# Universidad Autónoma de Sinaloa

Colegio de Ciencias Agropecuarias

Facultad de Agronomía

**Maestría en Ciencias Agropecuarias**

## TESIS:

CONCENTRACIONES DE NaOCl Y PERIODOS DE AGITACIÓN DE RAÍCES DE PEPINO PARA LA EXTRACCIÓN DE HUEVECILLOS VIABLES DE *Meloidogyne* spp., Y NIVELES DE AGALLAMIENTO DE RAÍCES

**Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias Agropecuarias**


**PRESENTA:**

GUILLERMO GÓMEZ GONZÁLEZ

**DIRECTOR DE TESIS:**

DR. MOISÉS GILBERTO YÁÑEZ JUÁREZ

## Culiacán, Sinaloa, México; a 25 de octubre de 2019

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **GUILLERMO GÓMEZ GONZÁLEZ**, BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y HA SIDO APROBADA POR EL MISMO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

CONSEJO PARTICULAR

_____

DIRECTOR DR. MOISÉS GILBERTO YÁÑEZ JUÁREZ

_____

CO-DIRECTOR DR. TIRZO PAÚL GODOY ANGULO

_____

ASESOR DR. ROBERTO GASTÉLUM LUQUE

_____

ASESOR DR. JORGE FABIO INZUNZA CASTRO

CULIACÁN, SINALOA, OCTUBRE DE 2019

**CONTENIDO** **PÁGINA**

**ÍNDICE DE CUADROS..... vi**

**ÍNDICE DE FIGURAS..... vii**

**RESUMEN……..... ix**

**ABSTRACT……... x**

**I. INTRODUCCIÓN……..... 1**

**II. HIPÓTESIS……... 3**

**III. OBJETIVO GENERAL…… 3**

**IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS……. 3**

**V. REVISIÓN DE LITERATURA……. 4**

**5.1. El cultivo de Pepino (*Cucumis sativus* L.)…….. 3**

**5.1.1. Importancia económica nacional y estatal…… 4**

**5.1.2. Origen y distribución……. 4**

**5.1.3. Clasificación taxonómica……. 4**

**5.1.4. Morfología…….. 5**

**5.1.5. Temperatura y humedad…….. 6**

**5.1.6. Fertilización…….. 6**

**5.1.7. Preparación del suelo……. 7**

**5.1.8. Siembra…….. 7**

**5.1.9. Tutorado y poda…….. 7**

**5.1.10. Manejo de plagas y enfermedades…….. 8**

**5.1.11. Nematodos que atacan al cultivo de pepino……. 10**

**5.2. Nematodos fitoparásitos (NFP)…… 11**

**5.2.1. Importancia económica……. 11**

**5.2.2. Clasificación taxonómica…… 11**

**5.2.3. Morfología…… 13**

5.2.3.1 Cubierta externa…….. **14**

5.2.3.2. Tubo interno del cuerpo……. **15**

5.2.3.3. Cavidad corporal falsa…… **16**

**5.2.4. Sistema de reproducción…… 17**

**5.2.5. Sistema nervioso…… 18**

**5.2.6. Ecología y dispersión…….. 19**

**5.2.7. Principales géneros de NFP en cultivos hortícolas…… 20**

**5.3. El género *Meloidogyne*…….. 20**

**5.3.1. Historia y clasificación…….. 20**

**5.3.2. Importancia económica…….. 21**

**5.3.3. Ciclo patogénico…….. 22**

**5.3.4. Morfología…….. 23**

**5.3.4.1. Segundo estadio juvenil (J2)…… 23**

**5.3.4.2. Macho……... 23**

**5.3.4.3. Hembra…… 24**

**5.3.4.4. Huevecillo…… 27**

**5.3.5. Síntomas de la enfermedad…… 27**

**5.3.6. Desarrollo de la enfermedad…… 29**

**5.3.7. Especies importantes en cultivos hortícolas……... 30**

**5.3.8. Uso de NaOCl en la extracción de huevecillos de *Meloidogyne* spp…….. 31**

**5.3.9…Niveles de daño…….…… 32**

**VI. MATERIALES Y MÉTODOS……. 35**

**6.1. Lugar donde se hizo el estudio…… 35**

**6.2. Extracción de huevecillos……. 35**

**6.3. Viabilidad de inóculo…….. 36**

**6.4. Niveles de daño…… 38**

**6.5. Identificación molecular…… 39**

**6.6. Análisis estadístico……. 41**

**6.6.1. Extracción de huevecillos…….. 41**

**6.6.2. Viabilidad de inóculo……... 43**

**6.6.3. Niveles de daño…… 44**

**VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN……..……. 45**

**7.1. Concentraciones de NaOCl y periodos de agitación de raíces de pepino en la extracción de huevecillos de *Meloidogyne* spp……. 45**

**7.2. Viabilidad de huevecillos de *Meloidogyne* spp., extraídos con distintas concentraciones de NaOCl y periodos de agitación de raíces de pepino…... 49**

**7.3. Niveles de agallamiento de raíces de pepino inoculadas con distintas densidades de *Meloidogyne* spp……..... 55**

**7.4. Identificación molecular de *Meloidogyne* spp……. 58**

**VII. CONCLUSIONES……... 60**

**VIII. LITERATURA CITADA……..…… 61**

## ÍNDICE DE CUADROS


| CUADRO | | PÁGINA |
|---|---|---|
| 1 | Clasificación taxonómica del pepino | 5 |
| 2 | Clasificación taxonómica del género *Meloidogyne* | 21 |
| 3 | Principales especies del género *Meloidogyne* asociadas a cultivos hortícolas de importancia en los trópicos y subtrópicos | 30 |
| 4 | Temperaturas medias registradas durante el primer experimento de viabilidad de inóculo de *Mleloidogyne* spp. | 36 |
| 5 | Temperaturas medias registradas durante el segundo experimento de viabilidad de inóculo de *Mleloidogyne* spp. | 37 |
| 6 | Efecto de diferentes concentraciones de NaOCl y periodos de agitación de raíces en la extracción de huevecillos (primer experimento) de *Meloidogyne* spp. | 45 |
| 7 | Efecto de diferentes concentraciones de NaOCl y periodos de agitación de raíces en la extracción de huevecillos (segundo experimento) de *Meloidogyne* spp. | 47 |
| 8 | Efecto de diferentes concentraciones de NaOCl y periodos de agitación de raíces en la viabilidad de huevecillos de *Meloidogyne* spp., en el cultivo de pepino | 50 |

## ÍNDICE DE FIGURAS


| Figura | Título | Página |
|---|---|---|
| 1.- | Clasificación taxonómica de los NFP……..... | 12 |
| 2.- | Sección longitudinal de una raíz indicando el sitio de alimentación que de manera común adoptan diferentes géneros de NFP……..... | 13 |
| 3.- | Morfología y tamaños de algunos de los nematodos fitoparásitos de mayor importancia…….……. | 14 |
| 4.- | Morfología de NFP: vista lateral y frontal del extremo anterior o cabeza y de la sección media del cuerpo……. | 16 |
| 5.- | Principales características morfológicas del NFP hembra y macho…….……. | 18 |
| 6.- | Estructura general del sistema nervioso de los nematodos…….. | 19 |
| 7.- | Estadios de desarrollo de *Meloidogyne incognita*……. | 22 |
| 8.- | Segundo estadio juvenil del nematodo agallador…….. | 25 |
| 9.- | Hembra adulta del nematodo agallador…….. | 26 |
| 10.- | Embriones de *Meloidogyne incognita* en diferentes estadios de desarrollo……. | 28 |
| 11.- | Efecto de combinaciones de concentraciones de NaOCl y periodos de agitación de raíces en el primer experimento para la extracción de huevecillos de *Meloidogyne* spp……. | 46 |
| 12.- | Efecto de combinaciones de concentraciones de NaOCl y periodos de agitación de raíces en el segundo experimento para la extracción de huevecillos de *Meloidogyne* spp…… | 48 |
| 13.- | Efecto de combinaciones de concentraciones de NaOCl y periodos de agitación de raíces en la viabilidad de huevecillos de *Meloidogyne* spp*.,* en el cultivo de pepino……..... | 51 |

| Figura | Título | Página |
|---|---|---|
| 14.- | Efecto de concentraciones de NaOCl (empleadas para la extracción de huevecillos de Meloidogyne spp.) en el agallamiento de raíces de pepino…… | 52 |
| 15.- | Efecto de concentraciones de NaOCl utilizadas en la extracción del inóculo de Meloidogyne spp., en la producción de huevecillos en raíces de pepino….. | 54 |
| 16.- | Efecto de diferentes densidades de inóculo de *Meloidogyne* spp., en el agallamiento de raíces de pepino…….. | 55 |
| 17.- | Relación entre la densidad de inóculo y el nivel de agallamiento por *Meloidogyne* spp……... | 56 |
| 18.- | Factor de reproducción de las diferentes densidades de inóculo en el cultivo de pepino…… | 57 |
| 19.- | Gel de agarosa de productos de PCR amplificados con oligonucleótidos específicos de la especie *M. enterolobii*…… | 59 |

# RESUMEN

La extracción de huevecillos de *Meloidogyne* spp., por medio de agitación de raíces agalladas en solución de hipoclorito de sodio es un procedimiento que se utiliza para investigar los niveles poblacionales del fitoparásito, así mismo es práctico en la obtención de inóculo. En investigaciones previas, ha sido necesario modificar el método con el objetivo de optimizar los resultados; en este sentido, la contribución de información sobre los efectos de interacción entre diferentes niveles de ambos factores puede mejorar los resultados de las evaluaciones cuando este método es requerido. Por lo tanto, se realizaron experimentos en laboratorio e invernadero para determinar el efecto de diferentes concentraciones de NaOCl y periodos de agitación de raíces en la extracción y viabilidad de los huevecillos. Así mismo, se evaluó el efecto de distintas densidades de inóculo en el cultivo de pepino y se identificó molecularmente la especie de nematodo. Se demostró que la mayor extracción de huevecillos se logró con diferentes combinaciones de ambos factores, es decir, por medio de concentraciones de NaOCl de 3,000 y 6,000 ppm en combinación con periodos de agitación de 8 y 12 min, concentraciones de 9,000 ppm con periodos de agitación de 4 y 6 min, así mismo empleando concentraciones de 5,000 ppm de NaOCl con periodos de agitación de 6 a 18 min y concentraciones de 7,000 ppm con periodos de agitación de 6 min. Por su parte, la viabilidad de los huevecillos fue mayor con el empleo de concentraciones de NaOCl de 5,000 ppm en la extracción, a su vez, la patogenicidad de los huevecillos extraídos con concentraciones de 3,000 ppm fue mayor, ambos casos en comparación con concentraciones de NaOCl más elevadas. Finalmente, el nivel de daño ocasionado en las raíces, mostró una correlación del 84% con la densidad de inóculo. El nivel de agallamiento osciló de un 2 hasta un 5 en la escala de índice de agallamiento, con el empleo de la menor y la mayor densidad de inóculo, respectivamente. Se identificó la especie *M. enterolobii* en el 90% de las muestras amplificadas.

Palabras clave: *Meloidogyne*, extracción, raíces agalladas, viabilidad, interacción, NaOCl, agitación, nivel de daño, densidades de inóculo, identificación.

# ABSTRACT

The extraction of eggs of *Meloidogyne* spp., by agitation of galled roots in sodium hypochlorite solution is a procedure used to investigate the population levels of the phytoparasite, and it is also practical in obtaining inoculum. In previous research, it has been necessary to modify the method in order to optimize the results; in this sense, the contribution of information on the effects of interaction between different levels of both factors can improve the results of the evaluations when this method is required. Therefore, laboratory and greenhouse experiments were carried out to determine the effect of different concentrations of NaOCl and periods of root agitation on the extraction and viability of the eggs. Likewise, the effect of different inoculum densities on the cucumber culture was evaluated and the nematode species was molecularly identified. It was shown that the greatest extraction of eggs was achieved with different combinations of both factors, that is, through NaOCl concentrations of 3,000 and 6,000 ppm in combination with agitation periods of 8 and 12 min, concentrations of 9,000 ppm with periods of stirring of 4 and 6 min, also using concentrations of 5,000 ppm of NaOCl with stirring periods of 6 to 18 min and concentrations of 7,000 ppm with stirring periods of 6 min. On the other hand, the viability of the eggs was greater with the use of NaOCl concentrations of 5,000 ppm in the extraction, in turn, the pathogenicity of the eggs extracted with concentrations of 3,000 ppm was greater, both cases compared to concentrations of higher NaOCl. Finally, the level of damage caused to the roots showed a correlation of 84% with the inoculum density. The damage level ranged from 2 to 5 on the scale of the galling index, with the use of the lowest and the highest inoculum density, respectively. The species *M. enterolobii* was identified in 90% of the amplified samples.



Keywords: *Meloidogyne*, extraction, galled roots, viability, interaction, NaOCl, agitation, damage level, inoculum densities, identification.

# I. INTRODUCCIÓN

El pepino (*Cucumis sativus* L.) es una cucurbitácea de importancia económica cuya producción a nivel mundial fue de 65 millones de t (FAO, 2016), en México se cosecharon 886,269 t de pepino en una superficie de 18,891 ha, y el estado de Sinaloa produjo 361,887 t en 4,082 ha en el mismo año (SIAP, 2019). Entre los principales factores que limitan la producción de pepino están los nematodos fitoparásitos, cuyo impacto económico sobre la producción agrícola se estima en pérdidas cercanas a los 78 mil millones de dólares alrededor del mundo (Ravichandra, 2014). El nematodo agallador (*Meloidogyne* spp.) posee una amplia distribución y rango de hospedantes, induce malformaciones típicas en las raíces con lo cual se afecta la absorción de agua y nutrientes en los vegetales, la translocación de fotosintatos y minerales, además de inducir un cambio en la proporción raíz-follaje, y disminución de la calidad y cantidad de la producción (Anwar y Van Gundy, 1989; Orr y Robinson, 1984; Williamson y Hussey, 1996); asimismo, está involucrado en diversas enfermedades complejo en varios cultivos hortícolas junto con *Rhizoctonia solani*, *Pythium debaryanum*, *Fusarium oxysporum* y *Ralstonia solanacearum*, entre otros patógenos (Evans y Hydock, 1993; Francl y Wheeler, 1993). Más de 100 especies de *Meloidogyne* se han reportado en diversas áreas del mundo (Karssen y Moens, 2006), aunque las que se presentan con mayor frecuencia (95%) son *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla* (Sasser, 1980). En México, se ha determinado la incidencia de estas principales especies (Cid del Prado *et al*., 2001) en distintos estados, mientras que en Sinaloa se ha reportado además la presencia de *M. enterolobii* (Carrillo-Fasio *et al*., 2000; Martínez *et al.*, 2015).

El daño que el nematodo agallador puede ocasionar a un cultivo susceptible depende entre otros aspectos de la especie y densidad de población existente en el suelo y tejido vegetal, es decir, el rendimiento del cultivo puede permanecer sin afectación hasta cierta densidad de población del nematodo. En este sentido, investigar las densidades iniciales de inóculo del nematodo agallador puede contribuir en la predicción de daños en diferentes cultivos; por lo tanto, la extracción, cuantificación e identificación de los niveles poblacionales de las especies presentes constituye parte de las estrategias de manejo del nematodo (Greco y Di Vito, 2009). La obtención de huevecillos de *Meloidogyne* spp., es posible por medio de suspensión o licuado de las masas de huevecillos así como por medio de agitado de raíces en soluciones de NaOCl a concentraciones del 0.5% al 1%, no obstante, concentraciones mayores pueden reducir la viabilidad los huevecillos (Bird, 1968; McClure *et al*., 1973). Así mismo, huevecillos de ciertas especies pueden ser más sensibles que otras al hipoclorito de sodio, es decir, el estadio no eclosionado es afectado y consecuentemente la viabilidad de los huevecillos pude ser menor en comparación con el empleo de larvas o masas obtenidas sin tratamiento con NaOCl (Bird, 1968; Hussey y Barker, 1973; McClure *et al*., 1973; Vrain, 1977; Di Vito *et al.*, 1986). Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del empleo de distintas combinaciones de concentraciones NaOCl y de periodos de agitación de raíces de pepino agalladas sobre el grado de extracción de huevecillos de *Meloidogyne* spp., sobre su viabilidad, y conocer el nivel de daño de raíces de pepino respecto a la densidad de inóculo.

## II. HIPÓTESIS

El empleo de distintas combinaciones de concentraciones NaOCl y de periodos de agitación de raíces de pepino agalladas, diferencia el grado de extracción de huevecillos de *Meloidogyne* spp., y la viabilidad de éstos, que al ser utilizados como inóculo, provocan un nivel de agallamiento proporcional a la densidad empleada.

## III. OBJETIVO GENERAL

1. Determinar el efecto del empleo de distintas combinaciones de concentraciones NaOCl y de periodos de agitación de raíces de pepino agalladas sobre el grado de extracción de huevecillos de *Meloidogyne* spp., sobre su viabilidad, y conocer el nivel de daño de raíces de pepino respecto a la densidad de inóculo.

## IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la cantidad de huevecillos extraídos y su viabilidad empleando raíces de pepino agalladas y la combinación de diferentes periodos de agitación y concentración de hipoclorito de sodio.
2. Conocer el grado de agallamiento en las raíces de plantas de pepino inoculadas con diferentes niveles de inóculo.
3. Determinar mediante técnicas moleculares la especie de *Meloidogyne* estudiada.

# V. REVISIÓN DE LITERATURA

## 5.1. El cultivo de Pepino (*Cucumis sativus* L.)

**5.1.1. Importancia económica nacional y estatal.** En el año 2017 la superficie sembrada de pepino en México fue de más de 19 mil hectáreas con un volumen de producción mayor a 848 mil toneladas. El 23% de esta superficie se sembró en el Estado de Sinaloa, donde se produjo el 36% de esta fruta a nivel nacional. El rendimiento promedio del pepino en Sinaloa fue de 71 t $ha^{-1}$, superior al promedio nacional de 47 t $ha^{-1}$, aunque inferior al de Tamaulipas y San Luis Potosí (120 y 117 t $ha^{-1}$, respectivamente) (SIAP, 2019).

**5.1.2. Origen y distribución.** Se considera que el pepino es originario de la India en la región sur de los montes Himalaya (Welbaum, 2015), donde aún puede encontrarse la especie silvestre *Cucumis sativus* var. Hardwickii (syn: *Cucumis hardwickii* Royle), considerada como el posible progenitor del pepino, ésta posee frutos pequeños y espinosos de sabor muy amargo, y es compatible con *Cucumis sativus* (Grubben y Denton, 2004). Se dice que el pepino se cultivó en la India por al menos tres mil años, desde donde se esparció a China, Grecia y el resto de Europa hace dos mil años durante el Imperio Romano; posteriormente fue introducido en la región norte de América a mediados del siglo XVI por los primeros viajeros y exploradores, así mismo por esclavos provenientes de África a principios del siglo XVII (Grubben y Denton, 2004; Welbaum, 2015).

**5.1.3. Clasificación taxonómica.** La familia Cucurbitaceae consiste en cerca de 120 géneros y más de 800 especies, todas las plantas comestibles corresponden a la subfamilia Cucurbitoideae y se dividen en dos tribus: la Sicyoideae y Cucurbiteae, a esta última pertenece el género *Cucumis*, siendo *C. sativus* L., la especie conocida como pepino (Cuadro 1) (Welbaum, 2015).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del pepino.

| Clasificación | Nombre |
|---|---|
| Reino | Plantae |
| División | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Orden | Cucurbitales |
| Familia | Cucurbitaceae |
| Subfamilia | Cucurbiteae |
| Tribu | Cucurbiteae |
| Género | *Cucumis* |
| Especie | *C. sativus* |

(Welbaum, 2015).

**5.1.4. Morfología.** El pepino tiene un número de cromosomas n = 7, los cultivares comerciales son de temporada cálida, sensibles a heladas y de polinización cruzada, la planta es una hierba monoica anual con tallo trepador o rastrero de hasta 5 m de longitud, tiene sarcillos simples de hasta 30 cm de longitud; tallo angulado escasamente ramificado; sistema radicular extensivo y mayormente superficial (Welbaum, 2015). Hojas alternadas, simples, estípulas absentas, pecíolo de 5 a 20 cm longitud; hoja triangular-ovalada en su perímetro, tamaño de 7 a 20 cm * 7 a 15 cm, lobulada, aguda en el ápice, dentada y de vellosidad abundante (Grubben y Denton, 2004). Sus flores son unisexuales con sépalos triangulares angostos, 0.5 a 1 cm longitud, la corola es de ancho acampanado con lóbulos de hasta 2 cm de longitud, amarillas; las flores masculinas se disponen en 3 a 7 fascículos florales, con pedicelo de 0.5 a 2 cm de longitud y 3 estamentos; las flores femeninas son solitarias, con pedicelo corto y grueso, de hasta 0.5 cm de longitud, alargamiento en fruto de hasta 5 cm, ovario inferior elipsoidal de 2 a 5 cm longitud (Welbaum, 2015).

