

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE
HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



**DETERMINACIÓN ESPECÍFICA DE MELOIDOGYNE
CAUSANTE DE LA DEFORMACIÓN RADICULAR EN
ZANAHORIA (*Daucos carota*). PONGORA,
2744 msnm AYACUCHO.**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERA AGRÓNOMA**

**PRESENTADO POR:
INÉS URBANO FERNÁNDEZ**

**AYACUCHO – PERÚ
2017**

DEDICATORIA

A mis padres (Maxi Irene y Marcelino)
por su cariño, apoyo constante durante
mi vida.

A mis hermanos (Alex, Delia, Ronald,
Javier) y familiares por su apoyo y su
comprensión en todos los momentos de
la vida.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más sincera gratitud a la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga alma mater de generaciones.

A la Escuela Profesional de Agronomía y a todos los docentes.

Al personal de la Unidad del Centro de Diagnóstico de Sanidad Vegetal de la Universidad Nacional Agraria la Molina.

Gratitud especial al Ing. Guillermo Carrasco Aquino por su confianza y apoyo durante todo el proceso del presente trabajo.

Gratitud especial al Ing. Fernando Barrantes Del Águila, Antonio Jerí Chávez, por su apoyo y colaboración en la ejecución del presente trabajo.

A mis amigos y compañeros de estudio que me brindaron apoyo y palabras de aliento para continuar la realización de la presente tesis.

ÍNDICE

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE	iv
RESUMEN	vi
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I REVISIÓN DE LITERATURA	3
1.1. Cultivo de la zanahoria.	3
1.1.1. Origen y distribución	3
1.1.2. Composición y valor nutricional.	4
1.1.3. Clasificación taxonómica de la zanahoria.	4
1.1.4. Generalidades del cultivo.	5
1.1.5. Características morfológicas	6
1.2. Nematodos fitopatógenos	6
1.3. Genero <i>Meloidogyne</i> .	9
1.4. Métodos de extracción.	25
1.5. Método morfológico para la identificación de <i>Meloidogyne spp.</i>	26
CAPITULO II MATERIALES Y MÉTODOS	29
2.1. Lugar de la investigación.	29
2.2. Materiales y equipos.	30
2.3. Metodología.	30
2.4. Procedimiento para reconocer el género.	36
2.5. Procedimiento para identificar la especie.	37

CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
CAPITULO VI CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	52
4.1. CONCLUSIONES	52
4.2. RECOMENDACIONES	52
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	54
ANEXO	58

RESUMEN

Las muestras de raíces de zanahoria con síntomas de deformación radicular, bifurcación, agallas y proliferación de raicillas, procedentes de la localidad de Pongora del distrito de Pacaycasa, se sometieron a diferentes técnicas para su reconocimiento e identificación del género y especie del parasito causante de estos síntomas. Para la determinación del género se extrajo de las agallas tanto la hembra, los estados juveniles del nematodo y la rizosfera del suelo. Con la muestra extraída se procedió a la caracterización morfoanatómicos tanto de la hembra y del macho. La sintomatología presente en las raíces de zanahoria sirvió de base para la determinación preliminar del género de nemátodo encontrado en las agallas, posteriormente se estableció al género *Meloidogyne* como el parásito causante de estas alteraciones. La determinación de la especie se realizó en el Laboratorio de Nematología de la UNALM, para lo cual, se utilizaron muestras seleccionadas de nematodos hembras, utilizándose las características morfotaxoanatómica del patrón perineal. Los resultados del análisis revelaron que la especie causante de los síntomas encontrados en la raíz de zanahoria es *Meloidogyne incognita*.

INTRODUCCIÓN

En el Perú, son escasos los estudios y publicaciones escritas que brinden mayor información sobre nematodos fitoparásitos asociados al cultivo de la zanahoria (Gaviola, 2013; Anwar y McKenry, 2010). En la Región de Ayacucho no existen referencias sistematizadas de fitonematodos asociados al cultivo de zanahoria; esta especie se cultiva en forma permanente, como monocultivo de áreas limitadas, en valles interandinos de Ayacucho, donde ha establecido una enfermedad frecuente que deforma las raíces, reduce su tamaño y ocasiona pérdidas importantes al horticultor.

Generalmente, los fitonemátodos dañan las raíces ocasionando crecimiento deficiente, deformaciones, agallas, rajaduras y bifurcaciones con proliferación de raíces secundarias que bajan la calidad del producto, así como el bajo aprovechamiento del agua y nutrientes que perjudican el desarrollo del cultivo (Nico, 2002). Dentro de este grupo de parásitos, las especies de *Meloidogyne* inducen la formación de agallas y se les

considera de mayor importancia económica ya que afecta a gran parte de los cultivos (Hussey y Janssen, 2002). Teniendo en cuenta la importancia de los fitonemátodos en la agricultura, y que su presencia causan síntomas como: agallas, deformación y bifurcación de raíces, proliferación de raicillas, que bajan la calidad del producto, se planteó la investigación para lograrse los siguientes objetivos:

- a) Evidenciar la existencia de una especie de *Meloidogyne* en la deformación radicular de zanahoria en el valle de Pongora.
- b) Caracterizar la especie de *Meloidogyne* a través de sus características morfológicas.

CAPITULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. CULTIVO DE LA ZANAHORIA

1.1.1. Origen y Distribución

La zanahoria es originaria de Asia, aunque algunas especies silvestres han sido encontradas en Europa y Norteamérica. Estrictamente su origen se atribuye a Afganistán, y otros países del Asia menor, que es donde se encuentra la mayor diversidad de formas y colores, (púrpura y amarillo).

En la antigüedad, durante los siglos XIII y XV fueron llevadas por los Árabes a Europa Occidental, donde además aparecieron las zanahorias blancas, las cuales probablemente derivaron de las púrpura o amarillas afganas. Las zanahorias que actualmente se comercializan (anaranjadas) son consecuencia de la selección que el agricultor europeo realizó sobre las de coloración amarilla, aunque otros autores plantean que las zanahorias originales son las de color blanco (Oliva, 1987, citado por García, 2002).

1.1.2. Composición y Valor Nutricional

Esta hortaliza a diferencia de los demás, tiene un reconocido valor nutricional debido a su alto contenido de caroteno, pro vitamina A; el contenido de caroteno es variable dependiendo del almacenamiento de la raíz ya que durante el desarrollo de la raíz logra una mayor síntesis de caroteno conduciéndolo a un aumento real del contenido de vitamina A (García, 2002).

Cuadro 1.2. Cantidad de los nutrientes que corresponde a 100 gramos de zanahoria

Calorías	39,40 kcal.	Proteínas	1,25 g.
Grasa	0,20 g.	Vitamina A	1455,17 ug.
Sodio	61 mg.	Hierro	0,47 mg.
Carbohidratos	6,90 g.	Vitamina C	6,48 mg.
Fibra	2,60 g.	Calcio	27,24 mg.
Azúcares	6,90 g.	Vitamina B3	0,77 mg.

Fuente (FAO 2010)

1.1.3. Clasificación Taxonómica de la Zanahoria.

Casseres (1980) clasifica a la zanahoria de la siguiente manera:

Reino : Vegetal
División : Fanerógamas
Subdivisión : Angiosperma
Clase : Dicotiledónea
Orden : Apiales
Familia : Umbelliferae
Subfamilia : Apioideae

Género : Daucos

Especie : *Daucos carota L*

Numero de cromosomas: $2n=18$

1.1.4. Generalidades del Cultivo

La zanahoria tiene hojas en rosetas (7 a 13 hojas) con pecíolos largos, con hojas alternas, lámina muy dividida en segmentos angostos, el tallo está reducido a un pequeño disco o corona en la parte superior de la raíz (García, 2002). El sistema radicular consta de una raíz principal pivotante de reserva la que se considera como órgano de consumo. Sin embargo hay que aclarar que además, esta raíz consta de una parte del hipocotilo que se ensancha y tiene un crecimiento similar al de la raíz primaria.

