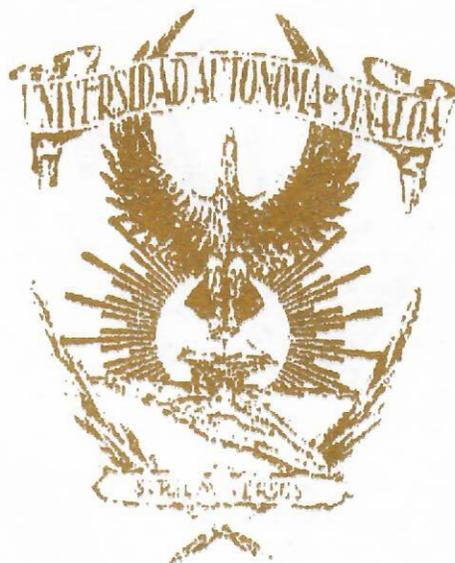


Universidad Autónoma de Sinaloa
Colegio de Ciencias Agropecuarias
Facultad de Agronomía
Doctorado en Ciencias Agropecuarias



TESIS

**"IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES DEL
NEMATODO AGALLADOR (*Meloidogyne* SPP.) EN TOMATE,
EN SINALOA, MÉXICO"**

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

PRESENTA

JOSÉ ÁNGEL MARTÍNEZ GALLARDO

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. TOMÁS DÍAZ VALDEZ**

**CO-DIRECTOR DE TESIS:
DR. RAÚL ALLENDE MOLAR**

Culiacán Rosales, Sinaloa, México Noviembre de 2017

Universidad Autónoma de Sinaloa
Colegio de Ciencias Agropecuarias
Facultad de Agronomía
Doctorado en Ciencias Agropecuarias



TESIS:

**“IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES DEL
NEMATODO AGALLADOR (*Meloidogyne* SPP.) EN TOMATE,
EN SINALOA, MÉXICO”**

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

PRESENTA:

JOSÉ ÁNGEL MARTÍNEZ GALLARDO

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. TOMÁS DÍAZ VALDÉS

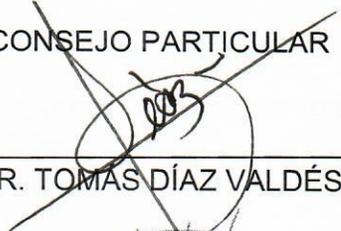
CO-DIRECTOR DE TESIS:

Dr. RAÚL ALLENDE MOLAR

Culiacán Rosales, Sinaloa, México, Noviembre de 2017

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **JOSÉ ÁNGEL MARTÍNEZ GALLARDO**,
BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y FUE
APROBADA POR EL MISMO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

DIRECTOR ~~CONSEJO PARTICULAR~~

DR. TOMÁS DÍAZ VALDÉS

CO-DIRECTOR

DR. RAÚL ALLENDE MOLAR

ASESOR

DR. LEOPOLDO PARTIDA RUVALCABA

ASESOR

DRA. TERESA DE JESÚS VELÁZQUEZ ALCARAZ

ASESOR

DR. JESÚS ENRIQUE RETES MANJARREZ

CULIACÁN, SINALOA, NOVIEMBRE DE 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

FACULTAD DE AGRONOMÍA CULIACÁN
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL FUERTE
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL CARRIZO

En la Ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, el día 20 de enero del año 2020, el que suscribe José Ángel Martínez Gallardo, alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Agropecuarias, con número de cuenta 03341364, de la Unidad Académica Facultad de Agronomía, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la UAS, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Tomás Díaz Vadés y del Dr. Raúl Allende Molar y cede los derechos del trabajo titulado “Identificación y distribución de especies del nematodo agallador (*Meloidogyne* spp.) en tomate, en Sinaloa, México”, a la Facultad de Agronomía, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Sinaloa, para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales, todo esto en apego al artículo 27 de la Ley Federal de Derechos de Autor.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ATENTAMENTE

José Ángel Martínez Gallardo

CORREO ELECTRÓNICO: jose_angel_13@hotmail.com
CURP: MAGA881113HSLRLN04



UAS- Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir Igual, 4.0 Internacional.

DEDICATORIA

A MIS ABUELOS:

Por darme sus ejemplos de vida, su cariño, cuidarme y seguir bendiciéndome desde donde estén.

A MIS PADRES:

Por su apoyo, sacrificios, cariño, amor, pero sobre todo la confianza que en mí han depositado; gracias.

A MI HERMANA:

Por ser mi compañera inseparable, darme su amor y aguantarme en las buenas y malas.

A MARIEL CRISTINA CURIEL GUZMÁN:

Por su apoyo, cariño y amor en una etapa más en la que me ha acompañado.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado durante mi doctorado.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa, por permitirme formar parte de ella desde el bachillerato hasta hoy culminar con el doctorado.

Al Colegio de Ciencias Agropecuarias por permitirme formar parte de él y todo el apoyo brindado por las personas que en él laboran, en especial: Dr. Javier Alonso Romo, y Gabriela Juárez.

A la Facultad de Agronomía, por abrirme sus puertas y transmitirme sus conocimientos mediante sus profesores y personal que en ella laboran.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Coordinación Culiacán, por permitir complementar mi desarrollo e investigación doctoral en sus instalaciones.

A M.C. José Armando Carrillo Fasio, por brindarme su confianza, sabiduría y conocimientos, pero sobre todo por su amistad día a día.

A Dr. Tomás Díaz Valdés, por su rigor en el aula (nunca se olvida), su guía, ayuda y consejos en distintos procesos, pero sobre todo por su amistad.

A Dr. Raúl Allende Molar por el apoyo brindado a través de sus conocimientos, asesorías, disponibilidad, consejos personales y su amistad.

A Dr. Leopoldo Partida Ruvalcaba por la oportunidad de formar parte del posgrado (en su momento), ayuda durante todos los procesos necesarios y por su amistad.

A Dra. Teresa de Jesús Velázquez Alcaraz por sus consejos, disponibilidad y amistad.

A Dr. Jesús Enrique Retes Manjarrez por sus consejos, disponibilidad, ideas y amistad brindada dentro y fuera del doctorado.

A I.B.Q. Rosalba Contreras Martínez, por su amistad incondicional, conocimientos, apoyo, regaños, y pleitos, gracias "JEFA".

A Ing. Isidro Márquez Zequera, por todo el apoyo brindado en el laboratorio de fitopatología, sus conocimientos y por su amistad.

A Ing. Yoshio Smith Félix Gutiérrez, por sus conocimientos, experiencias en malla sombra e invernaderos, convivencias, pero más por su amistad sincera.

A Luis Alfredo Osuna García por su amistad y colaboración en la realización del trabajo.

A M.C. María Valdéz, M.C. José Gómez y Gabriel Montoya por su ayuda durante la realización de este trabajo, pero sobre todo por su amistad incondicional.

A todos mis compañeros y amigos que para no herir sentimientos ni omitir alguno los menciono como "todos", por el buen humor, algunos momentos difíciles, sugerencias, consejos, pero sobre todo por su amistad.

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS.....}	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA.....	1
1.1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.2 REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
1.2.1 Nematodos fitoparásitos.....	3
1.2.2 Ecología y distribución.....	3
1.2.3 Síntomas ocasionados por los nematodos.....	4
1.2.4 Importancia del género <i>Meloidogyne</i> en el cultivo de tomate.....	4
1.2.5 Ciclo de vida y parasitismo de <i>Meloidogyne</i> spp.....	5
1.2.6 Principales especies de <i>Meloidogyne</i> que afectan el cultivo de tomate.....	8
1.2.7 <i>Meloidogyne enterolobii</i>	8
1.2.8 Identificación morfológica (tradicional) de nematodos fitoparásitos..	8
1.2.9 Identificación mediante técnicas moleculares de nematodos fitoparásitos.....	9
1.2.9.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	9
1.2.9.2. Visualización de ADN: la electroforesis.....	10
CAPÍTULO 2. PRIMER REPORTE DE <i>Meloidogyne enterolobii</i> PARASITANDO TOMATE EN CULIACÁN, SINALOA, MÉXICO.....	12
2.1 Resumen.....	12
2.2 Introducción.....	12
2.3 Materiales y métodos.....	13
2.4 Resultados y discusión.....	15
2.5 Conclusiones.....	17
2.6 Agradecimientos.....	17
2.7 Literatura citada.....	17

CAPÍTULO 3. IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE <i>Meloidogyne</i> SPP. EN TOMATE, EN SINALOA, MÉXICO.....	19
3.1 Resumen.....	19
3.2 Abstract.....	19
3.3 Introducción.....	20
3.4 Materiales y métodos.....	21
3.5 Resultados y discusión.....	24
3.6 Conclusiones.....	26
3.7 Literatura citada.....	27
CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES GENERALES.....	29
CAPÍTULO V. LITERATURA CITADA.....	30

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1	Localización de muestras en cultivo de tomate, en Sinaloa..	21
2	Secuencia de primers específicos de <i>Meloidogyne</i>	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Daño de <i>Meloidogyne enterolobii</i> en <i>Solanum lycopersici</i> L. A) y B) Síntomas aéreos (achaparramiento, clorosis y marchitamiento). C) y D) Síntomas en raíz (agallas o tumores).....	13
2	Gel de agarosa al 1% mostrando el fragmento de ADN amplificado a partir de hembras de <i>Meloidogyne enterolobii</i> . M, marcador de peso molecular; carril 1, control negativo; carril 2, carril 3 y carril 4, muestras de nematodos procedentes de raíces agalladas de plantas de tomate.....	15
3	Microfotografía del patrón perineal de una hembra de <i>Meloidogyne enterolobii</i> aislada de plantas de tomate.....	16
4	Porcentaje poblacional de especies de <i>Meloidogyne</i> en el cultivo de tomate en Sinaloa.....	24
5	Patrones perineales de: A) <i>M. incognita</i> , B) <i>M. arenaria</i> y C) <i>M. enterolobii</i> , obtenido de hembras de raíces de cultivo de tomate en Sinaloa.....	25
6	Distribución de especies de <i>Meloidogyne</i> en el cultivo de tomate, en Sinaloa.....	27