El fruto es un péndulo ligeramente curvo, de forma cilíndrica a globular y de hasta 30 cm de longitud, la piel es usualmente verde, aunque en algunos cultivares es blanca, amarilla o café; la carne es color verde pálido y contiene muchas semillas, las cuales

son oblongas y ovaladas en su perímetro, de tamaño de 8 a 10 mm de longitud y de 3 a 5 mm de anchura; son comprimidas, blancas y suaves (Grubben y Denton, 2004).

**5.1.5. Temperatura y humedad.** El pepino requiere climas cálidos con temperatura óptima de desarrollo de 30 °C y de 18-21 °C de temperatura nocturna óptima; la temperatura mínima para el buen desarrollo es de 15 °C. La sensibilidad a la longitud del día varía entre cultivares; los días cortos usualmente promueven el crecimiento vegetativo y la floración femenina, mientras que la intensidad de luz alta es requerida para cosechas óptimas. El pepino requiere una gran cantidad de agua, sin embargo no puede permanecer en anegación; la baja humedad relativa provoca una alta evaporación debida a superficie foliar extendida, mientras que una alta humedad relativa por periodos prolongados con suelo y follaje húmedos favorece la aparición de enfermedades de pudrición de fruto y foliares, por lo que se recomienda el riego por las mañanas para permitir que el suelo y el follaje sequen antes del anochecer. Una regla de riego para el pepino menciona 2.5 cm de agua por semana, la cual pude ser superior (5 cm) durante periodos secos o de alta temperatura, de igual forma el requerimiento hídrico es mayor durante la producción de frutos y una deficiencia puede causar deformación de los mismos. El pepino puede ser irrigado por goteo, aspersión o riego rodado, siendo el riego localizado preferible al método de aspersión sobre el cultivo, debido a que dispersa enfermedades al follaje y al fruto y afecta la labor de las abejas ya que son más activas durante la mañana; el riego por goteo se utiliza con acolchado pero también puede usarse con suelo desnudo (Welbaum, 2015).

**5.1.6. Fertilización.** El pepino requiere un pH de 6 a 7 en el suelo, los nutrientes extraídos del campo por un típico cultivo de pepino pueden ser de aproximadamente 196 kg $ha^{-1}$ de nitrógeno, 28 kg $ha^{-1}$ de fósforo y 196 kg $ha^{-1}$ de potasio. Las recomendaciones adicionales de fósforo superan la cantidad extraída por el cultivo debido a que parte de este es inmovilizado en el suelo, así mismo la adición de micronutrientes es recomendada (Welbaum, 2015). La recomendación de aplicación de fertilizantes en el valle de Culiacán es de 250-250-150 kg de N, P y K respectivamente y de 30-20-30 kg de Ca, Mg y S respectivamente (INIFAP, 2010).

Una adecuada disposición de nitrógeno en la primera etapa del cultivo promueve el crecimiento vegetativo y la formación de la parte aérea requerida para maximizar la fotosíntesis y posterior desarrollo de frutos; se debe incorporar fertilizante al suelo previo a la siembra en caso de no contar con fertirriego (Welbaum, 2015).

**5.1.7. Preparación del suelo.** El suelo debe ser preparado y libre de terrones para proveer un buen contacto de la semilla con el suelo en siembras directas. El empleo de acolchado plástico es común en producción de pepino porque favorece el control de malezas y el manejo del riego, y aunque la producción en campo puede ser con o sin éste, de igual forma se recomienda el empleo de camas altas, lo cual es de especial importancia durante la temporada de lluvias para mejorar el drenaje, además de favorecer el desarrollo radicular y reducir la pudrición del fruto (Welbaum, 2015).

**5.1.8. Siembra.** Actualmente existe una gran variedad de híbridos en el mercado, el millar de semillas de pepino pesa de 25 a 30 g y para la siembra de 1 ha se requiere de 1 a 3 kg de semilla dependiendo del sistema de siembra; las recomendaciones generales para el pepino para mercado en fresco son de un espaciado de 23 a 31 cm de espaciado entre plantas y de 0.9 a 1.8 m entre hileras, el resultado es una densidad de 18 a 40 mil plantas $ha^{-1}$. Las semillas son sembradas regularmente a profundidad de 1.3 a 5 cm, según las condiciones físicas del suelo y la temporada; el sembrado por trasplante puede reducir de 10 días a dos semanas el tiempo a la primera cosecha, además de resultar en mayor uniformidad en el establecimiento del cultivo (Welbaum, 2015).

**5.1.9. Tutorado y poda.** El empleo del tutorado permite una mayor ventilación y aprovechamiento de la energía de la radiación solar, por medio de una disposición foliar más adecuada al mantener la planta elevada del suelo, también facilita la cosecha, permite emplear densidades de población mayores y también mejora la calidad del fruto (Welbaum, 2015). Bajo condiciones de agricultura protegida el tutorado se realiza por sujeción de las plantas con hilos de polipropileno, otros tipos de tutorado son la malla plástica y estacas de madera. El tallo principal y los tallos laterales del pepino crecen rápidamente y requieren de poda para mantener un

adecuado desarrollo, al realizar esta práctica se obtienen frutos de mayor valor comercial (Grubben y Denton, 2004; Olalde *et al*., 2014).

**5.1.10. Manejo de plagas y enfermedades.** Los insectos que pueden causar mayores problemas en el cultivo de pepino son la conchuela (*Epilachna* spp.), gusano trozador (*Agrotis ipsilon*) y escarabajos del pepino (*Diabrotica* y *Acalymma* spp, vectores de marchitez por bacteria). Por su parte, el gusano del melón (*Diaphania hyalinata*) y la araña roja (*Tetranychus* spp.) pueden causar mucho daño a las hojas, mientras que la mosca del melón (*Dacus cucurbitae*) puede causar pudrición de fruto. Así mismo los escarabajos, gusanos minadores y saltamontes pueden ocasionar daño general en el cultivo. Todas estas plagas pueden ser controladas correctamente con insecticidas, además de que en el caso de los áfidos, su control ayuda a prevenir la dispersión de enfermedades por virus (Grubben y Denton, 2004; Welbaum, 2015).

Por lo general no se recomienda sembrar el pepino donde han sido sembradas previamente otras cucurbitáceas, en un periodo considerable de tiempo para evitar enfermedades del suelo. Muchas de las enfermedades que afectan al pepino pueden transmitirse por la semilla por lo que el emplear materiales libres de enfermedades y aplicar tratamientos a semillas puede reducir considerablemente el riego a enfermedades y virus. Para la mayoría de las enfermedades foliares y virus, pueden disponerse de cultivares resistentes que pueden minimizar las afectaciones (Grubben y Denton, 2004; Welbaum, 2015).

Las enfermedades foliares ocasionadas por hongos y que pueden resultar en daños severos al cultivo de pepino son: mildiu velloso (*Pseudoperonospora cubensis*), cenicilla (*Erysiphe cichoracearum* y *Sphaerotheca fuliginea*), antracnosis (*Colletotrichum lagenarium*), mancha foliar (*Alternaria cucumerina, Corynespora cassiicola*), y tizón gomoso del tallo (*Didymella bryoniae*); además de la bacteria *Pseudomonas lachrymans*, causante de la mancha foliar angular. Se recomienda el control cultural por medio de remoción de residuos vegetales al final del ciclo, emplear densidades de población reducidas para mejorar la circulación del aire, y evitar el exceso de fertilización nitrogenada. Diversos fungicidas pueden controlar las

enfermedades por mildiu, tales como trifloxystrobin, azoxystrobin, y clorotalonil + miclobutanil; los cuales pueden ser alternados con fungicidas de amplio espectro como oxicloruro de cobre y mancozeb para reducir la dispersión (Grubben y Denton, 2004; Welbaum, 2015).

Otras enfermedades del suelo son la marchitez por Fusarium (*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*), pudrición de raíz (*F. oxysporum* y *Phomopsis sclerotitioides*) y la marchitez bacteriana (*Erwinia tracheiphila*), ésta última es esparcida por el insecto diabrótica (*Diabrotica undecimpunctata*) el cual ejerce un pequeño daño directo al alimentarse de las hojas, mientras que la bacteria es introducida y logra proliferar en el xilema reduciendo el flujo de agua entre las hojas y raíces. Así mismo las plántulas jóvenes de pepino en suelos mal drenados son susceptibles al ahogamiento (damping-off) que puede ser ocasionado por diversos patógenos como *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* o *Phytophthora* spp., de los cuales algunos causan también pudrición de raíz en plantas viejas. Para controlar el damping-off se recomienda el tratamiento de la semilla con Thiram, aplicaciones de fungicidas al suelo durante el trasplante, y aplicación foliar con Metalaxyl a las plántulas en emergencia (Welbaum, 2015).

Entre las enfermedades que pueden causar daño al fruto esta la roya (*Cladosporium cucumerinum*) que también ataca hojas de cultivares susceptibles, pudrición blanda (*Erwinia*), pudrición de fruto (*P. capsici*), pudrición del vientre (*R. solani*), podredumbre húmeda del fruto (*Choanephora cucurbitarum*), y la antracnosis (*C. lagenarium*) (Grubben y Denton, 2004; Welbaum, 2015).

Los virus que pueden ocasionar pérdidas considerables en rendimientos de pepino en regiones tropicales son el virus de mosaico de pepino (CMV, por sus siglas en inglés), virus del mosaico amarillo de la calabaza zucchini (ZYMV, por sus siglas en inglés), virus del mosaico de la sandía 1 (WMV-1, por sus siglas en inglés) y virus de la mancha anular del papayo (PRSV, por sus siglas en inglés), además de un rango de virus trasmitidos por mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) tales como el virus de amarillamiento de las venas del pepino (CVYV, por sus siglas en inglés) y el virus de amarillamiento del pepino (CYV, por sus siglas en inglés). Otros virus de importancia

son el virus del mosaico moteado verde del pepino (CGMMV, por sus siglas en inglés), el cual es altamente trasmisible por semillas y puede conservar su infectividad en el suelo en los residuos de cosecha (Grubben y Denton, 2004; Welbaum, 2015).

**5.1.11. Nematodos que afectan al cultivo de pepino**. El cultivo de pepino es afectado por distintos géneros y especies de nematodos fitopatógenos (ejemplo: *Ditylenchus destructor*, *Heterodera trifolii*, *Hoplolaimus indicus*, *Longidorus africanus*, *Meloidogyne* spp., *Rotylenchulus reniformis* y *Tylenchorhynchus vulgaris*), las cuales pueden dañar severamente su crecimiento y rendimiento (Ravichandra, 2014).

La mayoría de las variedades de pepino presentan mayor susceptibilidad a *M. incognita* o *M. javanica* que a *M. hapla* y *M. arenaria* (Luc, *et al*., 2005), además, algunas de éstas especies pueden desarrollar relaciones sinérgicas con otros microorganismos patógenos en complejos de enfermedades, por ejemplo la marchitez del pepino por *Fusarium* (*M. incognita* con *F*. *o*. f. sp. *cucumerinum*). Aunque se ha hecho poco progreso en el desarrollo de resistencia al nematodo agallador en las Cucurbitaceae, actualmente existen variedades de pepino con cierto grado de resistencia a *M. incognita* (Improved Long Green), y también a *M. javanica* (GY-5937) (Sikora y Fernández, 2005; Ravichandra, 2014).

## 5.2. Nematodos fitoparásitos (NFP)

**5.2.1. Importancia económica.** Existen diversas estimaciones de la importancia económica de los nematodos fitoparásitos (NFP) en la producción agrícola mundial y en países en específico, donde se considera que alrededor del 10% de la producción agrícola en general se pierde como resultado del daño por NFP y sobre el 13.5 % en cultivos hortícolas importantes, lo cual se estima cantidades cercanas a los 78 mil millones de dólares anuales de pérdida alrededor del mundo en los principales cultivos. No obstante al considerar todos los cultivos, las pérdidas podrían exceder los 100 mil millones de dólares al año (Whitehead, 1998; Reddy, 2008; Ravichandra, 2014). En los EE. UU., Koenning *et al*., (1999) estimaron una pérdida del 25 % sobre diversos cultivos.

Las pérdidas son ocasionadas principalmente por NFP que atacan las raíces, bulbos y tubérculos, aunque algunos se alimentan de las partes aéreas de la planta, el grado del daño a un cultivo en particular es influenciado por el mismo cultivar y la especie de nematodo involucrada, su nivel de infestación en el suelo y el ambiente, por lo que un daño severo puede resultar si un cultivo susceptible es sembrado en suelo con alta infestación. Debido a su alimentación bajo el suelo, el daño no puede ser siempre diagnosticado de manera puntual, además de que el daño en planta ocasionado es frecuentemente pasado por alto, debido a que los síntomas resultantes no específicos tales como crecimiento lento, atrofia y amarillamiento, también pueden ser atribuidos a desórdenes nutrimentales y condiciones hídricas (Stirling *et al*., 1998; Ravichandra, 2014).

**5.2.2. Clasificación taxonómica.** Los nematodos son el filo (Nematoda) más abundante dentro del reino animal después de los insectos, se estima que existen 1 millón de especies en este filo (Iqbal y Jones, 2017), de las cuales solamente se ha descrito y clasificado alrededor del 3%, dentro de 250-300 familias (Maggenti, 1981; Ravichandra, 2014). Actualmente se han descrito más de 4,100 especies de NFP, los cuales pertenecen principalmente al orden Tylenchida y el resto al orden Dorylaimida y Triplonchida (Figura 1) (Agrios, 2005; Zullini, 2006). Las diferencias morfológicas

entre los tres grupos se basan principalmente en la estructura del estilete (órgano exclusivo de los NFP) y del esófago (Taylor, 1977).

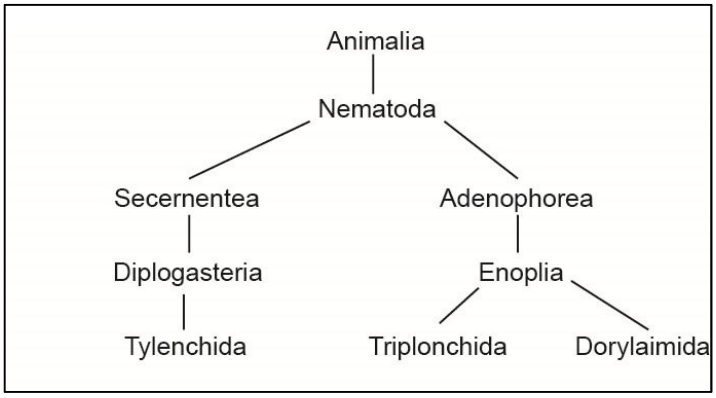


Figura 1. Clasificación taxonómica de los NFP (en orden descendente: reino, filo, clases, subclases y órdenes) (Fourie *et al.*, 2017).

De manera general los NFP son clasificados como endo y ecto-parásitos, ambos pueden ser sedentarios o migratorios; cuando el NFP se transporta dentro del tejido vegetal, alimentándose de una célula a otra y sin inducir un sitio de alimentación permanente, se le considera endoparásito migratorio, mientras que si deja de desplazarse y permanece insertado a la raíz de forma completa o parcial, modificando a las células para crear un sitio de alimentación, se le nombra endoparásito sedentario; los ectoparásitos migratorios únicamente implantan su porción anterior para alimentarse desde el exterior en las células cercanas a la superficie radicular sin dejar de trasladarse (Figura 2) (Taylor, 1977; Agrios, 2005; Iqbal y Jones, 2017).

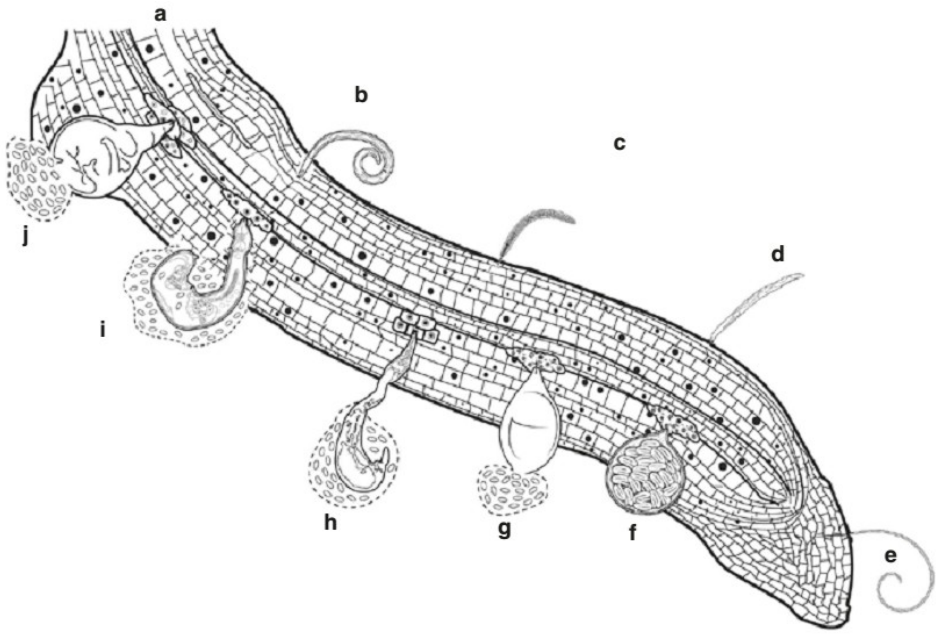


Figura 2. Sección longitudinal de una raíz indicando el sitio de alimentación que de manera común adoptan diferentes géneros de NFP: (a) endoparásito migratorio e.g. *Pratylenchus*; (b) semi endo-ectoparpasito e.g. *Helicotylenchus*; (c y d) ectoparásito sedentario e.g. *Criconema* y *Nanidorus*, respectivamente; (e) ectoparásito e.g. *Longidorus*. Endoparásitos sedentarios: *Glodobera* llena de huevecillos (f), *Heterodera* (g), *Tylenchulus* (h), *Rotylenchulus* (i) y hembra *Meloidogyne* (j) (Fourie *et al*., 2017).

**5.2.3. Morfología.** Los NFP carecen de apéndices, son de forma cilíndrica, tipo transparente, de simetría bilateral y de tamaño microscópico que puede variar entre especies de 250 a 1,000 µm, con algunas de hasta 12 mm de longitud (Ravichandra, 2014). La proporción del cuerpo igualmente varía entre especies, siendo la longitud del cuerpo mayor que el grosor en razón de 10 a 50 veces (Taylor, 1977; Agrios, 2005), por lo que su forma es generalmente alargada, aunque en algunos géneros (*Meloidogyne*, *Heterodera*, *Rotylenchulus*, entre otros) el cuerpo de la hembra adulta puede ser muy abultado, confiriendo formas esferoides (Ravichandra, 2014). No obstante, los machos adultos son sin excepción gusanos delgados (Figura 3) (Taylor, 1971).

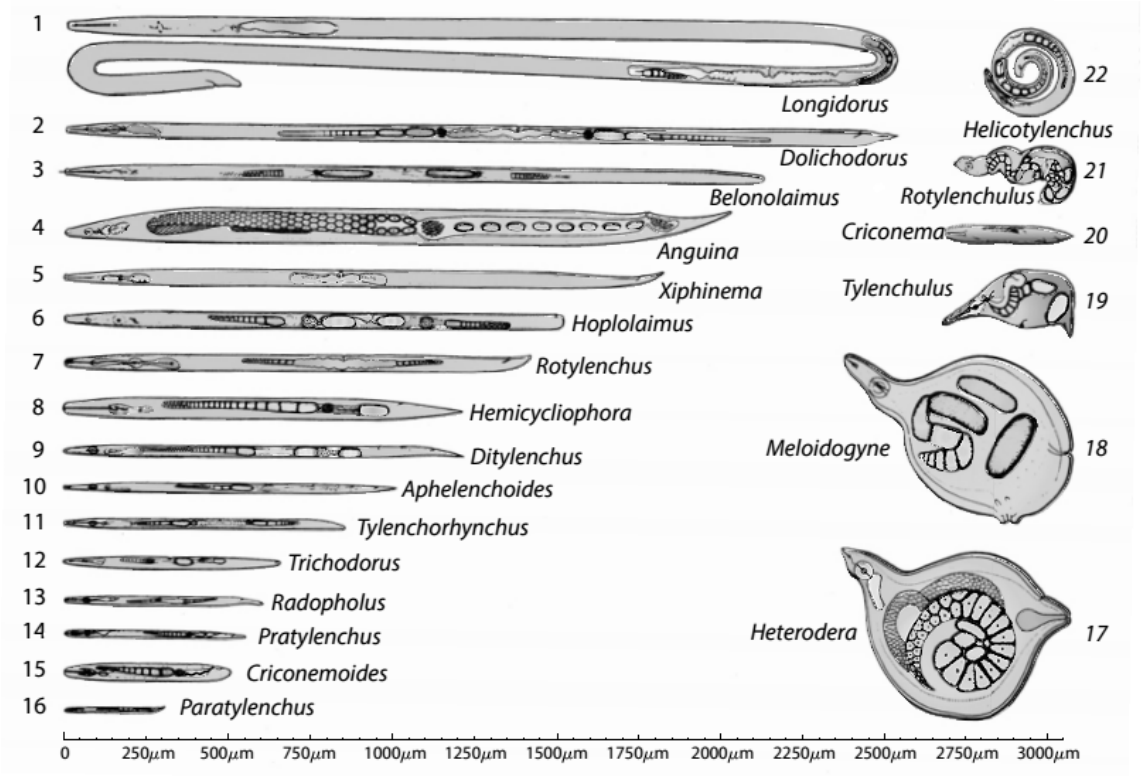


Figura 3. Morfología y tamaños de algunos de los nematodos fitoparásitos de mayor importancia (Agrios, 2005).

