleos prominentes. *M. charis*, *M. belli*, *M. mexicana* y *M. astonei* extienden el crecimiento de la célula gigante dentro del cilindro vascular provocando desplazamiento y distorsión de los haces vasculares del xilema y floema a diferencia de *M. zacanensis* y *M. floridensis* que no distorsionan tanto a los haces vasculares (xilema y floema) (Mundo-Ocampo y Baldwin, 1983; Cohn *et al.*, 1984; Heald, 1984; Cid del Prado y Cárdenas, 1995).



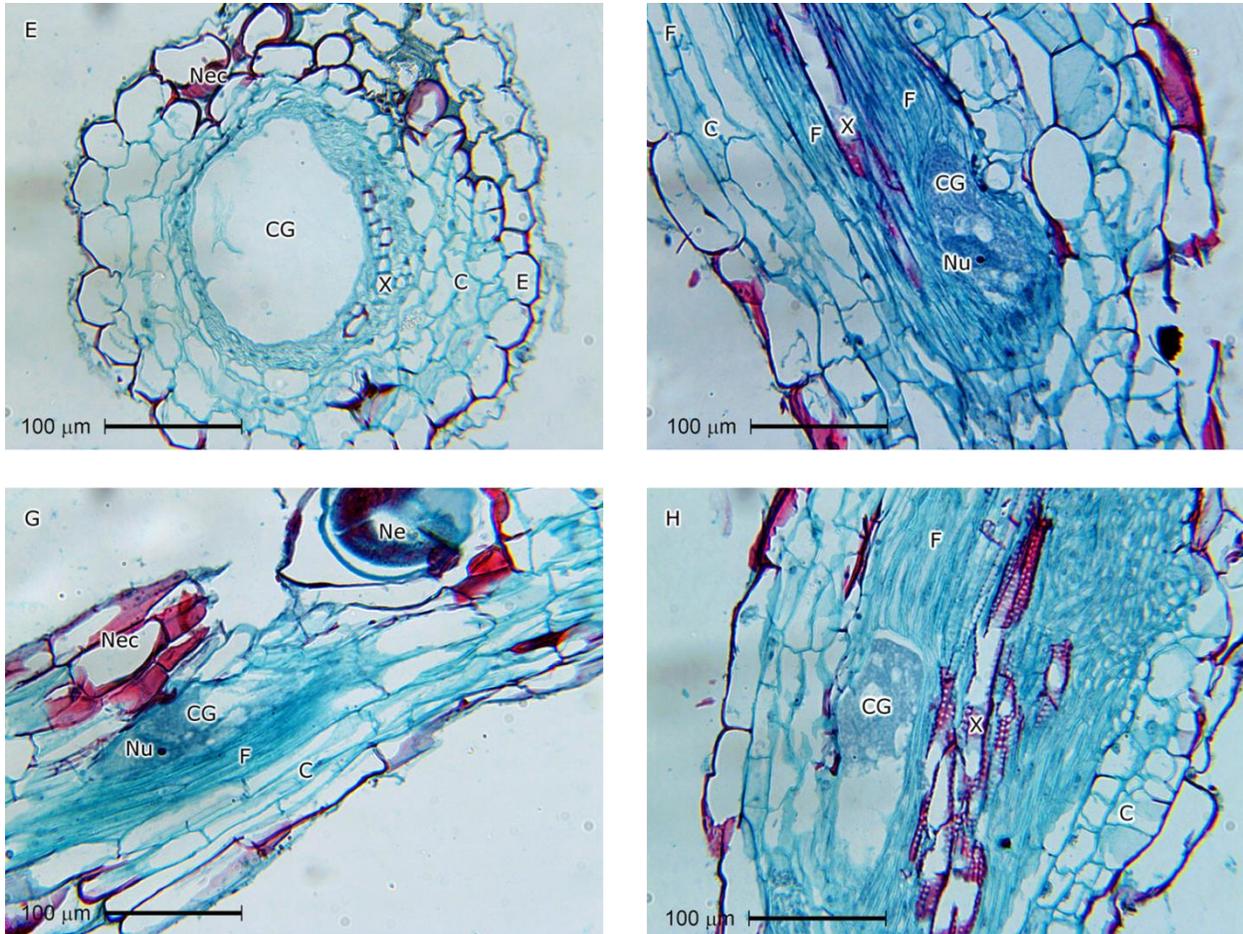


Figura 1. Histopatología inducida por *Meloidodera astonei* A-G. Corte transversal: A: Raíz sana de *Solanum rostratum*; B: Células corticales necrosadas y colapsadas, CG con denso contenido citoplasmático; C: CG sin contenido citoplasmático; D: CG con un solo núcleo y nucléolo hipertrofiado; E: Raíz con crecimiento primario con daño severo en el cilindro vascular; Corte longitudinal: F, G: CG con citoplasma denso uninucleado hipertrofiado; H: CG con poco contenido citoplasmático. C= corteza, Cam= cambium, CG= célula gigante, E= epidermis, F= floema, N= núcleo, Ne= nematodo, Nec= necrosis, Nu= nucléolo, Rm= radio medular, X= xilema, Xs= xilema secundario.

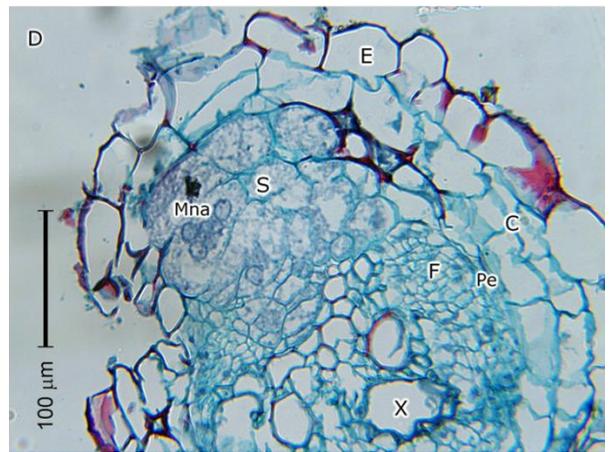
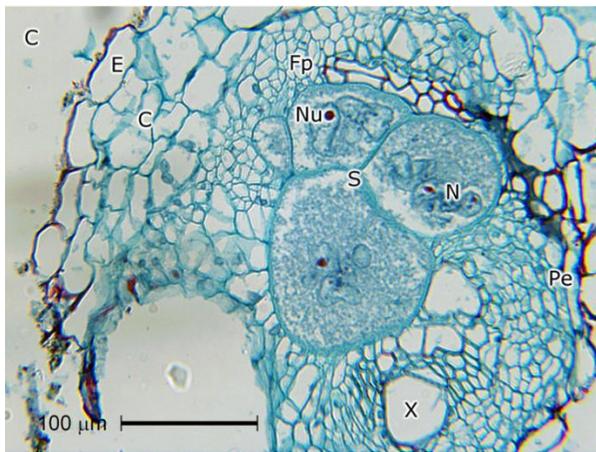
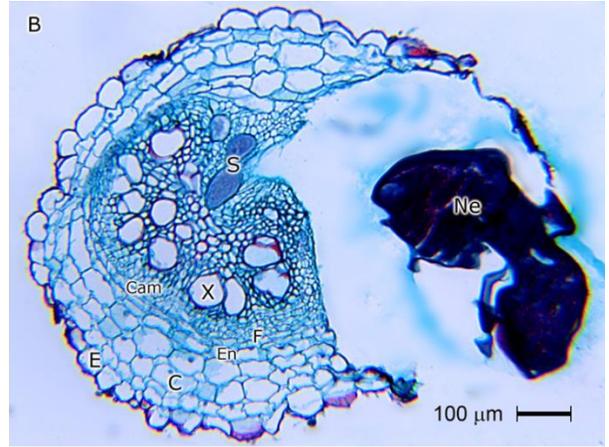
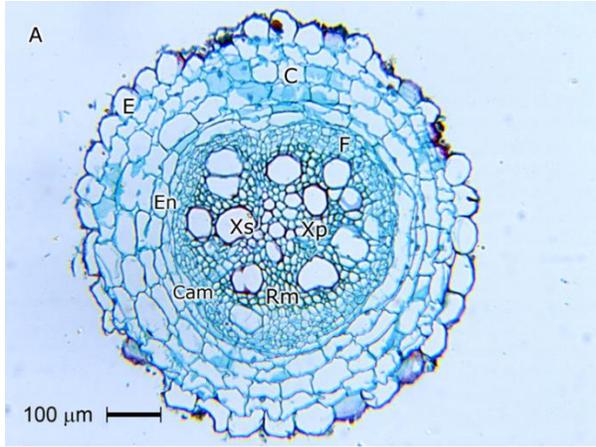
4.2 Descripción de alteraciones histológicas causadas por *Globodera* sp. en *Solanum stoloniferum*

La raíz sana de *Solanum stoloniferum* presenta una epidermis con células parenquimatosas isodiamétricas, la corteza formada por cuatro estratos de células parenquimatosas, con una endodermis, el cilindro central formado por dos haces vasculares de xilema y dos de floema, posteriormente ocurre el crecimiento secundario (Fig. 2. A).