RESUMEN

Identificación y distribución de especies del nematodo agallador (*Meloidogyne* spp.) en tomate, en Sinaloa, México

José Ángel Martínez Gallardo

A nivel mundial el género de nematodos fitoparásitos de mayor importancia es *Meloidogyne*, ya que afecta más de 3,000 especies de plantas y su infección se caracteriza por la formación de agallas en la raíz de la planta infectada. En Sinaloa se desconoce la distribución actual de *Meloidogyne*, debido a que los reportes más recientes son del año 2000 y 2001, identificando a las especies *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. hapla* y *M. javanica*, distribuidas en el estado. En el presente trabajo de investigación los objetivos fueron identificar morfológicamente y molecularmente las especies del nematodo agallador (*Meloidogyne* spp.); así como, determinar su distribución en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), en Sinaloa, México. Se muestrearon lotes cultivados con tomate en las distintas zonas hortícolas de Sinaloa, México, durante los ciclos agrícolas 2013-14, 2014-15, 2015-16 y 2016-17, en campo abierto, malla sombra e invernaderos, donde se colectaron muestras de suelo y raíces agalladas, para realizar identificación morfológica y molecular. Las especies identificadas en las muestras colectadas fueron *M. enterolobii*, *M. incognita* y *M. arenaria* con un 88, 10 y 2% de incidencia respectivamente. Estos resultados indican que *M. enterolobii*, *M. incognita* y *M. arenaria* se encuentran distribuidos en el estado de Sinaloa en el cultivo de tomate, siendo *M. enterolobii* la especie predominante. Los resultados permitieron reportar por primera vez *M. enterolobii*, parasitando el cultivo de tomate en Sinaloa, México.

Palabras clave: *Lycopersicon esculentum* Mill., nematodo agallador, horticultura agricultura protegida, patogenicidad.

ABSTRACT

Identification and distribution of root-knot nematode species (*Meloidogyne* spp.) in tomato, in Sinaloa, Mexico

José Ángel Martínez Gallardo

Globally the genus of major nematode parasitic nematodes is *Meloidogyne*, as it affects more than 3,000 plant species and its infection is characterized by the formation of galls in the root of the infected plant. In Sinaloa the current distribution of *Meloidogyne* is unknown, since the most recent reports are from 2000 and 2001, identifying the species *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. hapla* and *M. javanica*, distributed in the state. In the present research the objectives were to identify morphologically and molecularly the species of the root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.); as well as to determine its distribution in the tomato crop (*Lycopersicon esculentum* Mill.), in Sinaloa, Mexico. Cultivated lots with tomato were sampled in the different horticultural zones of Sinaloa, Mexico, during the agricultural cycles 2013-14, 2014-15, 2015-16 and 2016-17, in open field, shade mesh and greenhouses, where samples of soil and gilled roots were taken, to perform morphological and molecular identification. The species identified in the collected samples were *M. enterolobii*, *M. incognita* and *M. arenaria* with 88, 10 and 2% incidence respectively. These results indicate that *M. enterolobii*, *M. incognita* and *M. arenaria* are distributed in the state of Sinaloa in the tomato crop, with *M. enterolobii* being the predominant specie. The results allowed to report for the first time *M. enterolobii*, parasitizing tomato crop in Sinaloa, Mexico.

Keys words: *Lycopersicon esculentum* Mill., root-knot nematode, horticulture, protected agriculture, pathogenicity.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. INTRODUCCIÓN

La palabra tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) proviene del náhuatl "tomatl", que significa planta de frutos globosos, y según evidencias, México fue el primer país donde se domesticó por los primeros pobladores (Rodríguez *et al.*, 2001). En el año 2012, la producción mundial de tomate fue de 163 millones de t, con un valor de 59 mil millones de dólares, colocándolo en la posición 8 en la lista de los 20 productos más importantes en cuanto a su producción (FAO, 2014). El tomate es el principal producto agroalimentario de exportación en México, su producción en el 2013, fue de 3.2 millones de t (SIAP, 2014). En la temporada 2013-2014 en Sinaloa se produjeron alrededor de 1 millón de t de tomate, exportándose de ese total 313, 914 t con un valor de 303.2 millones de dólares (CIDH, 2014). En la región tomatera de Sinaloa, la producción de hortalizas para exportación es considerada como una de las más modernas. Esto es debido a la utilización de tecnología moderna que incluye, entre otras cosas, el uso de fertirrigación con acolchados plásticos para retener por un mayor tiempo la humedad, control de malezas y patógenos mediante la fumigación del suelo, aplicación del control biológico y la práctica de agricultura orgánica de los campos agrícolas (SAGARPA, 2011). Ello ha implicado cambios drásticos en el manejo de la humedad del suelo y su medio ambiente, el cual es adecuado para los microorganismos que lo habitan, entre ellos los patógenos de plantas como *Phytophthoraspp.*, *Pythium spp.*, *Macrophominaphaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae*, *Fusarium spp.*, nematodos (*Meloidogyne spp.*) y otros (Ferrato y Alarcón, 2001).

Cuando el problema en un determinado cultivo es causado específicamente por nematodos fitoparásitos, es difícil realizar el diagnóstico en campo, salvo cuando éstos inducen síntomas característicos (agallas en raíces, hojas o semillas, presencia de quiste en raíces, anillo color rojo en cocotero, etc.); debido a estas razones, para determinar con certeza si la enfermedad es causada por nematodos, debe realizarse un análisis fitopatológico en laboratorios especializados (Carrillo *et al.*, 2000).

En el cultivo de tomate se presentan diversos microorganismos fitopatógenos que inducen daños en las plantas y por ende disminución en la producción, entre estos factores bióticos sobresalen los hongos, bacterias, fitoplasmas, virus, y nematodos; éstos últimos se han reportado en el cultivo de tomate en Argentina, Brasil, México, Nicaragua, El Salvador, Costa Rica, España, Panamá, Jamaica, Puerto Rico, Venezuela y Trinidad y Tobago (Sosa-Moss *et al.*, 1985). En estudios realizados en Nicaragua, se reporta la presencia de los géneros *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus*, *Tylenchorrhynchus* y *Helicotylenchus* (Salazar-Antón y Guzmán-Hernández, 2013). Así mismo, en España se ha reportado a *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* y *M. javanica*, atacando el sistema radical de tomate y causando agallas o daños mecánicos inducidos por la entrada del estilete (Sorribas *et al.*, 2002).

Uno de los principales problemas fitopatológicos en el cultivo de tomate y otros cultivos en México, es el nematodo "agallador" *Meloidogyne* spp., que afecta a un amplio rango de hospederos (hierbas, arbustos y árboles); sin embargo, existen especies que no han sido reportadas y en las que por ese hecho se desconocen sus umbrales de daño en el cultivo de tomate (SAGARPA, 2011).

En el estado de Sinaloa en el cultivo de tomate, se considera que el género *Meloidogyne* ocasiona pérdidas que oscilan desde un 5 a 30% (SIAP, 2014). Sin embargo, se desconoce la identificación y distribución actual de *Meloidogyne* spp. en el cultivo de tomate, debido a que los reportes más recientes son del año 2000 y 2001 (Carrillo *et al.*, 2000; Cid del Prado *et al.* 2001), por lo cual se cree que en el estado de Sinaloa existen diferentes especies de *Meloidogyne* presentes en el cultivo de tomate. Por lo que su detección e identificación para cada predio o región es de mucha importancia para determinar el umbral de daño, y con ello poder determinar las pérdidas reales ocasionadas por estos fitoparásitos, además de seleccionar el tipo de manejo o control. El objetivo del presente trabajo fue identificar morfológica y molecularmente a las especies del nematodo agallador (*Meloidogyne* spp.) presentes en el cultivo de tomate, así como determinar su distribución en el estado de Sinaloa, México.

1.2 REVISIÓN DE LITERATURA

1.2.1 Nematodos fitoparásitos

Los nematodos son organismos pluricelulares de cuerpo semitransparente y cilíndrico con el diámetro de sus extremos generalmente reducido, además, poseen todos los sistemas fisiológicos de los animales superiores con excepción del sistema respiratorio y circulatorio, considerándolos como cosmopolitas debido a que se les puede encontrar en cualquier parte donde exista vida, incluyendo los desiertos, el fondo del mar, los hielos del antártico y manantiales termales; sin embargo, algunas especies que viven en la tierra sólo se alimentan de plantas superiores (nematodos fitoparásitos), otros afectan a insectos, a los animales domésticos y al hombre, pudiendo causar serios problemas si no se controlan oportunamente (Sánchez y Talavera, 2013).

1.2.2 Ecología y distribución

El tipo, número y distribución de nematodos de los suelos agrícolas dependen del clima, suelo y otros factores locales, para el caso de los nematodos fitoparásitos, su población estará determinada por el tipo de plantas susceptibles que han crecido en el suelo y por las medidas que se han ejercido para su control (Carrillo *et al.*, 2000).

La mayoría de los nematodos que se alimentan de plantas viven al menos una parte de su vida en el suelo y se alimentan de las raíces y tallos subterráneos de las plantas, por lo que en cultivos anuales se encuentran en mayor abundancia en la capa comprendida entre los 0 y 30 cm de profundidad, pero también se han encontrado desarrollándose a capas más profundas donde crecen las raíces de los cultivos perennes (Weiland, 2001).

Las poblaciones de los nematodos no permanecen estacionadas; disminuyen cuando las condiciones existentes no favorecen la reproducción y aumentan cuando existen raíces de plantas susceptibles que sirven para la alimentación o cuando la temperatura y humedad del suelo favorecen la actividad de los nematodos; mientras que las especies fitoparásitas aumentan con gran rapidez pocas semanas después de haberse plantado el cultivo

susceptible y las poblaciones alcanzan su máximo cuando el crecimiento de la raíz es más activo (Weiland, 2001).