El cuerpo de los NFP puede ser dividido en tres regiones: *a)* la cubierta externa, *b)* el tubo interno del cuerpo y *c)* la cavidad corporal falsa o seudoceloma (Ravichandra, 2014).

**5.2.3.1 Cubierta externa.** Se compone de la cutícula (exoesqueleto), hipodermis y capa muscular. La cutícula es no-celular, elástica, sin color y usualmente estampada por estriaciones; está compuesta de distintas capas (epi, exo, meso y endo cutículas) producidas por la hipodermis sincitial (multinucleada), de la cual, su porción citoplasmática se extiende como una delgada capa entre la cutícula y el músculo (Maggenti, 1981; Ravichandra, 2014). La hipodermis se divide en cuatro cuerdas dispuestas en el cuerpo longitudinalmente en dos laterales mayores, una dorsal, y una ventral, esta última se compone de una o dos células en sección transversal (Maggenti, 1981). La musculatura somática que mueven el cuerpo, forma una completa envoltura subcuticular, separada por las cuerdas hipodermales, en cuatro

haces de músculos longitudinales: dos sub-dorsales y dos sub-ventrales, compuestos a su vez de dos o más células (Taylor, 1971; Maggenti, 1981). Los músculos especializados están dispersos a través del cuerpo, operan el estilete, pueden ser cutáneo-esofágicos, cutáneo-intestinales, u operar las espículas en el macho o los esfínteres en la vulva de la hembra (Maggenti, 1981).

**5.2.3.2. Tubo interno del cuerpo.** Se compone del sistema digestivo, esófago, intestino, recto y cloaca (Ravichandra, 2014). El sistema digestivo comienza en la boca, ésta se sitúa terminalmente en el extremo anterior del NFP, está rodeada de seis labios dispuestos en pares (sub-dorsales, laterales y sub-ventrales), seguidos de la cavidad bucal (Agrios, 2005). Dentro de la cavidad bucal se encuentra una lanza o estilete hueco similar a una aguja hipodérmica, aunque algunos NFP tienen una lanza sólida; todos los NFP poseen este órgano, el cual utilizan por medio de músculos unidos a tres protuberancias en la parte posterior del estilete, haciéndolo salir de la cavidad bucal para penetrar el tejido y extraer nutrientes de la célula vegetal (Figura 4) (Taylor, 1977; Maggenti, 1981).

Detrás del estilete se encuentra el orificio de la glándula dorsal esofágica, en este punto existe una abertura que da al esófago y con frecuencia se observa en tal punto una brusca curvatura. El esófago es un tubo delgado que se une a la parte posterior del estilete, conduce a un bulbo medio que a su vez se acopla por medio de otro tubo estrecho al intestino (Taylor, 1977).

Por detrás del bulbo medio, el esófago contiene tres glándulas, una dorsal, y dos sub-ventrales, cada una con un núcleo; las tres glándulas pueden formar un bulbo terminal que va unido al intestino, o pueden formar un lóbulo dispuesto a lo largo del mismo. En cualquier caso, la glándula dorsal esofágica posee un conducto que se dirige a la parte anterior a través del bulbo medio y que se une con el esófago (orificio de la glándula dorsal esofágica) (Taylor, 1977).

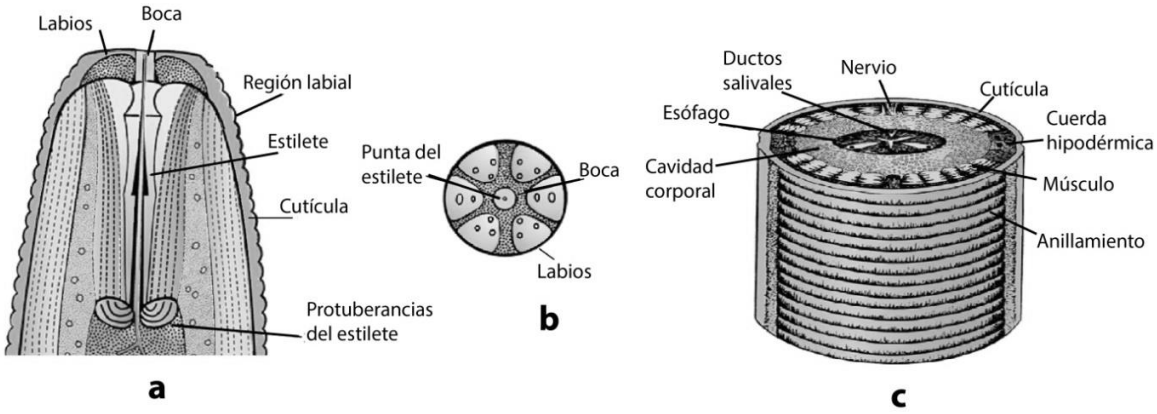


Figura 4. Morfología de NFP: vista lateral y frontal del extremo anterior o cabeza (a y b respectivamente), y de la sección media del cuerpo (c) (Agrios, 2005).

El bulbo medio contiene una válvula con la que se hallan ligadas fibras musculares que la activan para absorber el alimento a través del estilete hacia el intestino; este último funciona como órgano de retención y por lo general está lleno de glóbulos de sustancia aparentemente grasa, está dotado de paredes del espesor de una célula y se estrecha por detrás formando el recto y termina en el ano. El sistema excretor en los NFP no está bien desarrollado y generalmente la única parte que se ve es una sección de tubo que lleva al poro excretor, el cual se haya frente o detrás del bulbo medio del esófago, raramente coincidiendo con la parte anterior del intestino; el poro mismo es visible como una apertura redonda en la parte ventral (Taylor, 1977).

**5.2.3.3. Cavidad corporal falsa.** El pseudoceloma o la cavidad corporal falsa es donde sucede la respiración y la circulación, ésta se extiende a lo largo del cuerpo entre la cubierta externa y los órganos internos, está llena de fluido que cubre los músculos, sistema digestivo, reproductivo y excretor (Maggenti, 1981; Ravichandra, 2014). El seudoceloma está altamente presurizado, esta característica es esencial para dar la forma al nematodo y permite la locomoción, pues actúa como esqueleto hidrostático (Schafer, 2016); contiene una variedad de células, membranas y tejido fibroso, sirve como transporte de oxígeno, materiales alimenticios y productos del metabolismo (Maggenti, 1981; Ravichandra, 2014).

**5.2.4. Sistema de reproducción.** La reproducción de los NFP puede ser partogenética, donde los huevecillos se desarrollan sin fecundación; hermafrodita, donde la hembra produce los huevecillos y el esperma; y sexual, donde el macho fecunda la hembra; algunas especies sexuales pueden reproducirse partogenéticamente en ausencia de machos, los cuales pueden ser escasos o ausentes en las especies hermafroditas y partogenéticas (Taylor, 1977). Los órganos del sistema reproductivo de los NFP son principales y pueden ocupar una gran porción de la cavidad corporal (Ravichandra, 2014).

Los órganos de reproducción de la hembra están formados por uno o dos ovarios que se sitúan en la vulva. El ovario es un tubo de paredes muy delgadas y en su extremo se encuentra una célula que por división produce oocitos que descienden al ovario aumentando de tamaño a medida que avanzan; se pueden fecundar con el esperma contenido en una espermoteca o con el producido cerca del fondo del ovario; los oocitos pasan al útero y forman una envoltura delgada y flexible antes de ser depositados a través de la vulva, que por lo general sucede durante la fase unicelular del huevecillo (Figura 5). Algunos NFP depositan los huevecillos directamente en el suelo o en tejido vegetal, otros géneros como *Meloidogyne* depositan sus huevecillos dentro de una masa gelatinosa (ooteca) (Taylor, 1977).

El sistema reproductivo del macho consta de un testículo (la mayoría de la clase Secernentea) o dos (la mayoría de la clase Adenophera), los cuales son estructuras tubulares cubiertas de tejido epitelial y glandular; poseen paredes muy delgadas y una célula que se divide continuamente para producir espermatocitos que descienden a través de éstos, aumentando su tamaño para posteriormente dividirse en cuatro espermatozoides globulares de unas cuantas micras de diámetro y de movimiento ameboide. Muchos machos poseen un par de protuberancias quitinosas llamadas espículas y un gubernáculo, algunas especies también poseen una membrana delgada llamada aleta (Taylor, 1977; Ravichandra, 2014).

Las espículas son los principales órganos copulatorios y pueden ser útiles en la identificación de NFP al observarse fácilmente bajo microscopio, sus extremos posteriores están próximos entre sí en el ano, mientras que los extremos anteriores son divergentes. En la copulación, las espículas se proyectan a través del ano y sirven para abrir la vulva, mientras que el gubernáculo que está situado detrás de las espículas, actúa de guía cuando éstas se hacen salir, mientras que la aleta se emplea para sujetar la hembra; los espermatozoides son eyaculados desde la cloaca hacia el rededor de las espículas (Figura 5) (Taylor, 1977; Ravichandra, 2014).

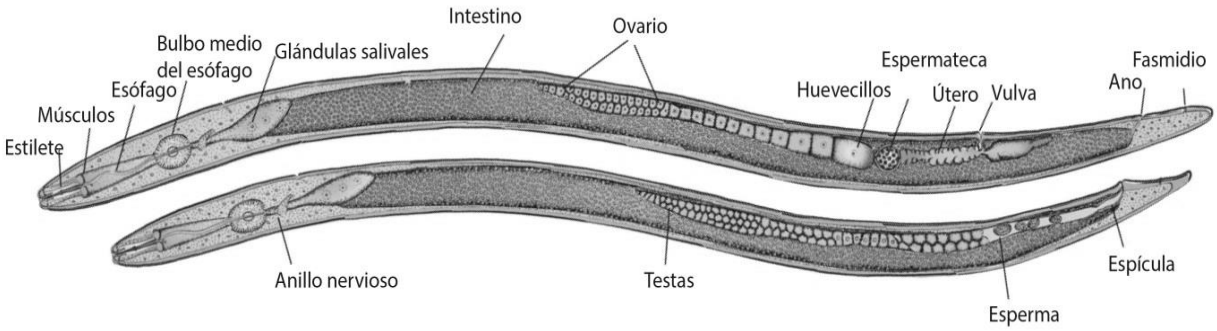


Figura 5. Principales características morfológicas del NFP hembra y macho (Agrios, 2005).

**5.2.5. Sistema nervioso.** Los NFP poseen un sistema nervioso bien desarrollado, aunque se puede ver poco de éste, excepto el collar nervioso y el hemizonido; el collar nervioso rodea el esófago exactamente detrás del bulbo medio (Figura 6), pero solo es claramente visible en algunos ejemplares; el hemizonido es a veces visible cerca del poro excretor, donde por lo general hay una ligera curvatura en la pared de la región ventral del cuerpo (Taylor, 1977).

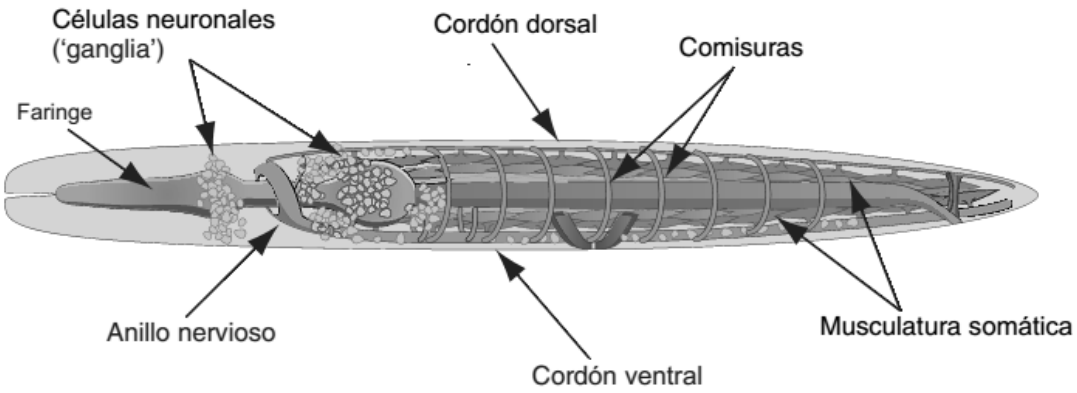


Figura 6. Estructura general del sistema nervioso de los nematodos (Schafer, 2016).

Los NFP poseen órganos táctiles llamados papilas en el extremo anterior y otras partes del cuerpo; poseen también órganos quimiorreceptores llamados anfidios, situados en el extremo anterior en la parte lateral, los cuales son difíciles de ver en los NFP (Taylor, 1977). Casi todos los NFP poseen fasmidios cuya función es menos entendida, aunque algunos trabajos con *Caenorhabditis elegans* sugieren que son órganos polimodales (Schafer, 2016).

**5.2.6. Ecología y dispersión.** En escala global, existe una mayor diversidad de géneros y especies de NFP en regiones tropicales y subtropicales que en aquellas con climas templados, no obstante, es en estas últimas donde los mayores problemas causados por NFP han sido detectados (Luc *et al*., 2005). La distribución geográfica de las especies de NFP varían en gran medida, algunas son cosmopolitas (*Meloidogyne* spp.), otras están geográficamente restringidas (*Nacobbus* spp.) o son altamente específicas a un hospedero (*Heterodera carotae*) (Ravichandra, 2014). Así mismo, su distribución es influenciada en gran medida por el ambiente (temperatura, humedad y aireación del suelo), debido principalmente a los requerimientos térmicos óptimos de sus procesos biológicos que determinan el rango geográfico ideal (Luc *et al*., 2005). Por otra parte, algunos cultivos son atacados por pocas especies, mientras que otros están asociados a un amplio rango de especies y géneros de NFP (Ravichandra, 2014).

Los NFP habitan principalmente la capa superficial del suelo (15 a 30 cm), donde la mayoría de éstos viven durante un periodo, y en todos, incluso en los sedentarios especializados, los huevos, los estadíos juveniles y los machos, son encontrados en el suelo durante toda su vida o parte de ella (Fourie *et al*., 2017). Se diseminan lentamente bajo su propia energía y con mayor rapidez cuando los poros del suelo están ocupados por una delgada película de agua (algunos micrómetros de espesor), que cuando está anegado (Agrios, 2005).

En adición a su movimiento, los NFP pueden ser dispersados fácilmente en áreas cercanas por cualquier medio que acarree partículas de suelo: implementos agrícolas, riego, drenaje superficial, pies de animales, aves, y tolvaneras, mientras que para grandes distancias, son dispersados por la producción agrícola y plantas de vivero (Agrios, 2005). Algunos ejemplos son la dispersión de *Heterodera glyvines* a Sudamérica, *Globodera pallida* a Europa y *Bursaphelenchus cocophilus* hacia América centro y sur (Luc *et al*., 2005).

**5.2.7. Principales géneros de NFP en cultivos hortícolas.** Los principales géneros de NFP asociados a cultivos hortícolas alrededor del mundo incluyen a *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Ditylenchus*, *Globodera*, *Tylenchulus*, *Xiphinema*, *Radopholus*, *Rotylenchus*, *Helicotylenchus*, *Pratylenchus*, *Aphelenchoides*, entre otros (Ravichandra, 2014). Esta lista puede variar según la ubicación geográfica específica, además, la importancia del NFP puede ser juzgada en caso de que sus efectos sean o no catastróficos en los principales cultivos (Sasser y Freckman, 1987).

### 5.3. El género *Meloidogyne*

**5.3.1. Historia y clasificación.** Berkeley en 1855 estudió raíces de pepino dañadas por nematodo, lo cual fue considerado como el primer reporte de *Meloidogyne* spp. (Maggenti, 1981). Posteriormente en raíces de cafetales enfermos, Jobert (1878) observó huevecillos elípticos dentro de membranas traslúcidas que contenían pequeños animales vermiformes, notó la eclosión de los huevecillos y la abundancia de dichos gusanos en el suelo, no obstante no se determinaron como la causa de la

enfermedad; diez años después, Goeldi (1887) señaló por primera vez al nematodo *Meloidogyne exigua* causante de la enfermedad de los cafetales y como la especie característica de este nuevo género (Taylor y Sasser, 1983). Fue hasta 1949 que Chitwood re-describió y clasificó dentro del género *Meloidogyne* (propuesto por Göldy) a las cuatro especies más comunes y ampliamente distribuidas: *M. incognita, M. javanica, M. arenaria y M. hapla*, que aún eran consideradas como *Heterodera radicícola* o *Heterodera marioni* (Cuadro 2); así mismo introdujo el concepto de diferenciación de especies con base al patrón anular de la región perineal de la hembra, herramienta básica en la diferenciación de especies de *Meloidogyne* previo a la identificación molecular.

Cuadro 2. Clasificación taxonómica del género *Meloidogyne*.

| Clasificación | Nombre |
|---|---|
| Reino | Animalia |
| Phylum | Nematoda |
| Clase | Secernentea |
| Orden | Tylenchida |
| Súper familia | Tylenchoidea |
| Familia | Heteroderidae |
| Subfamilia | Meloidogyninae |
| Género | *Meloidogyne* |

(Maggenti, 1981).

**5.3.2. Importancia económica.** *Meloidogyne spp.,* ocurre alrededor del mundo, especialmente en áreas templadas, cálidas y de inviernos cortos o templados, por lo que son un problema común en invernaderos (Ravichandra, 2014). Atacan a casi todas la plantas cultivables y reducen la producción agrícola mundial en alrededor del 5% aunque las pérdidas individuales en campo pueden ser mucho mayores (Ravichandra, 2014). Estos nematodos fitoparásitos dañan a las plantas al debilitar los ápices radiculares y ocasionar la formación de abultamientos en las raíces (Agrios, 2005). Cuando el cultivo es infectado durante su establecimiento, las pérdidas pueden ser desde considerables hasta la destrucción del cultivo, mientras

que las plantas adultas al infectarse pueden presentar efectos leves o reducciones graves de rendimiento (Agrios, 2005).

**5.3.3. Ciclo patogénico.** Un ciclo de vida de *Meloidogyne* spp., se completa en 25 días a 27 °C, aunque puede variar a menor o mayor temperatura, las primeras dos etapas de juveniles del nematodo agallador son de forma de gusano y se desarrollan dentro del huevecillo, del cual emerge el segundo estadio juvenil (J2) de apariencia y estructura similar a la del macho adulto (Figura 7). Este J2 es la única etapa infecciosa y puede desplazarse hasta 100 cm en el suelo en busca de un hospedero susceptible cuando la humedad del suelo es óptima, una vez dentro de la raíz crea un sitio de alimentación conocido como célula gigante, la cual es esencial para establecer la relación hospedero-parásito; es entonces cuando el J2 se convierte en sedentario y crece aumentando su grosor (Agrios, 2005; Ravichandra, 2014).