También presenta numerosas raíces secundarias las que tienen función de absorción. La raíz primaria se elonga rápidamente posgerminación, alcanzando su largo máximo típico del cultivar (variable entre 3 y 30 cm), que normalmente se produce después de los 55 a 60 días de sembrado. Posteriormente se inicia una etapa de engrosamiento y crecimiento celular, en donde se almacena sacarosa y otros azúcares de reserva que se usan para reiniciar el crecimiento en la segunda temporada. A su vez, estas células contienen pigmentos como clorofila, carotenoides (alfa y beta), antocianina y licopeno, cuya presencia y concentración relativa determinan el color de las raíces, que varía desde blanco a púrpura, predominando el anaranjado en la mayoría de los cultivares (Gaviola, 2013).

1.1.5. Características Morfológicas

Casseres y Fersini (1980), informan que la zanahoria es una planta bianual cuyo cultivo se usa como materia prima para la extracción de algunas vitaminas; el color de la zanahoria depende del contenido de carotenos alfa y beta. Asimismo los nutricionistas y el mercado prefieren zanahorias de color anaranjado intenso y uniforme.

➤ Raíz

Siviero y Donelli (1997), mencionan que al realizar un corte transversal se distinguen dos zonas bien definidas: una exterior, constituida principalmente por el floema secundario y otra interior formada por el xilema y la médula. Las zanahorias más aceptadas son las que presentan gran proporción de corteza exterior, ya que el xilema es generalmente leñoso y sin sabor. De igual modo dice que la característica de la raíz, es fusiforme, jugosa y carnosa, de sabor dulce, de largo y color variables, representando la parte comestible de la hortaliza utilizada tanto en la alimentación del ganado como en el hombre. La raíz de reserva puede ser larga, media o corta; tiene forma cónica, cilíndrica o fusiforme; el ápice puede ser redondeado, filiforme u obtuso; su color externo es rojo, anaranjado, amarillo o violáceo.

1.2. NEMATODOS FITOPATÓGENOS

Los nematodos son un grupo diverso de organismos, parásitos y de vida libre. Generalmente son encontrados en todo el mundo. Los síntomas que ocasionan no suelen ser específicos, y por eso el daño suele ser atribuido

a algún otro patógeno. Los nematodos fitoparásitos generalmente tienen una longitud que va de los 300-1000 micrómetros. Las hembras de algunos géneros pierden su forma vermiforme al llegar a la etapa adulta, tomando forma de pera, limón, esférica o de riñón (Nico, 2002).

En algunas especies existe un dimorfismo sexual definido, con hembras y machos bien diferenciados. Los sistemas reproductores están bien desarrollados: los nematodos hembras tienen de uno a dos ovarios y un útero que termina en una vulva; los nematodos machos tienen un testículo, una vesícula seminal y termina en un orificio común con el intestino. Los nematodos fitoparásitos difieren de los nematodos que se alimentan de bacterias y hongos, por poseer una estructura especializada para alimentarse denominada estilete. Este es usado para inyectar enzimas dentro de las células vegetales y los tejidos, para luego extraer su contenido. Pueden formar rápidamente una población a partir de la reproducción uno o dos nematodos (Agrios, 2004).

1.2.1. Importancia económica y distribución de los fitonematodos

Los nematodos fitopatógenos causan enfermedades de gran trascendencia en la producción agrícola por la magnitud de las pérdidas que ocasionan y la dificultad para controlarlos eficientemente. Reducen la producción agrícola aproximadamente un 11% a nivel mundial, ocasionando pérdidas de millones de toneladas anuales en la agricultura industrial de países desarrollados tecnológicamente los nemátodos presentan amplia distribución en los continentes, desde los polos hasta el

desierto. Son polípagos; un nematodo puede tener varios hospedantes y una planta puede ser afectada por varios géneros y especies de nemátodos. Aun cuando su diseminación en forma activa no es eficiente, varios agentes pueden ayudar a diseminarlos en forma pasiva. Difícil de erradicar en condiciones naturales es casi imposible la erradicación, la solución es bajar las poblaciones para reducirlos daños (Karssen y Mons, 2006).

Hussey y Janssen (2002), mencionan que los nematodos fitopatógenos son habitantes numerosos de suelos. Predisponen a las plantas a factores bióticos (susceptible a hongos, bacterias, hongos etc.) y factores abióticos (susceptible a sequías altas temperaturas); casi siempre pasan desapercibidos por su tamaño pequeño, así como sus efectos en las plantas, porque los síntomas que causan no siempre son visibles o específicos (no matan a la planta pero si bajan su rendimiento, por lo tanto son considerados como hemibiótrofos).

1.2.2. Hábitos alimenticios de los fitonematodos

Los nematodos parásitos pueden ubicarse y alimentarse en las partes aéreas de las plantas, además de raíces y tubérculos. Por su comportamiento alimenticio y movilidad se dividen en tres grupos principales: endoparásitos migratorios que son nematodos móviles que se alimentan dentro del tejido de las raíces. Los endoparásitos sedentarios los cuales una vez que tengan un sitio de alimentación dentro de la

planta, dejan de moverse y se alimentan localmente; los ectoparásitos, se alimentan desde afuera de la planta (Moens y Perry 2009).

1.3. GENERO MELOIDOGYNE

El género *Meloidogyne* fue investigado y descrito por Glodi en 1887. Se le conoce como nematodo de los nódulos radicales; la hembra y el macho en estado larval miden 0.5 mm. Entre las características distintivas están la presencia de estilete y nódulos visibles al microscopio; la región del istmo es más pequeño en relación con los demás géneros (Sasser 1989). Las agallas ocasionadas por *Meloidogyne* son hipertrofias de los tejidos corticales que rodean al nematodo (Bridge y Starr, 2007). *Meloidogyne* comprenden más de 80 especies diferentes con un amplio rango de plantas hospedantes (más de 5.000 especies de plantas); constituyen uno de los fitopatógenos de mayor importancia económica en todo el mundo (Karssen y Moens, 2006).

Cuatro especies de *Meloidogyne*: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla* representan el 95% de todas las infestaciones de nematodos formadores de agallas en tierras cultivadas; *M. incognita* es la especie de mayor importancia económica (Hussey y Janssen 2002).

En Perú en los valles de mayor producción de zanahoria los suelos son arenosos (costa) y franco arcilloso que corresponden a los valles interandinos (sierra); en estos suelos se diagnosticó la presencia de

Meloidogyne a gran escala. En suelos de costa y sierra de Perú la especie predominante es *Meloidogyne incognita* (Vera, 2014).

1.3.1. Ubicación Taxonómica

Según Canto (2010) el género *Meloidogyne* se ubica dentro de la siguiente clasificación taxonómica:

Dominio : Eucariota

Reino : Metazoa

Phylum : Nemata

Clase : Secernentea, Von Linstow 1950, Dougherty 1958.

Orden : Tylenchida, Thorne 1949.

Suborden : Tylenchina, Chitwood 1950.

Superfamilia : Tylenchoidea, Örley 1880.