Aunque aún se conoce muy poco sobre la ecología de los nematodos agalladores (*Meloidogyne* spp.), se sabe que la naturaleza del suelo, estructura, aireación y grado de humedad ejercen una gran influencia en la vida de los nematodos, así como el alimento (materia orgánica) y la competencia biológica (nematodos de vida libre). Además de los anteriores, se considera de gran importancia la textura y las características químicas de la solución del suelo (pH y conductividad eléctrica) (Yeates, 1996; Guzmán *et al.*, 2008).

1.2.3 Síntomas ocasionados por nematodos

Los nematodos que infectan a las plantas producen síntomas tanto en las raíces como en los órganos aéreos de las plantas, en la raíz aparecen en forma de nudos, agallas o lesiones en ella, ramificación excesiva de la raíz, puntas dañadas y pudriciones de la raíz cuando las infecciones por nematodos van acompañadas por bacterias y hongos saprófitos o fitopatógenos; dichos síntomas con frecuencia van acompañados por síntomas no característicos en los órganos aéreos de las plantas y que aparecen principalmente en forma de un menor crecimiento, síntomas de deficiencias de nutrientes como el amarillamiento del follaje, el marchitamiento excesivo en tiempo cálido o seco, una menor producción de las plantas y una baja calidad de sus productos (Sánchez y Talavera, 2013).

Algunas especies de nematodos invaden los órganos aéreos de las plantas más que las raíces, y en ellos producen agallas, pudriciones y lesiones necróticas, retorcimiento o deformación de las hojas y tallos, y un desarrollo anormal de los verticilos florales (Carrillo *et al.*, 2000).

El nematodo más importante en el ámbito mundial por el amplio rango de hospederos que ataca, así como su gran adaptación a diferentes condiciones ambientales y por los grandes daños que causa a plantas cultivadas, es el nematodo agallador *Meloidogyne* spp. (Muñoz, 2011).

1.2.4 Importancia del género *Meloidogyne* en el cultivo de tomate

En diversas partes del mundo se considera al nematodo *Meloidogyne* como una de las principales plagas en los cultivos hortícolas; además se ha reportado

como una plaga de distribución cosmopolita y es considerado como el más importante dentro del grupo de los nematodos fitoparásitos que reducen significativamente la producción agrícola. Su importancia radica en su amplia distribución debido a su gran capacidad evolutiva para sobreponerse a las condiciones ambientales desfavorables, al grado de parasitismo y el tipo de reproducción partenogenética y anfigónica. Por lo que presentan gran adaptación y es frecuente observar su presencia en regiones tropicales y subtropicales, así como en lugares con climas fríos, templados y cálidos (Cid del Prado *et al.*, 2001).

En el cultivo del tomate, *Meloidogyne* spp. son importantes por su rápida expansión, alta frecuencia de infestación y su capacidad para reducir su rendimiento hasta en un 68% aproximadamente. Los daños causados no sólo reducen el número de frutos del cultivo, sino que también afectan la calidad de los mismos impactando de esta forma en sus precios. Se ha documentado que la población inicial de *Meloidogyne* sp. influye en la severidad del daño, afectando el desarrollo del tomate y su rendimiento (Salazar-Antón y Guzmán-Hernández 2013).

En México, el nematodo agallador de raíces se ha reportado en al menos 23 de los 32 estados. El género *Meloidogyne* afecta a plantas cultivadas y silvestres; actualmente se considera que en casi todos los cultivos son susceptibles al ataque del nematodo (Guzmán *et al.*, 2008).

1.2.5 Ciclo de vida y parasitismo de *Meloidogyne* spp.

Una vez que los juveniles de segundo estado eclosionan del huevo, si se encuentran en el interior de las raíces infectan los tejidos cercanos, y si por el contrario se encuentran en el exterior, migran en el suelo en busca del hospedante. Se ha demostrado que éstos son atraídos por emanaciones de CO₂ y aminoácidos provenientes de la zona de elongación y áreas de emergencia de raíces laterales, las que son captadas por sus órganos cefálicos sensoriales, fundamentalmente las anfidas (Karssen y Moens, 2006). Los juveniles de segundo estado, en su penetración y movimiento utilizan medios mecánicos y químicos. Como su estilete no es tan robusto que les permita perforar las paredes celulares, segregan enzimas digestivas que debilitan la lámina media entre las

células (Fenoll y del Campo, 1998). Cuando los juveniles de segundo estado alcanzan el cilindro vascular en desarrollo, reconocen una célula particular y se establecen; dicha célula será la precursora del sitio de alimentación permanente; los componentes de las secreciones de los nematodos son los responsables de activar los mecanismos implicados en la inducción de los sitios de alimentación (Keen y Roberts, 1998; Abad *et al.*, 2003; Williamson y Gleason, 2003). La formación de la célula gigante, como sitio de alimentación permanente en la planta, es el resultado de repetidas divisiones nucleares sin citocinesis. El resultado final es una célula grande multinucleada (Gheysen y Fenoll, 2002; Abad *et al.*, 2003). Al formarse estas células gigantes, se bloquean los vasos del xilema e inducen la multiplicación de células corticales, que aumentan tanto en tamaño como en número, produciéndose entonces una agalla o nudo en la raíz (Fenoll y del Campo, 1998; Almeida, 1999). El tamaño de la agalla está relacionado con la planta hospedante, el número de juveniles de segundo estado y la especie de nematodo (Karssen y Moens, 2006).

Después de establecidos los nematodos en el sitio de alimentación, los músculos de la pared de su cuerpo degeneran y quedan atrapados en el interior de las agallas o nódulos (Fenoll y del Campo, 1998; Keen y Roberts, 1998). A partir de este momento dependen absolutamente de esa zona para abastecerse de agua y de nutrientes (Abad *et al.*, 2003). Una vez inmovilizados, pasan por una segunda, tercera y cuarta muda hasta alcanzar la fase adulta y la madurez sexual. Durante la última muda los machos cambian dramáticamente su forma y abandonan la raíz. Las hembras comienzan a engrosar su cuerpo y como consecuencia provocan ruptura de los tejidos de la planta quedando conectadas con su estilete al sitio de alimentación. Las hembras se reproducen asexualmente y segregan una matriz gelatinosa dentro de la cual depositan cientos de huevos (Karssen y Moens, 2006).

Los huevos inmersos en esta matriz gelatinosa, pueden quedar en el exterior de los tejidos o encerrados en el interior de la raíz hasta su eclosión. Dentro de los huevos se forma el primer estado larval y se produce la primera muda antes de eclosionar (Karssen y Moens, 2006). La producción de huevos es

un proceso muy perjudicial para la planta infestada, la formación de los mismos supone una gran demanda de agua, nutrientes y productos de la fotosíntesis (Fenoll y del Campo, 1998).

Los síntomas del ataque de *Meloidogyne* spp. son enanismo de la planta y amarillamiento de las hojas. Las plantas manifiestan síntomas de deficiencia de agua en las horas de mayor calor, aún en presencia de riego adecuado, lo cual se debe a la poca capacidad de la planta atacada para aprovechar el agua disponible (Weiland, 2001).

Los síntomas típicos se presentan en el sistema radical donde las plantas atacadas son en general más cortas y sin ramificaciones laterales, y el síntoma más característico es la formación de agallas o tumores. El sistema radical así deteriorado no es capaz de absorber el agua y los nutrientes disponibles en el suelo y, en consecuencia, las plantas sufren retardo en el crecimiento (Muñoz, 2011).

Las agallas son la manifestación externa del ataque de *Meloidogyne* spp. en el sistema radical; sin embargo, internamente sufre daños que se inician desde el momento de penetrar los juveniles del segundo instar (J2), cerca de las puntas de las raíces o en las zonas de elongación; al hacerse sedentario el patógeno, éste induce mediante secreciones a través del estilete, una serie de cambios en los tejidos radicales, como un aumento en el tamaño de las células (hipertrofia) que se encuentran cerca de la cabeza del nematodo y la multiplicación celular (hiperplasia) que da origen a las agallas. Las células hipertrofiadas son conocidas como "células gigantes", son las que proporcionan al nematodo la fuente de alimentación necesaria para su completo desarrollo y reproducción (Muñoz, 2011).

Al hacer un corte transversal de una agalla radical en una planta susceptible, se observa que ha perdido el arreglo normal de los tejidos, debido al desplazamiento de algunos de ellos, producido por la multiplicación anormal de las células, la formación de células gigantes y engrosamiento del nematodo dentro del tejido (Carrillo *et al.*, 2000). Esta disrupción de los tejidos, especialmente de los haces vasculares (floema y xilema), hace que en la planta se reduzca el flujo normal de agua y nutrientes desde las raíces a la parte aérea; como consecuencia

se disminuye su crecimiento y manifiesta los síntomas de deficiencias nutricionales (Muñoz, 2011).

1.2.6 Principales especies de *Meloidogyne* que afectan el cultivo de tomate

Las especies de nematodos del género *Meloidogyne* constituyen uno de los patógenos más nocivos del cultivo del tomate a nivel mundial, ya que las especies del género dañan severamente las raíces del cultivo. *Meloidogyne* se distingue de otros géneros por tener un amplio rango de hospedantes, esto ha hecho que sea catalogado como el género de nematodos fitoparásitos de mayor importancia económica en el mundo (Salazar-Antón y Guzmán-Hernández, 2013).

En México, en diferentes estados productores de tomate, se ha reportado la presencia de 4 especies de *Meloidogyne*, dentro de las cuales destacan *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* y *M. hapla* (Carrillo *et al.*, 2000; Cid del Prado *et al.*, 2001); sin embargo, en la temporada 2012-2013, Martínez *et al.* (2015) realizaron el primer reporte de la presencia de la especie *M. enterolobii* atacando plantas de tomate portadoras del gen Mi (altamente resistentes a *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*) en condiciones de cultivos de tomate en malla sombra.