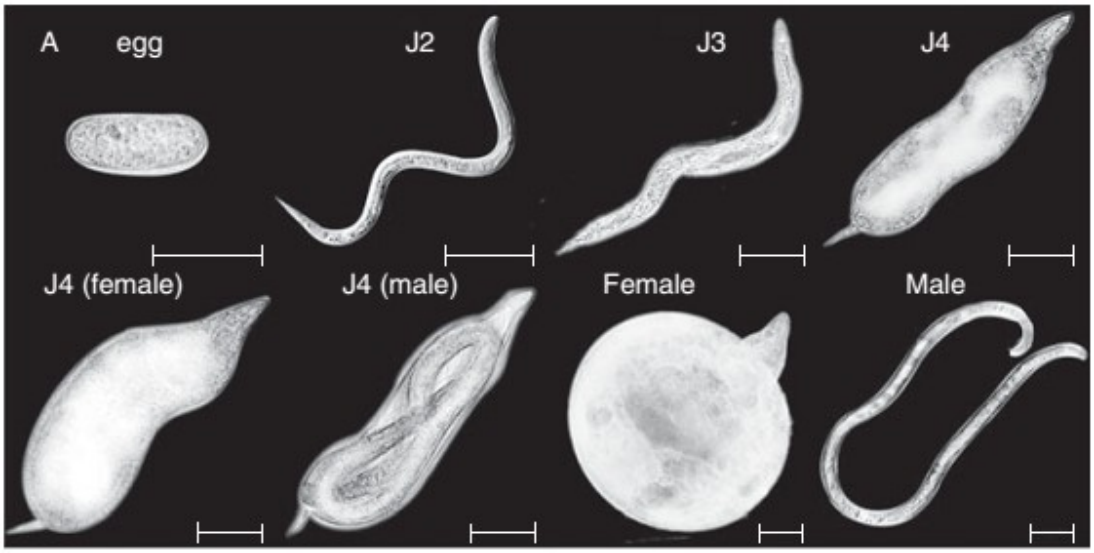


Figura 7. Estadios de desarrollo de *Meloidogyne incognita*, barras de escala = 40 µm (Abad *et al*., 2009).

Posteriormente el J2 sufre una segunda muda y origina su tercera etapa juvenil (J3), la cual es breve y en seguida experimenta su tercera muda, produciendo el cuarto estadio juvenil (J4), el cual puede ser distinguido como macho o hembra (Agrios, 2005). Después de la cuarta y final muda puede emerger el macho adulto en forma de gusano que de nuevo es de vida libre aunque ya no es capaz de alimentarse; por

su parte, la hembra continúa su alimentación y con su crecimiento en grosor y un poco en longitud, por lo que toma una forma de pera (Agrios, 2005). La hembra puede producir huevecillos con o sin fertilización de un macho, ésta deposita aproximadamente 500 huevecillos en una cubierta protectora gelatinosa dentro o fuera del tejido vegetal dependiendo de la ubicación de la misma; los huevecillos pueden eclosionar inmediatamente y migrar a partes adyacentes de la misma raíz, de otras raíces u otras plantas, aunque algunos de ellos pueden entrar en dormancia (Ravichandra, 2014).

### 5.3.4. Morfología

**5.3.4.1. Segundo estadio juvenil (J2).** Este puede eclosionar o permanecer en el huevecillo en un estado de diapausa cuando las condiciones ambientales no son favorables (de Guiran and Ritter, 1979). Aquellos que eclosionan son capaces de moverse grandes distancias (40-100 cm) a través del suelo cuando los niveles de humedad son óptimos. La pared corporal en conjunto con su cutícula protectora y músculos somáticos es controlada por el sistema nervioso, el cual permite al nematodo agallador responder a señales ambientales que le permiten moverse hacia un sitio susceptible y establecer una relación parásito-hospedero (Figura 8). El sistema digestivo comienza la formación de un sitio de alimentación, y los nutrientes que el nematodo absorbe son almacenados en el intestino, el cual se agranda y resulta en un juvenil hinchado el cual ya no es capaz de moverse. La energía almacenada el eventualmente transferida al primordio genital, el cual subsecuentemente se desarrolla y forma el sistema reproductivo adulto (Triantaphyllou, 1960, 1962, 1979; Papadopoulou y Triantaphyllou, 1982).

**5.3.4.2. Macho.** Este se torna vermiforme después de la tercera muda y permanece así durante la cuarta muda hacia el estado adulto, el cual se vuelve móvil y eventualmente emerge de las cutículas de los estadios previos antes de dejar la agalla y migrar al suelo con el objetivo de encontrar una hembra para reproducirse sexualmente. Tal como en el J2, la pared corporal y el sistema nervioso le permiten al macho responder a señales ambientales y moverse a través del suelo. En las especies que se reproducen por anfimixis los machos son muy comunes, pero en las

especies partenogenéticas los machos pueden ser raros y son innecesarios para la reproducción. A diferencia del J2 y la hembra, el macho no requiere alimentarse pues toda la energía requerida para la formación se su sistema reproductivo fue obtenida en los estadios previos; como consecuencia, la glándula faringeal del macho está degenerada y probablemente no es funcional, mientras que el intestino sirve como almacenamiento de reservas de alimento y proporciona la energía para la producción del esperma (Triantaphyllou, 1979).

**5.3.4.3. Hembra.** Esta tiene forma de pera y es sedentaria, únicamente la región del cuello permanece musculada en la hembra para permitirle cambiar la posición de la cabeza dentro del sitio de alimentación con una o más células gigantes. El incremento del tamaño y cambio de la forma del cuerpo añaden volumen para el sistema reproductivo, el cual está en contacto con el intestino amorfo agrandado. Mientras que el sistema digestivo está especializado para la conservación de las células gigantes y la absorción de nutrientes de la planta, el intestino está menos especializado y funciona como órgano primario de almacenamiento de los nutrientes. Singularmente, el intestino no está adherido al recto y por lo tanto tiene un final ciego; en su lugar, seis glándulas rectales grandes vacían su contenido a través del ano para formar la masa gelatinosa que rodea y protege a los huevecillos conforme son depositados a través de la vulva. Los dos ovarios del sistema genital de la hembra están en contacto directo con el intestino, por lo que los nutrientes almacenados son dispersados a través de pocas membranas celulares y ser disponible para el crecimiento de los oogonios y oocitos en huevecillos maduros (Eisenback y Hunt, 2009).

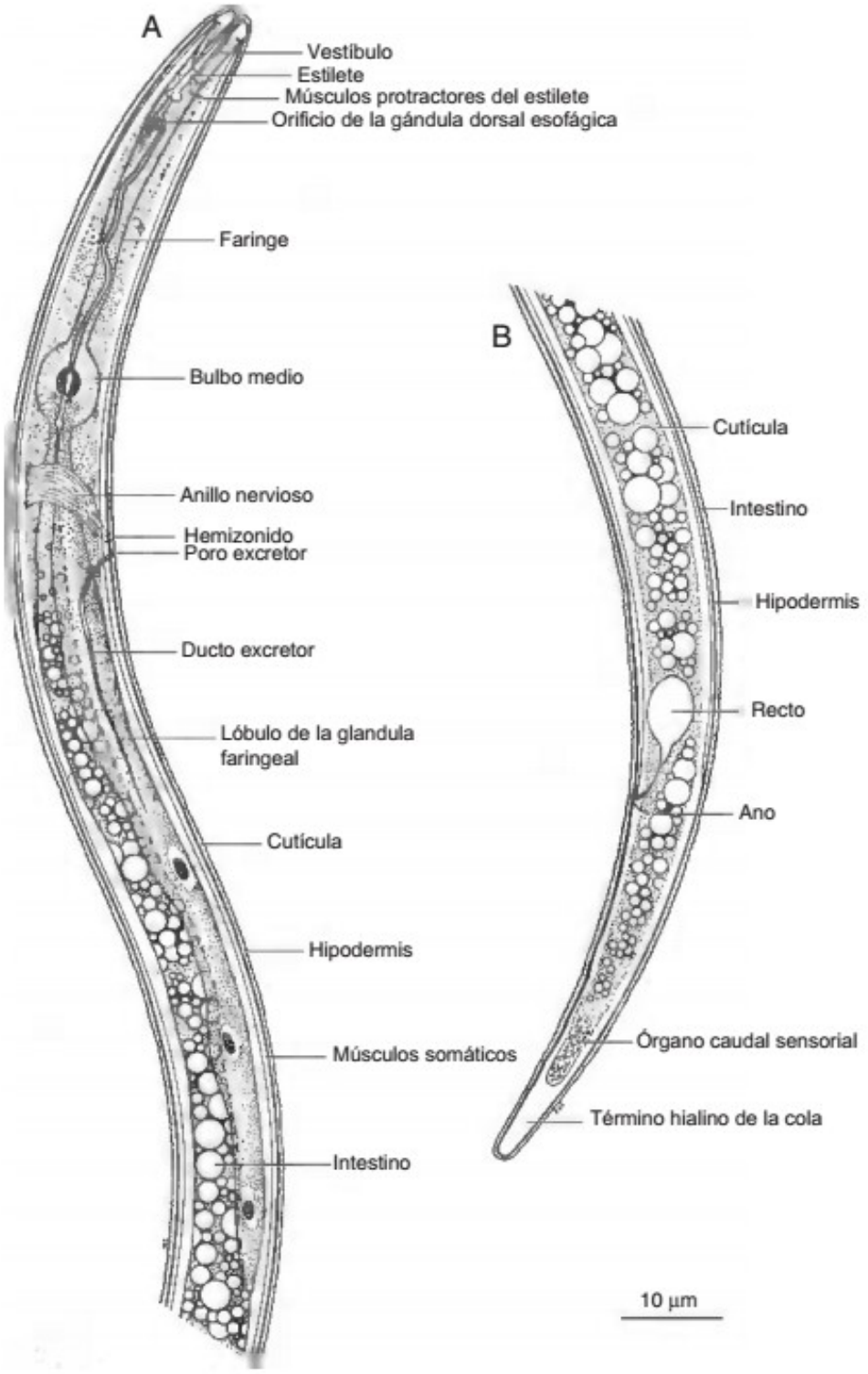


Figura 8. Segundo estadio juvenil del nematodo agallador. A: región anterior; B: región posterior (Eisenback y Hunt, 2009).

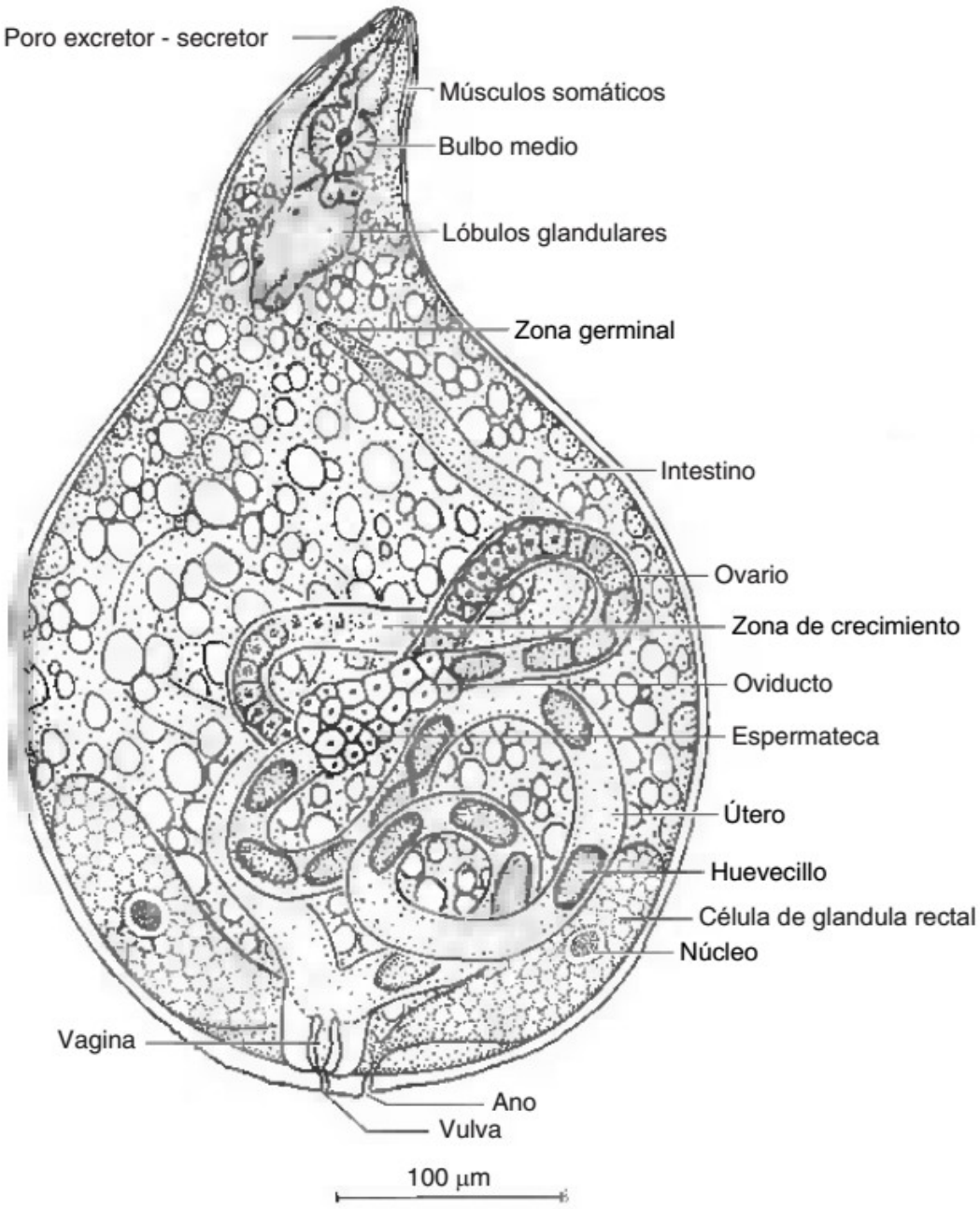


Figura 9. Hembra adulta del nematodo agallador (Eisenback y Hunt, 2009).

**5.3.4.4. Huevecillo**. Estos varían en tamaño y forma pero son típicamente de alrededor de 95 µm de longitud y de 40 µm de diámetro. La cubierta del huevecillo consiste de una capa externa de vitelina de aproximadamente 30 nm de espesor, una capa media quitinosa de alrededor de 400 nm de espesor y una capa interna glicolipídica de espesor variable, la cual confiere resistencia a químicos abrasivos y como consecuencia los huevecillos no son sensibles a toxinas como los nematicidas comunes (Eisenback y Hunt, 2009). La ovogonia y ovocito que llena el huevecillo madura dentro de la hembra hasta un estadio de embrión de una o dos células para posteriormente ser depositado en la masa de huevecillos; previo al desarrollo del embrión, la célula se condensa y la membrana lipoide presiona alejándose de la cubierta del huevecillo, dejando un espacio perivitelino en ambos polos del huevecillo. El desarrollo temprano del huevecillo es favorecido a 28°C, a esta temperatura un ciclo de vida tarda alrededor de 3 semanas (Figura 10), no obstante, mayores temperaturas resultan devastadoras en su supervivencia y menores temperaturas resultan en alargamiento del ciclo (Calderón-Urrea *et al*., 2016).

**5.3.5. Síntomas de la enfermedad.** Los mayores síntomas presentados en la parte aérea de la planta son crecimiento reducido, hojas de color verde pálido o amarillentas, debilitadas, de poco crecimiento y que tienden a marchitarse en climas cálidos (Agrios, 2005; Ravichandra, 2014). El número y calidad de flores y frutos se reduce, no obstante las plantas afectadas usualmente persisten durante la temporada de crecimiento y raramente mueren prematuramente (Agrios, 2005). Los síntomas característicos de la afectación aparecen en las partes subterráneas de la planta, confiriendo en la raíz las típicas agallas, las cuales son mucho más grandes en diámetro que una raíz sana. Muchas infecciones a lo largo de la raíz crean una apariencia áspera y maltratada, e incluso ciertas especies pueden provocar desarrollo abundante de raíces menores. Sin embargo, las raíces infectadas permanecen de menor tamaño y muestran necrosis y pudrición, particularmente cuando ha avanzado el ciclo del cultivo. Cuando los tubérculos u órganos carnosos subterráneos son atacados, se producen abultamientos en su superficie, los cuales se vuelven prominentes y causan distorsión o rompimiento. Las raíces de los arboles también desarrollan agallas aproximadamente proporcionales en tamaño a el periodo de infección.

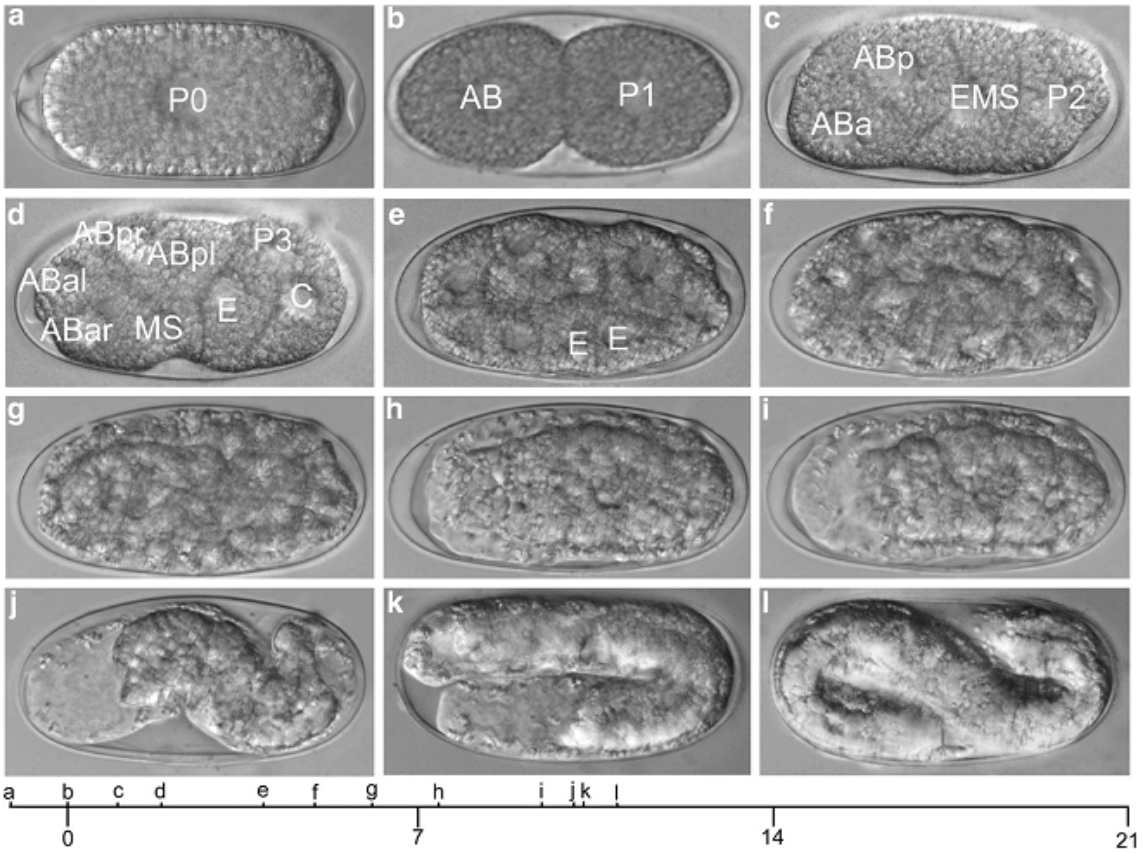


Figura 10. Embriones de *Meloidogyne incognita* en diferentes estadios de desarrollo: célula individual (a); 2-células (b); 4-células cambiando de un patrón lineal hacia uno romboide (c); 8-células previo a la división de la célula $P_3$ (d); embrión en el comienzo de gastrulación, ambas células-E comienzan a migrar hacia dentro (e); estadio de células múltiples mostrando claras diferencias entre células endodermas grandes rodeadas de células ectodermas (f y g); múltiples células mostrando diferencia clara entre la parte anterior clara y una parte posterior del embrión más granulada (h y i); elongación al comienzo de la flexión dentro del huevecillo (j); estadio 2-doblez (k); estadio 3-doblez (pretzel) (l). Se muestra una escala del tiempo en días después de la primera división celular (Calderón-Urrea *et al*., 2016).

**5.3.6. Desarrollo de la enfermedad.** Al entrar a la raíz los J2 se mantienen en movimiento hasta alcanzar posiciones detrás del punto de crecimiento, donde se fijan con su cabeza en el cilindro vascular de desarrollo, aunque en raíces viejas, la cabeza está usualmente en el periciclo (Agrios, 2005). Durante su alimentación, el J2 secreta saliva de manera intermitente, la cual contiene sustancias que fluidifican parte del contenido de las células para ser absorbido a través del estile, así mismo, las células cercanas a la trayectoria del J2 comienzan a agrandarse por efecto de dichas sustancias y después de dos o tres días que el juvenil se establece, también algunas de las células alrededor de su cabeza comienzan a agrandarse (Agrios, 2005). Estas células agrandadas son esenciales en la trasferencia de nutrientes al nematodo y se forman principalmente por endomitosis sucesivas sin las subsecuentes citoquinesis, es decir, el núcleo se divide pero ninguna pared celular se constituye, las paredes celulares entre algunas células adyacentes también colapsan y desaparecen, este proceso de agrandamiento y unión de células continúa por dos o tres semanas, originándose una hiperplasia e hipertrofia en el tejido alrededor de la hembra y su sitio de alimentación, lo cual forma las agallas características de la enfermedad, cada agalla usualmente contiene tres o seis células gigantes (Agrios, 2005; Ravichandra, 2014).