Familia : Heteroderidae, Filipjev, Schuurmans, Sterkhoven 1941

Subfamilia : Meloidogyninae, Skarbilovich 1959.

Género : *Meloidogyne*, Göldi 1892.

Especie : *M. hapla*; *M. arenaria*, *M. incógnita*; *M. javanica*; *M. exigua*.

1.3.2. Ecología

Hábitat

Según Perry y Moens (2006), las poblaciones de *Meloidogyne* spp. de mayor importancia económica son habitantes de suelos agrícolas. En regiones tropicales, donde la temperatura no varía grandemente entre estaciones y existe presencia de hospedantes, humedad favorable,

suficiente aireación en el suelo y un régimen apropiado de irrigación o suficiente lluvia, se favorece la constante reproducción de *Meloidogyne*.

1.3.3. Morfología de *Meloidogyne*

La hembra es de color blanco diamantado con un cuerpo redondeado en forma de pera y un cuello pronunciado, a veces doblado. El rango de longitud de la hembra va de 350 micras a 3 mm y un ancho máximo entre 300 y 700 micras. En hembras completamente desarrolladas, los anillos de la cutícula son visibles en la región de la cabeza y la parte posterior, donde un patrón cuticular o patrón perineal puede ser observado alrededor del perineo. La forma del patrón, es a veces variable e influenciada por muchos factores de desarrollo. El perineo es terminal con el fásmido arriba del ano. Usualmente el ano está cubierto con una pequeña cutícula plegada y el perineo puede ser ligeramente elevado. Algunas especies tienen líneas laterales o puntuaciones sub-cuticulares arriba del perineo. La cabeza posee una clara pero delicada estructura cefálica. El disco labial es ligeramente levantado y está fusionado con los labios medios y laterales. Posee dos aberturas anfidiales y diez pequeñas sensilias (unidades sensoriales) alrededor de la estoma del estilete y este tiene una longitud de 10 a 25 micras, en la mayoría de especies, el cono es ligeramente curvado y el eje es recto e incluye tres nódulos basales. La forma de los nódulos basales del estilete varía de redondeada a transversalmente alargada y puede ser inclinado posteriormente. La abertura de la glándula esofagial dorsal (DGO) está localizado entre 2.5 y

9 micras detrás de los nódulos del estilete. El poro excretor está localizado usualmente entre el nódulo basal del estilete y el nivel metacarpial. El metacarpus es relativamente largo y conectado posteriormente con la glándula faríngea. Estas glándulas son variables en tamaño y forma, y se superponen al intestino ventralmente. Dos largos didelfos (úteros), con gónadas. Cada gónada está compuesta de un ovario con una zona germinal y de crecimiento, un oviducto, una larga esférica lobulada espermateca y un largo útero. La mayoría de los huevos embrionados son depositados en un saco de huevos producido por seis glándulas rectales y secretadas a través del ano (Perry y Moens, 2006).

El macho es vermiforme, no sedentario, claramente anillado y con un rango de longitud de 600 a 2500 micras. La cabeza está compuesta de un anillo post-labial. La región de la cabeza puede ser compensada y/o en parte subdividida por una cisura transversal o anillamientos. La capa protectora de la cabeza tiene un largo disco labial redondeado y está usualmente fusionado con los cuatro labios medios. Seis labios interiores están centrados alrededor de la abertura oral y una sensilia cefálica está presente en cada labio medio. Las dos largas aberturas anfidales están localizadas entre el disco labial y el labio lateral. En algunas especies, estos labios laterales son reducidos o están ausentes. El estilete y la región cefálica están bien desarrollados; los rangos de estos últimos en longitud van desde 13 a 33 micras. La abertura de la glándula esofagial dorsal (DGO) está localizado 2-13 micras atrás de los tres nódulos basales del estilete; la forma del nódulo basal del estilete es como la de

las hembras. El metacarpus de los machos es mucho más pequeño comprado con el de las hembras. El poro excretor-secretor y el hemizonio están localizados entre el nivel metacorpial y la superposición ventral de las glándulas faríngea. El hemizonio está posicionado anterior o a veces posterior al poro excretor-secretor. La glándula faríngea es usualmente reducida a dos. En la mayoría de especies, el campo lateral tiene cuatro incisiones y las bandas de afuera son a veces areoladas. La cola es muy corta, francamente redondeada y sin bolsa. Los pequeños fásmidos están posicionados cerca a la cloaca. Las espículas son finas y de 20 a 40 micras de largo, mientras el gobernáculo tiene 10 micras de largo. El estadio juvenil J2, es vermiforme, anillado y con rangos de longitud de 250 a 600 micras. La estructura de la cabeza es como la de los machos pero más pequeña y con una débil región cefálica esclerotizada.

El delicado estilete recto tiene de largo de 9 a 16 micras, y la posición del DEGO (Dorsal Esophageal Gland Orifice) está de 2 a 12 micras detrás del nódulo basal del estilete. El metacarpus del juvenil J2, es relativamente pequeño con una valva bien desarrollada. El hemizonio está usualmente posicionado anterior y posterior al poro excretor-secretor. Tres glándulas faríngeas están usualmente presentadas con superposición al intestino. Usualmente el recto es claramente inflado. La cola tiene de 15 a 100 micras de largo y la punta de la cola es estrecha y termina en una parte de la cola hialina. Los fásmidos son muy pequeños y están localizados a un tercio de la longitud de la cola abajo del nivel del ano. Los campos laterales tienen cuatro incisiones con bandas usualmente areoladas. La

tercera etapa juvenil y cuarta etapa son sedentarias dentro de la raíz e hinchadas; no tienen estilete y se desarrollan dentro de la cutícula del J2 (Perry y Moens, 2006).

1.3.4. Ciclo de vida de nematodo del género del *Meloidogyne*

Los huevos de *Meloidogyne*. se encuentran inmersos en una masa gelatinosa dentro de la agalla o tumor, que los mantiene juntos y los protege tanto de las condiciones ambientales extremas como de depredadores. Las masas gelatinosas están compuestas por glicoproteínas y también se les atribuye propiedades antimicrobianas. Generalmente, están depositadas en la superficie de los nódulos, pero algunas veces se encuentran directamente sobre la superficie o dentro del tejido de la raíz de la planta hospedante. La masa de huevos es inicialmente suave, pegajosa y hialina, pero se hace más firme y de color marrón oscuro con el tiempo. Se pueden encontrar más de 1 000 huevos en una masa, que puede ser más grande que el cuerpo de la hembra; la eclosión de los huevos es influenciada por la temperatura y ocurre sin requerir ningún estímulo por parte de la raíz de la planta; sin embargo los exudados radiculares algunas veces estimulan la eclosión (Karssen y Moens, 2006).

El desarrollo del huevo comienza breves horas después de la ovoposición, resultando en 2, 4, 8, 16 a más células, hasta que se ve el primer estado juvenil completamente formado, enrollado y con un estilete. Se puede mover dentro del huevo pero no es muy activo. La primera

muda tiene lugar en el huevo y no es difícil distinguir la cutícula del primer estado juvenil, sobresaliendo más allá de la cabeza del segundo estado juvenil (J2). Poco después, este emerge rompiendo la membrana flexible del huevo, por medio de pinchazos repetidos con el estilete. El juvenil de segundo estado que ha emergido, se mueve a través del suelo en busca de una raíz de la que pueda alimentarse de esta forma convirtiéndose en sedentario. Su capacidad de sobrevivir se ve reforzada por varias adaptaciones fisiológicas y bioquímicas, incluyendo la quiescencia y la diapausa, y las reservas de lípidos que prolongan su viabilidad hasta que llega e invade la planta hospedante (Eisenback, 2009).