En los cortes transversales se observó el daño provocado por la introducción de *Globodera* sp. en la raíz, provocando necrosamiento y colapso en las células de la corteza. Wyss (1992) reportó que la migración del juvenil (J2) de *Heterodera schachtii* es intracelular por lo que provoca ruptura en las paredes celulares. En este estudio se observó que a medida que el nematodo crece, se forman huecos grandes que destruyen la mayor parte de la corteza y el cilindro vascular (Fig. 2. B). El sitio de alimentación de *Globodera* sp., es inducido en las células del periciclo. Las células del floema y de la corteza son afectadas por el aumento de tamaño de las células del periciclo y cambium (Fig. 2. D). En el cilindro vascular, entre un haz vascular y otro es en donde se desarrollan los sincitios presentándose células hipertrofiadas con abundante citoplasma granuloso ocupando la parte más interna del cilindro vascular de las raíces (Fig. 2. B, C). Las raíces afectadas son de crecimiento primario y secundario, el xilema es afectado, pero como hay crecimiento secundario del xilema, la planta puede seguir desarrollándose. Los daños pueden abarcar desde el cilindro central hasta la parte más interna que es la médula, el floema también es dañado (Fig. 2. B, C, E). Las células adyacentes son hipertrofiadas y pierden la pared celular por lo que forman un sincitio (Fig. 2. D). Los sincitios presentaron dimensiones de 35-290 μm de largo \times 25-230 μm de ancho y los núcleos de 15-43 μm de largo \times 8-23 μm de ancho. En los cortes longitudinales, las células que forman parte del sitio de alimentación, mostraron un

crecimiento robusto en relación al diámetro de las raíces, el tamaño de los sincitios fueron de 73-900 μm de largo \times 20-310 μm de ancho. El floema fue muy afectado y el xilema presentó menor daño. El citoplasma muy denso (Fig. 2. F, G, H).

Estudios realizados por Doucet *et al.* (2004) reportaron que *G. tabacum* forma su sitio de alimentación en células corticales, periciclo, xilema y floema en *Nicotiana tabacum*. Por lo que es similar a lo observado en *Globodera* sp. ya que induce su sitio de alimentación en las células del periciclo, las células del floema y corteza son afectadas presentando hipertrofia en las raíces *S. stoloniferum*. En otras especies estudiadas como *G. rostochiensis* que afectó a las células de la endodermis, periciclo, parénquima vascular y corteza (Rice *et al.*, 1987) y los sincitios inducidos en *S. lycopersicon* por *G. pallida* se observaron en el cilindro central, células corticales, las células adyacentes con presencia de hiperplasia (Vovlas *et al.*, 1986). Melillo *et al.* (1990) también estudio a *G. pallida* parasitando a papa en donde reporta que los cultivares Diamante e Irene afectó el cilindro central a diferencia del cultivar Anosta que desarrolló el sincitio en las células corticales y partes externas del cilindro vascular. El género *Globodera* afecta principalmente al cilindro vascular aunque también las células corticales pueden formar parte del sincitio y pueden presentar hiperplasia en las células adyacentes al sincitio. El sincitio presenta citoplasma denso, granuloso con degradación de paredes celulares y núcleos hipertrofiados. *Globodera* sp., afecta al floema por el crecimiento del sincitio por lo que se considera que el daño es más severo que *G. rostochiensis*, *G. pallida* y *G. tabacum*.



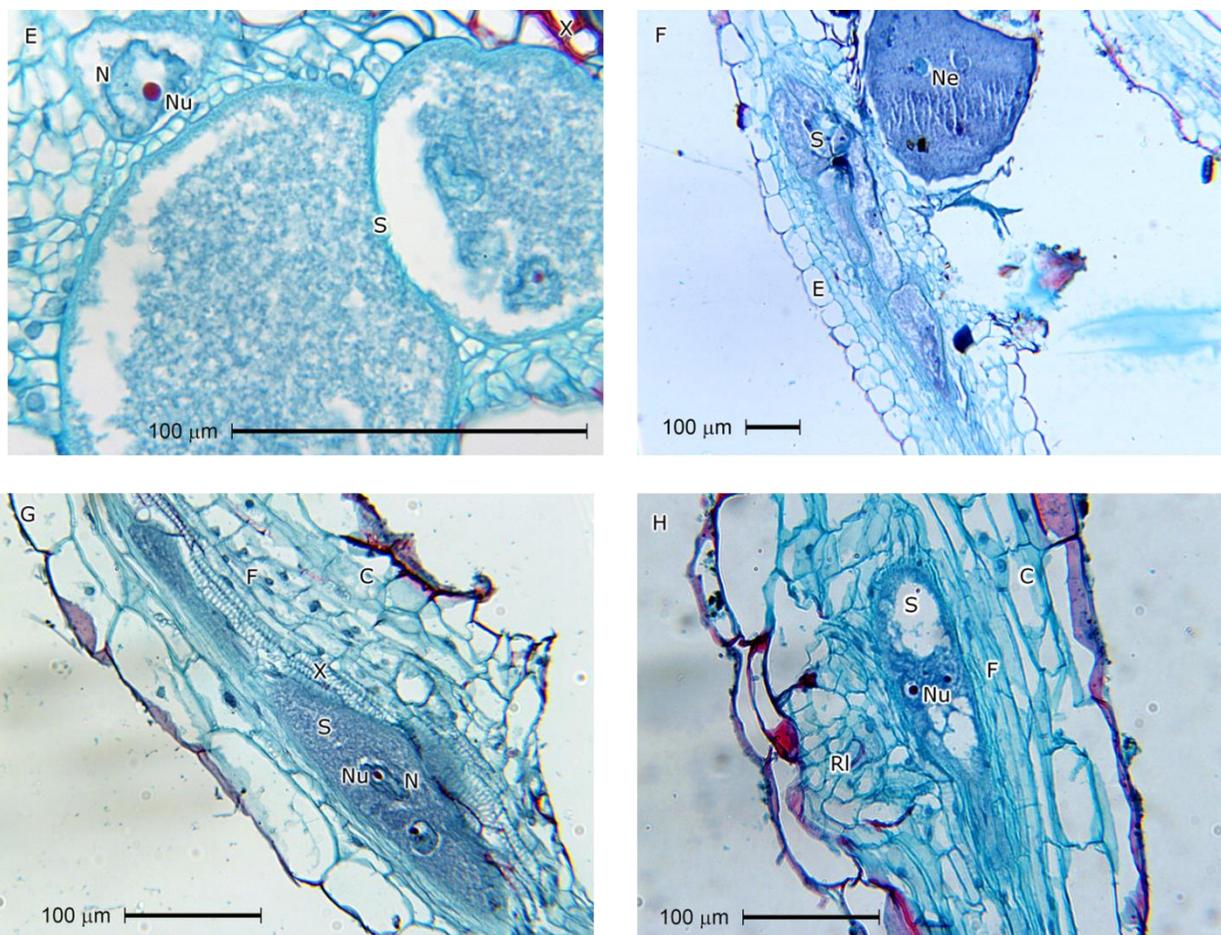


Figura 2. Histopatología inducida por *Globodera* sp. A-H. Corte transversal: A: Raíz sana de *Solanum stoloniferum*; B: Sitio de alimentación con citoplasma denso y destrucción de la corteza y cilindro vascular por el crecimiento del cuerpo de *Globodera* sp.; C: Sincitio con núcleos hipertrofiados formando agregados y nucléolos hipertrofiados; D: Sincitio con degradación de paredes celulares; E: Sincitio con citoplasma denso y granuloso, núcleos y nucléolos hipertrofiados; Corte longitudinal: F, G, H: Sincitio con citoplasma denso, granuloso, núcleos y nucléolos hipertrofiados. C= corteza, Cam= cambium, E= epidermis, En= endodermis, F= floema, Fp= floema primario, Mna= material nuclear agregado, N= núcleo, Ne= nematodo, Nu= nucléolo, Pe= periciclo, RI= raíz lateral, Rm= radio medular, S= sincitio, X= xilema, Xp= xilema primario, Xs= xilema secundario.

4.3 Descripción de alteraciones histológicas causadas por *Globodera mexicana* en *Solanum rostratum*

En los cortes transversales se muestra que *Globodera mexicana* entra a través de la corteza provocando necrosamiento y colapsamiento de ésta (Fig. 3. A), hasta alcanzar las células del periciclo en las raíces con crecimiento primario y del cambium interfascicular en raíces con crecimiento secundario, en donde induce cambios morfológicos y fisiológicos para formar el sincitio, afectando la corteza y gran parte del parénquima del cilindro central (Fig. 3. A, B). Las células que rodean al sitio de alimentación presentan hiperplasia, tienen una pared celular delgada, núcleos prominentes y citoplasma denso (Fig. 3. C). El sincitio daña tanto al xilema secundario como al floema secundario. Las dimensiones del sincitio fueron de 28-198 μm de largo \times 18-150 μm de ancho. En corte longitudinal se observa que el sincitio se forma a partir de células del periciclo y del cambium, las cuales presentan hipertrofia celular con abundante citoplasma, núcleos y nucléolos hipertrofiados, el floema secundario abastece al sincitio, éste funge como almacén de fotosintatos. Las dimensiones de los sincitios en este plano fueron de 50-560 μm de largo \times 38-200 μm de ancho (Fig. 3. D, E, F). En algunas de las células de la corteza presentaron taninos.