Así como la hembra se agranda y produce sus masas de huevecillos, ésta presiona hacia el exterior, divide el córtex y puede quedar expuesta en la superficie de la raíz o permanecer completamente cubierta, dependiendo de su posición en la superficie radicular (Agrios, 2005). El nematodo agallador interactúa con otros fitopatógenos presentes en el suelo, los efectos patogénicos de la interacción sobre el hospedero pueden incrementarse o reducirse, es decir, puede ser sinérgica o antagónica; el incremento frecuentemente es ocasionado por ciertos hongos parásitos, los cuales pueden fácilmente atacar las raíces debilitadas y a las hipertrofiadas, por otra parte, algunos hongos *e.g.*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* y el oomycete *Pythium*, crecen y se reproducen en mayor número sobre las agallas que en otras áreas de la raíz, lo cual induce un colapso del tejido radicular (Agrios, 2005; Ravichandra, 2014).

**5.3.7. Especies importantes en cultivos hortícolas.** Es sabido que la mayoría de los cultivos hortícolas son atacados por alguna de las especies más importantes de *Meloidogyne* (Cuadro 3) (Taylor, 1977).

Cuadro 3. Principales especies del género *Meloidogyne* asociadas a cultivos hortícolas de importancia en los trópicos y subtrópicos.

| Cultivo | *M. incognita* | *M. javanica* | *M. arenaria* | *M. hapla* |
|---|---|---|---|---|
| *Allium cepa* (Cebolla) | ● | ● | ● | |
| *A. sativum* (Ajo) | ● | | | |
| *A. schocnoprasum* (Cebollín) | | ● | | |
| *Apium graveolens* (Apio) | ● | ● | | |
| *Basella alba* (Espinaca china) | ● | | | |
| *Beta vulgaris* (Remolacha) | ● | | ● | ● |
| *Brassica oleracea* var. *acephale* (Col) | | ● | ● | |
| *B. oleracea* var. *botritys* (Coliflor) | ● | ● | ● | |
| *B. oleracea* var. *capitata* (Repollo) | ● | | ● | ● |
| *Capsicum annuum* (Pimiento) | ● | | ● | |
| *C. frutescens* (Chile Tabasco) | ● | ● | ● | |
| *Carica papaya* (Papaya) | ● | ● | ● | ● |
| *Citrullis lanatus* (Sandía) | ● | ● | ● | |
| *Cucumis melo* (Melón) | ● | ● | ● | |
| *C. sativus* (Pepino) | ● | ● | ● | |
| *Cucurbita maxima* (Calabaza) | ● | ● | ● | |
| *C. moschata* (Calabaza) | ● | ● | ● | |
| *C. pepo* (Clabacita) | ● | ● | ● | |
| *Daucus carota* (Zanahoria) | ● | ● | ● | ● |
| *Fragaria* x *ananassa* (Fresa) | ● | ● | | ● |
| *Lactuca sativus* (Lechuga) | ● | ● | ● | ● |
| *Luffa cylindrica* (Esponja) | ● | ● | | |
| *Lycopersicon esculentum*(Tomate) | ● | ● | ● | ● |
| *Malus domestica* (Manzano) | ● | ● | ● | |
| *Momordica charantia* (Melón amargo) | ● | ● | ● | |
| *Musa* x *paradisiaca* (Plátano) | ● | ● | | |
| *Petroselinum crispum* (Perejil) | ● | | ● | ● |
| *Prunus persica* (Durazno) | ● | ● | ● | ● |
| *Sechium edule* (Chayote) | | ● | | |
| *Solanum melongena* (Berenjena) | ● | ● | ● | |
| *S. tuberosum* (Papa) | ● | ● | ● | ● |
| *Vitis vinifera* (Vid) | ● | ● | ● | |

(Luc *et al*., 2005; Ravichandra, 2014)

Cerca del 95% de las poblaciones de nematodo agallador se componen sólo por *M. incognita, M. javanica, M. arenaria*, y *M. hapla*, las primeras dos son ampliamente distribuidas en regiones tropicales, subtropicales y climas templados cálidos; *M. arenaria* también es encontrada en tales climas pero es relativamente menos frecuente; las tres primeras especies suceden en un rango de temperatura de 36 °C o menor en el mes más cálido; *M. hapla* se encuentra en climas templados, en áreas con rango de temperatura de -15 °C durante el mes más frio, pero se limita a zonas con promedio de temperatura menor a 27 °C durante el mes más cálido (Ravichandra, 2014). Respecto a *M. incognita*, se han descrito cuatro razas designadas como raza 1, raza 2, raza 3 y raza 4, mientras que en *M. arenaria* se han descrito la raza 1 y raza 2; no obstante, las razas 1 y 2 en *M. incognita* y la raza 2 de *M. arenaria* son las más ampliamente distribuidas (Ravichandra, 2014). Por su parte, *M. enterolobii* ha sido considerada en los últimos años como una de las especies más importantes debido a su amplia distribución geográfica, amplio rango de hospederos y su habilidad para superar la resistencia de cultivos importantes, tales como genotipos de tomate, chile y algunos cultivos que poseen el gen *Mi-1*, el cual confiere resistencia a *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. incognita* (Sikora y Fernández, 2005).

**5.3.8. Uso de NaOCl en la extracción de huevecillos de *Meloidogyne* spp.** El NaOCl es comúnmente utilizado como desinfectante postcosecha a concentraciones de 50 a 600 ppm, es un fuerte oxidante con un amplio espectro de actividad antimicrobiana, en agua ioniza a $Na^+$ y el ion de hipoclorito se equilibra en ácido hipocloroso (HOCl), esta fracción activa de la sustancia daña la membrana celular, proteínas y ácidos nucleicos de los microbios por medio de degradación oxidativa al contacto (Mishra *et al*., 2018). En la nematología vegetal, el NaOCl fue utilizado por primera vez a concentración de 0.5% para degradar el material gelatinoso que resguarda los huevecillos de *Meloidogyne javanica* sin afectar la eclosión o estructura del huevecillo, esto por suspensión de las masas durante 2 a 3 min (Bird, 1968); posteriormente, McClure *et al.* (1973) empleó este método al licuar masas de huevecillos en solución al 1% para obtener huevecillos limpios de *Meloidogyne incognita*. En el mismo año, Hussey y Barker (1973) compararon concentraciones de

1.05 y 0.53% de NaOCl para la obtención de inóculo, el mejor resultado se obtuvo al 0.5% de la solución y con agitado vigoroso de las raíces de tomate durante 4 min en lugar del licuado de las masas de huevecillos, reportaron que la exposición al NaOCl puede ocasionar detrimento a los huevecillos de *Meloidogyne* spp., y que existe mayor sensibilidad a la exposición a NaOCl en huevecillos de *M. incognita* respecto a *M. hapla*, lo anterior, observado en la cantidad de huevecillos producidos.

Stetina *et al.* (1997), compararon la extracción de huevecillos y larvas de *M. incognita* en dos experimentos con tratamientos de agitación durante 5 y 10 min, licuado 5 y 10 segundos, y concentraciones de 0% y 0.5% de NaOCl a partir de submuestras de 1.5 g de raíz de soya y tomate; sus resultados mostraron una mayor cantidad de huevecillos obtenida con la agitación durante 10 min en solución de 0.5% de NaOCl. Respecto a la obtención de inóculo con este método, Vrain (1977) comparó tres tipos de inóculo de *M. incognita*: masas de huevecillos intactas, huevecillos liberados por agitado de raíces de tomate durante 3 min NaOCl al 0.53% y larvas eclosionadas a partir de huevecillos tratados con la concentración de NaOCl mencionada; este último autor demostró un alto porcentaje de juveniles eclosionados inmóviles 60-80%, no obstante la infectividad del inóculo fue mayor a partir de las larvas comparado con los huevecillos.

**5.3.9. Niveles de daño**. El nematodo agallador de raíces y muchos otros nematodos fitoparásitos son patógenos y causan enfermedad que es expresada a niveles histológico, morfológico, fisiológico y molecular, lo cual resulta en reducción de crecimiento, rendimiento, esperanza de vida y resistencia a estrés ambiental de plantas afectadas. El grado de patogenicidad de un nematodo también depende en su agresividad y la reacción a ésta por parte de una especie o cultivar. El daño al cultivo de la enfermedad inducida puede consistir en una cantidad o calidad reducida de la cosecha. Por ejemplo, la producción en suelos infestados puede tener una mayor proporción no comercializable debido a tamaño pequeño o malformación. También, el contenido de azúcar de la raíces de la remolacha en campos infestados con *M. incognita* puede reducirse, como en el contenido de proteína de leguminosas en suelo infestado con *M. artiellia*. Las especies o cultivares que apoyan la

reproducción de nematodo son referidas como susceptibles. Entre ellas, algunas pueden sufrir mayormente por el parasitismo y se les considera intolerantes, mientras que otras sufrirán mucho menos y producen rendimiento satisfactorio, se les considera tolerantes. También, otras especies vegetales o cultivares pueden ser infectados por el nematodo pero entonces activan un mecanismo de defensa que limita el desarrollo y reproducción del nematodo, estos son referidos como resistentes. Diferentes especies y cultivares pueden expresar diferentes grados de resistencia, susceptibilidad y tolerancia (Greco y Di Vito, 2009).

La evaluación de la respuesta del cultivo al nematodo agallador está basada en la severidad de los síntomas causados sobre las raíces (índice de agallamiento) y la reproducción del nematodo sobre esa especie. Numerosas escalas son utilizadas para tasar el índice de agallamiento; están basadas sobre el número de agallas o también en el tamaño de las agallas y apariencia del sistema radicular. Taylor y Sasser (1978) tasaron por primera vez el índice de agallamiento en escala de 0 a 5, en la cual 0 = sin agallas, 1 = 1-2 agallas, 2 = 3-10 agallas, 3 = 11-30 agallas, 4 = 31-100 agallas, y 5 = más de 100 agallas por raíz. La misma escala es utilizada para evaluar el índice de masas de huevecillos. Basado sobre agallamiento de raíz o tasa de reproducción, Canto-Sáenz (1985) clasificó la respuesta de la planta al nematodo agallador como susceptible, buena reproducción y agallamiento severo; tolerante, buena reproducción y poco agallamiento; resistente, sin o con reproducción pobre y poco o sin agallamiento; e hipersusceptible, poca reproducción y agallamiento severo. Ejemplos de hipersusceptibilidad son la remolacha infectada por *M. naasi*, maíz infectado por *M. artiellia* y algunos cultivares de chícharo de vaca infectados con *M. incognita* (Greco y Di Vito, 2009).

La información sobre el grado de daño que un nematodo fitoparásito puede causar, especialmente pérdida de rendimiento, es básico para la implementación de estrategias de control más apropiadas. Por ejemplo, para incluir un nematodo en la lista de organismos de cuarentena, el potencial patogénico del nematodo en un país debe ser demostrado. Además, quienes elaboran las políticas nacionales considerarán que el impacto que un nematodo puede tener sobre cultivos y áreas

dadas para sus decisiones. A nivel de granja, la información del potencial de las poblaciones del nematodo de causar pérdida de rendimiento es un prerrequisito para decidir si y cuándo aplicar un tratamiento, y para escoger la estrategia de control más apropiada. Así mismo, la información de experimentos que evalúan la relación entre una población inicial, la densidad final y la dinámica de la población en la ausencia o presencia de un hospedero, es básica para el análisis de posibles tácticas de manejo. Basado en esta información, el umbral económico puede ser calculado (Ferris y Noling, 1987).

# VI. MATERIALES Y MÉTODOS

## 6.1. Lugar donde se hizo el estudio

El primer experimento de extracción de huevecillos y la identificación molecular de la especie se realizaron en el laboratorio de fitopatología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. La segunda extracción de huevecillos y los experimentos de viabilidad de huevecillos y densidades de inóculo se realizaron en el laboratorio e invernadero de Nematodos Fitoparásitos de la Facultad de Agronomía-UAS.

## 6.2. Extracción de huevecillos

El material vegetal se obtuvo de plantas de pepino (*Cucumis sativus* L. cv 'Spada') cultivadas en invernadero por alrededor de 11 semanas en suelo infestado por nematodo agallador. Las raíces agalladas se lavaron cuidadosamente, se cortaron en segmentos de 1.5 cm y se mezclaron en agua destilada dentro de un recipiente para homogenizar el material y posteriormente se tomaron submuestras de 10 g para cada extracción.

Los tratamientos se establecieron por arreglo factorial con tres concentraciones de NaOCl y tres periodos de agitación. Para el primer experimento, los niveles de NaOCl fueron 3,000, 6,000 y 9,000 ppm con agitación durante 4, 8 y 12min (llevado a cabo el día 30 de septiembre de 2018). El segundo experimento se realizó con concentraciones de NaOCl de 5,000, 7,000 y 9,000 ppm y periodos de agitación de 6, 12 y 18min (llevado a cabo el día 16 de octubre de 2018). Las extracciones se realizaron en diseños completamente al azar con cuatro repeticiones.

El hipoclorito de sodio fue diluido de una solución al 6% (ICR, Iztapalapa) añadiendo agua destilada (pH 7.0) hasta lograr las concentraciones mencionadas. Las submuestras fueron procesadas con un agitador magnético Hanna HI322 (Smithfield, RI) al 45% de velocidad (±400 rpm) en matraces de 500 mL conteniendo 350 mL de la concentración de NaOCl correspondiente. Las soluciones se mantuvieron a 28°C durante la agitación y posteriormente fueron vaciadas en tamices seriados de 75, 45

and 25µm de abertura de malla. Los tamices fueron lavados varios minutos con agua destilada para remover residuos de NaOCl. Los huevecillos recolectados en alícuotas fueron contados por microscopía para determinar la cantidad de huevecillos extraídos por gramo de raíz.

### 6.3. Viabilidad de inóculo

Los huevecillos obtenidos de cada repetición del segundo experimento de extracción fueron utilizados como inóculo en 36 plántulas de pepino (cv. 'Spada'), sembradas en el mismo número de macetas de 1.6 L de capacidad. Se utilizó suelo pasteurizado con vapor durante 45 min, la textura del suelo era 7% arena, 60% limo y 33% arcilla; pH 6.8. La inoculación de las plántulas fue el día 17 de octubre de 2018, a los 14 días después de la siembra (DDS), utilizando una densidad de inóculo de 1,500 huevecillos/planta, colocados en un agujero cercano a la raíz. Las plantas se desarrollaron en invernadero durante 7 semanas después de la inoculación (SDI) donde la temperatura varió de 21°C a 33°C (Cuadro 4) registradas diariamente con ayuda de un termómetro digital Steren TER-140. Se utilizó un diseño en bloques completos al azar. Al final del experimento se evaluó la producción de huevecillos por medio de agitación del sistema radicular completo durante 12 min en concentraciones de 5,000 ppm de NaOCl.

Cuadro 4. Temperaturas medias registradas durante el primer experimento de viabilidad de inóculo de *Mleloidogyne* spp.

| Temperatura | SDI-1[a] | SDI-2 | SDI-3 | SDI-4 | SDI-5 |
|---|---|---|---|---|---|
| Máxima | 34 | 34 | 34 | 31 | 30 |
| Mínima | 25 | 23 | 20 | 18 | 16 |
| Media | 29 | 28 | 27 | 25 | 23 |

[a] Semanas después de la inoculación.

Para un segundo experimento de viabilidad, el inóculo fue extraído de raíces de pepino agalladas, cultivadas en suelo infestado con nematodo agallador como se describió anteriormente; los tratamientos fueron las concentraciones de NaOCl de 3,000, 4,000 y 5,000 ppm con periodos de agitación de 12 min. Un tratamiento con

agua destilada como inoculante fue utilizado como testigo. Se sembraron cuatro semillas de pepino (cv. 'Spada') en macetas de 15 L de capacidad, llenadas con suelo de las mismas características descritas anteriormente. El momento de inoculación fue el día 15 de noviembre de 2018, a los 21 DDS con una densidad de 6,000 huevecillos/maceta, dejando solo dos plantas/maceta. Las plantas se desarrollaron en invernadero durante 17 SDI, donde la temperatura varió de 14°C a 29°C (Cuadro 5). Se utilizó un diseño en bloques completos al azar con un total de 40 unidades experimentales.

Cuadro 5. Temperaturas medias registradas durante el segundo experimento de viabilidad de inóculo de *Mleloidogyne* spp.

| Temperatura | SDI 1-4[a] | SDI 5-8 | SDI 9-12 | SDI 13-16 | SDI 17-20 |
|---|---|---|---|---|---|
| Máxima | 29 | 27 | 28 | 28 | 31 |
| Mínima | 16 | 13 | 15 | 13 | 15 |
| Media | 23 | 21 | 22 | 22 | 24 |

[a] Rango de semanas después de la inoculación.

Al final del experimento se extrajeron y se lavaron cuidadosamente las raíces de cada maceta para determinar los porcentajes e índices de agallamiento con escala del 0 al 10, donde 0= sin agallamiento, 1= 1-10%, 2= 11-20%, 3= 21-30%, 4= 31-40%, 5= 41-50%, 6= 51-60%, 7= 61-70%, 8= 71-80%, 9= 81-90% y 10= 91-100% (Zeck, 1971). Para determinar la viabilidad del nematodo agallador (huevecillos/g de raíz), se seccionaron las raíces de cada maceta de manera individual, se mezclaron cuidadosamente en agua y posteriormente se tomaron cinco muestras al azar para ser mezcladas a su vez, y a partir de éstas se recuperaron 10 g para realizar las extracciones de huevecillos en concentraciones de 5,000 ppm de NaOCl con 12min de agitación.

### 6.4. Niveles de daño

El material vegetal se obtuvo de plantas de pepino cultivadas en suelo infestado con nematodo agallador, como se describió anteriormente. Las raíces agalladas fueron agitadas en solución de NaOCl al 0.5% durante 10 min para la obtención del inóculo de huevecillos. Los tratamientos evaluados fueron las densidades de inóculo de 0, 450, 900, 1800, 3600 y 7200 huevecillos/maceta. Se sembraron cuatro semillas de pepino (cv. 'Spada') en macetas de 15 L de capacidad, llenadas con suelo de textura de 7% arena, 60% limo y 33% arcilla; pH 6.8. El momento de inoculación fue el día 16 de noviembre de 2018, a los 22 DDS, dejando solo dos plantas/maceta. Las plantas se desarrollaron en invernadero durante 17 SDI, donde la temperatura varió de 14°C a 29°C (Cuadro 5). Se utilizó un diseño en bloques completos al azar con un total de 60 unidades experimentales.

Al final del experimento se evaluaron lavaron cuidadosamente las raíces para determinar el índice de agallamiento con escala del 0 al 10, donde 0= sin agallamiento, 1= 1-10%, 2= 11-20%, 3= 21-30%, 4= 31-40%, 5= 41-50%, 6= 51-60%, 7= 61-70%, 8= 71-80%, 9= 81-90% y 10= 91-100% (Zeck, 1971). Por otra parte, se determinó el factor de reproducción en base a la cantidad de huevecillos recuperados y el peso fresco de la raíz entre la densidad de inóculo (Djian-Caporalino *et al.,* 2011). Ambos experimentos fueron fertilizados con solución Steiner al 75%, CE de 1.5 dS/m y pH 6.5.

### 6.5. Identificación molecular

La identificación molecular se realizó por el procedimiento de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés); para lo cual, 36 hembras fueron diseccionadas a partir de la fuente de inóculo empleada en la reproducción del nematodo para los distintos experimentos presentados. Las hembras fueron colocadas individualmente en tubos de centrífuga de 1.5 mL conteniendo 45 µl de NaOH a concentración de 50 mM, posteriormente las hembras fueron maceradas dentro del tubo por medio de puntillas plásticas, una vez maceradas se incubaron durante 10 min a temperatura de 95°C. Después de esto, se agregó a cada tubo 5 µl de Tris HCl a concentración 1 M (pH 8.0), fueron mezclados cuidadosamente y se centrifugaron a 10,000 *g* durante 1 min. Posterior a esto, cada sobrenadante fue transferido a microtubos y se evaluó la concentración del ADN; esta se ajustó a 20 ng/µl y se mezcló con 7.5 µl de Master Mix®, 1.0 µl de cada oligonucleótido y 5.5 µl de agua inyectable (Hu *et al.*, 2011).