La búsqueda de la raíz es al azar, hasta que se acerca a unos cuantos centímetros. Luego son atraídos por los exudados radiculares, acumulándose y penetrando la raíz por la zona de elongación debajo del punto de crecimiento. Se considera que el dióxido de carbono es el factor más importante para atraer a los juveniles de segundo estado (Hussey y Janssen, 2001; Karssen y Moens, 2006).

A través de algún punto de la zona subapical donde la endodermis presenta escaso desarrollo y no constituye una barrera física para el ingreso hacia el interior (Verdejo y Castillo, 2011); el nematodo avanza hasta el tejido cortical y una vez allí la migración continúa intercelularmente hasta llegar al cilindro vascular en diferenciación. El avance a través del apoplasto se realiza por medios mecánicos a través de golpes de estilete, las cuales perforan las paredes celulares e inyectan

secreciones de sus glándulas esofágicas. Estas secreciones causan un agrandamiento de las células en el cilindro vascular y aumentan la proporción de la división celular en el periciclo. Esto da lugar a la formación de células gigantes (también llamadas sincitos) formada por un agrandamiento de las células (hipertrofia). Al mismo tiempo, hay una intensa multiplicación celular (hiperplasia). Los nematodos absorben los nutrientes del citoplasma directamente o a través de tubos de alimentación sintetizados con tal propósito mediante las secreciones procedentes de las glándulas subesofágicas dorsales (Hussey y Glundler, 1998).

Varios estudios han documentado los efectos de la infección por nematodos en la expresión génica. Algunos estudios en las células gigantes han revelado que el ARNm de algunos genes puede estar presente en niveles muchas veces mayor que en células de una raíz no infectada. También se ha reportado que los niveles de enzimas oxidoreductasas se incrementa, indicando un aumento en la actividad metabólica (Hussey y Janssen, 2001; Karssen y Moens, 2006).

Los nematodos del nódulo de la raíz secretan a través de su cutícula, enzimas antioxidantes que son producidas en la hipodermis y protegen al nematodo de la respuesta oxidativa del hospedante frente a la infección. Así también, las proteínas producidas y secretadas por las células de las glándulas esofágicas dentro de la planta hospedante por medio del estilete, son señales moleculares que desencadenan la activación de

rutas de señalización, que conducen a la supresión de la defensa del hospedante y a la inducción de células gigantes. Mientras se están formando las células gigantes y los nódulos, aumenta el ancho del nematodo y hay una dilatación considerable de las glándulas esofágicas. Las células del primordio genital se dividen y éste se agranda haciéndose notorio, dos ramificaciones en la hembra o formando un cuerpo alargado en el macho (Anwar y McKenry, 2010).

Dentro de la raíz el individuo J2 pasa al estadio J3 y J4, si las condiciones son propicias para la alimentación y reproducción, permanecerá en la raíz y se convertirá en una hembra, si las condiciones son inadecuadas para alimentarse, el individuo J4 dejará la raíz y se convertirá en un macho. Cuando se completan la segunda y tercera muda en la hembra, evidenciadas por las dos cutículas desprendidas, el estilete y el bulbo esofágico medio desaparecen. Poco después de la cuarta muda el estilete y el bulbo medio son regenerados, se forman el útero y la vagina y el patrón perineal se hace visible. La hembra de la cuarta etapa continúa aumentando de grosor y un poco más de longitud, sufriendo la última muda y desarrollándose como hembra adulta, de forma piriforme. Las hembras pueden producir huevos por dos a tres meses y viven algún tiempo más después de que cesa la producción de huevos. El ciclo termina cuando la hembra tiene su primera ovoposición. En el caso del macho Después de la segunda y tercera muda, el estilete no es visible, el bulbo esofágico medio se ha degenerado y sólo la gónada se ha alargado. Luego ocurre una rápida metamorfosis: el cuerpo alargado se

desarrolla dentro de la cutícula, completo con estilete, esófago con bulbo medio, espículas, y esperma en los testículos. El macho de la cuarta etapa es vermiforme y sufre una última muda y emerge de la raíz ya como adulto. No hay evidencia de alimentación por parte de machos adultos y pueden ser encontrados en especies partenogénicas cuando las condiciones son desfavorables para el desarrollo de la hembra, por ejemplo, cuando las densidades son muy altas y hay una limitación del suministro de alimentos los machos probablemente viven sólo semanas (Harshman, D. 2011).

1.3.5. Tipo de Reproducción.

El estado citogenético del género *Meloidogyne* spp. Es complejo pero importante en el entendimiento de la biología y evolución de estos nematodos. Tienen tres modos de reproducción: anfimixis, automixis y afomixis. (a) anfimixis, en el cual el esperma de los machos fertiliza los ovocitos en las hembras y posteriormente se produce una meiosis, (b) partenogénesis meiótica facultativa, en el cual en presencia de machos se produce una anfimixis, pero en su ausencia, se lleva a cabo una meiosis en los ovocitos, con dos de sus núcleos, con una reducción de complemento cromosómico (el pronúcleo y el segundo cuerpo polar), posteriormente se fusionan (automixis), y (c) partenogénesis mitótica obligada, donde los machos no están involucrados y uno de los dos núcleos producidos durante la división mitótica inicial dentro del ovocito se deteriora y el otro se convierte en el precursor del embrión posterior (afomixis) (Chitwood y Perry, 2009).

Al igual que muchos nematodos del suelo, la mayoría de especies de *Meloidogyne* spp. son partenogénicas; el modo de reproducción apomíctico se encuentra en las especies más importantes en cuanto a su distribución geográfica e impacto agronómico. Las poblaciones de una misma especie de *Meloidogyne* pueden ser diferentes en el modo de reproducción (Sasser 1989).

La mayoría de especies anfimícticas y automícticas son diploides, con un número haploide de cromosomas. Mientras que la mayoría de especies apomícticas son poliploides o aneuploides y por lo general muestran una amplia variación en el número de cromosomas ($2n = 30-55$ cromosomas). Las especies de *Meloidogyne* spp. también se diferencian en su proporción de machos y hembras, las especies con fertilización cruzada por lo general tienen una proporción de 1:1, mientras que las especies que se reproducen por partenogénesis facultativa u obligatoria como *M. hapla* y *M. Incognita* tienen valores variables de dicha proporción. En el género *Meloidogyne*, los cromosomas sexuales están ausentes y la proporción de machos y hembras puede estar influida por factores ambientales. Cuando se reproducen por partenogénesis meiótica y mitóticas, el hacinamiento, la escasez de alimentos, las temperaturas extremas u otras tensiones ambientales adversas, pueden dar lugar a la formación de machos por inversión sexual. Estos machos raramente inseminan hembras, e incluso cuando lo hacen, una división mitótica en el ovocito inicia la embriogénesis sin fusión con el núcleo de espermatozoide. La inversión sexual ocurre cuando en condiciones

desfavorables para el nematodo, una vez formado el primordio genital de hembras, este cambia para dar lugar a un nematodo macho. Dependiendo de la etapa de desarrollo en la cual ocurre la inversión sexual, los machos involucrados pueden tener 1 o 2 gónadas de tamaño variable. La inversión sexual en un período inicial de desarrollo da lugar a machos con un testículo, casi indistinguible de machos normales de igual modo en una etapa media de desarrollo del segundo estado da lugar a la degeneración del núcleo de una de las células que resulta en machos con un testículo atrofiado y otro bien desarrollado (Chitwood y Perry, 2009).