G. mexicana indujo su sitio de alimentación en las células del periciclo y cambium interfascicular afectando a la corteza, las células adyacentes al sincitio presentaron hiperplasia, por lo que es similar a lo observado por Vovlas *et al.* (1986) y Melillo *et al.* (1990) en *G. pallida* ya que el sincitio afectó al cilindro central, células corticales y las células adyacentes al sincitio presentaron hiperplasia. Por otra parte, *G. rostochiensis* también afectó las células de la endodermis, periciclo, parénquima vascular y corteza (Rice *et al.*, 1987). *G. tabacum* indujo el sincitio en células corticales, periciclo, xilema y floema en *N. tabacum* (Doucet *et al.*, 2004),

estas observaciones nos indican que las especies del género *Globodera* afectan principalmente al cilindro vascular. Los sincitios de *G. mexicana* presentaron degradación de paredes celulares, citoplasma denso y núcleos hipertrofiados como en *G. rostochiensis*, *G. pallida* y *G. tabacum*. Melillo *et al.* (1990) señalan que las células en donde son inducidos los sincitios pueden estar relacionadas con los diferentes grados de susceptibilidad del hospedante. Otros géneros que provocan hiperplasia en las células adyacentes al sincitio como *G. mexicana* son *Heterodera glycines* causando hipertrofia e hiperplasia en los sincitios inducidos en raíces de soya resistente y susceptible (Endo, 1991). *Cactodera galinsogae* también provocó hiperplasia en las células adyacentes a los sincitios en raíces de *Galinsoga parviflora* y *Bidens odorata*. (Hernández *et al.*, 2006).

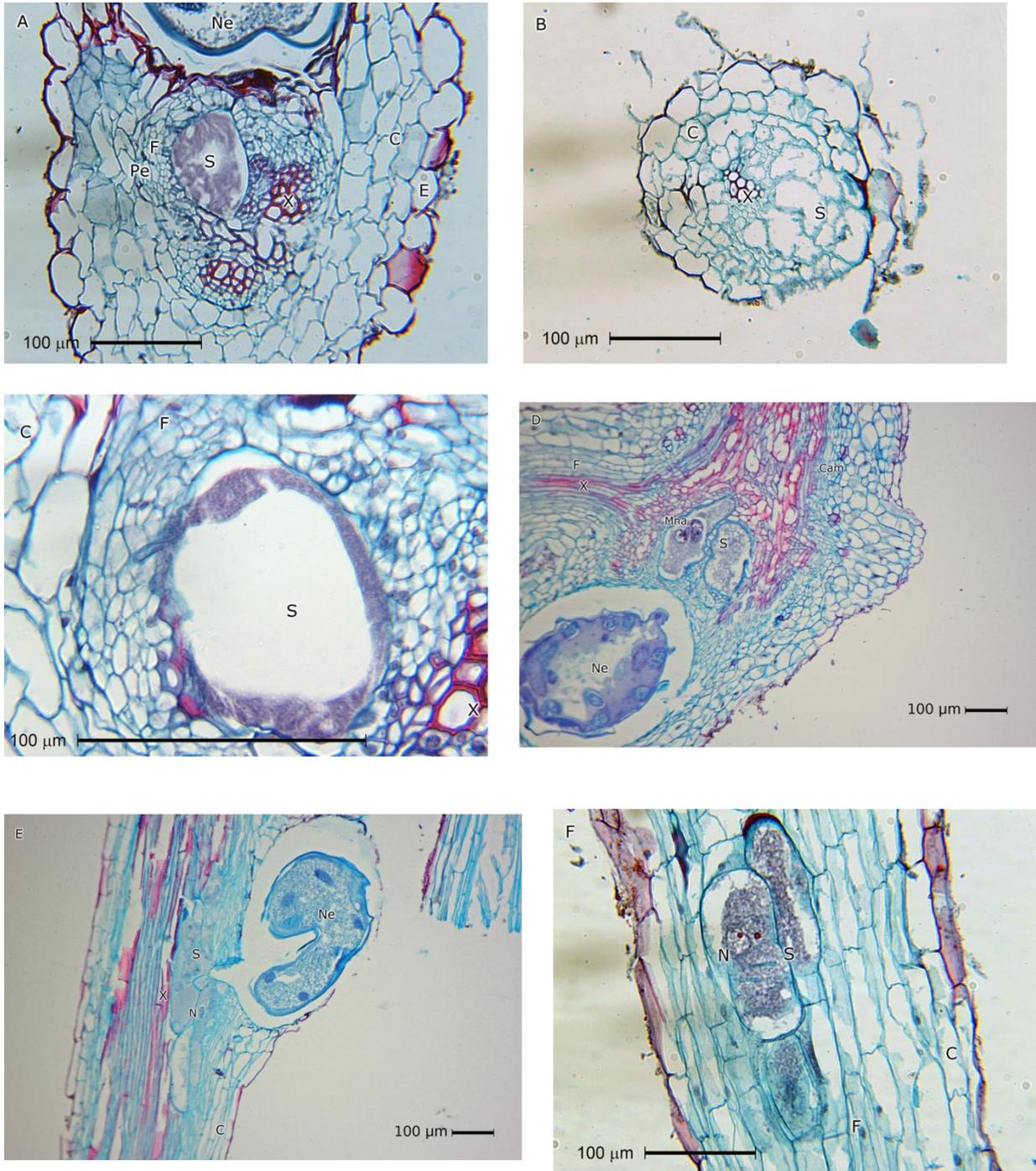


Figura 3. Histopatología inducida por *Globodera mexicana* A-D. Corte transversal: A: Raíz de *S. rostratum* con necrosis y colapso de células de la corteza, sincitio con citoplasma denso; B: Corteza afectada por el Sincitio; C: Hiperplasia de las células adyacentes al sincitio; Corte longitudinal: D: Sincitio con material nuclear agregado e hipertrofiado; E: Sincitio provocando daño en el xilema y floema; F: Sincitio con núcleos hipertrofiados. C= corteza, Cam= cambium, E= epidermis, F= floema, Mna= material nuclear agregado, N= núcleo, Ne= nematodo, Pe= periciclo, S= sincitio, X= xilema

4.4 Descripción de alteraciones histológicas causadas por *Punctodera chalcoensis* en *Zea mays*

Las raíces sanas de *Zea mays* presentan una epidermis, una corteza formada por varios estratos de 12 a 15 células parenquimáticas isodiamétricas con espacios intercelulares pequeños, la capa interna es la endodermis uniestratificada formada por células isodiamétricas sin espacios intercelulares entre ellas, las cuales presentan la banda de Caspary; el cilindro vascular está formado por el periciclo que es un tejido meristemático a partir del cual se originan las raíces laterales, próximo a este periciclo se encuentran varios vasos del protoxilema, en la región interna se encuentran los vasos del metaxilema de gran diámetro en donde el floema alterna entre estos vasos y la parte más interna se encuentra la médula formada por células parenquimatosas isodiamétricas (Fig. 4. A).

Las observaciones realizadas en los cortes transversales nos muestra que *Punctodera chalcoensis* penetra a través de la corteza hasta llegar a las células del periciclo. Las células de la corteza se observan necrosadas algunas colapsadas, similar a lo observado por Suárez *et al.*, (1985) en donde reportan que las células corticales son dañados por la penetración del nematodo. El cuello de *P. chalcoensis* crece tanto hasta alcanzar las células del periciclo, las cuales se modifican aumentando de tamaño, de tal manera que la endodermis forma como una protuberancia por el crecimiento de dichas células del periciclo afectadas por el nematodo que a su vez, dañan a las células de la corteza (Fig. 4. B). Las células que aumentan de tamaño se encuentran próximas a las células del floema posiblemente se abastecen de éste. Las células del periciclo afectadas por el nematodo aumentan de tamaño, además muestran núcleos hipertrofiados (Fig. 4. C). Las células que forman el sincitio, está formado por varias células del periciclo, endodermis y corteza, las cuales presentan citoplasma granuloso con gran actividad que deben estar

translocando fotosintatos (Fig. 4. D). En los cortes longitudinales se observan las células de la corteza, endodermis y periciclo hipertrofiados presentando citoplasma denso (Fig. 4. E, F).

Punctodera chalcoensis forma su sitio de alimentación básicamente en las células del periciclo, la endodermis y la corteza se ven afectadas, las células que aumentan de tamaño están próximas al floema; Suárez *et al.* (1985) reportan observaciones similares a diferencia de que señalan que el sincitio inicia generalmente en las células de la endodermis y en algunos casos se establece en las células del periciclo y corteza. Otras especies de nematodos formadores de quistes tales como: *Heterodera glycines*, *H. schachtii*, *Globodera rostochiensis*, *G. pallida*, *G. tabacum* y *Cactodera galinsogae*, también forman sus sitios de alimentación en el cilindro vascular y en algunas ocasiones en la corteza, en donde el grupo de células rompen sus paredes celulares y los citoplasmas se van fusionando llegando a ser un sincitio multinucleado, con citoplasma denso, núcleos y nucléolos hipertrofiados (Rice *et al.*, 1987; Melillo *et al.*, 1990; Endo, 1991; Doucet *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2006; Wieczorek y Gundler, 2006; Tovar-Soto *et al.*, 2007).