1.2.7 *Meloidogyne enterolobii*

M. enterolobii ha sido reportada en España (EPPO, 2011) y en México se ha reportado en Veracruz en el cultivo de sandía (Ramírez-Suárez *et al.*, 2014) y en 2016 en pitahaya en Jalisco (Ramírez-Suárez *et al.*, 2016). Se describe como una especie con mayor adaptabilidad a diferentes temperaturas y su reproducción y agresividad son mayores que las especies *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* y *M. hapla*. Además de infectar plantas con los genes Mi, N y Tabasco, los cuales le confieren resistencia a *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* (Brito *et al.*, 2007; Kiewnick *et al.*, 2009).

1.2.8 Identificación morfológica (tradicional) de nematodos fitoparásitos

La identificación de nematodos se basa tradicionalmente en la cuidadosa medición y comparación de las estructuras morfológicas de los mismos, dado que se han observado diferencias significativas en dichas estructuras. Sin embargo, algunas veces la discriminación entre especies se basa en medidas promedio de una población de individuos, lo cual puede llegar a complicarse cuando las

poblaciones están compuestas por mezclas de especies muy estrechamente relacionadas entre sí (Powers, 2004).

El primer paso en el desarrollo de un protocolo de diagnóstico involucra la selección de un ejemplar o individuo representativo, lo cual es un punto crítico en el diagnóstico tradicional, por lo cual resulta extraño o irónico que en la mayoría de los estudios este paso es el menos examinado. Además, este es un paso muy delicado, que en la mayoría de los casos requiere de un alto grado no sólo de conocimiento sino también de habilidades por parte del investigador (Powers, 2004).

Por medio del diagnóstico tradicional se han logrado identificar aproximadamente 25000 especies de nematodos y se estima que faltan por describir entre 10 y 40 veces más especies. Así, se piensa que los métodos moleculares pueden ayudar a agilizar este proceso (Powers, 2004).

Algunas de las desventajas de los métodos tradicionales de identificación incluyen los bajos niveles de sensibilidad y la necesidad de suficientes cantidades de material para los análisis. Además, se requiere de personal altamente calificado, con un alto grado de habilidad y especialización, ya que las diferencias morfológicas suelen ser muy pequeñas. Asimismo, esta técnica requiere de mucho tiempo, por lo que se han empezado a realizar estudios utilizando las técnicas moleculares, ya que brindan varias ventajas en el diagnóstico de nematodos (Bates *et al.*, 2002).

1.2.9 Identificación mediante técnicas moleculares de nematodos fitoparásitos

Como se mencionó en la sección anterior, el uso de técnicas de diagnóstico tradicionales o morfológicas puede presentar una serie de desventajas, por lo que se han desarrollado una gran cantidad de métodos alternos a éstos, para facilitar el diagnóstico de nematodos.

1.2.9.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en una técnica que permite multiplicar exponencialmente pequeños fragmentos de ADN, es un procedimiento experimental que reproduce en un tubo de ensayo un proceso

esencial en la vida de la célula: la replicación del material genético. Es indispensable la presencia de una ADN polimerasa termoestable (*Taq* polimerasa o *Pfu*), imprimadores que flanquean la región de ADN patrón que se desea amplificar, dNTPs (A, C, G, T) para la síntesis de las cadenas complementarias, cofactores como el Mg^{2+} y un amortiguador de reacción que optimizan la actividad de la ADN polimerasa (Madriz, 2005).

La PCR ha ampliado enormemente el poder de la investigación del ADN recombinante y ha encontrado aplicaciones en un amplio rango de disciplinas, incluyendo la biología molecular, la genética y la evolución. Una de las grandes ventajas de esta técnica radica en que, a diferencia de otras técnicas de ADN recombinante, en las que se requiere la disponibilidad de grandes cantidades de un segmento específico de ADN, la PCR permite la amplificación directa de segmentos de ADN específicos sin clonación, y pueden utilizarse fragmentos de ADN que están presentes en cantidades ínfimamente pequeñas. Además, la PCR tiene la ventaja de ser más rápida y menos laboriosa que las técnicas de clonación convencionales, y ha reemplazado la utilización de sondas clonadas en campos como el diagnóstico prenatal (Klug y Cummings, 1999).

Existen una gran variedad de técnicas moleculares que han sido utilizadas satisfactoriamente en la identificación de nematodos, entre las cuales se pueden citar:

- PCR Simple: PCR en la que se utiliza un único par de iniciadores, específicos o universales, para amplificar una secuencia de ADN.
- PCR-Multiplex: es una variante de la PCR que permite la amplificación simultánea de más de una secuencia de interés (blanco) en una reacción, por medio de la utilización de más de un par de iniciadores. La ventaja es que reduce el tiempo de diagnóstico, ya que se pueden identificar más de una especie en el mismo ensayo (Bulman y Marshall, 1997).

1.2.9.2 Visualización de ADN: la electroforesis

La electroforesis en gel es una técnica crucial tanto para el análisis como para la purificación de los ácidos nucleicos, cuando una molécula cargada se coloca en un campo eléctrico, migrará hacia el electrodo con la carga opuesta; los

ácidos nucleicos son moléculas cargadas negativamente, debido a la presencia de grupos fosfato en su estructura, por lo que migrarán hacia el polo positivo (ánodo) en este campo eléctrico se aplica a geles o matrices, que consisten en una red compleja de poros, sobre los cuales las moléculas de ácidos nucleicos migran (Dale y Von Schantz, 2002).

Trascurrida la electroforesis, la localización relativa de los fragmentos se determina mediante distintos métodos de detección. La tinción con bromuro de etidio, una sonda fluorescente tras iluminación con luz ultravioleta, es un método generalizado de detección de fragmentos de ADN, ya que la sonda se intercala entre la doble hélice de ADN y emite luz (Dale y Von Schantz, 2002).

CAPÍTULO 2

PRIMER REPORTE DE *Meloidogyne enterolobii* PARASITANDO TOMATE EN CULIACÁN, SINALOA, MÉXICO

2.1 Resumen

Durante el ciclo hortícola 2012-2013, se observó la presencia de agallas en plantas de tomate cv Ramsés (con alta resistencia a *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*) cultivadas en suelo y en condiciones de malla sombra en Culiacán, Sinaloa. El objetivo del presente trabajo fue identificar la especie de *Meloidogyne* estaba causando agallamiento en las raíces de las plantas. Se colectaron raíces agalladas, y se procedió a la identificación morfológica y molecular mediante PCR para las hembras extraídas de las raíces. Basados en características morfológicas, morfométricas y confirmación por PCR, el agente causal se identificó como *Meloidogyne enterolobii*.

Palabras clave: *Lycopersicon esculentum*, agricultura protegida, patogenicidad.

2.2 Introducción

El tomate es uno de los cultivos hortícolas más importantes en el Noroeste de México. En Sinaloa, México, en el ciclo hortícola 2012-2013 se sembraron 13,785 hectáreas, de las cuales, 2,405 correspondieron a superficie protegida (malla sombra e invernadero).

Durante los últimos diez ciclos hortícolas, se ha observado la presencia de agallas radiculares en diferentes híbridos comerciales de tomate. Sin embargo, en el ciclo 2012-2013, se observó en condiciones de malla sombra, el daño de agallamiento por nematodos en el híbrido de tomate indeterminado cv Ramsés, al cual lo reportan con alta resistencia al daño de las especies *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*.

Los síntomas causados por el daño de nematodos incluían achaparramiento de las plantas, presencia de agallas en la raíz (Figura 1) y como consecuencia reducción en el rendimiento. Lo anterior indica que el daño a estas plantas podría estar causado por una especie de nematodo aún no detectada en la zona de estudio, por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue identificar la especie de nematodo agallador responsable de la enfermedad.



Figura 1. Daño de *Meloidogyne enterolobii* en *Solanum lycopersici* L. A) y B) Síntomas aéreos (achaparramiento, clorosis y marchitamiento). C) y D) Síntomas en raíz (agallas o tumores).

2.3 Materiales y métodos

Se colectaron 20 sub muestras de suelo y raíces agalladas en cultivos de tomate cv Ramsés bajo malla sombra en el valle de Culiacán, las cuales se homogenizaron para formar una sola muestra (2 kg). La extracción de machos y juveniles se realizó mediante la técnica de tamiz-embudo (Cobb, 1918). Para extraer las hembras adultas de las raíces se utilizó la técnica de triturado de tejido radical y se procedió a su identificación a nivel género y especie. Los especímenes de hembras globosas, se sometieron a disección, para obtener patrones o modelos perineales. Cada uno de los patrones o modelos perineales que presentaron las hembras, se comparó con los ya reportados por Yang y

Eisenback (1983). Para la confirmación mediante técnicas moleculares de la identidad de *Meloidogyne* a nivel especie, se extrajeron 50 hembras con una aguja de disección y se depositaron en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL; posteriormente, se añadió una alícuota de 45 μ L de buffer de lisis (NaOH 50mM), se sometió a lisis por calor a 95°C por 10 min, se agregó una alícuota de 45 μ L de Tris-HCl (pH 8) y se centrifugó por 3 min a 10000 rpm (Huet *et al.*, 2011); se recuperó el sobrenadante, para proceder con la PCR utilizando el par de iniciadores específicos Me-F (5'-AACTTTTGTGAAAGTGCCGCTG-3') y Me-R (5'-TCAGTTCAGGCAGGATCAACC-3'), que codifican un fragmento de la región rADN-IGS2 (Long *et al.*, 2006).