Se utilizaron los oligonucleótidos MF/MR (GGGGATGTTTGAGGCAGATTTG/ AACCGCTTCGGACTTCCACCAG) para la amplificación del dominio de expansión 28S rRNA D2-D3 de *Meloidogyne* spp. Las amplificaciones también se realizaron con los oligonucleótidos específicos de especie Mi-F/Mi-R y Fjav/Rjav (GTGAGGATTCAGCTCCCCAG/ ACGAGGAACATACTTCTCCGTCC y GGTGCGCGATTGAACTGAGC/ CAGGCCC-TTCAGTGGAACTATAC) para los marcadores SCAR de *M. incognita* y *M. javanica* respectivamente. Para la amplificación de la región rDNA-IGS2 de *M. enterolobii,* se utilizaron los oligonucleótidos específicos Me-F/Me-R (AACTTTTGTGAAAGTGCCGCTG/ TCAGTTCAGGCAGGATCAACC). El PCR de punto final fue realizado con una desnaturalización inicial de 94°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 68°C durante 1 minuto y 72°C por 30 segundos, con una extensión final de 5 minutos a 72°C (Hu *et al.*, 2011).

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis a 80 kV durante 80 minutos en 100 mL de gel de agarosa al 1%, teñido con 5 µl de RedGel®. Se utilizó un marcador molecular de 100 pares de bases (pb) para determinar el tamaño molecular de las bandas.

Finalmente, a partir de los productos de PCR, se seleccionaron aislamientos representativos (NMP21 y NMP23) para ser purificados con ayuda del kit Wizard® DNA Clean-up System. Se añadieron 50 µl del producto de PCR a la minicolumna previamente ensamblada en el tubo de recolección, donde también se agregaron 50 µl de "Membrane Binding Solution" para incubar a 30 °C durante 1 min. Posteriormente se centrifugaron a 16,000 *g* durante 2 min, se descartó el sobrenadante y se reinsertó la miniculumna. Se repitió el proceso dos veces añadiendo 700 µl y 500 µl de la "Membrane Binding Solution" respectivamente y con dos ciclos de centrifugado a 16,000 *g* durante 5 min al final. Posteriormente se colocaron los tubos con la tapa abierta en un termoblock a 37 °C durante 30 min; una vez transcurrido el tiempo se añadió 50 µl de "agua libre de endonucleasas", se incubó a 35 °C durante 1 min y se centrifugó a 16,000 *g* durante 5 min. Finalmente se descartó la minicolumna y se almacenó el ADN purificado a -20 °C para su sucesiva secuenciación en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C.

## 6.6. Análisis estadístico

**6.6.1. Extracción de huevecillos.** Los datos de conteos de huevecillos fueron transformados por logaritmo $x^1 = \log_{10} (x+1)$ previo al análisis estadístico (Clewer y Scarisbrick, 2001). Se realizó un análisis de varianza doble con los datos de los experimentos de extracción de huevecillos para determinar los efectos de cada factor y la significancia de la interacción, esto por medio de la prueba de mínimos cuadrados con ajuste Tukey para comparaciones múltiples ($\alpha = 0.05$).

El modelo estadístico empleado fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

$\mu$ = efecto medio general

$\alpha_i$ = efecto del $i$ ésimo nivel del NaOCl

$\beta_j$ = efecto del $j$ ésimo nivel del Agitación

$(\alpha\beta)_{ij}$ = efecto de interacción NaOCl–Agitación

$\varepsilon_{ijk}$ = error aleatorio

$k = m$ repeticiones

Así mismo, se realizaron comparaciones de medias con la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher ($\alpha = 0.05$) para determinar los efectos principales de los tratamientos sobre el resto de las variables en los experimentos (SAS v.9.1) (SAS Institute, Cary, NC).

El modelo estadístico empleado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$\mu$ = efecto medio general

$\tau_i$ = efecto del $i$ ésimo tratamiento

$\varepsilon_{ij}$ = error aleatorio

$j = m$ repeticiones

Para determinar si la cantidad de raíz de cada repetición que se procesó para extraer la producción de huevecillos afectó la cantidad de huevecillos extraídos y la significancia de la interacción, se realizó un análisis de varianza con el peso fresco de raíz de cada repetición como la variable concomitante adicional en el modelo (SAS v.9.1) (SAS Institute, Cary, NC).

El modelo estadístico empleado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta(X_{ij} - \bar{x}) + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$\mu$ = efecto medio general

$\tau_i$ = efecto de la $i$ ésima interacción NaOCl–Agitación

$\beta$ = valor de PFR en la observación $Y_{ij}$

$X_{ij}$ = valor del PFR de la $i$ ésima interacción en la $j$ ésima repetición

$\bar{x}$ = valor medio de PFR

$\varepsilon_{ij}$ = error aleatorio

$j = m$ repeticiones

**6.6.2. Viabilidad de inóculo.** Para determinar el efecto de la concentración de NaOCl y del periodo de agitación y definir la significancia de la interacción en el primer experimento, se realizó un análisis de varianza doble por medio de la prueba de mínimos cuadrados con ajuste Tukey para comparaciones múltiples (α = 0.05).

El modelo estadístico empleado fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

$\mu$ = efecto medio general

$\alpha_i$ = efecto del $i$ ésimo nivel del NaOCl

$\beta_j$ = efecto del $j$ ésimo nivel del Agitación

$(\alpha\beta)_{ij}$ = efecto de interacción NaOCl–Agitación

$\varepsilon_{ijk}$ = error aleatorio

$k = m$ repeticiones

En el segundo experimento se realizaron comparaciones de medias con la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher (α = 0.05) para determinar los efectos principales de las concentraciones de NaOCl sobre las variables (SAS v.9.1) (SAS Institute, Cary, NC).

El modelo estadístico empleado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$\mu$ = efecto medio general

$\tau_i$ = efecto del $i$ ésimo tratamiento

$\varepsilon_{ij}$ = error aleatorio

$j = m$ repeticiones

**6.6.3. Niveles de daño.** En este experimento se realizaron comparaciones de medias con la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher (α = 0.05) para determinar los efectos principales de las densidades de inóculo sobre las variables (SAS v.9.1) (SAS Institute, Cary, NC).

El modelo estadístico empleado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$\mu$ = efecto medio general

$\tau_i$ = efecto del $i$ ésimo tratamiento

$\varepsilon_{ij}$ = error aleatorio

$j = m$ repeticiones

Posteriormente, se realizó un análisis de regresión lineal entre los datos de las densidades de inóculo (variable independiente) y los niveles de agallamiento (variable dependiente) obtenidos; así mismo se realizó análisis de correlación de Pearson entre ambas variables (SigmaPlot v.12.3) (Systat Software, San Jose, CA).

El modelo estadístico de la regresión lineal fue el siguiente:

$$Y = \alpha + \beta X + \varepsilon$$

Donde:

$\alpha$ = origen

$\beta X$ = pendiente

$\varepsilon$ = error aleatorio

# VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 7.1. Concentraciones de NaOCl y periodos de agitación de raíces de pepino en la extracción de huevecillos de *Meloidogyne* spp.

En el primer experimento de extracción de huevecillos, la cantidad de huevecillos obtenidos fue un 18% mayor ($P \leq 0.01$) con el empleo de la concentración de 6,000 ppm en comparación con la concentración de NaOCl de 3,000 ppm así como un 8% mayor ($P > 0.05$) respecto a la concentración de 9,000 ppm. Los periodos de agitación de 8 y 12min resultaron en una extracción superior ($P \leq 0.001$) en un 44% y 52% respecto al periodo de 4min (Cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto de diferentes concentraciones de NaOCl y periodos de agitación de raíces en la extracción de huevecillos (primer experimento) de *Meloidogyne* spp.

| Factor | Nivel[a] | Huevecillos | CV% |
|---|---|---|---|
| Concentración de NaOCl | 3,000*** | 2,905[b] b[c] | 7.8 |
| | 6,000*** | 3,444 a | 5.6 |
| | 9,000 | 3,186 ab | 3.7 |
| Periodo de agitación | 4*** | 2,409 l | 7.3 |
| | 8* | 3,456 k | 4.9 |
| | 12* | 3,669 k | 3.1 |

[a] Niveles de concentraciones de NaOCl se presentan como ppm y niveles de agitación se presentan como min.

[b] Los datos presentados son medias de 12 repeticiones de cada factor.

[c] Valores dentro de cada factor seguidos de la misma letra (a-b; k-l) no son significativamente distintos ($P > 0.05$) por la por la prueba de mínimos cuadrados con ajuste Tukey para comparaciones.

* Los asteriscos muestran significancia de la interacción al nivel de probabilidad de $P \leq 0.05$ y $P \leq 0.001$ por la prueba de mínimos cuadrados.

El efecto simple de la interacción indicó que la concentración de 9,000 ppm de NaOCl y el periodo de agitación de 12 min no dependieron de los efectos de interacción para la extracción lograda, por lo que con el empleo de estos niveles se observaron los menores coeficientes de variación (CV) (Cuadro 6).

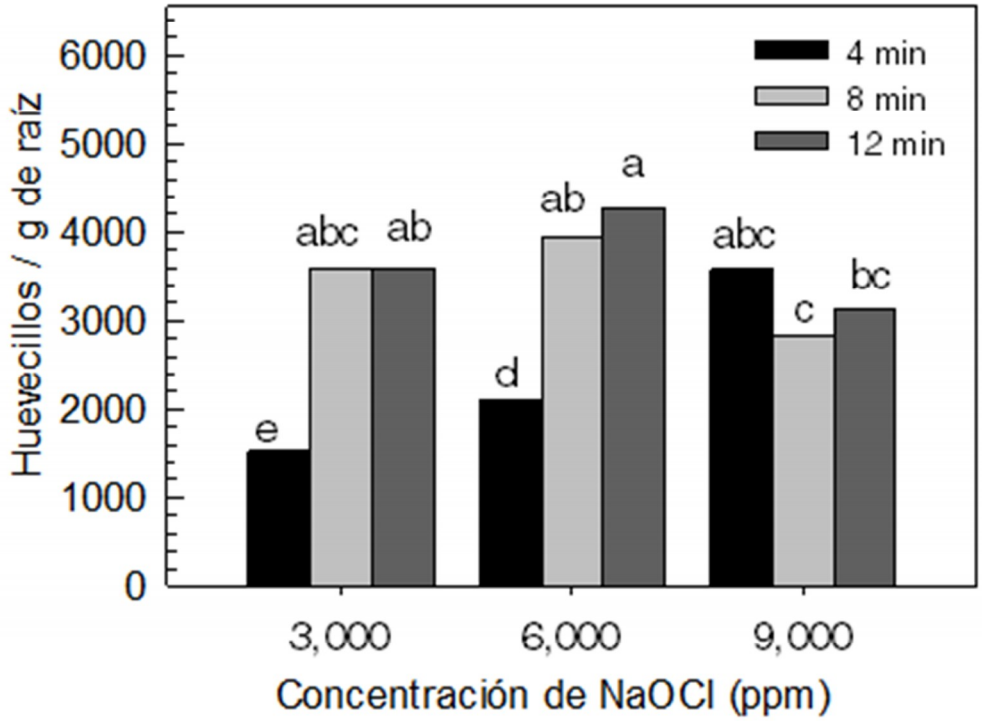


Figura 11. Efecto de combinaciones de concentraciones de NaOCl y periodos de agitación de raíces en el primer experimento para la extracción de huevecillos de *Meloidogyne* spp. Los valores son medias de cuatro repeticiones. Barras con la misma letra no son significativamente distintas ($P > 0.05$) mediante la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher.

Como consecuencia, la extracción de huevecillos entre tratamientos fue superior ($P \leq 0.05$) con las combinaciones de los niveles más bajos de NaOCl (3,000 y 6,000 ppm) y los periodos de agitación de 8 y 12 min, así como por la combinación de la concentración más alta de NaOCl y el periodo de agitación más bajo. No obstante, la extracción de huevecillos fue numéricamente mayor ($P > 0.05$) cuando la concentración de 6,000 ppm fue combinada con el periodo de agitación de 12 min

(Figura 11). Se observó que las tres combinaciones de la concentración de 9,000 ppm no fueron diferentes entre sí ($P > 0.05$), aunque las tres combinaciones del periodo de agitación de 4 min fueron diferentes entre sí (Figura 11); esto comprueba que se pueden extraer huevecillos por medio de suspensión de la masa gelatinosa en concentraciones de NaOCl al 0.9% (Djian-Caporalino *et al*., 2011).

En el segundo experimento para la extracción de huevecillos, el resultado entre niveles de NaOCl mostró ser superior con la concentración de 5,000 ppm en un 32% respecto a las concentraciones de 7,000 y 9,000 ppm respectivamente. El periodo de agitación de 6 min resultó en una extracción 16% y 34% mayor que los otros niveles de este factor (12 y 18 min) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Efecto de diferentes concentraciones de NaOCl y periodos de agitación de raíces en la extracción de huevecillos (segundo experimento) de *Meloidogyne* spp.

| Factor | Nivel[a] | Huevecillos | CV% |
|---|---|---|---|
| Concentración de NaOCl | 5,000 | 908[b] a[c] | 1.8 |
| | 7,000*** | 687 b | 3.2 |
| | 9,000*** | 689 b | 3.2 |
| Periodo de agitación | 6 | 876 k | 2.4 |
| | 12*** | 754 l | 3.1 |
| | 18*** | 654 m | 2.8 |

[a] Niveles de concentraciones de NaOCl se presentan como ppm y niveles de agitación se presentan como min.
[b] Los datos presentados son medias de 12 repeticiones de cada factor.
[c] Valores dentro de cada factor seguidos de la misma letra (a-b; k-m) no son significativamente distintos ($P > 0.05$) por la por la prueba de mínimos cuadrados con ajuste Tukey para comparaciones.
* Los asteriscos muestran significancia de la interacción al nivel de probabilidad de $P \leq 0.001$.

Por lo tanto, la mayor ($P \leq 0.05$) extracción de huevecillos se obtuvo con las combinaciones de 5,000 ppm de NaOCl con los tres periodos de agitación investigados, así como por las concentraciones de 7,000 y 9,000 ppm en combinación con el periodo de agitación de 6 min (Figura 12). No obstante, la extracción lograda con la combinación de 5,000 ppm de NaOCl y el periodo de agitación de 12 min fue superior ($P > 0.05$) de un 10% a un 15% en comparación a las otras combinaciones con este nivel de NaOCl (Figura 12).

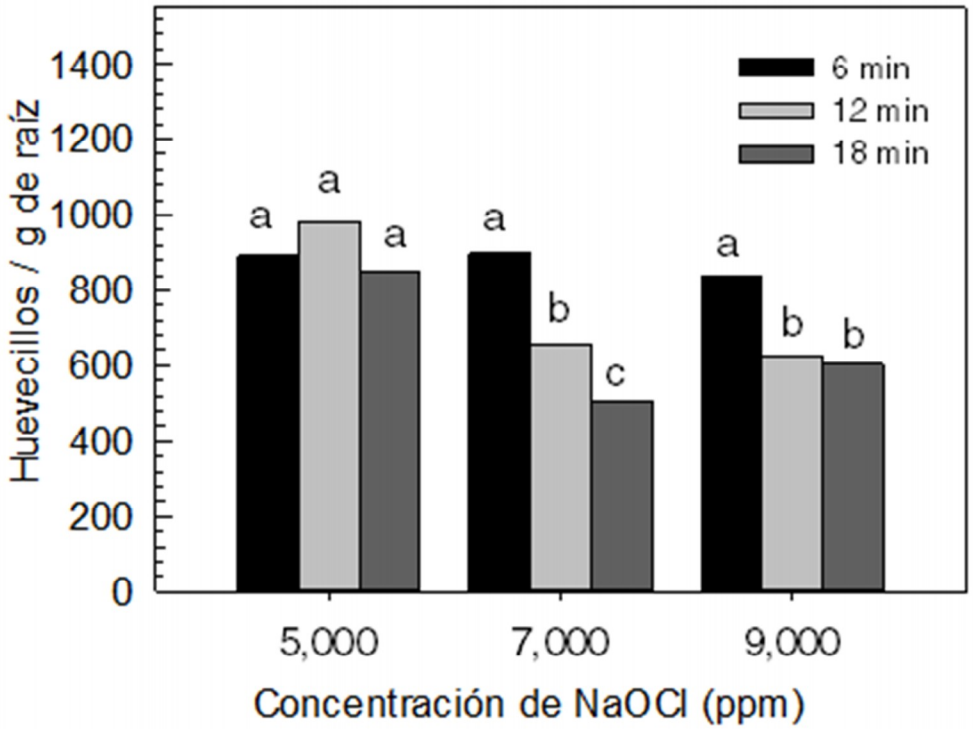


Figura 12. Efecto de combinaciones de concentraciones de NaOCl y periodos de agitación de raíces en el segundo experimento para la extracción de huevecillos de *Meloidogyne* spp. Los valores son medias de cuatro repeticiones. Barras con la misma letra no son significativamente distintas ($P > 0.05$) mediante la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher.

Nuestros resultados comprobaron que la interacción de los factores estudiados provocaron un efecto significativo sobre la cantidad de huevecillos extraídos, por lo anterior, se demuestra que el empleo de una alta concentración de NaOCl es beneficiada por periodos de agitación breves, aunque un periodo de agitación de 4 min puede resultar en una menor extracción de huevecillos cuando la concentración de NaOCl es menor a 9,000 ppm. Así mismo, las concentraciones de bajos niveles entre ambos factores fueron dependientes de efectos de interacción para la extracción observada; en contraste, las combinaciones entre altos niveles de los factores fueron negativamente afectadas por efecto de la interacción.

Por otra parte, se demuestra que fue posible ajustar los niveles de ambos factores para la obtención de cantidades similares de huevecillos de *Meloidogyne* spp., esto por medio del empleo de concentraciones de 3,000 ppm combinadas con periodos de agitación de 8 a 12 min, así como por las combinaciones de periodos de agitado de 4 a 6 min con la concentración de 9,000 ppm. No obstante, este método mostro un mejor efecto de extracción en el rango de concentraciones de NaOCl de 5,000 a 6,000 ppm, combinadas con periodos de agitación de 6 a 12 min, coincidiendo con los resultados previos obtenidos con el método de NaOCl en combinación con el agitado de raíces en sustitución del licuado o sacudido vigoroso (Stetina *et al.*, 1997). Por lo tanto, el ajuste del método puede ser discutido desde la cantidad de sustancia empleada o el tiempo consumido durante la prueba.

### 7.2. Viabilidad de huevecillos de *Meloidogyne* spp., extraídos con distintas concentraciones de NaOCl y periodos de agitación de raíces de pepino

Los periodos de agitación empleados para la extracción del inóculo en el primer experimento de extracción de huevecillos no mostraron efectos significativos ($P > 0.05$) sobre la producción de huevecillos. No obstante, la menor concentración de NaOCl (5,000 ppm) resultó en una producción de huevecillos superior ($P \leq 0.01$) (12,726), en comparación al inóculo extraído con el nivel más alto de NaOCl (9,000 ppm), en el cual, esta variable fue similar al valor observado con la concentración de 7,000 ppm de NaOCl con 7,549 huevecillos producidos ($P > 0.05$) (Cuadro 8).

Como consecuencia, el inóculo obtenido por la combinación de la concentración de NaOCl de 5,000 ppm con el periodo de agitación de 12 min resultó en la mayor producción de huevecillos entre los tratamientos ($P \leq 0.05$), excepto del tratamiento con la misma concentración y 18 min de agitación (Figura 13); no obstante, la diferencia numérica entre estos dos tratamientos fue de un 24% mayor para el primero. De igual forma se demostró una similitud entre la producción de huevecillos por el inóculo extraído por la combinación de 5,000 ppm de NaOCl con 6 min de agitación y el resto de los tratamientos que incluían las concentraciones de 7,000 y 9,000 ppm, excepto del tratamiento con la concentración de NaOCl más alta y el

periodo de agitación más prolongado; en la cual, la producción de huevecillos observada fue la más baja ($P > 0.05$).

Cuadro 8. Efecto de diferentes concentraciones de NaOCl y periodos de agitación de raíces en la viabilidad de huevecillos de *Meloidogyne* spp*.,* en el cultivo de pepino.

| Factor | Nivel[a] | Huevecillos | CV% |
|---|---|---|---|
| Concentración de NaOCl | 5,000 | 12,726[b] a[c] | 6.6 |
| | 7,000 | 7,549 ab | 6.6 |
| | 9,000* | 5,248 b | 6.6 |
| Periodo de agitación | 6 | 7,753 k | 7.8 |
| | 12 | 10,091 k | 7.8 |
| | 18** | 7,679 k | 7.8 |

[a] Niveles de concentraciones de NaOCl se presentan como ppm y niveles de agitación se presentan como min.

[b] Los datos presentados son medias de 12 repeticiones de cada factor.

[c] Valores dentro de cada factor seguidos de la misma letra (a-b; k) no son significativamente distintos ($P > 0.05$) por la por la prueba de mínimos cuadrados con ajuste Tukey para comparaciones.