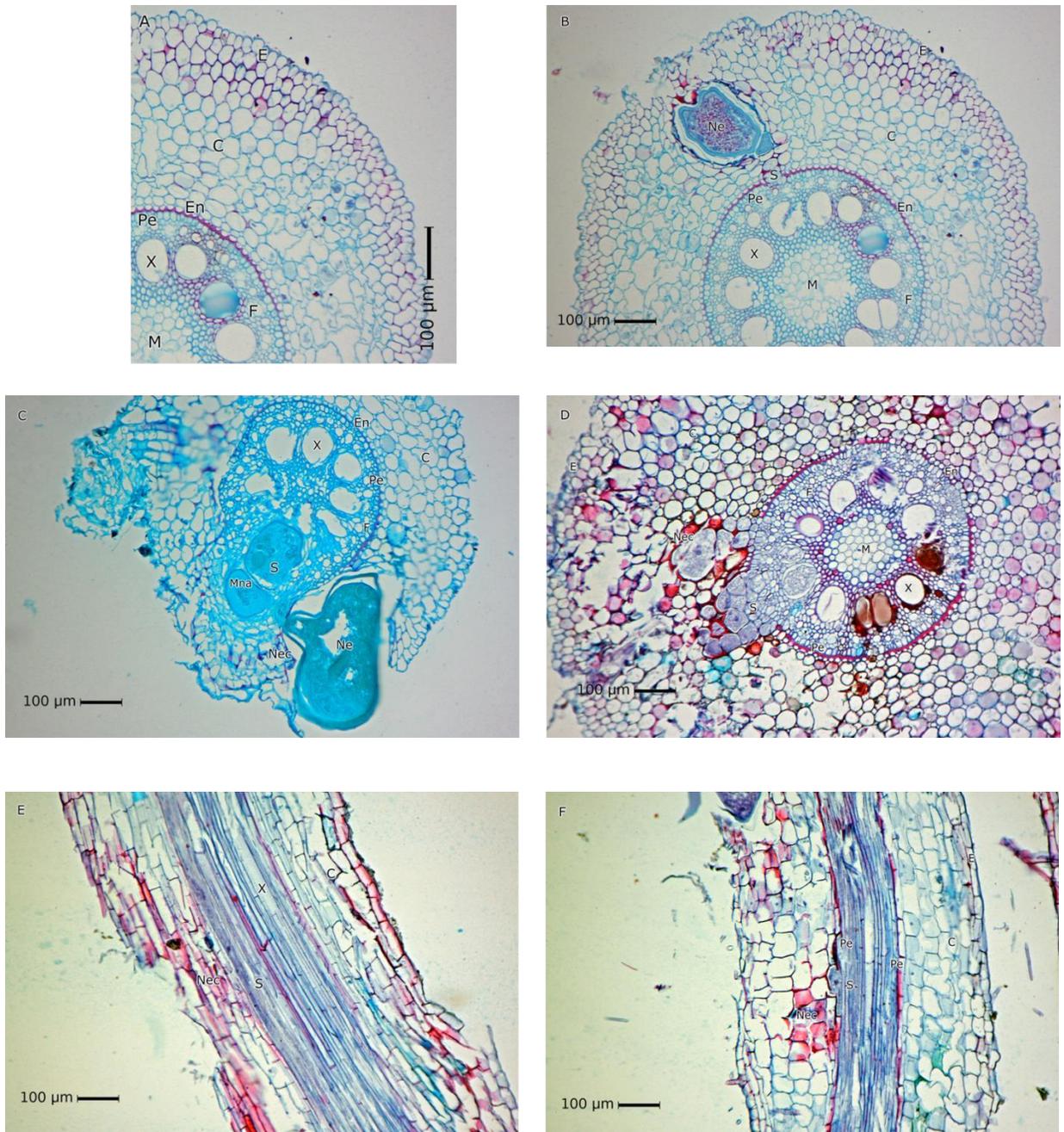


Figura 4. Histopatología inducida por *Punctodera chalconensis* A-D. Corte transversal: A: Raíz sana de *Zea mays*; B: Raíz con inicio de la hipertrofia en células corticales, endodermis y periciclo; C: Sincitio hipertrofiado con citoplasma denso y núcleos hipertrofiados; D: Sincitio en las células del periciclo, endodermis, corteza con presencia de necrosis; Corte longitudinal: E, F: Células necrosadas y colapsadas de la corteza, sincitio en células corticales, endodermis, periciclo con citoplasma denso. C= corteza, E= epidermis, En= endodermis, F= floema, M= médula, Mna= material nuclear agregado, Ne= nematodo, Nec= necrosis, Pe= periciclo, S= sincitio, X= xilema.

4.5 Descripción de alteraciones histológicas causadas por *Cactodera rosae* en *Amaranthus hybridus*

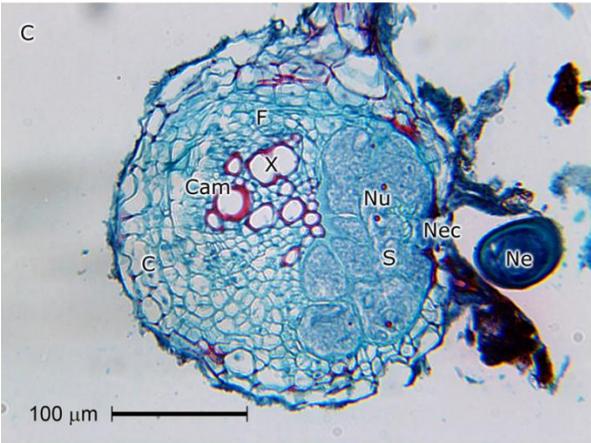
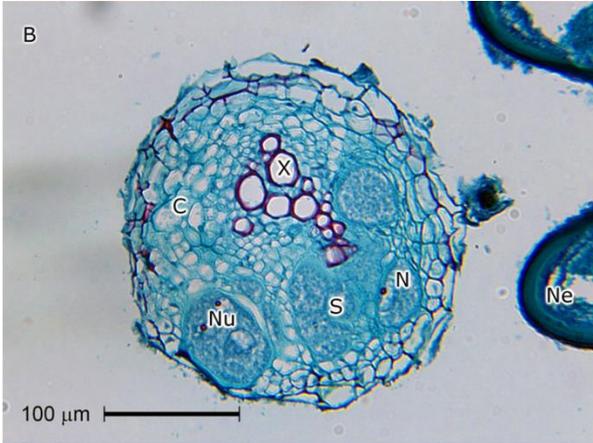
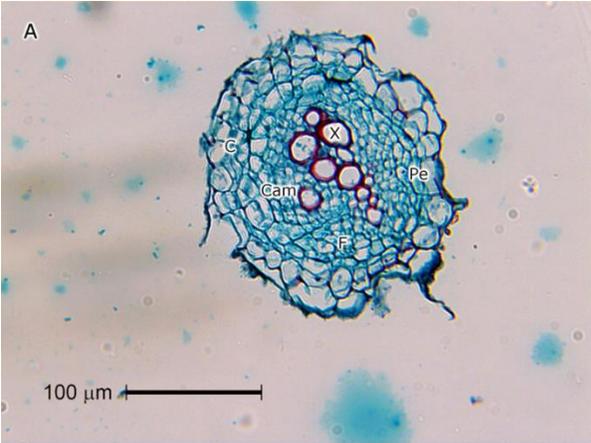
En las raíces sanas de *A. hybridus* se observa una peridermis, ya que estas raíces presentan crecimiento secundario, una corteza delgada de cuatro estratos de células, una endodermis y el cilindro central formado por cuatro haces de xilema (tetarca) y cuatro haces vasculares de floema (Fig. 5. A).

En los cortes transversales de las raíces de *A. hybridus* afectadas por *Cactodera rosae*, se observó que el segundo estadio juvenil (J2), al introducirse en las raíces va causando necrosis de las células de la corteza que a su vez, induce hipertrofia celular. Cuando el nematodo selecciona la célula para establecer su sitio de alimentación, la célula comienza a presentar cambios morfológicos y fisiológicos debido a que el nematodo secreta sustancias las cuales provocan esos cambios, la célula afectada presenta hipertrofia celular, y al paso del tiempo se afectan las células adyacentes, formando un grupo de varias células hipertrofiadas, las cuales van degradando sus paredes, estas células presentan un citoplasma muy denso, núcleos que miden 13-25 μm de largo \times 8-20 μm de ancho y nucléolos hipertrofiados, formando una estructura conocida como sincitio multinucleado. Estas células que presentan hipertrofia están próximas al tejido vascular del floema originadas por el cambium y periciclo, dependiendo de la ontogenia de los tejidos y abarcando casi la mitad del diámetro de la raíz (Fig. 5. B, C, D). Los sincitios miden 40-185 μm de largo \times 35-95 μm de ancho. Los sincitios son abastecidos por el floema lateral ya que éste no es dañado, finalmente estos sitios de alimentación se necrosan. El floema no es afectado en su totalidad por lo que le permite a la planta desarrollarse. Los cortes longitudinales nos muestran que *C. rosae* forma sincitios en la peridermis ya que estas células parenquimatosas son meristemáticas, las cuales están derivando del meristemo secundario llamado felógeno, capaces

de ser modificadas por las secreciones de dicho nematodo, que a su vez, se observa la introducción de su cabeza en esta misma región, en donde ha inducido la formación de células hipertrofiadas las cuales pueden abarcar células del floema y al cabo de cierto tiempo el contenido citoplasmático denso se ve disminuido (Fig. 5. E). El sincitio crece longitudinalmente, las células son muy alargadas y sus medidas fueron de 105-700 μm de largo \times 30-183 μm de ancho, multinucleadas con sus respectivos nucléolos, las cuales también sufren hipertrofia. Por el crecimiento tan fuerte, el floema es afectado principalmente, el xilema en menor grado (Fig. 5. E, F, G, H).

Observaciones reportadas por Tovar-Soto *et al.* (2007) en *Hordeum vulgare* reportan que el nematodo *C. galinsogae* afectó las células del cilindro vascular y cortical, con desorganización, desplazamiento y rompimiento del xilema y floema. Similar al daño provocado por *C. rosae* en *A. hybridus*, en donde formó su sitio de alimentación en las células que están próximos al tejido vascular del floema originadas por el cambium y periciclo, a su vez, las células corticales son afectadas. El xilema fue afectado pero principalmente el floema. Asimismo, otras especies como *C. eremica* inducen sincitios grandes con desorganización de gran parte del cilindro vascular en las raíces de *Atriplex confertifolia* (Baldwin y Bell, 1985) y *C. galinsogae* en *Galinsoga parviflora* y *Bidens odorata*, los sincitios fueron ubicados principalmente en el cilindro vascular y córtex, hubo presencia de hiperplasia en las células adyacentes del sincitio (Hernández *et al.*, 2006) lo que no fue observado en *C. rosae* y *C. eremica*. Los sincitios presentan hipertrofia celular, sus paredes fueron degradándose permitiendo la fusión de los citoplasmas densos, con núcleos y nucléolos hipertrofiados (Hernández *et al.*, 2006, Tovar-Soto *et al.*, 2007). Por otra parte, Otras especies como *H. glycines*, *G. rostochiensis*, *G. pallida*, *G. tabacum* son especies que inducen su sitio de alimentación en el cilindro vascular pero a la vez afectan a las células

corticales; lo que fue observado el *C. rosae* y a su vez, el daño principal en el floema también se presentó en *G. tabacum* (Rice *et al.*, 1987; Melillo *et al.*, 1990; Endo, 1991; Doucet *et al.*, 2004).