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando el sistema de PCR core Systems 1 (Promega). El volumen total de la mezcla de reacción fue de 25 μ L para todas las reacciones. El contenido de la mezcla de reacción fue: 10 ngde ADN genómico, 5 μ L de buffer de PCR 10x, 3 μ L de MgCl₂ (25 mM), 0.5 μ L de cada dNTP (10mM), 1 μ L de cada iniciador, 0.2 μ L de *Taq* polimerasa (5u/ μ L) y el resto de agua nanopura estéril. La amplificación del ADN se llevó a cabo en un termociclador (BIO-RAD T100), bajo las siguientes condiciones de amplificación: 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 30 s, 64°C por 30 s, 68°C por 1 min, seguidos de una extensión final a 72°C por 5 min.

Una alícuota del producto de PCR se visualizó, en un gel de agarosa al 1%, teñido con 1 μ L de bromuro de etidio (10 mg mL⁻¹), en un transiluminador (Benchtop UV). La respuesta positiva se definió como una banda visible de 256 pb (Figura 2). Adicionalmente, se evaluó la densidad de población de *Meloidogyne* en el suelo colectado y se realizó una prueba para confirmar la patogenicidad de los nematodos sobre el cv Ramsés.

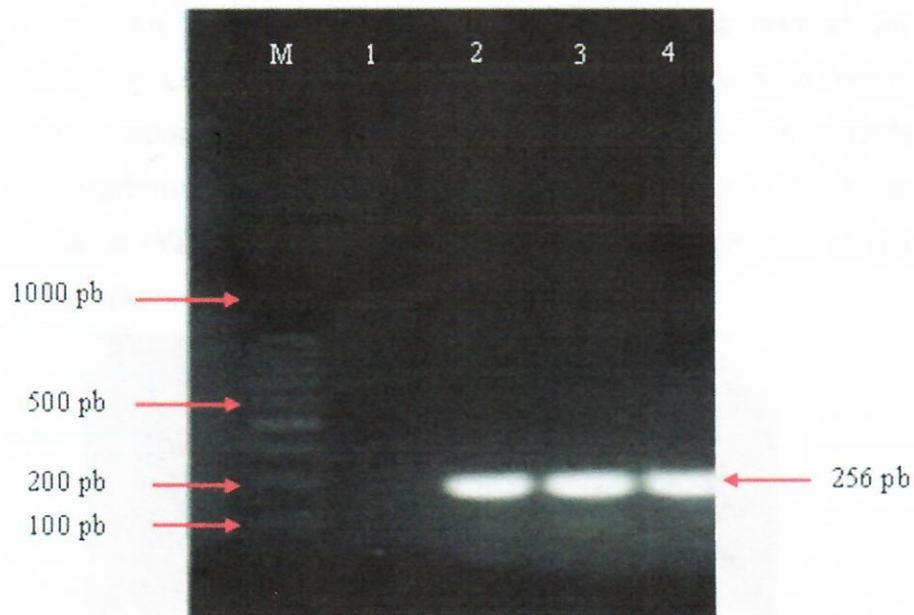


Figura 2. Gel de agarosa al 1% mostrando el fragmento de ADN amplificado a partir de hembras de *Meloidogyne enterolobii*. M, marcador de peso molecular; carril 1, control negativo; carril 2, carril 3 y carril 4, muestras de nematodos procedentes de raíces agalladas de plantas de tomate.

La prueba de patogenicidad se realizó en 30 plántulas de tomate cv Ramsés de 4 semanas de edad, en macetas que contenían 5 kg de sustrato formado por suelo (estéril) y fibra de coco en relación 3:1, a las que se les aplicó una dosis de inóculo de 15 larvas por 100 g de suelo. En plantas testigo solo se agregó agua destilada. Las plantas se mantuvieron dentro de un invernadero a 28° C y 70% de HR, se regaron cuando fue necesario y se aplicó una dosis de fertilizante (10 meq L⁻¹ de NO₃, 1.5 meq L⁻¹ de H₂PO₄, 3 meq L⁻¹ de SO₄, 8 meq L⁻¹ de K, 6 meq L⁻¹ de Ca y 5 meq L⁻¹ de Mg) al inicio del experimento.

2.4 Resultados y discusión

La población de nematodos en la muestra colectada fluctuó entre 300 y 315 larvas por cada 100 g de suelo. Los juveniles (J2) se caracterizaron por ser vermiformes anillados, con extremos ahusados, de 406.3-469.9 µm de largo. Los machos son vermiformes, ligeramente anillados hacia adelante y redondeados de la parte posterior, de tamaño variable, donde el estilete osciló entre 21.3 y 24.9 µm. Las hembras son anilladas con campos laterales blancos y de forma piriforme, de tamaño variable. La relación entre la distancia de la cabeza al poro excretor

osciló de 4.1 a 4.5 μm , ubicándose a nivel del metacorpus. La longitud del estilete fue de 13.0-17.8 μm . Los patrones perineales fueron de ovoides a redondeados, con el arco moderadamente alto y redondeado (Figura 3). Las características morfológicas y morfométricas coinciden con lo reportado por la EPPO en 2011, para *M. enterolobii* (Yang y Eisenback, 1983) o su sinónimo *M. mayaguensis* (Rammah y Hirschmann, 1988).

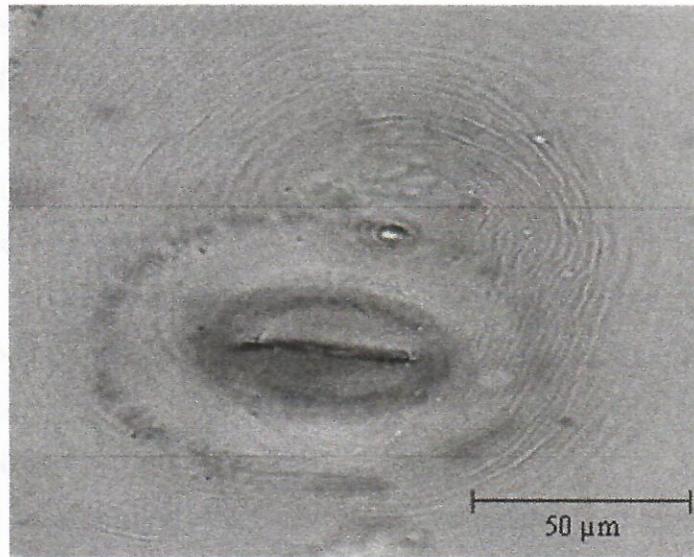


Figura 3. Microfotografía del patrón perineal de una hembra de *Meloidogyne enterolobii* aislada de plantas de tomate.

En los ensayos de patogenicidad, la formación de agallas y síntomas de daño por nematodos fue observado a los 45 días después de la inoculación. Se realizó la extracción de nematodos, se confirmaron las características morfológicas y la identificación por PCR se realizó en hembras del nematodo tomadas directamente de las agallas formadas, lo que confirmó la patogenicidad de *M. enterolobii*. En las plantas control no se observó ningún daño por nematodo. El experimento fue repetido bajo las mismas condiciones y se obtuvieron resultados similares.

Aunque *M. enterolobii* ha sido detectado en diversos países como: Congo, Costa de Marfil, Malawi, Senegal, Sudáfrica, Estados Unidos de América, Brasil, Costa Rica, Cuba, Guatemala, Martinica, Trinidad y Tobago, Venezuela y Francia, y en cultivos como: *Capsicum annuum* L., *Citrullus lanatus* L., *Coffea arabica* L.,

Glycine max L., *Ipomea batatas* L., *Solanum lycopersici* L., *Nicotiana tabacum* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Psidium vulgaris* L., *Psidium guajava* L., *Solanum melongena* L. y plantas ornamentales, en México solamente existe el reporte de Ramírez *et al.* (2014) quienes identificaron a *M. enterolobii* causando daños en el cultivo de sandía en el estado de Veracruz.

2.5 Conclusiones

El agente causal del agallamiento en plantas de tomate cv. Ramsés es *Meloidogyne enterolobii*.

Hasta donde conocemos este es el primer reporte de *M. enterolobii* afectando plantas de tomate en el valle de Culiacán.

2.6 Agradecimientos

Al fondo C003V, modalidad PRO11, solicitud: 217682, desarrollo de un paquete tecnológico para el manejo integral de nematodos fitopatógenos en el cultivo del tomate.

2.7 Literatura citada

- Cobb, N. 1918. Estimating the nematode population of soil. Department of Agriculture of E. U. 1: 1-48.
- 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.
- Long, H., Liu, H. and Xu, H. 2006. Developmet of a PCR diagnostic for the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii*. *Acta Phytopathologica Sinica*. 36:109-115.
- Ramírez-Suárez, A., Rosas-Hernández, L., Alcasio-Rangel, S. and Powers, T. O. 2014. First report of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* parasitizing watermelon from Veracruz, Mexico. *Plant Disease*, 98: 428.
- Rammah, A. and Hirschmann, H. 1988. *Meloidogyne mayaguensis* n. sp. (*Meloidogynidae*), a root-knot nematode from Puerto Rico. *Journal of Nematology*, 20: 58-69.

Wang, B. and Eisenback, J. 1983. *Meloidogyne enterolobii* n. sp. (*Meloidogynidae*), a root-knot nematode parasitizing pacaraearpod tree in China. *Journal of Nematology*, 15 (3): 381-391.

CAPÍTULO 3

IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE *Meloidogyne* SPP. EN TOMATE, EN SINALOA MÉXICO

3.1 Resumen

A nivel mundial el género de nematodos fitoparásitos de mayor importancia es *Meloidogyne*, ya que afecta más de 3,000 especies de plantas y su infección se caracteriza por la formación de agallas en la raíz de la planta infectada. En Sinaloa se desconoce la distribución actual de *Meloidogyne*, debido a que los reportes más recientes son del año 2000 y 2001, identificando a las especies *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. hapla* y *M. javanica*, distribuidas en el estado. En el presente trabajo de investigación los objetivos fueron identificar morfológicamente y molecularmente las especies del nematodo agallador (*Meloidogyne* spp.); así como, determinar su distribución en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Sinaloa, México. Se muestrearon lotes cultivados con tomate en las distintas zonas hortícolas de Sinaloa, México, durante los ciclos agrícolas 2013-14, 2014-15, 2015-16 y 2016-17, en campo abierto, malla sombra e invernaderos, donde se colectaron muestras de suelo y raíces agalladas, para realizar identificación morfológica y molecular. Las especies identificadas en las muestras colectadas fueron *M. enterolobii*, *M. incognita* y *M. arenaria* con un 88, 10 y 2% de incidencia respectivamente. Estos resultados indican que *M. enterolobii*, *M. incognita* y *M. arenaria* se encuentran distribuidos en el estado de Sinaloa en el cultivo de tomate, siendo *M. enterolobii* la especie predominante.