* ** Los asteriscos muestran significancia de la interacción al nivel de probabilidad de $P \leq 0.05$ y $P \leq 0.01$, respetivamente.

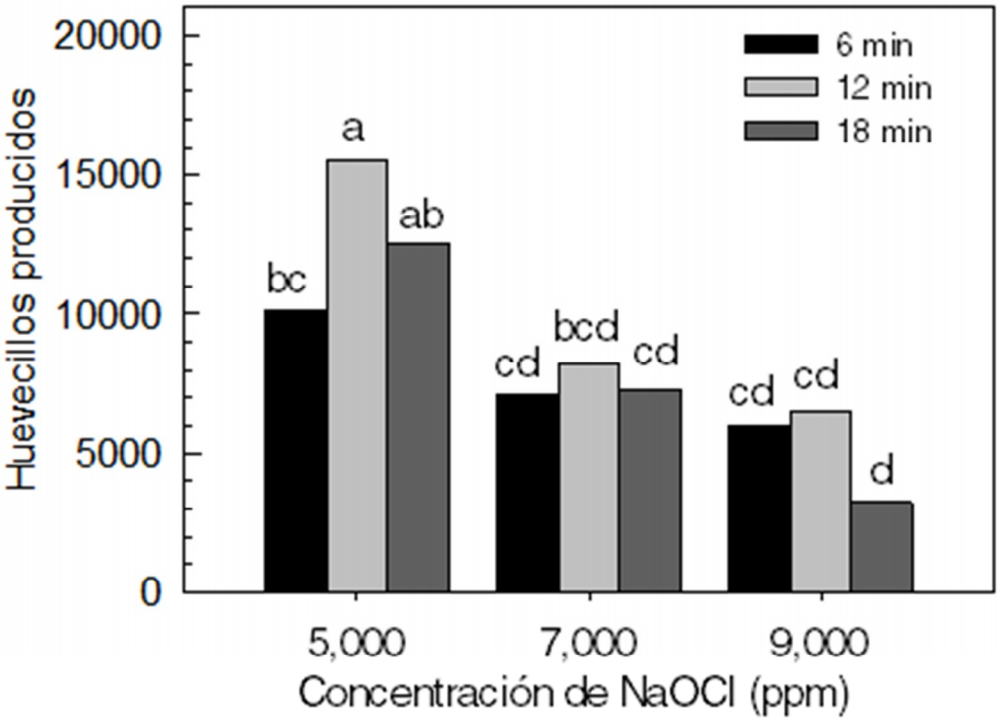


Figura 13. Efecto de combinaciones de concentraciones de NaOCl y periodos de agitación de raíces en la viabilidad de huevecillos de *Meloidogyne* spp*.,* en el cultivo de pepino. Los valores son medias de cuatro repeticiones. Barras con la misma letra no son significativamente distintas ($P$ > 0.05) mediante la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher.

Durante el ciclo del desarrollo embrionario de *Meloidogyne* spp., la cubierta del huevecillo aporta protección en contra de sustancias tóxicas a través de la membrana lipoide interna, la cual es degradada vía actividad enzimática inmediatamente antes de la eclosión del J2 (Curtis *et al*., 2009). Nuestros resultados en el primer experimento para evaluar la viabilidad de inóculo demuestran que la exposición a la mayor concentración de NaOCl estudiada, afectó la permeabilidad de los huevecillos, reduciendo la supervivencia con resultado en la menor infectividad observada. Esto se debe a un retraso sobre la eclosión o una reducción de juveniles infectivos, efectos previamente descritos con concentraciones de 0.5% a 1.0% (Vrain, 1977; Di Vito *et al*., 1985, 1986).

En el segundo experimento de viabilidad de inóculo se observó significancia a consecuencia de las concentraciones de NaOCl en el agallamiento de raíces ($P \leq 0.001$). El daño observado en el tratamiento con inóculo extraído por medio de la concentración de 3,000 ppm alcanzó un valor de cinco en la escala del índice de agallamiento, el cual fue superior al provocado por los inóculos extraídos con las concentraciones de 4,000 y 5,000 ppm de NaOCl, respectivamente (Figura 14).

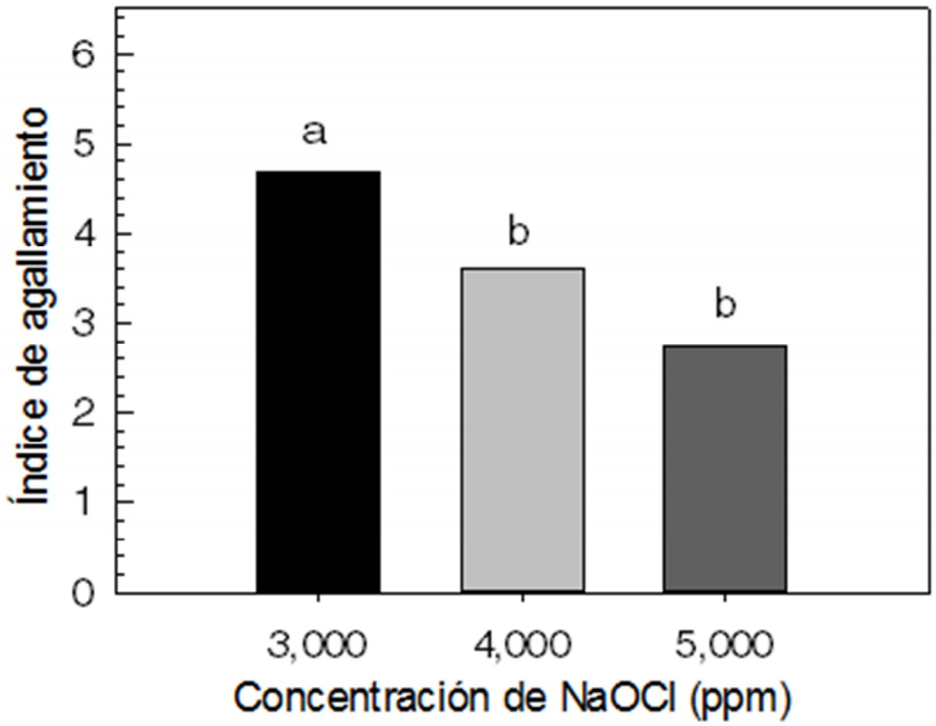


Figura 14. Efecto de concentraciones de NaOCl (empleadas para la extracción de huevecillos de *Meloidogyne* spp.) en el agallamiento de raíces de pepino. Barras con la misma letra no son significativamente distintas ($P > 0.05$) mediante la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher. Índice de agallamiento: 0= sin agallamiento, 1= 1-10%, 2= 11-20%, 3= 21-30%, 4= 31-40%, 5= 41-50%, 6= 51-60%, 7= 61-70%, 8= 71-80%, 9= 81-90% and 10= 91-100% (Zeck, 1971).

Por otra parte, la cantidad de huevecillos recuperada mostró una tendencia numérica inversa respecto al incremento de las concentraciones de NaOCl (Figura 15). Existe una relación entre la cantidad de nematodos de *Meloidogyne* spp., infectando raíces y el tamaño de las agallas (Vovlas *et al*., 2005). En nuestros experimentos, los tratamientos con NaOCl no mostraron significancia en el índice de agallamiento debido a la evaluación temprana (5 SDI) y por la variación ocasionada por los periodos de agitación; no obstante la reproducción del nematodo fue favorecida por las temperaturas óptimas (21°C a 33°C) (Noe, 1991) que se presentaron durante la ejecución del primer experimento con inóculo. Como consecuencia, cuando los sistemas radiculares completos fueron procesados para la extracción de huevecillos, se logró diferenciar a los tratamientos con concentraciones de NaOCl de 5,000 y 7,000 ppm respecto a los tratamientos con 9,000 ppm, con base en la mayor cantidad de huevecillos extraídos.

En contraste, cuando se permitió que el inóculo se desarrollara por 17 SDI, las concentraciones de NaOCl fueron únicamente diferenciadas por el agallamiento provocado, mientras que las cantidades de huevecillos recuperados a partir de submuestras de los sistemas radiculares fueron similares entre tratamientos. Respecto a esto, se han reportado reducciones significativas en variables de crecimiento de materiales susceptibles de pepino (cv. Royal Sluis) con densidades de inóculo a partir de 500 juveniles de *M. incognita* (Kayani *et al*., 2018). Así mismo se ha descrito una densidad de equilibrio en el suelo de 9,909 J2 + huevecillos / 250 $cm^3$ en el cultivo de pepino (cv. Dasher II) (Giné *et al*., 2017).

Nuestros resultados demostraron que la densidad de inóculo de 6,000 huevecillos / maceta, extraídos vía agitación durante 12 min en concentración de NaOCl de 3,000 ppm, no afectó significativamente el rendimiento y crecimiento del pepino (datos no mostrados); no obstante, el periodo de evaluación de 17 SDI resultó en niveles de agallamiento significativos entre tratamientos sin que se redujera el efecto de la concentración de inóculo como se ha descrito en otros trabajos (Abdel-Momen *et al*., 1998).

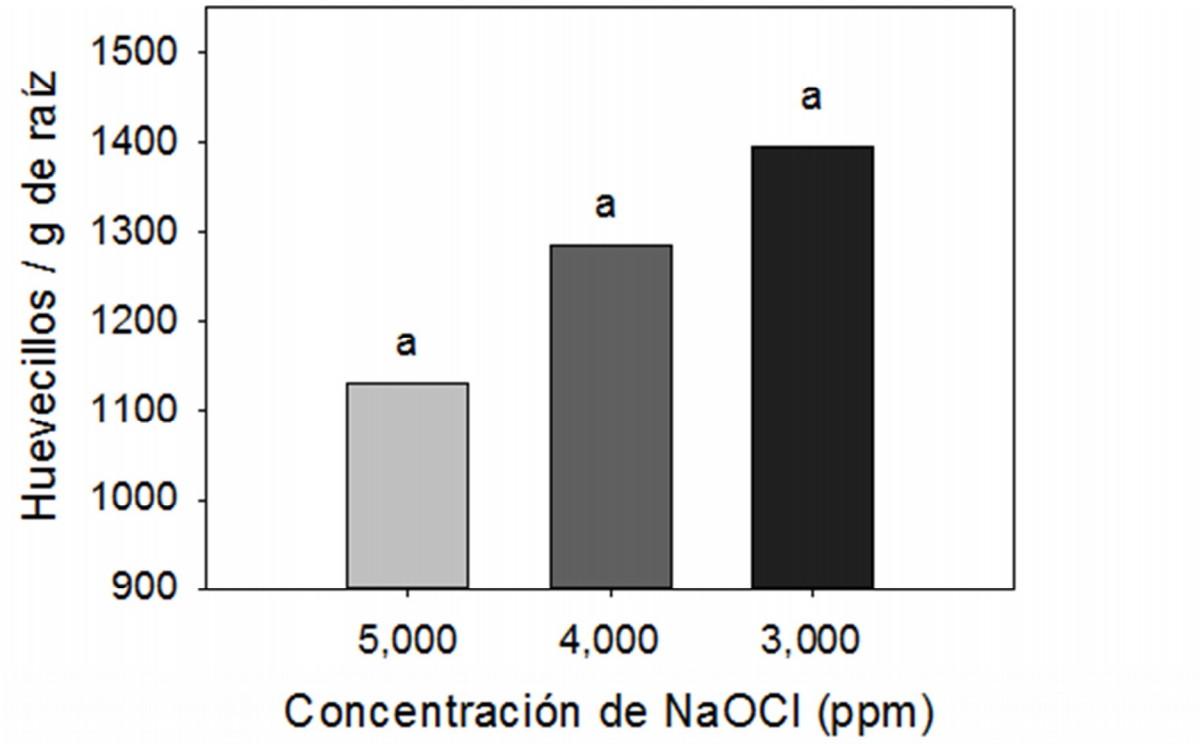


Figura 15. Efecto de concentraciones de NaOCl utilizadas en la extracción del inóculo de *Meloidogyne* spp., en la producción de huevecillos en raíces de pepino. Barras con la misma letra no son significativamente distintas ($P > 0.05$) mediante la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher.

### 7.3. Niveles de agallamiento de raíces de pepino inoculadas con distintas densidades de *Meloidogyne* spp.

El nivel de daño de raíces ocasionado por las diferentes densidades de inóculo a los 140 dds osciló en la escala de índice de agallamiento de 3 al 5, con la menor y la mayor densidad inoculada, respectivamente. Esta última densidad mencionada de 7,200 huevecillos/maceta observó un daño superior al resto de los tratamientos, excepto del tratamiento con 3,600 huevecillos/maceta ($P \leq 0.05$). En este sentido, el agallamiento provocado fue estadísticamente mayor en el rango de 3600 a 7200 huevecillos/maceta respecto al observado en el rango de 450 a 900 huevecillos/maceta (Figura 16).

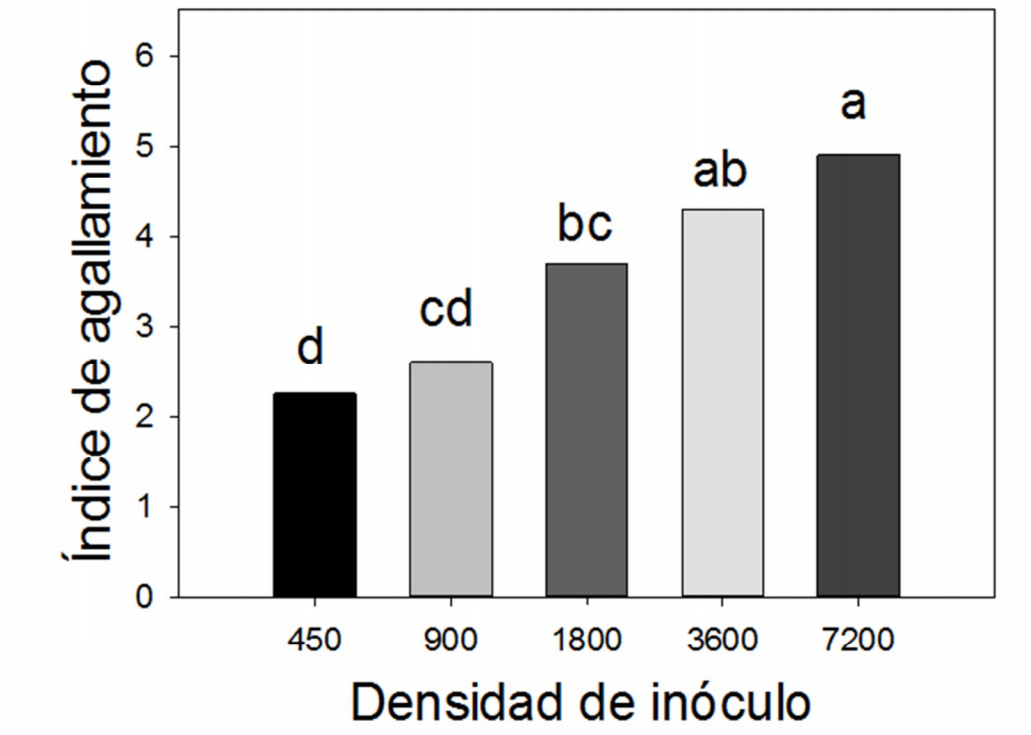


Figura 16. Efecto de diferentes densidades de inóculo de *Meloidogyne* spp., en el agallamiento de raíces de pepino. Barras con la misma letra no son significativamente distintas ($P > 0.05$) mediante la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher. Índice de agallamiento: 0= sin agallamiento, 1= 1-10%, 2= 11-20%, 3= 21-30%, 4= 31-40%, 5= 41-50%, 6= 51-60%, 7= 61-70%, 8= 71-80%, 9= 81-90% and 10= 91-100% (Zeck, 1971).

Por su parte, la relación entre la densidad de inóculo y agallamiento mostró ser significativa ($P$ > 0.05) mediante un análisis de regresión lineal, mientras que el coeficiente de determinación presentó que el nivel de agallamiento dependió en un 84% (R=0.92) de la densidad de inóculo (Figura 17).

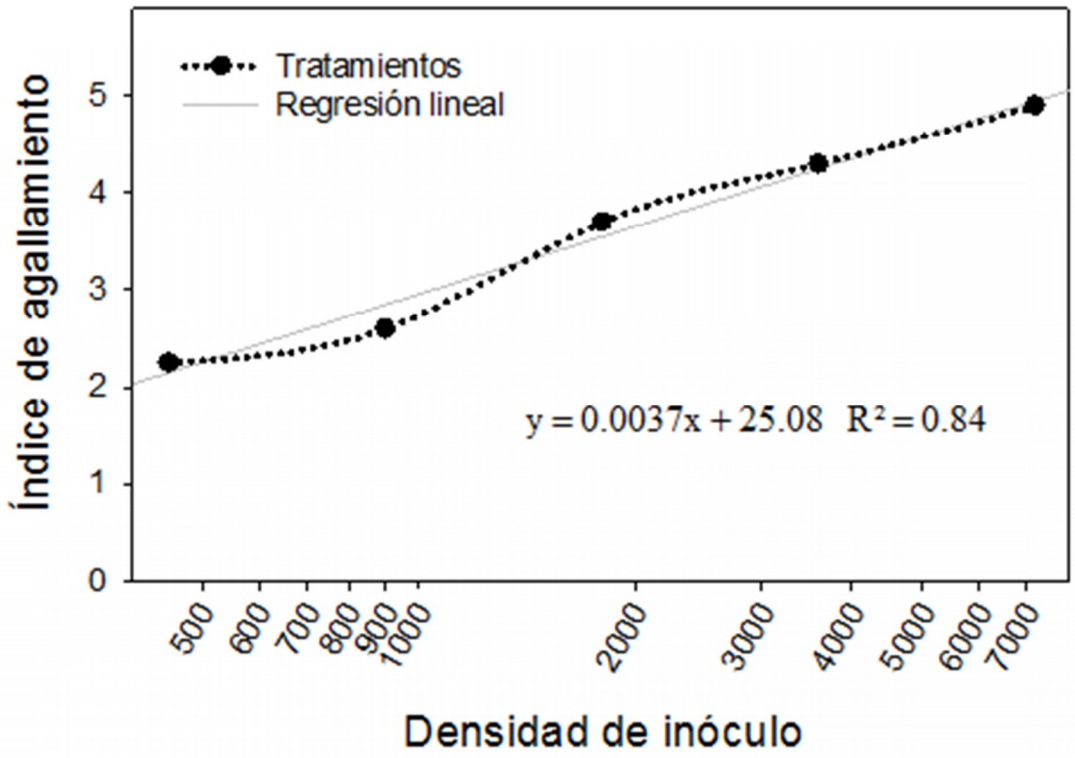


Figura 17. Relación entre la densidad de inóculo y el nivel de agallamiento por *Meloidogyne* spp. Índice de agallamiento: 0= sin agallamiento, 1= 1-10%, 2= 11-20%, 3= 21-30%, 4= 31-40%, 5= 41-50%, 6= 51-60%, 7= 61-70%, 8= 71-80%, 9= 81-90% and 10= 91-100% (Zeck, 1971).

El factor de reproducción del nematodo en este experimentó osciló de 73 a 15.5 para la mayor y menor densidad de inóculo empleada, respectivamente. Este índice fue mayor ($P \leq 0.05$) en los tratamientos con las densidades más bajas de inóculo (450 y 900 huevecillos/maceta), mientras que las dos más altas densidades de inóculo (3,600 y 7,200 huevecillos/maceta) resultaron en un factor de reproducción menor al resto de los tratamientos; por su parte, la densidad de inóculo de 1,800

huevecillos/maceta observó un factor de reproducción que se situó entre los dos pares de tratamientos mencionaos anteriormente, con un valor de 48.1 (Figura 18).