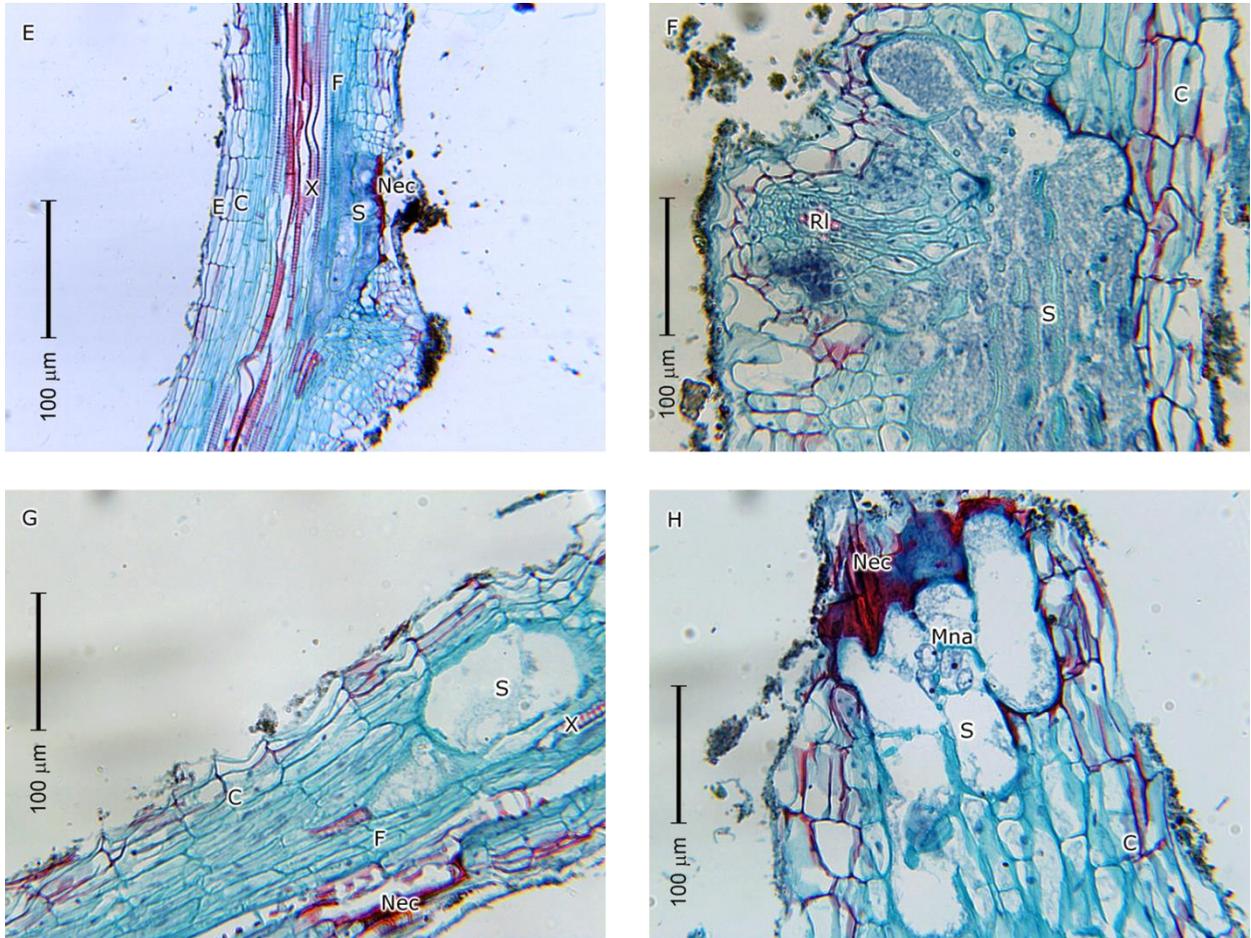


Figura 5. Histopatología inducida por *Cactodera rosae* A-H. Corte transversal: A: Raíz sana de *Amaranthus hybridus*; B: Sincitio en corteza y tejido vascular del floema; C: Degradación de pared celular del sitio de alimentación y citoplasma denso; D: Sincitio con núcleo y nucléolo hipertrofiados; Corte longitudinal: E: Sincitio con células hipertrofiadas y alargadas; F: Sincitio con paredes celulares degradados; G, H: Sincitio con poco contenido citoplasmático, núcleos y nucléolos hipertrofiados. C= corteza, Cam= cambium, E= epidermis, F= floema, Mna= material nuclear agregado, Ne= nematodo, Nec= necrosis, N= núcleo, Nu= nucléolo, Rl= raíz lateral, S= sincitio, X= xilema.

4.6 Descripción de alteraciones histológicas causadas por *Meloidogyne* sp. en árbol tropical

En las raíces sanas de un árbol tropical se observó la peridermis formada por felógeno las cuales son células meristemáticas, en donde las células externas dan origen al súber o corcho y éstos contienen taninos. Por otra parte, las células internas forman la felodermis, las cuales son células vivas con un núcleo prominente. La corteza está formada por varios estratos de células y dentro de éstas hay grupos de células que contienen posiblemente almidón y en la parte más interna de la corteza está el cambium, el cual da origen al floema secundario hacia la parte externa y hacia la parte interna al xilema secundario. La parte interna está ocupada completamente por el xilema por lo que no presenta médula (Fig. 6. A).

Las hembras de *Meloidogyne* sp. se encontraron embebidas completamente en las raíces del árbol leñoso, con la parte anterior hacia el cilindro vascular y la parte posterior en la corteza, presentando una fuerte hiperplasia de la cual se forman las agallas, aunque las agallas son pequeñas, las cuales miden de 0.30 – 2.3 mm, las células corticales que están cercanas al cuerpo del nematodo presentan lignificación (Fig. 6. B). *Meloidogyne* sp. establece su sitio de alimentación en las células del parénquima que forman los radios medulares entre los haces secundarios del xilema y floema, formando grupos de 4-19 células gigantes multinucleadas, estas células presentan un citoplasma denso, con núcleos y nucléolos hipertrofiados. En la zona meristemática de la corteza que es parte del felógeno presenta hipertrofia celular (Fig. 6. C, D). Debido a la presencia de mitosis nuclear, la gran mayoría de núcleos presentan dos nucléolos. En los cortes longitudinales se observan células gigantes multinucleadas sin presentar necrosis. En el sitio de alimentación presenta hipertrofia e hiperplasia de las células adyacentes, estas células son abastecidas por el floema secundario, fotosintatos de los cuales se alimenta el nematodo (Fig. 6. E, F).

Durante la formación del sitio de alimentación, algunas células presentan hipertrofia e hiperplasia que son característicos en las células gigantes y formación de agallas (Williamson y Hussey, 1996); las células gigantes pueden establecerse en las células corticales, endodermis, periciclo y parénquima vascular de los tejidos radicales de sus hospedantes Hussey y Williamson (1997 citado por Vovlas *et al.*, 2005). En este trabajo se observamos que *Meloidogyne* sp. establece su sitio de alimentación en las células del parénquima que forman los radios medulares formando grupos de 4 a 19 células gigantes multinucleadas. La cantidad de núcleos presentes en cada célula gigante fue de 3 a 23 en el plano transversal y de 3 a 47 en el plano longitudinal. Medina-Canales *et al.* (2011), mencionan que *M. arenaria* formaron grupos de 4 a 12 células gigantes multinucleadas y para *M. hapla* de 3 a 7 células gigantes en zanahoria (*Daucus carota*). Asimismo, reportan que la cantidad de núcleos observados varió entre 40 y 60. Pedrosa *et al.* (1996) observaron de 5-8 células gigantes inducidas por *M. arenaria* en frijol (*Phaseolus vulgaris*) y el número de núcleos en *M. arenaria* raza 2 fue de 16-64 mientras que en *M. arenaria* raza 1 hubo de 8-34 núcleos por cada célula gigante. Vovlas *et al.* (2005) reportan que *M. arenaria* forman grupos de 4-6 células gigantes en garbanzo (*Cicer arietinum*) y el número de núcleos fue de 20-30. Bird (1973) reporta que observó 40 núcleos por célula gigante en haba (*Vicia faba*) causado por *M. javanica*. De los estudios realizados presentaron menor cantidad de grupos de células gigantes que *Meloidogyne* sp. Sin embargo, se asemeja al grupo de células mínimas formadas por *M. arenaria* en zanahoria en donde la cantidad mínima fue similar pero el máximo que fue de 12, es superado por *Meloidogyne* sp. siendo 19 células gigantes. Por otra parte, la cantidad de núcleos que se contabilizaron en cada célula gigante es variable a los reportados por Medina-Canales *et al.* (2011), Pedrosa *et al.* (1996), Vovlas *et al.* (2005) y Bird (1973). Adicionalmente, se observó que la gran mayoría de núcleos presentan dos nucléolos. Las

células gigantes presentan un citoplasma denso, con núcleos y nucléolos hipertrofiados. Las células adyacentes a las células gigantes presentaron hiperplasia, las cuales fueron similares a lo observado por Singh *et al.* (2013), en donde reportaron que la respuesta inmediata en *Lens culinaris* causada por *M. arenaria* fue hipertrofia e hiperplasia en los tejidos de la raíz cercana a la parte anterior del nematodo. Estas células hipertrofiadas presentaron citoplasma denso y granular. Medina-Canales *et al.* (2011), observaron que las células gigantes presentan citoplasma denso y granuloso afectando principalmente a las células del cilindro vascular y corteza con núcleos y nucléolos hipertrofiados en zanahoria. Las células gigantes son multinucleadas con núcleos y nucléolos hipertrofiados y se incrementa en la densidad citoplasmática (Huang, 1985 citado por Vovlas *et al.*, 2005). Medina-Canales *et al.* (2011), reportaron que observaron desplazamiento en el cilindro vascular en zanahoria lo que fue causado por *Meloidogyne* sp. sin embargo, se observó que el xilema es el que abastece a las células gigantes.