3.2 Abstract

Globally the genus of major nematode parasitic nematodes is *Meloidogyne*, as it affects more than 3,000 plant species and its infection is characterized by the formation of galls in the root of the infected plant. In Sinaloa the current distribution of *Meloidogyne* is unknown, since the most recent reports are from 2000 and 2001, identifying the species *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. hapla* and *M. javanica*, distributed in the state. In the present research the objectives were to identify morphologically and molecularly the species of the root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.); as well as to determine its distribution in the tomato crop

(*Solanum lycopersicum* L.), in Sinaloa, Mexico. Cultivated lots with tomato were sampled in the different horticultural zones of Sinaloa, Mexico, during the agricultural cycles 2013-14, 2014-15, 2015-16 and 2016-17, in open field, shade mesh and greenhouses, where samples of soil and gilled roots were taken, to perform morphological and molecular identification. The species identified in the collected samples were *M. enterolobii*, *M. incognita* and *M. arenaria* with 88, 10 and 2% incidence respectively. These results indicate that *M. enterolobii*, *M. incognita* and *M. arenaria* are distributed in the state of Sinaloa in the tomato crop, with *M. enterolobii* being the predominant specie. The results allowed to report for the first time *M. enterolobii*, parasitizing tomato crop in Sinaloa, Mexico.

Palabras clave: nematodo agallador, *Solanum lycopersicum*, horticultura

3.3 Introducción

El tomate es el principal producto agroalimentario de exportación en México, su producción en el año 2013, fue de 3.2 millones de t (SIAP, 2017). En la temporada 2013-2014 se cultivaron en Sinaloa 47,136 ha de hortalizas, produciendo alrededor de 1 millón de t de tomate, exportándose de ese total 313,914 t con un valor de 303.2 millones de dólares (CIDH, 2014).

Las especies de nematodos del género *Meloidogyne* constituyen uno de los patógenos más nocivos del cultivo del tomate a nivel mundial, ya que las especies de dicho género dañan severamente las raíces del cultivo. *Meloidogyne* se distingue de otros géneros por tener un amplio rango de hospedantes, esto ha hecho que sea catalogado como el género de nematodos fitoparásitos de mayor importancia económica en el mundo (Salazar-Antón y Guzmán-Hernández, 2013).

En México, *Meloidogyne* spp., es el género de nematodos fitoparásitos más importante que ataca al cultivo de tomate, debido al porcentaje de pérdidas que ocasiona, y en diferentes estados productores se ha reportado la presencia de cuatro especies: *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* y *M. hapla* (Carrillo *et al.*, 2000; Cid del Prado *et al.*, 2001); sin embargo, en la temporada 2012-2013, Martínez *et al.* (2015), realizaron el primer reporte de la presencia de la especie *M. enterolobii* atacando plantas de tomate portadoras del gen Mi (altamente

resistentes a *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*) en condiciones de cultivos de tomate en malla sombra en Culiacán, Sinaloa.

Las técnicas de biología molecular, especialmente las que implican la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han proporcionado un enfoque alternativo y sensible para la detección e identificación de nematodos agalladores y muchos organismos patógenos presentes en el suelo (Huet *al.*, 2011).

Los objetivos del presente estudio fueron identificar morfológicamente y molecularmente a *Meloidogyne* spp., así como conocer su distribución en el cultivo de tomate, en Sinaloa, México.

3.4 Materiales y métodos

Se muestrearon 160 lotes cultivados con tomate en etapa de producción bajo condiciones de campo abierto, malla sombra e invernadero en cuatro de las principales zonas de producción de Sinaloa: (Los Mochis, Culiacán, La Cruz de Elota y Escuinapa), durante los ciclos agrícolas 2013-2014, 2014-2015, 2015-2016 y 2016-2017, donde se tomaron los datos de la georreferenciación de cada punto de muestreo (Cuadro 1). La toma de muestra de suelo se realizó entre los 5 y 30 cm de profundidad, cercano a la zona de crecimiento radical (rizósfera) de las plantas, debido a que es donde se encuentra la mayor densidad de nematodos fitoparásitos. También se incluyó la colecta de raíces agalladas para su respectivo análisis. Cada muestra de suelo estuvo constituida por 2 kg (8 a 10 submuestras) y 5 raíces agalladas, se etiquetó y se almacenó a 4 °C hasta la extracción de nematodos.

Cuadro 1. Localización de muestras en cultivo de tomate, en Sinaloa.

Municipio	Latitud	Longitud	M.S.N.M.
Los Mochis	25°43'51.56"	108°45'42.67"	19
Los Mochis	25°55'43.13"	108°50'11.68"	30
Los Mochis	25°51'16.28"	108°54'36.75"	22
Los Mochis	25°47'17.75"	108°44'32.27"	24
Los Mochis	25°39'55.11"	108°45'37.99"	12
Culiacán	24°53'22.86"	107°39'54.45"	26

Culiacán	24°52'27.97"	107°41'41.41"	18
Culiacán	24°48'53.58"	107°48'11.44"	7
Culiacán	24°43'31.98"	107°36'26.59"	14
Culiacán	24°39'07.41"	107°28'37.93"	15
Culiacán	24°38'45.56"	107°30'18.54"	15
Culiacán	24°36'19.72"	107°34'37.05"	7
Culiacán	24°45'54.16"	107°31'03.34"	27
Culiacán	24°56'41.70"	107°28'13.01"	109
Culiacán	24°55'59.57"	107°26'36.05"	72
Culiacán	24°32'49.77"	107°26'12.75"	17
Culiacán	24°32'19.36"	107°26'18.25"	15
Culiacán	24°31'18.36"	107°27'45.30"	10
Elota	24°01'55.38"	107°00'32.72"	7
Elota	24°00'23.13"	107°01'27.80"	10
Elota	24°00'20.38"	106°59'41.17"	7
Elota	23°57'24.13"	106°52'37.48"	54
Elota	23°57'17.58"	106°51'42.45"	67
Elota	23°54'04.78"	106°53'53.99"	10
Elota	23°54'10.31"	106°52'26.60"	15
Elota	23°53'40.45"	106°52'29.58"	20
Escuinapa	23°06'49.21"	106°01'54.69"	91
Escuinapa	23°01'21.33"	105°55'10.96"	31
Escuinapa	22°55'55.85"	106°06'31.24"	7
Escuinapa	24°44'25.53"	105°50'22.38"	5
Escuinapa	22°43'40.57"	105°50'16.49"	4
Escuinapa	22°40'49.13"	105°47'57.83"	5

Las muestras de suelo y raíces de cada muestreo, se analizaron en el laboratorio de Nematología del CIAD, Culiacán. Los especímenes de nematodos se identificaron con base en sus características morfológicas y patrones perineales de las hembras, apoyándose con claves taxonómicas de Eisenback y EPPO. Para

la confirmación de la identidad de *Meloidogyne* a nivel especie, las raíces agalladas se lavaron con agua destilada para remover el suelo, se seleccionaron agallas individuales, de donde se extrajeron 50 hembras con una aguja de disección y se depositaron en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL; posteriormente, se añadió una alícuota de 45 µL de buffer de lisis (NaOH 50mM), se sometió a lisis por calor a 95°C por 10 min, se agregó una alícuota de 45 µL de Tris-HCl (pH 8) y se centrifugó por 3 min a 10000 rpm (Huet *al.*, 2011); se recuperó el sobrenadante, para proceder con la PCR utilizando los iniciadores específicos Me-F y Me-R (*Meloidogyne enterolobii*), F-jav y R-jav (*Meloidogyne javanica*), Ma-F y Ma-R (*Meloidogyne arenaria*), Mi-F y Mi-R (*Meloidogyne incognita*), Mha-F y Mha-R (*Meloidogyne hapla*), que codifican para la región 28S ARNr (Cuadro 2) (Huet *al.*, 2011).

Cuadro 2. Secuencia de primers específicos de *Meloidogyne*.

Primer	Secuencia de primer (5'-3')	Especie específica
F: Me	AACTTTTGTGAAAGTGCCGCTG	<i>M. enterolobii</i>
R: Me	TCAGTTCAGGCAGGATCAACC	
F: Jav	GGTGCGCGATTGAACTGAGC	<i>M. javanica</i>
R: Jav	CAGGCCCTTCAGTGGA ACTATAC	
F: Ma	TCGAGGGGCATCTAATAAAGG	<i>M. arenaria</i>
R: Ma	GGGCTGAATATTCAAAGGAA	
F: Mi	GTGAGGATTCAGCTCCCCAG	<i>M. incognita</i>
R: Mi	ACGAGGAACATACTTCTCCGTCC	
F: Mha	TCGAGGGGCATCTAATAAAGG	<i>M. hapla</i>
R: Mha	GGGCTGAATATTCAAAGGAA	

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando el sistema de PCR core Systems 1 (Promega). El volumen total de la mezcla de reacción fue de 25 µL para todas las reacciones. El contenido de la mezcla de reacción fue: 10 ngde ADN genómico, 5 µL de buffer de PCR 10x, 3 µL de MgCl₂ (25 mM), 0.5 µL de cada dNTP (10mM), 1 µL de cada iniciador, 0.2 µL de *Taq* polimerasa (5u/µL) y el resto

de agua nanopura estéril. La amplificación del ADN se llevó a cabo en un termociclador (BIO-RAD T100), bajo las siguientes condiciones de amplificación: 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 30 s, 64°C por 30 s, 68°C por 1 min, seguidos de una extensión final a 72°C por 5 min.