1.3.6. Factores que afectan el desarrollo del nematodo

La temperatura, la humedad, la porosidad del suelo, la disponibilidad de oxígeno y la presencia de toxinas, pueden limitar o detener el movimiento, el desarrollo y la eclosión de huevos de los nematodos noduladores de la raíz (Rodríguez, M. 2000; Evans y Perry, 2009). La temperatura no sólo afecta la tasa de multiplicación del nematodo sino también su distribución, especialmente en relación con la capacidad de sobrevivir a los efectos de alta o baja temperatura. Dentro del género *Meloidogyne* hay dos grupos, termófilos y criófilos; son criófilos cuando sobreviven en el suelo a temperaturas de hasta por debajo de 10 °C, mientras que los termófilos no sobreviven en el suelo a temperaturas inferiores a 10 °C como es el caso de *Meloidogyne incógnita* (Mons y Perry, 2009).

1.3.7. Procesos asociados a los síntomas observados en plantas de importancia agronómica

Las agallas en raíces de vegetales causadas por especies de *Meloidogyne spp.* tienden a ser bastante largas y prominentes en la mayoría de hortalizas. El sistema radicular es dañado y reducido en tamaño. Un daño severo en la raíz resulta en una producción pobre, enanismo, clorosis, marchitez y defoliación, todo debido al daño severo de la raíz. Además, senescencia prematura, y la planta puede sufrir estrés hídrico y nutricional por el pobre funcionamiento de la raíz. El efecto más aparente del parasitismo de nematodo de *Meloidogyne* sobre la planta es una reducción general del crecimiento (Bridge y Starr, 2007).

Los nematodos del género de *Meloidogyne* reducen el crecimiento de las plantas debido a que destruyen la estructura de las células y consumen su contenido, interfiriendo en los procesos fisiológicos normales y modificando la expresión genética en la planta hospedante. Además de la disminución en el crecimiento, los síntomas asociados al parasitismo, a menudo son marchitez temporal y aparentes deficiencias nutricionales en las hojas; manifestaciones de alteraciones en dos funciones radicales básicas como son la absorción de agua y la nutrición mineral, respectivamente; provocan una reducción en la absorción de agua debido a la destrucción mecánica que se produce en las raíces y a la consiguiente pérdida de biomasa funcional. Sin embargo, se reporta que las relaciones hídricas en la planta se ven afectadas en etapas tempranas de la infección, cuando el parasitismo aún no ha originado destrucción de

tejidos ni ha reducido la relación raíz y parte aérea. El parasitismo origina interrupciones en la corriente transpiratoria, que afectan a células ubicadas dentro del cilindro vascular. Como consecuencia, la conductividad hidráulica disminuye en las raíces, tal como lo confirman estudios llevados a cabo en *Meloidogyne spp.* Las alteraciones en las relaciones entre el agua y el cultivo, a nivel radical, se traducen en desórdenes hídricos que se evidencian en la parte aérea, como la caída del potencial hídrico de las hojas y alteraciones en los valores normales de conductividad estomática, transpiración y eficiencia hídrica (Nico, A. 2002).

Otra función del sistema radical que sufre el efecto perjudicial del parasitismo del nematodo *Meloidogyne* es la nutrición mineral. La magnitud de la alteración varía ampliamente de acuerdo con el hospedante, las condiciones ambientales y el tiempo transcurrido desde el comienzo de la infección. La reducción en la absorción de nutrientes minerales obedece fundamentalmente a que la superficie activa para la misma se ve reducida tanto por el daño mecánico directo, como por la disminución de emisión de raíces laterales y la elongación de las ya existentes. El perjuicio causado por los nematodos a la nutrición mineral no se restringe al proceso de absorción, sino que afecta igualmente a la translocación de los mismos hacia la parte aérea. Este fenómeno es particularmente notable en *Meloidogyne spp* ya que se alojan en el cilindro vascular (Hussey y Janssen, 2001).

En algunos casos, esta circunstancia determina un comportamiento diferencial entre los diversos elementos minerales esenciales y un desajuste entre los mismos. Así, aquellos nutrientes cuya vía de traslocación es preferentemente simplástica, sufren de manera particular este efecto y terminan, de esta manera, concentrándose en la raíz y haciendo sentir su deficiencia en la parte aérea. El parasitismo de los nematodos de *Meloidogyne* causa efectos perjudiciales igualmente sobre la fotosíntesis. La reducción en la cantidad total de Dióxido de carbono asimilado ha sido demostrada en patosistemas que involucran a nematodos noduladores como *M. javanica*, *M. incognita* (Melakerberhan y Webster 1993).

Al no existir un contacto directo entre el nematodo *Meloidogyne* y los órganos aéreos involucrados en la fotosíntesis es de suponer que la reducción en la producción neta de fotoasimilados responde a mecanismos indirectos, esto es, que existen procesos intermedios cuya alteración es la que determina, en última instancia, la disfunción de la fotosíntesis normal. La reducción en la función fotosintética obedece, entre otras razones, a la reducción del área foliar a una menor concentración de clorofila como consecuencia del déficit de nitrógeno y a la reducción de las tasas de intercambio gaseoso como consecuencia del estrés hídrico y alteraciones en la función estomática normal (Rodríguez, 2000).

1.3.8. Meloidogyne en la zanahoria

Los nematodos del genero *Meloidogyne* constituyen un problema muy común en el cultivo de la zanahoria a lo largo del todo el ciclo productivo, al ocasionar disminución en su potencialidad productivo por el desarrollo de agallas y distorsión de las raíces secundarias; se produce un excesivo crecimiento de la raíz. Se presenta con mayor frecuencia en suelos arenosos y franco arcillosos con bajo contenido de materia orgánica; a pesar del daño extremo a la raíz, la parte superior puede crecer aparentemente normal (Gaviola, 2013).

Anwar y McKenry, (2010) también encontraron síntomas en plantas de zanahoria (*Daucus carota L.*). Inducido por *Meloidoyine spp*, como la presencia de agallas en pelos radicales, en ocasiones bifurcación de raíz con presencia de agallas en la parte terminal y en la parte aérea se evidencia la reducción del Gaviola (2013).

Anwar y McKenry (2010), hacen referencia que el género *Meloidogyne* utiliza su gran actividad enzimática en la raíz de zanahoria para la formación de agallas y deformación radicular, inducida por el buen desarrollo de sus glándulas esofagiales.

1.4. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

1.4.1. Extracción de nematodos por el método del embudo de Baerman

Este método se basa en los principios de movilidad de los nemátodos y de mayor densidad de estos que el agua, por lo que este método funciona solamente para nemátodos muy móviles, normalmente los nemátodos parásitos tienen escasa movilidad, siendo los de vida libre los que más se mueven y los que más abundantes resultan con este método de extracción al observar. Existen varias modificaciones del método original, en donde básicamente han sido reemplazados algunos componentes por otros más eficientes. Los requerimientos básicos de esta técnica consisten en un embudo de vidrio o de plástico de tamaño mediano. En su parte inferior se le ajusta una manguera de hule suave, que se cierra mediante una pinza de presión tipo Mohr. El embudo se coloca en un soporte y se llena con agua potable. Posteriormente, pequeñas cantidades de suelo, material vegetal u otro tipo de materia orgánica, son colocadas dentro de una bolsa de tela porosa o papel, la cual se sumerge suavemente en el agua del embudo. Una de las variantes que se puede implementar consiste en colocar a pocos milímetros del borde superior del embudo, un cedazo o malla de alambre cuya función es soportar la muestra, la que es vertida sobre tela o papel, cuya consistencia, textura y porosidad puede variar (Canto, 2005).