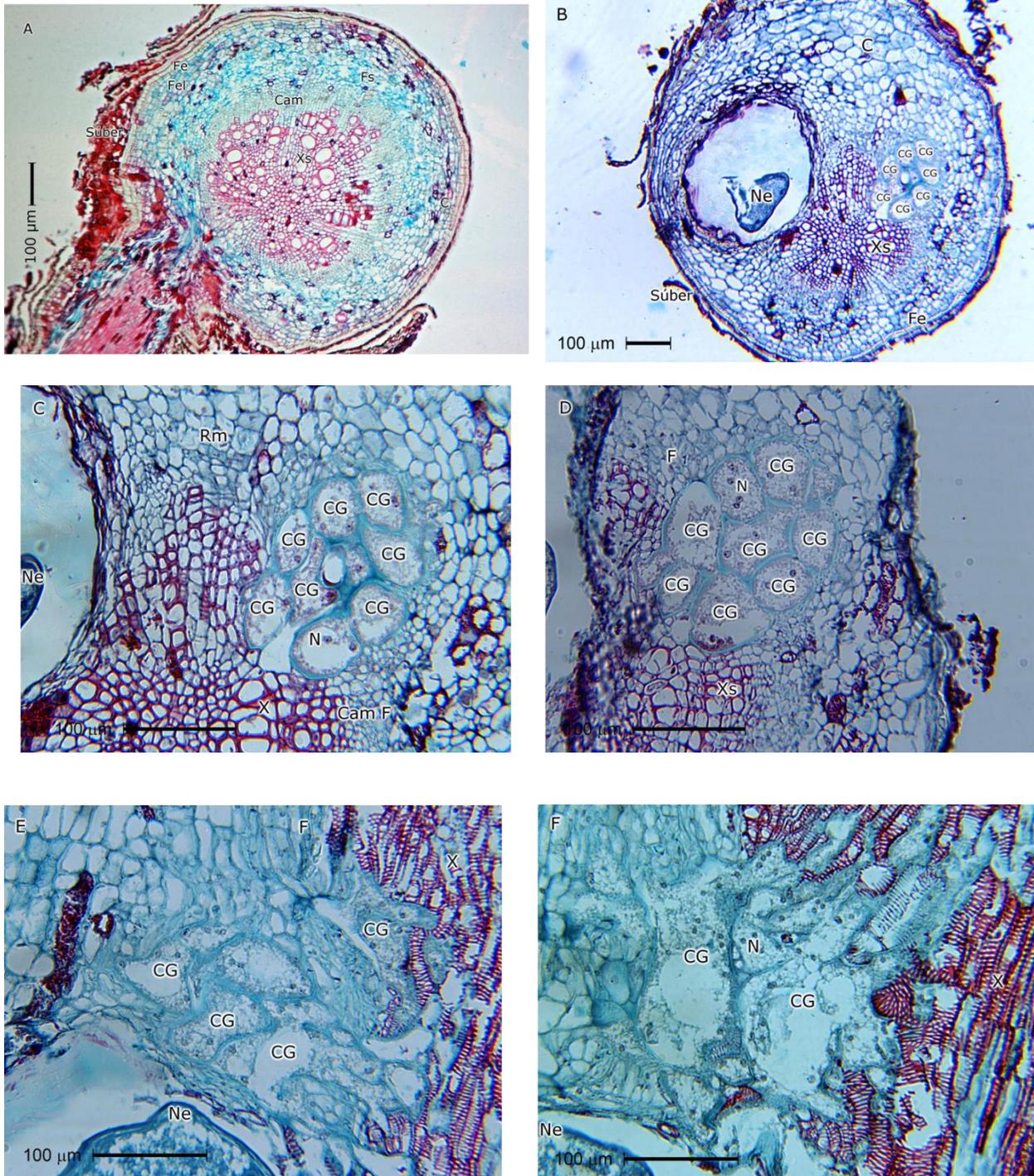


Figura 6. Histopatología inducida por *Meloidogyne* sp. A-F. Corte transversal: A: Raíz sana de árbol tropical; B: Hembras embebidas en las raíces, con presencia de hiperplasia celular; C, D: Células gigantes multinucleadas y nucléolos hipertrofiados, citoplasma denso; Corte longitudinal: E, F: Células gigantes multinucleadas con hiperplasia en células adyacentes. C= corteza, Cam= cambium, CG= célula gigante, F= floema, Fe= felógeno, Fel= felodermis, Fs= floema secundario, N= núcleo, Ne= nematodo, Rm= radio medular, X= xilema, Xs= xilema secundario.

5. CONCLUSIONES

En este estudio se observaron tres tipos de sitios de alimentación: 1) una sola célula gigante con un solo núcleo hipertrofiado inducido por *Meloidodera astonei*, 2) sincitio gigante multinucleado inducido por los nematodos como *Globodera* sp., *Globodera mexicana*, *Punctodera chalconensis* y *Cactodera rosae* y 3) células gigantes multinucleadas inducidas por *Meloidogyne* sp.

La condición de multinucleados de los sitios de alimentación inducidos por los nematodos formadores de quistes (*Globodera* sp., *G. mexicana*, *P. chalconensis* y *C. rosae*) es por la degradación de paredes celulares y fusión de citoplasmas y el número de núcleos es mucho menor. Por otra parte, el nematodo agallador (*Meloidogyne* sp.) inducen células gigantes en donde los núcleos presentaron mitosis, razón por la cual hay mayor cantidad de núcleos.

En todas las especies estudiadas, los sitios de alimentación se forman a partir de células no diferenciadas o meristemáticas como del felógeno, periciclo y cambium. Las células dañadas presentaron hipertrofia, citoplasma denso, núcleos y nucléolos hipertrofiados:

M. astonei indujo una célula gigante en el floema secundario observándose poco contenido citoplasmático e inclusive la mayoría vacíos, las células que rodean a la célula gigante presentaron hiperplasia con núcleos prominentes. Algunas de las raíces con crecimiento primario, el cilindro vascular fue dañado casi en su totalidad.

Globodera sp. estableció su sincitio en las células del periciclo afectando al floema y corteza. El floema presentó mayor daño que el xilema. En el caso de *G. mexicana*, las alteraciones inducidas fueron básicamente en las células del periciclo y cambium interfascicular presentando hipertrofia y las células circunvecinas del sincitio presentaron un exceso de división celular. El daño fue tanto al xilema como al floema secundario.

P. chalcoensis daña principalmente a las células del periciclo en donde indujo su sincitio, aunque también es afectada la endodermis y las células corticales.

En *C. rosae* se observó que las células del periciclo y cambium próximas al floema fueron dañadas, aunque el sincitio también afectó a las células corticales provocando hipertrofia celular. El floema abastece al sincitio por lo que se ve afectado.

Meloidogyne sp. estableció las células gigantes multinucleadas en las células del parénquima que forman los radios medulares entre los haces secundarios del xilema y floema, formando grupos de 4-19 células hipertrofiadas en donde la mayoría de los núcleos presentaron dos nucléolos. La corteza presentó hipertrofia. El floema secundario abastece a las células gigantes.

6. LITERATURA CITADA

- Baldwin J. G., and A. H. Bell. 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(2): 187-201.
- Baldwin, G. J. 1992. Evolution of cyst and noncyst-forming Heteroderinae. *Annual Review of Phytopathology* 30: 271-290.
- Baldwin, G. J., and M. Mundo-Ocampo. 1991. Heteroderinae, cyst and noncyst forming nematodes. Pp. 275-362. *In*: R. W. Nickle (ed.) *Manual of Agricultural Nematology*. Marcel Dekker Inc. New York, USA. 1035 p.
- Baldwin, G. J., M. Mundo-Ocampo, and M. A. McClure. 1997. *Cactodera salina* n. sp. From the estuary plant, *Salicornia bigelovii*, in Sonora, Mexico. *Journal of Nematology* 29(4): 465-473.
- Baldwin, J. G., E. C. Bernard, and M. Mundo-Ocampo. 1989. Four new species of Heteroderidae including *Ekphymatodera* n. gen. from California. *Journal of Nematology* 21: 48-68.
- Bird, A. F. 1973. Observations on chromosomes and nucleoli in syncytia induced by *Meloidogyne javanica*. *Physiol. Plant Pathol.* 3: 387-391.
- Bird, A. F. 1974. Plant response to root-knot nematode. *Annu. Rev. Phytopathol.* 12: 69-85.
- Bird, A. F., J. S. Downton, and J. S. Hawker. 1975. Cellulose secretion by second stage larvae of the root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*). *Marcellia* 38: 165-169.