Una alícuota del producto de PCR se visualizó, en un gel de agarosa al 1%, teñido con 1 μL de bromuro de etidio (10 mg mL^{-1}), en un transiluminador (Benchtop UV). Se consideró como respuesta positiva una banda visible de ± 250 pb. (*M. enterolobii*), ± 750 pb. (*M. javanica*), ± 950 pb. (*M. arenaria*), ± 1000 pb. (*M. incognita*) y ± 1500 pb. (*M. hapla*).

3.5 Resultados y discusión

Del total de las poblaciones obtenidas, al analizar su caracterización morfológica, morfométrica y molecular, se registró una frecuencia del 88% para *M. enterolobii*, 10% para *M. incognita* y 2% para *M. arenaria* (Figura 4).

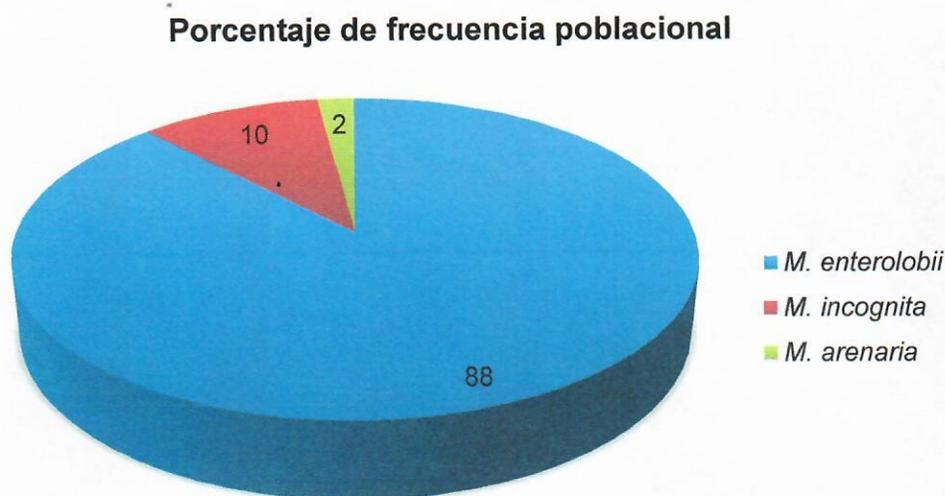


Figura 4. Porcentaje poblacional de especies de *Meloidogyne* en el cultivo de tomate en Sinaloa.

Tomando en consideración los patrones perineales de las hembras, las características de la región cefálica, tipo de estilete, tipo de nódulos basales y la distancia de la DGED las muestras se identificaron como *M. enterolobii*: hembras anilladas con campos laterales blancos y de forma piriforme, de tamaño variable,

la relación entre la distancia de la cabeza al poro excretor corta, ubicándose a nivel del metacorpus. Estilete grueso y los patrones perineales fueron de ovoides a redondeados, con el arco moderadamente alto y redondeado. *M. incognita* presentó dos anillos en la región cefálica anillada y la parte anterior del estilete en forma de "remo" con punta roma, nódulos basales redondeados y la distancia de la base de los nódulos a la DGED muy corta; además en los cortes perineales presentaron el arco dorsal alto formado por estrías que variaron de lisas a onduladas, sin líneas laterales claramente visibles. *M. arenaria* tuvo la característica de tres anillos en la región cefálica y la DGED larga; además, en los modelos perineales mostró presencia del arco dorsal con "hombrecas", formadas por ondulaciones pronunciadas de las estrías dorsales (Figura 5). La PCR amplificó fragmentos de ± 250 pb. (*M. enterolobii*), ± 950 pb. (*M. arenaria*) y ± 1000 pb. (*M. incognita*) respectivamente, lo que confirma los resultados obtenidos por morfología y morfometría.

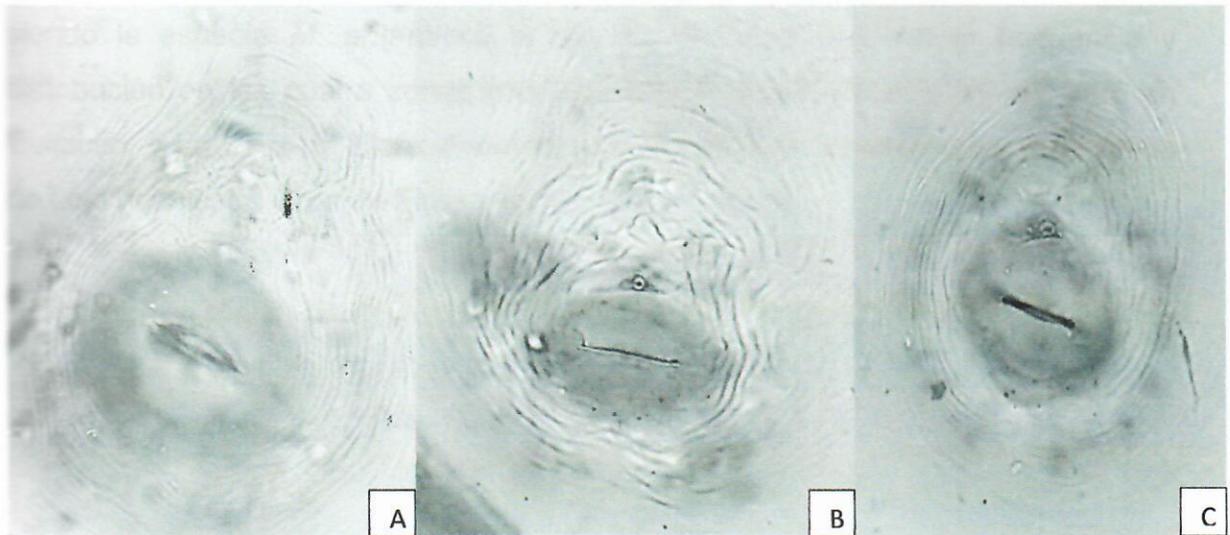


Figura 5. Patrones perineales de: A) *M. incognita*, B) *M. arenaria* y C) *M. enterolobii*, obtenido de hembras de raíces de cultivo de tomate de Sinaloa.

De acuerdo a las áreas de producción o zonas muestreadas, *M. enterolobii* se identificó en las cuatro zonas de producción de Sinaloa, mientras que *M. arenaria* se presentó en Los Mochis, La Cruz de Elota y Escuinapa, y *M. incognita* sólo se encontró en las zonas de Culiacán y La Cruz de Elota.

En cinco sitios o áreas se encontraron especies mezcladas, en una se presentó *M. enterolobii* y *M. incognita* y en cuatro se encontró la mezcla poblacional de *M. arenaria* y *M. enterolobii*.

Los resultados de la identificación de las especies de *Meloidogyne* su relación con la georreferenciación tridimensional, coinciden con los reportes de otros investigadores (Castro *et al.*, 1990; Cid del Prado *et al.*, 1998; Carrillo *et al.*, 2000; Cid del Prado *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2015), ya que reportan que los intervalos de distribución están regidos en base a los rangos de variación de cada una de las especies.

El presente estudio contribuye al conocimiento de la distribución actual de *Meloidogyne* en Sinaloa y se considera una base para futuras herramientas de control.

3.6 Conclusiones

El nematodo agallador (*Meloidogyne*), se encuentra distribuido en todas las zonas de producción de tomate en Sinaloa analizadas en el presente estudio, siendo la especie *M. enterolobii* la que se encontró con mayor frecuencia y distribución en las cuatro zonas muestreadas. *M. incognita* sólo se encontró en Culiacán, y La Cruz de Elota, mientras que *M. arenaria* se encontró en las zonas de Los Mochis, La Cruz de Elota y Escuinapa (Figura 6).

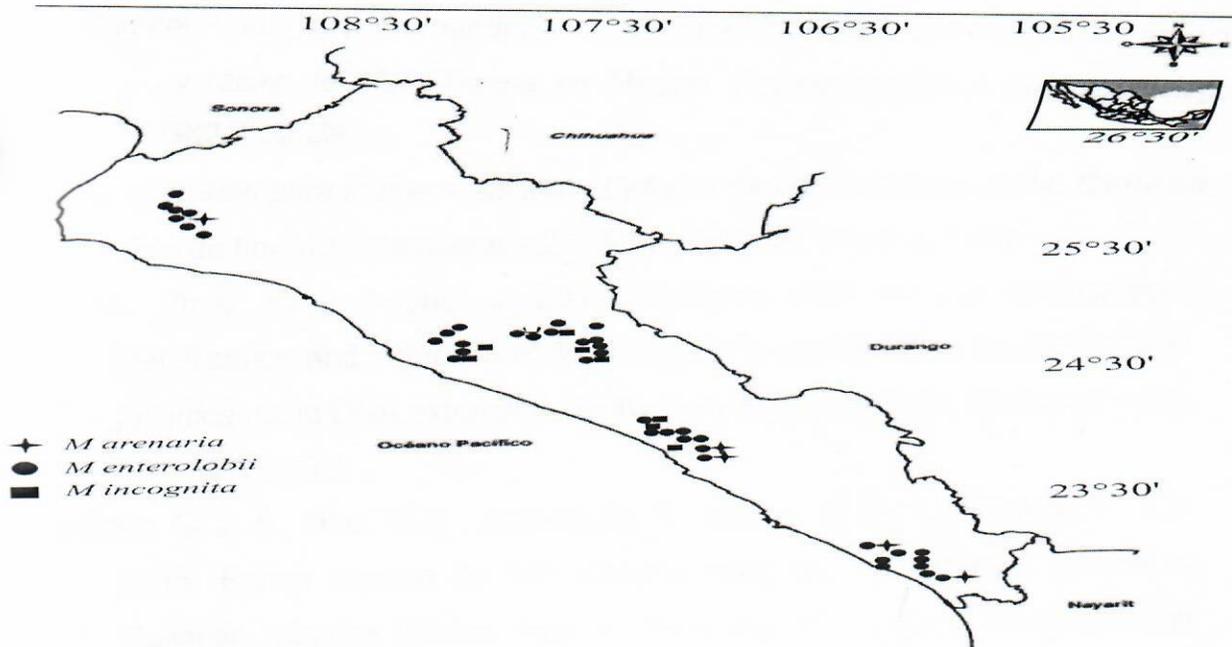


Figura 6. Distribución de especies de *Meloidogyne* en cultivo de tomate, en Sinaloa.