1.4.2. Método de la bandeja

Consiste en suspender el suelo en un determinado volumen de agua, y después de un corto período de reposo, la suspensión se vierte sobre un juego superpuesto de cribas de 100 y 400 mallas. El suelo retenido en la criba más fina, se transfiere a un cilindro con fondo de tela, que posteriormente se coloca en el embudo. Después de 24 a 48 horas, todas las formas activas de nematodos han pasado a través de la tela o papel y pueden ser recogidas en un pequeño volumen de agua al retirar la pinza Mohr de la manguera.

Este método se puede optimizar para la extracción de *Meloidogyne*, el método de la Bandeja tiene la ventaja de ser un método sencillo, no requiere equipamiento específico y extrae una amplia variedad de nematodos móviles y puede emplearse sin conocimientos técnicos de aparatos de laboratorio; como procedimiento final para la observación de nematodos se necesita un microscopio y muestra, tomado una gota de agua con un aza de platino y la colocamos en el cristal que se ubica en el microscopio (Canto, M. 2005).

1.5. MÉTODO MORFOLÓGICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Meloidogyne ssp*

La identificación clásica de especies de nemátodos, está basada en caracteres morfológicos y morfométricos. El procedimiento más frecuente para su identificación es el estudio del patrón perineal que se ubica en la región posterior del cuerpo de los especímenes hembras. Esta región

comprende el área de la vulva-ano (el perineo), el término de la cola, arco dorsal, fasmidios, líneas laterales, y estriaciones cuticulares circundantes. Es importante que las descripciones de las especies se ajusten a una norma general, con el fin de facilitar la comparación precisa y diagnóstico diferencial (Perry y Moens, 2009).

El patrón perineal ha sido usado en la identificación y descripción de especies desde 1949 cuando Chitwood lo usó como un método de identificación. Desde entonces permanece como uno de los métodos importantes en la identificación de especies debido a que las hembras son relativamente grandes en tamaño, fáciles de encontrar en tejidos infectados y preparar para examinarse en microscopio, a diferencia de los machos, los cuales son difíciles de encontrar, o juveniles los cuales son pequeños, vermiformes y difíciles de preparar para examinarlos por medio del microscopio. En cuanto a la identificación de machos, se utilizan las características de la región cefálica. Las características a analizar de la región cefálica son el estoma, los músculos del estilete (Hunt y Handoo, 2009).

El estudio de los caracteres morfológicos y su descripción va acompañado de dimensiones y radios (cocientes), establecidos y complementados con parámetros señalados por varios autores a lo largo de los últimos años. Sin embargo, debe considerarse que una población no debe identificarse únicamente con medidas, debido a que éstas

pueden ser variables e incluso pueden sobreponerse entre especies (Vera, 2014).

El tamaño de los nematodos del genero *Meloidogyne* hace necesario el empleo de un microscopio óptico compuesto para su observación y medición; así como para la realización de esquemas y fotografías de los especímenes y sus estructuras. También se utiliza el microscopio electrónico de rastreo o barrido, como una herramienta de trabajo para el diagnóstico, ya que permite ver con mucha más claridad algunos detalles morfológicos que son imprecisos utilizando el microscopio óptico compuesto; incluso permiten evidenciar diferencias morfológicas entre poblaciones o razas de diferentes especies. Entre los caracteres morfológicos más importantes revelados por el microscopio electrónico de rastreo se encuentran los de la región cefálica en hembras, machos y juveniles, así como detalles de las estructuras que se presentan en la al nivel del patrón perineal región de la cola en hembras y machos (Rodríguez, 2000).

Un preciso diagnóstico del nematodo *Meloidogyne spp.* es decisivo para un efectivo control de enfermedades, y esto depende de la rápida y certera identificación del patógeno. Adicionalmente, las decisiones de cuarentena de material vegetal, también demandan tiempo y diagnósticos precisos indican Perry y Moens (2009).

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación se realizó en el laboratorio de fitopatología de la EPA, con muestras obtenidas en el valle de Pongora ubicado en el Distrito de Pacaicasa, Provincia de Huamanga Departamento de Ayacucho a una altitud 2744 msnm, a una latitud de 13° 6' 0" y longitud de 74° 11' 0".

2.1.1. Agroecología de la zona

La zona tiene un clima templado está considerado como un valle interandino con humedad relativa de 76 %; el suelo es franco arcilloso. El terreno tiene una pendiente de 3% y pertenece a la zona de vida natural Montano bajo (Holdridge, 1999).

2.2. MATERIALES Y EQUIPOS

➤ Materiales de Campo

Plantas de zanahoria infectadas, muestra de suelo, bolsas polipropileno, libreta de campo, regla, cámara fotográfica, lápices, pico, pala, altímetro.

➤ Materiales de Laboratorio

Lupa, espátula, estereoscopio, microscopio compuesto, tamices de diferente calibre, soporte universal con aros, mallas de tela o plástico, recipientes de plástico, vasos de precipitado, bandejas de PVC, clips, tijera, papel filtro, pisceta, papel toalla, estilete con punta de pluma, balanza, agujas de disección.

2.3. METODOLOGÍA

2.3.1. Zona de trabajo

El área de recolección de muestras se estableció en el valle de Pongora por ser productora de hortalizas, entre las cuales se encuentra la zanahoria. Se eligieron campos según su extensión de cultivo. Se eligió el sector de Chanchará y el área de cultivo denominada Andabamba; se evaluó una superficie de 2,5 Has.



Fot. 2.1 Sitios de muestreo de suelos y raíces de zanahoria con síntomas



Fot. 2.2 Vista de Parcelas con cultivo de zanahoria

2.3.2. Toma de muestras de campo

El procedimiento de muestreo fue al azar para pequeñas parcelas representativas como indica (Coyne, 2007). Se recorrió el campo en zigzag estableciéndose 10 estaciones de muestreo, obteniéndose raíces infectadas y aproximadamente 5 kg de suelo de cada parcela; obtenidas las muestras de suelo, se procedió a homogenizarlas en el mismo campo;

de este homogenizado de suelos, se extrajo una muestra de 5 kg como representante del suelo de la zona de Pongora. En todos los muestreos se trató maximizar las evidencias para aumentar las posibilidades de obtener más datos de distribución de las especies de Meloidogyne. De las parcelas se extrajeron 10 raíces de zanahoria, que se depositaron en bolsas de polipropileno y trasladadas posteriormente al laboratorio de fitopatología de la Escuela de Agronomía.

2.3.3. Sub muestreo de suelos

De la muestra de suelo de 5 kg homogenizado, se extrajo una submuestra de 500 grs. para los estudios de extracción de nematodos en laboratorio.



Fot. 2.3. Muestra de suelo extraído de campo



Fot. 2.4. Sub muestreo de suelo de campo.

2.3.5. Métodos de extracción de nematodos

Para el reconocimiento a nivel de género, se obtuvieron muestras de suelo de la zona de rizósfera de cada planta de igual modo plantas

infectadas lo cual se utilizó en la extracción de nematodos machos y hembras respectivamente. En este trabajo se utilizaron tres métodos:

a. Método del embudo de Baerman

1. Se colocó los aros en el soporte universal y sobre el cual se colocó el embudo, en la punta del embudo se colocó una manguerita de goma y se cerró con un clips, en la parte ancha del embudo se colocó una malla para que soporte papel filtro y el suelo.
2. Se colocó el suelo sobre el pedazo de papel filtro y se envuelve ligeramente.
3. Luego con una pizeta se llenó de agua hasta que cubra todo el suelo y el nivel del embudo, cuidando que no sobrepase el nivel del embudo.
4. Al cabo de 48 horas los nemátodos pasaron por el papel filtro hacia el fondo del embudo, seguidamente se abrió el clips y recolectamos los nemátodos en un vaso de precipitado.
5. Finalmente se realizó la identificación de los nematodos.