- Bird, D. M., and H. Koltai. 2000. Plant parasitic nematodes: habitats, hormones, and horizontally-acquired genes. *Journal of Plant Growth Regulation* 19: 183-194.
- Bossis, M., and D. Mugniéry. 1993. Specific status of six *Globodera* parasites of solanaceous plants studied by means of two-dimensional gel electrophoresis with a comparison of gel patterns by a computed system. *Fundamental and Applied Nematology* 16: 47-56.
- Buhrer, E. M. 1938. Additions to the list of plants attacked by root-knot nematode (*Heterodera marioni*). *Plant Dis. Repr.* 22: 216-234.
- Caillaud, M. C., G. Dubreuil, M. Quentin, L. Perfus-Barbeoch, P. Lecomte, J. de Almeida E., P. Abad, M. N. Rosso, and B. Favery. 2008. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *Journal of Plant Physiology* 165: 104-113.
- Carrillo-Fasio, J. A., R. S. García-Estrada, R. Allende-Molar, I. Márquez-Zequera, y J. E. Cruz-Ortega. 2000. Identificación y distribución de especies del nematodo nodulador (*Meloidogyne* spp.) en hortalizas, en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 18(2): 115-119.
- Cid del Prado, V. I. 1991. Description of *Meloidodera mexicana* n. sp. (Nemata: Heteroderinae) with key to species. *Revue Nématol.* 14(4): 537-542.
- Cid del Prado, V. I. 1998. Description of *Meloidodera zacanensis* sp. n. (Heteroderidae), a parasite of tejocote trees in Mexico. *International Journal of Nematology* 7(2): 165-169.

- Cid del Prado, V. I. y E. S. Cárdenas. 1995. Histopatología inducida por dos especies de *Meloidodera* (Nemata: Heteroderidae) en raíces de chile y tejocote. *Nematropica* 25(1): 75-78.
- Cid del Prado, V. I., A. Tovar-Soto, y J. A. Hernández. 2001. Distribución de especies y razas de *Meloidogyne* en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19(1): 32-39.
- Cid del Prado, V. I., and B. F. Lownsbery. 1984. Histopathology and host range studies of the redwood nematode *Rhizonema sequoiae*. *Journal of Nematology* 16(1): 68-72.
- Cid del Prado, V. I., and B. L. Miranda. 2008. A second cyst-forming nematode parasite of barley (*Hordeum vulgare* L. var. Esmeralda) from Mexico. *Nematropica* 38(2): 105-114.
- Cid del Prado, V. I., and J. A. Rowe. 2000. *Cactodera evansi* sp. n. and *Meloidodera astonei* sp. n. (Tylenchida: Heteroderidae) from Mexico. *International Journal of Nematology* 10(2): 159-168.
- Cid del Prado, V. I., and S. A. subbotin. 2013. A new cyst nematode, *Cactodera torreyanae* sp. n. (Tylenchida: Heteroderidae), parasitising romerito, *Suaeda torreyana*, in Texcoco, México. *Nematology* 00: 1-12.
- Cole, C. S., and H. W. Howard. 1958. Observations on giant cells in potato roots infected with *Heterodera rostochiensis*. *J. Helminthol.* 32: 135-144.
- Conh, E., D. T. Kaplan, and R. P. Esser. 1984. Observations on the mode of parasitism and histopathology of *Meloidodera floridensis* and *Verutus volvingentis* (Heteroderidae). *Journal of Nematology* 16(3): 256-264.

- Curtis, R. H. C. 2007. Plant parasitic nematode proteins and the host-parasite interaction. *Briefings in functional genomics and proteomics* 6(1): 50-58.
- Davis, E. L., R. S. Hussey, and T. J. Baum. 2004. Getting to the roots of parasitism by nematodes. *Trends in Parasitology* 20(3): 134-141.
- Deubert, K. H., and R. A. Rohde. 1971. Nematode enzymes. Pp. 73-90. In: B. M. Zuckerman, W. F. Mai and R. A. Rohde (ed.) *Plant Parasitic Nematodes*. Academic Press, Inc. New York, USA. 347 p.
- Doney, D. L., J. M. Fife, and E. D. Whitney. 1970. The effect of the sugar beet nematode *Heterodera schachtii* on the free amino acids in resistant and susceptible species. *Phytopathology* 60: 1727-1729.
- Doucet, M. E., R. V. Angeli, and E. Lorenzo. 2004. Histopathology of two tobacco cultivars infected by *Globodera tabacum* in Argentina. *Nematol. Medit.* 32: 237-239.
- Dropkin, V. H. 1969. Cellular responses of plants to nematode infections. *Annu. Rev. Phytopathol.* 7: 101-122.
- Eisenback, J., and H. Hirschmann. 1991. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. Pp. 191-274. In: R. W. Nickle (ed.) *Manual of Agricultural Nematology*. Marcel Dekker Inc. New York, USA. 1035 p.
- Endo, B. Y. 1964. Penetration and development of *Heterodera glycines* in soybean roots and related anatomical changes. *Phytopathology* 54: 79-88.

- Endo, B. Y. 1971. Nematode-induced syncytia (Giant cells). Host-parasite relationships of Heteroderidae. Pp. 91-117. *In*: B. M. Zuckerman, W. F. Mai and R. A. Rohde (ed.) Plant Parasitic Nematodes. Academic Press, Inc. New York, USA. 347 p.
- Endo, B. Y. 1971. Synthesis of nucleic acids at infection sites of soybean roots parasitized by *Heterodera glycines*. *Phytopathology* 61: 395-399.
- Endo, B. Y. 1987. Ultrastructure of esophageal gland secretory granules in juveniles of *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology* 19(4): 469-483.
- Endo, B. Y. 1991. Ultrastructure of initial responses of susceptible and resistant soybean roots to infection by *Heterodera glycines*. *Revue Nématol.* 14(1): 73-94.
- Endo, B. Y., and J. A. Veech. 1970. Morphology and histochemistry of soybean roots infected with *Heterodera glycines*. *Phytopathology* 60: 1493-1498.
- 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. 452 p.
- Fenoll, C., and F. F. Del Campo. 1998. The molecular basis of nematode endoparasitism in plants. *Physiology Molecular Biology Plants* 4: 9-18.
- Golden, A. M., and D. S. Ellington. 1972. Redescription of *Heterodera rostochiensis* (Nematoda: Heteroderidae) with a key and notes on related species. *Proc. Helm. Soc. Wash.* 39: 64-78.

- Guzmán, P. O. A., J. Castaño Z., y B. Villegas E. 2012. Principales nematodos fitoparásitos y síntomas ocasionados en cultivos de importancia económica. *Agron.* 20: 30-50.
- Heald, C. M. 1984. Histopathology of okra and ridgeseed spurge infected with *Meloidodera charis*. *Journal of Nematology* 16(1): 105-108.
- Heald, C. M., and A. M. Golden. 1969. *Meloidodera charis*, a cystoid nematode infecting St. Augustine grass. *Plant Dis. Repr.* 53:527.
- Hernández, L. J., A. Tovar S., A. Carvajal S., y R. Torres C. 2006. Alteraciones anatómicas inducidas por *Cactodera galinsogae* (Nemata: Heteroderinae) en miembros de Asteraceae. *Polibotánica* 22: 1-18.
- Holtmann, B., M. Kleine, and F. M. W. Grundler. 1999. Ultrastructure and anatomy of nematode – induced syncytia in roots of susceptible and resistant sugar beet. *Protoplasma* 211: 29-50.
- Hussey, R. S. 1989. Disease-inducing secretions of plant-parasitic nematodes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27: 123-141.
- Jones, M. G. K. 1981. Host cell responses to endoparasitic nematode attack: structure and function of giant cells and syncytia. *Ann. Rev. Appl. Biol.* 97: 353-372.
- Jones, M. G. K., and D. H. Northcote. 1992. Nematode - induced syncytium – a multinucleate transfer cell. *J. Cell. Sci.* 10: 789 – 809.

- Linford, M. B. 1942. The transient feeding of root-knot nematode larvae. *Phytopathology* 32: 580-589.
- López, C. M. L., J. Márquez G., y G. Murguía S. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas: libro de laboratorio. 2ª. Edición. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 178 p.
- Medina-Canales, M. G., A. Carvajal-Sandoval, R. Alexandre-Aguilar, y A. Tovar-Soto. 2011. Alteraciones histológicas inducidas por *Meloidogyne hapla* y *M. arenaria* en zanahoria (*Daucus carota* L.) en el valle de Tepeaca, Puebla, México. *Nematropica* 41(2):223-228.
- Melillo, M. T., T. Bleve-Zacheo, and G. Zacheo. 1990. Ultrastructural response of potato roots susceptible to cyst nematode *Globodera pallida* pathotype Pa 3. *Revue Nématol.* 13(1): 17-28.
- Mundo-Ocampo, M., and J. G. Baldwin. 1983. Host response to *Meloidodera* spp. (Heteroderidae). *Journal of Nematology* 15(4): 544-554.
- Mundo-Ocampo, M., and J. G. Baldwin. 1984. Comparison of host response of *Cryphodera utahensis* with other Heteroderidae and a discussion of phylogeny. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 51: 25-31.
- Pedrosa, E. M. R., R. S. Hussey, and H. R. Boerma. 1996. Cellular responses of resistance and susceptible soybean genotypes infected with *Meloidogyne arenaria* races 1 and 2. *Journal of Nematology* 28: 225-232.