3.7 Literatura citada

- Carrillo, F. J. A., García, E. R. S., Allende, M. R., Márquez, Z. I. y Cruz, O. J. E. 2000. Identificación y distribución de especies del nematodo nodulador (*Meloidogyne* spp.) en hortalizas en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 18(2): 115-119.
- Castro, A. A. E., Zavaleta-Mejía, E., Cid del Prado, V. I. y Zamudio, G. V. 1990. Rotación e incorporación de *Tagetes erecta* L. para el manejo de *Meloidogyne incognita* (Kofoid&white) Chitwood en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Tecamachalco, Puebla. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 8:173-180.
- Cid del Prado, V. I., Hernández, J. A., Espinoza, V., Tovar, S. A. y Torres, R. 1998. Distribución geográfica y frecuencia de especies de *Meloidogyne* en la República Mexicana. En avances en la investigación. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Posgraduados, Montecillo Estado de México. 114-115 pp.

- Cid del Prado, V. I., Hernández, J. A. y Tovar, S. A. 2001. Distribución de especies y razas de *Meloidogyne* en México. Revista Mexicana de Fitopatología. 19(01): 32-39.
- CIDH, Comisión para la Investigación y Defensa de las Hortalizas. 2014. Cierre de ciclo de hortalizas temporada 2013-14. Culiacán, Sinaloa. 113 p.
- 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.
- Martínez, G. J. A., Díaz, V. T., Allende, M. R., García, E. R. S. y Carrillo, F. J. A. 2015. Primer reporte de *Meloidogyne enterolobii* parasitando tomate en Culiacán, Sinaloa México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. Pub. esp. 11: 2165-2168.
- Salazar-Antón, W. y Guzmán-Hernández, T. (2013). Efecto de las poblaciones de *Meloidogyne* sp. en el desarrollo y rendimiento del tomate. Agronomía mesoamericana. 24(2): 419-426.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2017. <http://www.siap.gob.mx/agricultura-produccion-anual/> (Consulta, abril 2017)

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES GENERALES

Las especies identificadas morfológica y molecularmente en las cuatro zonas muestreadas de producción de tomate en Sinaloa, son: *M. arenaria*, *M. enterolobii* y *M. incognita*. La especie *M. enterolobii* se encontró con mayor incidencia, seguida de *M. incognita* y *M. arenaria*. *M. enterolobii* se identificó en las cuatro zonas de producción analizadas, mientras que *M. incognita* en Culiacán y la Cruz de Elota, y *M. arenaria* en Los Mochis, La Cruz de Elota y Escuinapa. Los resultados permitieron reportar por primera vez *M. enterolobii*, parasitando el cultivo de tomate en Sinaloa, México.

CAPÍTULO 5. LITERATURA CITADA

- Abad, P. B., Favery, M. N., and Sereno, P. C. 2003. Pathogen profile root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology*, 4(4): 217-224.
- Almeida, E. J. 1999. Molecular markers and cell cycle inhibitors show the importance of cell cycle progression in nematode induced galls and syncytia. *The plant cell*, 11: 793-808.
- Bates, J., Taylor, E., Gans, P. and Thomas, J. 2002. Determination of relative proportions of *Globodera* species in mixed populations of potato cyst nematodes using PCR product melting peak analysis. *Molecular Plant Pathology*, 3(3): 153-161.
- Brito, J., Standley, J., Kaur, R., Centintas, R., Di Vito, M., Thies, J., and Dickson, D. (2007). Effects of the Mi-1, N and Tabasco genes on infection and reproduction of *Meloidogyne mayanguensis* on tomato and pepper genotypes. *Journal of Nematology*, 39(4): 327-332.
- Bulman, S.R. and Marshall, J.W. 1997. Differentiation of australasian potato cyst nematode (PCN) populations using the polymerase chain reaction (PCR). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 25: 123-129.
- Carrillo, F. J. A., García, E. R. S., Allende, M. R., Márquez, Z. I., y Cruz O. J. E. 2000. Identificación y distribución de especies del nematodo nodulador (*Meloidogyne* spp) en hortalizas en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 18 (2): 115-119.
- Cid del Prado, V. I., Hernández, J. A., Tovar, S. A. 2001. Distribución de especies y razas de *Meloidogyne* en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19(001). Sociedad Mexicana de Fitopatología. México, Sonora. 32-39 pp.
- CIDH, Comisión para la Investigación y Defensa de las Hortalizas. 2014. <http://www.cidh.org.mx/publico/plantilla/pl5.aspx?cveccion=313> (consulta, enero 2015).
- Dale, J. and Von Schantz, M. 2002. From genes to genome. E. Jhon Wiley and Sons. Sussex, Inglaterra. 360 p.

- Fenoll, C. and Del Campo, F. F. 1998. The molecular basis of nematode endoparasitism in plants. *Physiology Molecular Biology Plants*, 4: 9-18.
- Ferrato, F. R. y Alarcón, A. 2001. La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *Ciencia Ergo Sum*, 8(2): 175-183.
- Gheysen, G. and Fenoll, C. 2002. Gene expression in nematode feeding sites. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 191-219.
- Guzmán, P. R. A., Hernández, F. B., Franco, N. F. y Cadena, H. M. 2008. Nematodos agalladores en la Vega de Meztitlán, Hidalgo, México: identificación, distribución espacial y relación con factores edáficos. *Nematropica*, 38: 47-61.
- Karssen, G. and Moens, M. 2006. Root-knot nematodes. In: Perry, I *Nematology*. CAB International, Wallingford, UK. Pp 59-90.
- Keen, N. T. and Roberts P. A. 1998. Plant parasitic nematodes: digesting a page from proceedings of the national academy of sciences. USA. 95: 4789-4790.
- Kiewnick, S., Dessimoz, M., and Franck, L. (2009). Effects of the Mi-1 and the N root-knot nematode- resistance gene on infection and reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on tomato and pepper cultivars. *Journal of Nematology*, 41(2):134-139.
- Klug, W. S. and Cummings., M. R. 1999. Conceptos de genética. Traducido por: Ménsua, J.L. y Bueno, D. 5ª edición. Prentice Hall. Iberia, S.R.L.España. 814 p.
- Madriz, K. 2005. Manual de laboratorio biología molecular. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 49 p.
- Martínez, G. J. A., Díaz, V. T., Allende, M. R., García, E. R. S. y Carrillo, F. J. A. 2015. Primer reporte de *Meloidogyne enterolobii* parasitando tomate en Culiacán, Sinaloa México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. Pub. esp., 11. 2165-2168.
- Muñoz, N. L. A. 2011. Efecto del tipo de suelo, la concentración de materia orgánica y la incorporación de un hidrogel en la infestación de *Meloidogyne hapla* Chitwood, 1949. Tesis doctoral. Universidad Austral de Chile. 60 p.

- Powers, T. 2004. Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes. Annual Reviews Phytopathology. Department of Plant Pathology, 42: 367-383.
- Ramírez-Suárez, A., Rosas-Hernández, L., Alcasio-Rangel, S. and Powers, T. O. 2014. First report of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* parasitizing watermelon from Veracruz, Mexico. PlantDisease, 98: 428.
- Ramírez-Suárez, A., Alcasio-Rangel, S., Rosas-Hernández, L., and López-Buenfil, J.A. 2016. First report of *Meloidogyne enterolobii* infecting columnar cacti *Stenocereus queretaroensis* in Jalisco, Mexico. PlantDisease, 100(7): 1506.
- Rodríguez, G., Tabares, R. y Medina, S. (2001). Cultivo Moderno del Tomate. Madrid España: Mundi-Prensa.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2011. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. www.siap.gob.mx/index Acceso 8-diciembre-2012.
- Salazar-Antón, W., y Guzmán-Hernández, T. (2013). Efecto de las poblaciones de *Meloidogyne* sp. en el desarrollo y rendimiento del tomate. Agronomía mesoamericana, 24(2): 419-426.
- Sánchez, M. S. y Talavera, M. 2013. Los nematodos como indicadores ambientales en agroecosistemas. Revista Científica de Ecología y Medio Ambiente, 22(1): 50-55.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2014. <http://www.siap.gob.mx/agricultura-produccion-anual/> Acceso: abril de 2014
- SORRIBAS, F. J., ORNAT, C., VERDEJO, S. and GALDEANO, M. 2002. Economic impact of resistant tomato cultivars an alternative to methyl bromide to control *Meloidogyne javanica*. Nematology, 4(2): 258.
- Sosa-Moss, C., Bartker, K., Carter, C. and Sasser, J. 1985. Report on the status of *Meloidogyne* research in México, Central America and the Caribbean countries. En: An advanced treatise on *Meloidogyne*. Methodology. International *Meloidogyne* Project. North Carolina State University Graphics. Raleigh, North Carolina. Pp. 32-346.

- Weiland, A. C. M. 2001. Estado sanitario del cultivo de la vid (*Vitisvinifera*L.) respecto a infecciones de carácter viral en la denominación de origen condado de Huelva y métodos de saneamiento del material vegetal. Tesis doctoral.Universidad de Córdoba Colombia.Pp 208.
- Williamson, V. M. and Gleason, C. 2003.Plant-nematode interactions. Current Opinion in Plant Biology, 6: 327-333.
- Yeates, G. W. 1996. Nematode ecology. Russian Journal of Nematology, 4(1): 71-76.