Fot. 2.5. Extracción de nematodos machos del genero Meloidogyne por método del embudo.

b. Método de la bandeja

Modificado por Canto (2005), indica que se debe realizar el siguiente procedimiento:

1. Se colocó las bandejitas de PVC con una malla en la base en recipiente de plástico casi de la misma medida, de tal modo que no choque con la base del recipiente.
2. Se colocó una toalla sobre la malla, de modo que cubra toda la bandejita.
3. Se utilizò 150 gr. de suelo para cada bandeja.
4. Se llenó con una pizeta agua por los bordes de la bandejita, de modo que el agua cubrió todo el suelo.
5. Luego de las 48 horas se retiró el suelo y el agua de la bandejita que contenía los nematodos luego se pasó por un tamiz de 38 micras.
6. Se colecto en una placa petri los nemátodos del tamiz más fino.
7. Finalmente se observó al estereoscopio los nematodos.



Fot. 2.6. Extracción de nematodos machos del genero *Meloidogyne* por método de la bandeja.

c. Método del licuado

Este método se utiliza generalmente para extraer hembras adultas que están dentro del tejido infectado. El procedimiento desarrollado por Oostembrink (1960; citado por Canto, 2005) tiene el siguiente detalle:

1. Todo el contenido por 30 segundos, se lavó las paredes de la licuadora y se licuó nuevamente por 30 segundos más.
2. El contenido del licuado, que contenía la suspensión de nemátodos se vertió sobre los tamices, en la parte de arriba estuvo ubicado el tamiz de 100 mesh y en la parte de inferior el tamiz de 400 mesh. En seguida se Enjuago los dos tamices. Luego se descartó lo que quedo en el tamis de 100 mesh y se colecto el material que quedo el tamiz de 400 mesh, el cual se vertió en un vaso de precipitado de 250 ml. Se picó 2 raíces de zanahoria con síntomas de agalla, luego se puso a licuar por un lapso de 3 minutos, para lo cual se le agregó 20 ml. de hipocloritos de sodio al 10% luego se incrementó el volumen 200 ml usando agua destilada. Posteriormente se licuó

3. Para la observación se sacó una alícuota de 10 ml. El cual se puso sobre el portaobjeto y se observó al microscopio, para dicho fin se ha utilizado una gota con glicerina (Harshman, 2011).

2.4. PROCEDIMIENTO PARA RECONOCER EL GÉNERO

Para el reconocimiento del género *Meloidogyne* se basó en las características morfológicas de la hembra, del macho y de los síntomas que desarrolla en la raíz de zanahoria.

2.4.1. Reconocimiento del macho

Una vez extraídos los machos vermiformes por los métodos descritos anteriormente como es mandeja y Berman, se procedió a inmovilizar a los nematodos, transfiriéndolos a un tubo de ensayo de 100 ml. con la finalidad de matar al nematodo; el tubo se flamea con un mechero de alcohol durante 30 a 40 segundos, se deja enfriar y se transfiere a una luna de reloj o a un portaobjeto cóncavo con la ayuda de un estilete muy fino.

Para el reconocimiento a nivel de género se utilizó la clave para la identificación de los nematodos parásitos de plantas, traducido al español por Canto (2006), que se muestra en el Cuadro 2.1.

Cuadro 2.1 características que presentan el género *Meloidogyne*.

Características Generales	Estilete	Labios. Esqueleto labial	Lóbulo esofágico	Cola
Nemátodos pequeños de 0.35 a 0.45 mm. Filiformes color oscuro.	2 veces el ancho de la región labial, poco robustos con nódulos.	Cónicos, no sobresalientes, esqueleto cefálico ligeramente esclerotizado.	Con superposición ventral.	Variable, sub aguda a veces bifurcada la porción hialina.

2.4.2. Reconocimiento de la hembra

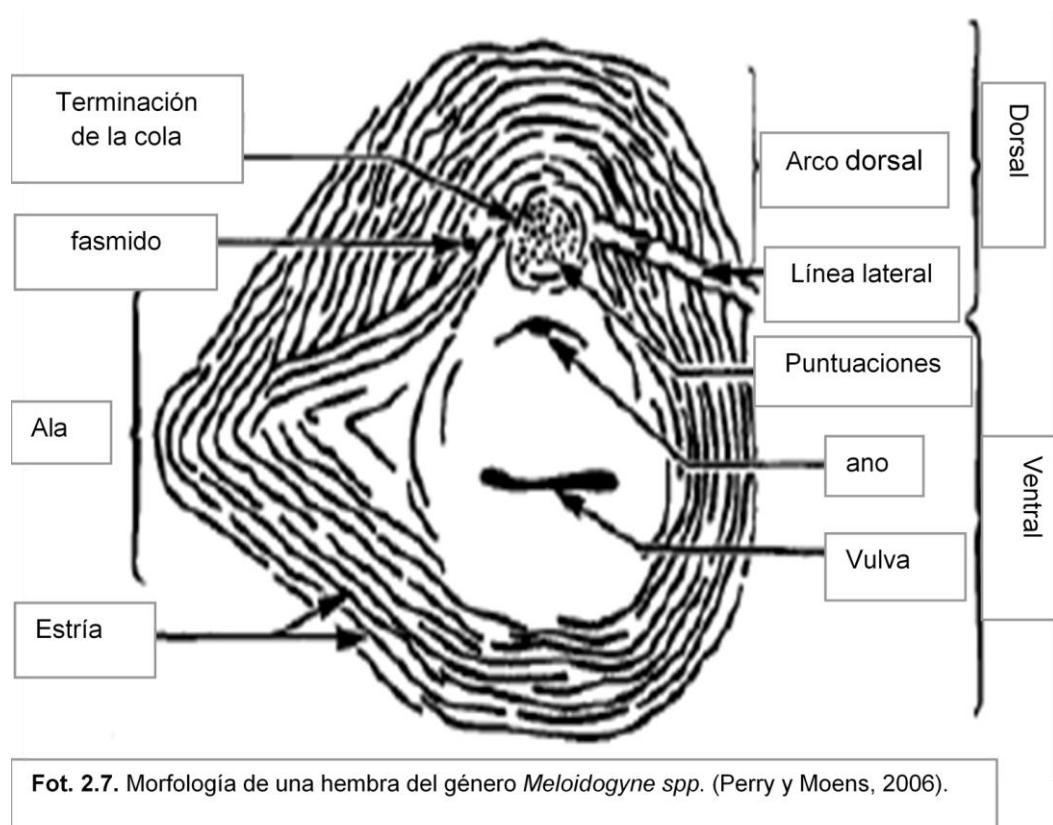
Las hembras del género *Meloidogyne* son considerados como endoparásitos sedentarios y es necesario extraerlos del tejido como se indica en la metodología.

El género *Meloidogyne* presenta un dimorfismo sexual bien marcado; la hembra tiene el cuerpo ensanchado en forma de pera (piriforme) y su eje central coincide con una línea recta desde el ano hasta el estilete. Lo característico de la hembra es la posición del cuello (Perry y Moens, 2006).