- Piegat, M., and A. Wilski. 1963. Changes observed in cell nuclei in roots of susceptible and resistant potato after their invasion by potato root eelworm (*Heterodera rostochiensis* Woll.) larvae. *Nemetologica* 9: 576-580.
- Pulido, G. L., O. Botella M., y C. A. Borso Di Carminati. 2002. Estudio anatómico de cuatro especies de labiadas de la provincia de Albacete. *SABUCO* 3: 123-135.
- Quiñones, F. J. A. 1979. Comparación morfométrica, entre tres poblaciones mexicanas del género *Globodera* y las especies descritas del mismo. Tesis de Maestría en Ciencias, Escuela Nacional de Agricultura, Colegio de Postgraduados. Chapingo, Edo. de México. 39 p.
- Ramírez-Suárez, A., L. Rosas-Hernández, and S. Alcasio-Rangel. 2014. First report of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* parasitizing watermelon from Veracruz, Mexico. *Plant Disease* 98(3): 428.
- Rice, S. L., A. R. Stone, and B. S. C. Leadbeater. 1987. Changes in cell structure in roots of resistant potatoes parasitized by potato cyst nematodes. 2. Potatoes with resistance derived from *Solanum vernei*. *Physiological and Molecular Plant pathology* 31: 1-14.
- Rich, J. R., J. A. Brito, R. Kaur, and J. A. Ferrell. 2008. Weed species as host of *Meloidogyne*: A review. *Nematropica* 39: 157-185.
- Sharma, P. D. 2006. *Plant pathology*. Alpha Science International Ltd. India. 21.9 p.

- Siddiqui, S., M. Sobczak, R. Tenhaken, F. M. W. Gundler, and H. Bohlmann. 2012. Cell wall ingrowths in nematode induced syncytia require UGD2 and UGD3. PLoS ONE 7(7): 1-12.
- Sijmons, P. C., H. J. Atkinson, and U. Wyss. 1994. Parasitic strategies of root nematodes and associated host cell responses. Annual Review Phytopathology 32: 235-239.
- Singh, S., Abbasi, and Hisamuddin. 2013. Histopathological response of *Lens culinaris* roots towards root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Pakistan Journal of Biological Sciences 16(7): 317-324.
- Sosa-Moss, C. 1986. Cyst nematodes in México, Central and South America. Pp. 397-398. In: F. Lamberti and C. E. Taylor (eds.) Cyst nematodes. Plenum Press. New York, USA. 467 p.
- Sosa-Moss, C. 1987. Cyst nematodes in Mexico, Central and South America. Nematología Mediterránea 15:13-19.
- Sosa-Moss, C., y P. González C. 1973. Respuesta de maíz chalqueño fertilizado y no fertilizado a 4 diferentes niveles de *Heterodera punctata* raza Mexicana (Nematoda: Heteroderidae). Nematropica 3:13-14.
- Stoyanov, D. 1972. *Heterodera amaranthi* n. sp. (Tylenchida: Heteroderidae); un nematodo formador de quiste en Cuba. Serie Poeyana. Instituto de Zoología. Academia de Ciencias de Cuba. 97: 1-12.
- Sturhan, D. 2002. Notes on genus *Cactodera* Krall & Krall, 1978 and proposal of *Betulodera betulae* gen. nov., comb. nov. (Nematoda: Heteroderidae). Nematology 4(7): 875-882.

- Suárez, Z., C. Sosa M., and R. N. Inserra. 1985. Anatomical changes induced by *Punctodera chalcoensis* in corn roots. *Journal of Nematology* 17(2): 242-244.
- Subbotin, S. A. 1993. Evolution of modified food cells induced by sedentary nematodes in plant roots. *Russian Journal of Nematology* 1(1): 17-26.
- Subbotin, S. A., A. Vierstraete, P. Deley, J. Rowe, L. Waeyenberge, M. Moens, and J. R. Vanfleteren. 2001. Phylogenetic relationships within the cyst-forming nematodes (Nematoda: Heteroderidae) based on analysis of sequences from the ITS regions of ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21: 1-16.
- Subbotin, S. A., D. Sturhan, H. J. Rumpfenhorst, and M. Moens. 2003. Molecular and morphological characterization of the *Heterodera avenae* complex species (Tylenchida: Heteroderidae). *Nematology* 5: 515-538.
- Subbotin, S. A., M. Mundo-Ocampo and J. C. Baldwin. 2010. Systematics of the genus *Globodera*. Pp. 107-177. *In*: D. J. Hunt and R. N. Perry (eds.). Systematics of cyst nematodes (Nemata: Heteroderidae). *Nemathology Monographs and Perspectives*. Vol. 8A. Brill Publishing. Leiden, Netherlands. 351 p.
- Subbotin, S. A., M. Mundo-Ocampo and J. C. Baldwin. 2010. Systematics of the genus *Cactodera*. Pp. 203-259. *In*: D. J. Hunt and R. N. Perry (eds.). Systematics of cyst nematodes (Nemata: Heteroderidae). *Nemathology Monographs and Perspectives*. Vol. 8A. Brill Publishing. Leiden, Netherlands. 351 p.
- Sumita, K., and B. Bhagawati. 2014. Role of esophageal gland secretions in plant-nematode relationship. *Journal of Global Biosciences*. 3(7): 1025-1033.

- Thiéry, M., and D. Mugniéry. 1996. Interspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in *Globodera* species, parasites of solanaceous plants. *Fundamental and Applied Nematology* 19: 471-479.
- Tovar Soto, A., I. Cid del Prado V., J. M. Nicol, K. Evans, J. S. Sandoval I., and A. Martínez G. 2003. *Cactodera galinsogae* n. sp. (Tylenchida: Heteroderinae) on barley (*Hordeum vulgare* L.) of the High Valleys of Mexico. *Nematropica* 33(1): 41-54.
- Tovar-Soto, A., I. Cid del Prado-Vera, J- Margaret-Nicol, K. Evans, J. S. Sandoval-Islas, A. Martínez-Garza y E. Cárdenas-Soriano. 2007. Cambios anatómicos en raíces de cebada (*Hordeum vulgare* L.) inducidos por *Cactodera galinsogae*. *Agrociencia* 41:555-561.
- Tovar-Soto, A., I. Cid del Prado-Vera, J. S. Sandoval-Islas, A. Martínez-Garza, J. M. Nicol y K. Evans. 2006. Los nematodos formadores de quistes en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24 (2): 145-151.
- Vazquez, J. T. 1976. Infestaciones de nematodos fitoparásitos como factor limitante en la producción de maíz en el altiplano mexicano. *Producción del Departamento Mexicano. CODAGEM*, pp. 79.
- Veech, J. A., and B. Y. Endo. 1969. The histochemical localization of several enzymes of soybeans infected with the root-knot nematode *Meloidogyne incognita acrita*. *Journal of Nematology* 1(3): 265-276.

- Vovlas, N., H. F. Rapoport, R. M. Jiménez Díaz, and P. Castillo. 2005. Differences in feeding sites induced by root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., in chickpea. *Phytopathology* 95: 368-375.
- Vovlas, N., I. Moreno, and R. N. Inserra. 1986. Histopathology of root gall induced in tomato by *Globodera pallida*. *Journal of Nematology* 18(2): 267-269.
- Vovlas, N., N. Trisciuzii, A. Troccoli, F. De Luca, N. C. Cantalapiedra, and P. Castillo. 2013. Integrative diagnosis and parasitic habits of *Cryphodera brinkmani* a non-cyst forming heteroderid nematode intercepted on Japanese white pine bonsai trees imported into Italy. *European Journal of Plant Pathology* 4(135): 717-726.
- Walker, J. C. 1969. *Plant pathology*. 3a. ed. McGRAW-HILL. USA. 819 p.
- Wieczorek, K., and F. M. W. Gundler. 2006. Expanding nematode-induced syncytia. *Plant Signaling and Behavior* 1(5): 223-224.
- Williamson, V. M., and R. S. Hussey. 1996. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *The Plant Cell* 18: 1735-1745.
- Wyss, U. 1992. Observations on the feeding behaviour of *Heterodera schachtii* throughout development, including events during moulting. *Fundam. Appl. Nematol.* 15(1): 75-89.
- Wyss, U., and U. Zunke. 1986. Observations on the behaviour of second stages juveniles of *Heterodera schachtii* inside host roots. *Rev. Nematol.* 9: 153-165.

Yáñez, J. P. 1977. Aborto de semillas de *Phaseolus vulgaris* L.: morfología y ensayo con reguladores de crecimiento. Colegio de Postgraduados-Escuela Nacional de Agricultura. Tesis de maestría. Chapingo, México. 74 p.

ANEXOS

Preparación del fijador FAA

| | |
|-----------------------|--------|
| Formaldehído | 100 ml |
| Alcohol etílico 96% | 500 ml |
| Ácido acético glacial | 50 ml |
| Agua destilada | 350 ml |

Verde rápido en alcohol al 70%

| | |
|----------------------|--------|
| Verde rápido (Sigma) | 3% |
| Alcohol etílico 70% | 250 ml |

Agitar 20 a 30 min para permitir disolver el colorante

Safranina en agua

| | |
|--------------------|--------|
| SafraninaO (Sigma) | 0.05 g |
| Cloruro de sodio | 2 % |
| Agua destilada | 1 L |

Agitar 20 a 30 min para disolver los componentes

Adhesivo de Haupt

| | |
|----------------|--------|
| Gelatina | 1.00 g |
| Fenol | 2.00 g |
| Glicerol | 15 ml |
| Agua destilada | 100 ml |

Formaldehído al 3.7%

| | |
|------------------|-------|
| Formaldehído 37% | 10 ml |
| Agua destilada | 90 ml |