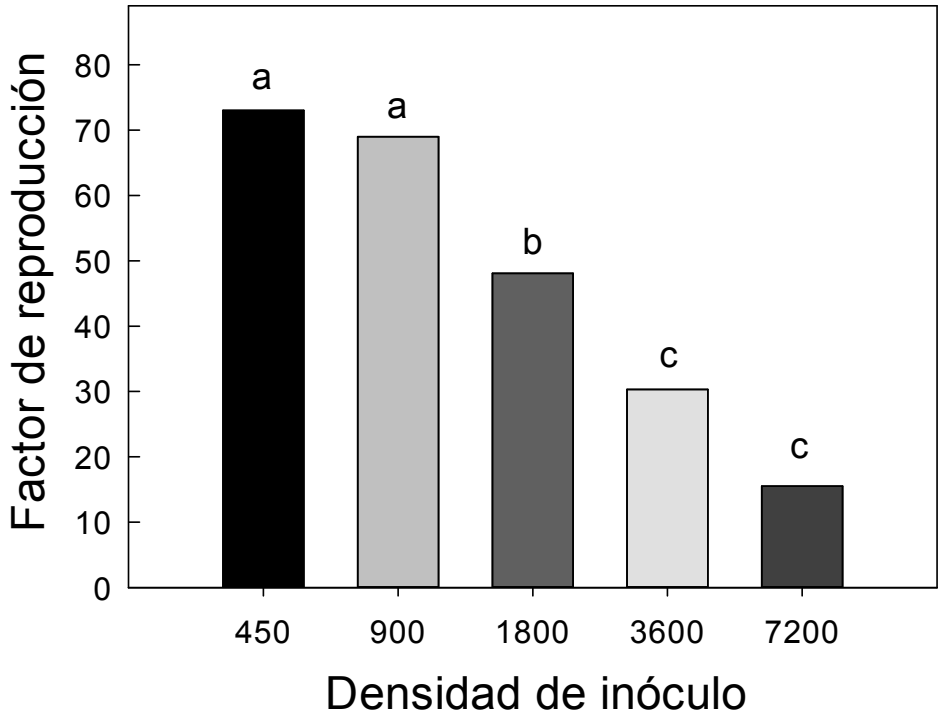


Figura 18. Factor de reproducción de las diferentes densidades de inóculo en el cultivo de pepino. Barras con la misma letra no son significativamente distintas (*P* > 0.05) mediante la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher.

Se ha reportado un alto coeficiente de correlación (R=0.99) entre las poblaciones de *Meloidogyne* spp., y las etapas fenológicas en el cultivo de tomate; esto muestra que la cantidad de nematodos se incrementa conforme avanza el desarrollo de las plantas, lo cual se debe a que en sistemas radiculares extensos, existe más alimento y refugio para los nematodos (Salazar y Guzmán, 2013).

Por su parte, Kayani *et al.*, (2017), con densidades de *M. incognita* de 500, 1000, 2000, 4000 y 8000 J2/maceta y diferentes fechas de inoculación en el cultivo de pepino, demostraron una correlación positiva entre los niveles de inóculo y los porcentajes de reducción en el crecimiento y la producción, así mismo concluyeron

que la reducción del periodo de exposición al nematodo puede disminuir significativamente la pérdida de rendimiento. Respecto al factor de reproducción observado, Djian-Caporalino *et al.* (2011), mostraron con un nivel de inóculo de alrededor de 400 J2 de *M. incognita*/planta en plántulas de chile y tomate susceptibles, que la relación población final de huevecillos/juveniles inoculados fue de 106 a 496, y de 105 a 280, respectivamente.

Nuestros resultados comprueban la relación directa entre la densidad de población del nematodo agallador y el nivel de daño que provocar en un cultivo susceptible; así mismo, se observa que densidades de *Meloidogyne* spp., tan bajas como 225 huevecillos/planta, pueden resultar en pérdidas del 22% de raíces en una planta de pepino. Por otra parte se demuestra un factor de reproducción en el cultivo de pepino es menor que el observado en chile y tomate; no obstante, no debemos pasar por alto que la estimación de los niveles de población final oscilaron entre los 33 mil a 112 mil huevecillos por maceta respecto a la menor y la mayor densidad de inóculo empleada (datos no mostrados).

### 7.4. Identificación molecular de *Meloidogyne* spp.

Se amplificó el 92% de las muestras los fragmentos de ADN de un peso aproximado de 500 pb con el empleo de los oligonucleótidos universales para determinación del género, mientras que el 90% de éstas amplificaron bandas de un peso aproximado de 235 pb con el empleo de los oligonucleótidos específicos para *M. enterolobii* (Figura 19).

Los fragmentos de ADN secuenciados fueron ingresados a la base da datos del GenBank como accesiones N°: MN304737 y MN304738; posteriormente con ayuda del programa Blastn, se compararon en búsqueda de genes homólogos, donde se encontró una identidad del 98.93% y 98.67% con las accesiones N°: MN017119 y KY033205, respectivamente. Lo anterior permitió corroborar la identificación de la especie *M. enterolobii* en no menos el 90% de las muestras positivas.

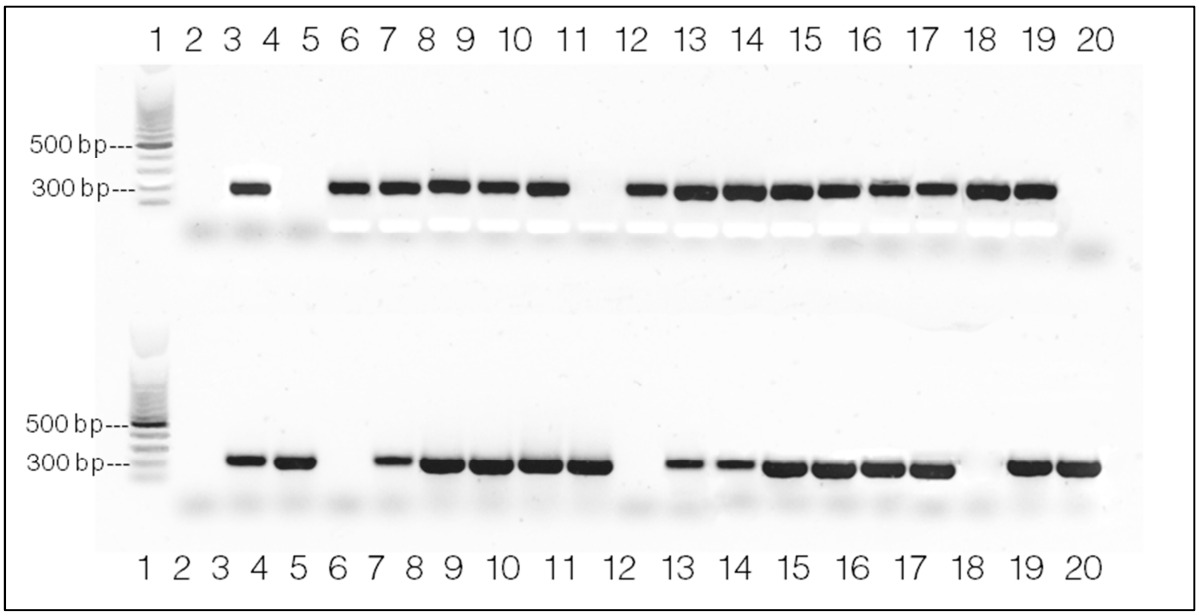


Figura 19. Gel de agarosa de productos de PCR amplificados con oligonucleótidos específicos de la especie *M. enterolobii*. Carril 1: marcador molecular de 100 pb; carril 2: blanco.

La especie *M. enterolobii* fue descrita originalmente por Yang y Eisenback (1983) en árboles de pacará (*Enterolobium contortisiliquum*), en la isla de Hainan, China. El primer reporte de esta especie parasitando el cultivo de pepino se realizó en Suiza por Kiewnick en el año 2008; mientras que en México fue reportada parasitando sandía en el estado de Veracruz y tomate en Sinaloa (Ramírez-Suárez *et al*., 2014; Martínez *et al.*, 2015).

# VIII. CONCLUSIONES

La mayor extracción de huevecillos se logró con el uso de NaOCl a concentraciones de 3 000 y 6 000 ppm en combinación con periodos de agitación entre 8 y 18 min, así mismo con empleo de 9 000 ppm y periodos de agitación de 4 o 6 min.

La viabilidad y patogenicidad de los huevecillos fue mayor con el empleo de concentraciones de NaOCl de 5,000 ppm y 3,000 ppm respectivamente en comparación con concentraciones más elevadas.

El nivel de daño en las raíces de pepino dependió directamente de la densidad de inóculo de huevecillos.

Se reafirma la incidencia de la especie *M. enterolobii* afectando cultivos hortícolas de importancia en el estado de Sinaloa.

# LITERATURA CITADA


Abad, P., Castagnone-Sereno, P., Rosso, M. N., Engler, J.D.A., and Favery, B. 2009. Invasion, feeding and development. *Root-knot nematodes*, 163-181.

Abdel-Momen, S.M., Simpson, C.E., and Starr, J.L. 1998. Resistance of interspecific *Arachis* breeding lines to *Meloidogyne javanica* and an undescribed *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 30: 341–346.

Agrios, G. N. 2005. Introduction to plant pathology. *Elsevier Academic Press Publication*.

Anwar, S.A., and Van Gundy, S.D. 1989. Influence of four nematodes on root and shoot growth parameters in grape. *Journal of Nematology*, 21(2), 276.

Bird, A.F. 1968. Changes associated with parasitism in nematodes, iii. ultrastructure of the egg shell, larval cuticle and contents of the subventral glands in *Meloidogyne javanica*, with some observations on hatching. *J. Parasitol*. 54:475-489.

Carrillo, F.A., García E.R.S., Allende M.R., Márquez Z.I., y Cruz O.J. 2000. Identificación y distribución de especies del nematodo nodulador (*Meloidogyn*e spp) en hortalizas en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 18: 2: 115-119.

Calderón-Urrea, A., Vanholme, B., Vangestel, S., Kane, S. M., Bahaji, A., Pha, K., Gheysen, G. 2016. Early development of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *BMC developmental biology*. *16*:10.

Canto-Sáenz, M. 1985. The nature of resistance to *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood,1949. In: Sasser, J.N. and Carter, C.C. (eds) *An Advanced Treatise on* Meloidogyne. *Volume I Biology and Control*. North Carolina State University Graphics, Raleigh, North Carolina, pp.225–231.

Chitwood, B.G., 1949. Root-knot nematodes. I. A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887. Proc. helminth. Soc. Wash. 16(2): 90-104.

Cid del Prado, V.I., Tovar S.A., y Hernández J.A. 2001. Distribución de especies y razas de *Meloidogyne* en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 32: 19: 32-39.

Clewer, A.G., and Scarisbrick D.H. 2001. Practical Statistics and Experimental Design for Plant and Crop Science, John Wiley & Sons, Ltd. 346p.

Curtis, R.H., Robinson, A.F., and Perry, R.N. 2009. Hatch and host location. *Root-knot nematodes*, 139-162.

Di Vito, M., Greco, and N., Carella, A. 1986. The effect of *Meloidogyne incognita* and importance of the inoculum on yield of eggplant. *Journal of Nematology* 18, 487–490.

Di Vito, M., Greco, N., and Zaccheo, G. 1985. On the host range of *Meloidogyne artiellia*. *Nematol. Mediterr*. 13:207-212.

Djian-Caporalino, C., Molinari S., Palloix A., Ciancio A., Fazari A., Marteu N., and Castagnone-Sereno P. 2011. The reproductive potential of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* is affected by selection for virulence against major resistance genes from tomato and pepper. *European journal of plant pathology*.*131*(3):431.

Eisenback, J.D., and Hunt, D.J. 2009. General Morphology. *Root-knot nematodes*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 18-54.

El-Sherif, A.G., Refaei A.R., El-Nagar M.E., and Salem M.M. 2007. The role of eggs inoculums level of *Meloidogyne incognita* on their reproduction and host reaction. *African Journal of Agricultural Research* 2(4): 159-163.

Evans, K., and Hydock P.P.J. 1993. Interaction of nematodes with root-rot fungi in: Khan M.W. (Ed.), *Nematode Interactions*. Chapman and Hall, London, UK, pp. 104-133.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2016. FAOSTAT Producción agrícola [online]

Ferris, H. and Noling, J.W. 1987. Analysis and prediction as a basis for management decision. In: Brown, R.H. and Kerry, B.R. (eds) *Principles and Practice of Nematode Control in Crops*. Academic Press, Sydney, Australia, pp. 49–85.

Fourie, H., Spaull, V.W., Jones, R.K., Daneel, M.S., and De Waele, D. (Eds.). 2017. Nematology in South Africa: A View from the 21st Century. Cham, Switz. Springer.

Francl, L.J., and Wheeler T.A. 1993. Interaction of plant parasitic nematodes with wilt inducing fungi. In Khan M.W. (Ed.), *Nematode Interactions*. Chapman and Hall, London, UK, pp. 79-103.

Giné, A., González C., Serrano L., and Sorribas F.J. 2017. Population dynamics of *Meloidogyne incognita* on cucumber grafted onto the Cucurbita hybrid RS841 or ungrafted and yield losses under protected cultivation.*European journal of plant pathology*. 148(4): 795-805.

Goeldi, E. A., 1887 . Relatório sobre a moléstia do cafeeiro na Província do Rio de Janeiro. Arch. Mus. Nac. 8: 7-123.

Gómez, L, Enrique R., Hernández-Ochandia D., Miranda I., Gonzalez E., Peteira B., y Rodríguez M.G. 2012. Susceptibilidad de genotipos de *Solanum lycopersicum* L. frente a *Meloidogyne incognita* Kofoid y White (Chitwood). *Rev. Protección Veg*. 27(2): 111-116.

Greco, N., and Di Vito M. 2009. Population Dynamics and Damage Levels. *Root-knot nematodes*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 246-274.

Grubben, G.J.H., and Denton, O.A. 2004. Plant resources of tropical Africa 2. Vegetables.*Plant resources of tropical Africa 2. Vegetables.*

Hu, M.; Zhuo, K. and Liao J. 2011. Multiplex PCR for the simultaneous identification and detection of *Meloidogyne incognita, M. enterolobii,* and *M. javanica* using DNA extracted directly from individual galls. *Phytopathology*. 101: 1270-1277.

Hussey, R.S., and Barker K.R. 1973. A comparision of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Dis Rep*. 57: 1025-1028.

INIFAP. 2010. Guía técnica para el área de influencia del campo experimental valle de Culiacán. Primera edición, 114-119.

Iqbal, S. and Jones, M.G.K. 2017. Nematodes. Encyclopedia of Applied Plant Sciences, 3, pp. 113–119.

Jobert, C. 1878. Sur un maladie du cafeier observée au Bresil. *Compte Rendue Hebdomodaire des Séances del'Académie des Sciences.* 87:941–943.

Karssen, G. and Moens, M. 2006. Root-knot nematodes. En: Perry, R.N. and Moens, M. (eds) Plant Nematology. CAB International, Wallingford, UK, pp. 59–90.

Kayani, M.Z., Mukhtar T., y Hussain M.A. 2018. Interaction between Nematode Inoculum Density and Plant Age on Growth and Yield of Cucumber and Reproduction of *Meloidogyne incognita*. *Pakistan J. Zool*. 50(3): 897-902.

Kayani, M.Z., Mukhtar T., y Hussain M.A. 2017. Effects of southern root knot nematode population densities and plant age on growth and yield parameters of cucumber, *Crop Protection* xxx: 1-6.

Kiewnick, S, Karssen G, Brito JA, Oggenfuss M. and Frey J.E. 2008. First report of root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* on tomato and cucumber in Switzerland. *Plant Disease.* 92(9):1370-1370.

Koenning, S.R., Overstreet, C., Noling, J.W., Donald, P.A., Becker, J.O., and Fortnum, B.A. 1999. Survey of croplosses in response to phytoparasitic nematodes in the UnitedStates for 1994. *Journal of Nematology.* 31: 587–618.

Luc, M., Bridge, J., and Sikora, R.A. 2005. Reflections on nematology in subtropical and tropical agriculture.*Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, pp. 1-10.

Maggenti, A. 1981. *General nematology*. Springer Series in Microbiology.

Martínez, G., J. Á., Díaz Valdés, T., Allende Molar, R., García Estrada, R. S., y Carrillo Fasio, J. A. 2015. Primer reporte de *Meloidogyne enterolobii* parasitando tomate en Culiacán, Sinaloa, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 6(11): 2165-2168.

McClure, M.A., Kruk T.H., and Misaghi I. 1973. A method for obtaining quantities of clean *Meloidogyne* eggs. *J Nematol.* 5: 230.

Mishra, V., Abrol, G.S., and Dubey, N. 2018. Sodium and Calcium Hypochlorite as Postharvest Disinfectants for Fruits and Vegetables. In *Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables.* Academic Press, pp. 253-272.

Noe, J.P. 1991. Development of *Meloidogyne arenaria* on peanut and soybean under two temperature cycles. *Journal of Nematology.* 23: 468–476.

Olalde, Gutiérrez, V.M., Mastache Lagunas, Á.A., Carreño Román, E., Martínez Serna, J., y Ramírez López, M. 2014. El sistema de tutorado y poda sobre el rendimiento de pepino en ambiente protegido.*Interciencia*. 39(10).

Orr, C.C., and Robinson A.F. 1984. Assement of cotton losses in weatern Texas caused by *Meloidogyne incognita*. *Plant Dis*. 68: 284-292.

Papadopoulou, J. and Triantaphyllou, A.C. 1982. Sex differentiation in *Meloidogyne incognita* and anatomical evidence of sex reversal. *Journal of Nematology* 14: 549–566.

Ravichandra, N.G. 2014. Horticultural nematology. Springer India.

Ramirez-Suarez, A, Rosas-Hernandez L, Alcasio S and Powers T.O. 2014. First report of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii*, parasitizing watermelon from Veracruz, Mexico. *Plant Dis*. 98: 428.

Reddy, P.P. 2008. *Diseases of horticultural crops: Nematode problems and their management* (379 pp). Jodhpur: Scientific Publishers.

Salazar, A. W., y Guzmán H.T. de J. 2013. Nematodos fitoparásitos asociados al tomate en la zona occidental de Nicaragua. *Agronomía Mesoamericana* 24 (1): 27-36.

Sasser, J.N., and Freckman D.W. 1987. A world perspective on nematology: the role of the society, in: J. Veech, D. Dickson (Eds.), Vistas on Nematology, Society of Nematologists, Hyattsville, MD, pp. 7–14.

Sasser, J.N. 1980. Root-knot nematodes: a global menace to crop production. *Plant Dis*. 64:36-41.

Schafer, W. 2016. Nematode nervous systems. Current Biology Volume 26, Issue 20, pR955–R959.

SIAP. 2019. Cierre de la producción agrícola por cultivo. www.siap.gob.mx (Consulta, abril 2019).

Sikora, R.A., and Fernandez, E. 2005. Nematode parasites of vegetables.Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. CAB International. 2: 319-392.

Stetina, S.R., McGawley E.C., and Russin, J.S. 1997. Extraction of root-associated *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis*. *Journal of Nematology* 29: 209–215.

Stirling, G.R., Nicol, J.M., and Reay, F. 1998. *Advisory services for nematodes pests – Operational guide.* Rural Industries Research and Development Corporation Publication. Canberra. 99(41) 120pp.

Taylor, A.L. 1977. Introducción a la nematologia vegetal aplicada: guía de la FAO para el estudio y combate de los nematodos parásitos de las plantas. Roma (Italy) FAO.

Taylor, A.L. and Sasser, J.N. 1978. *Biology, Identification and Control of Root-knot Nematodes* (*Meloidogyne species*). North Carolina State University Graphics, Raleigh, North Carolina.

Taylor, A.L. and Sasser, J.N. 1983. Biología, identificacion y control de los nematodos de nodulo de la raiz. *Departaemnto de Fitopatologia de la Universidad del Estado de Carolina del Norte*. p. 111.

Triantaphyllou, A.C. 1960. Sex determination in *Meloidogyne incognita* Chitwood, 1949 and intersexuality in *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. *Annals of the Institute of Phytopathology.* 3: 12–31.

Triantaphyllou, A.C. 1962. Oogenesis in the root-knot nematode *Meloidogyne javanica. Nematologica.* 7: 105–113.

Triantaphyllou, A.C. 1979. Cytogenetics of root-knot nematodes. In: Lamberti, F. and Taylor, C.E. (eds) *Rootknot Nematodes (Meloidogyne species); Systematics, Biology and Control*. Academic Press. pp. 85–109.

Vovlas, N., Rapoport H.F., Jimenez-Diaz R.M., and Castillo P. 2005. Differences in feeding sites induced by root-knot nematodes, *Meloidogyne spp*., in chickpea. *Phytopathology.* 95:368–375.

Vrain, T.C. 1977. A technique for the collection of larvae of *Meloidogyne* spp. and a comparison of eggs and larvae as inocula. *Journal of Nematology.* 9:249-251.

Welbaum, G.E. 2015. Vegetable production and practices. CAB International.

Whitehead, A.G. 1998. Plant nematode control. CAB International.

Williamson, V.M., and Hussey R.S. 1996. Nematode pathogenesis in resistance plants. Plant Cell. 8: 1735-1745.

Yang, B., and Eisenback J.D. 1983. *Meloidogyne enterolobii* n.sp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing pacara earpot tree in China. *Journal of Nematology.* 15: 381–391.

Zeck, W.M. 1971. A rating scheme for field evaluation of root-knot nematode infestations. *Pflanseschutz-Nachrichten Bayer AG*. 24: 14-144.

Zullini, A. 2006. Order Triplonchida, Freshwater Nematodes: Ecology and Taxonomy. CAB International, pp. 293–325.