2.5. PROCEDIMIENTO PARA IDENTIFICAR LA ESPECIE

Para identificar la especie de *Meloidogyne* se procedió como en el caso de la identificación de género; se colectó muestras de zanahoria con los síntomas característicos de agallas acompañado con muestra de suelo.

En este caso estas muestras se llevaron para su identificación al laboratorio de Nematología de la Universidad Nacional Agraria La Molina, siguiendo el protocolo correspondiente para dicho fin.



2.5.1. Extracción y montaje de hembras de *Meloidogyne* spp

Las muestras de raíces con síntomas se lavaron cuidadosamente sumergiéndolas en un depósito conteniendo agua, evitando el deterioro de la muestra. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico y agujas de disección se abrió el tejido afectado y las agallas tratando de no dañar las hembras maduras que se encuentran dentro de ellas; luego fueron transferidas a ácido láctico al 45 %, dejándose reposar por 24 horas. Para la realización de los montajes del patrón perineal se hizo con la

ayuda de un esteroscopio compuesto para ubicar el diseño perineal en la hembra madura y se procedió a cortarlo en forma rectangular. Los cortes perineales fueron colocados en un portaobjeto conteniendo una gota de glicerina, orientándose la vulva del diseño hacia la parte superior del portaobjeto, así como la parte interior de la cubierta del cuerpo hacia abajo. Luego se colocó un cubre objeto y se selló con esmalte transparente de uñas; los preparados se identificaron con etiquetas y el su código respectivo (Vera, 2014). Los montajes de los patrones perineales se observaron en microscopio óptico compuesto para su identificación.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sobre la base de los objetivos planteados y de los procedimientos aplicados en la presente investigación, se obtuvieron los resultados esperados cumpliéndose la hipótesis planteada.

3.1. SOBRE EL RECONOCIMIENTO DEL GÉNERO MELOIDOGYNE

El reconocimiento del género de nematodo en las muestras, se facilitó con la tecnología, además que los síntomas producidos en las raíces de zanahoria son característicos para el género y está bien documentados a nivel mundial (Harshman, 2011). En cuanto al muestreo se tuvo dificultad en la obtención de muestras enfermas, debido a la dispersión del nematodo en los suelos y a la presencia de otros fitopatógenos como *Pythium* que causan síntomas parecidos a los de Meloidogyne, en cuanto a la bifurcación de las raíces.

Según reportes de los agricultores de la zona, la presencia de estos síntomas en la zanahoria no es reciente, ya que hay años donde la incidencia de la enfermedad es mucho mayor, que se ve incrementada por la práctica de monocultivo de zanahoria que favoreciéndose la permanencia de la enfermedad, como un aspecto básico de la ecología de los fitonematodos (Karssen y Moens, 2006).

Según Castillo y Verdejo (2011) las características estructurales del suelo son importantes para presencia del nematodo y la incidencia de la enfermedad; en un suelo arenoso los síntomas son más evidentes que en un suelo franco arcilloso; en Pongora se encuentran suelos arenosos y arcillosos por ser lecho de río, y la presencia de sintomatología por nematodos fue baja debido probablemente a la poca presencia del nematodo en la zona; las zonas cercanas al curso de los ríos de valles interandinos de Ayacucho son normalmente una mezcla de arcillas, arenas y limos, y el nematodo siempre está presente.

3.1.1. Reconocimiento del nematodo macho

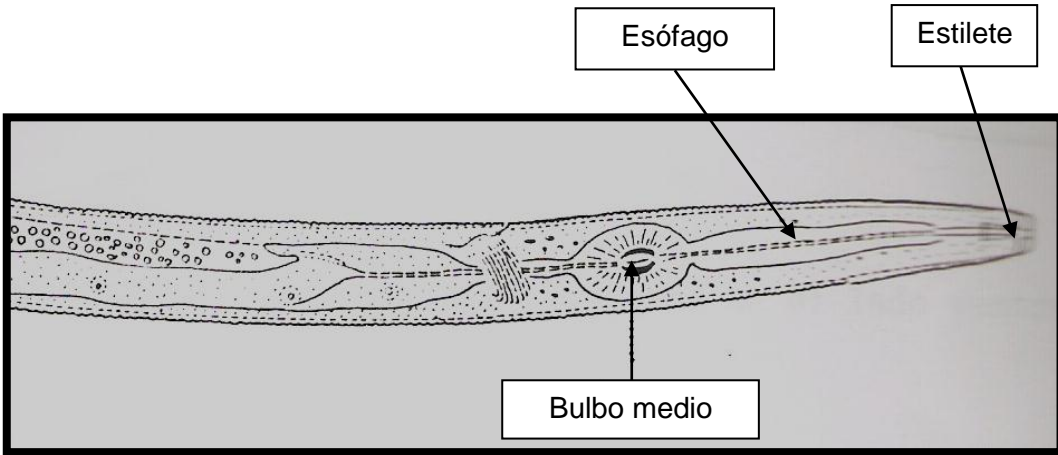
El género *Meloidogyne* presenta un dimorfismo sexual muy pronunciado, que se evidencia en la forma del cuerpo de la hembra y del macho; la hembra tiene un cuerpo ensanchado y el macho es vermiforme (Agris, 2004). El nematodo macho fue identificado por sus características morfoanatómicas basados fundamentalmente en el tipo de estoma y en la forma de la cola (Vera, 2014), como se puede observar en la fotografía 3.1.

Los machos son de tamaño pequeño y de color oscuro y vermiforme. Una de las características del género *Meloidogyne* es su tamaño, que oscila entre 0.30 a 0.50 mm., de textura filiforme en comparación con los otros géneros (Perry y Moens, 2009); estas características coincidieron en los nematodos extraídos de la zanahoria infectada de *Pongora*. Otra de las características representativas de este género es el tamaño de su estilete, que puede llegar a medir el doble del ancho de la región labial; tiene un estilete pequeño si lo comparamos con otros géneros, ya que este le sirve solamente para penetrar dentro de la raíz y ubicarse en el interior. Estas características indican que el género *Meloidogyne* es un endoparásito sedentario (Hussey y Janssen, 2001).

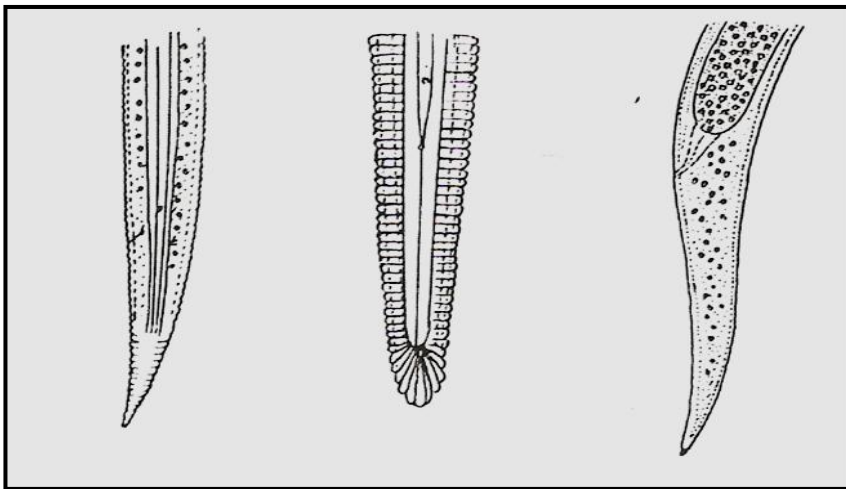
En cuanto a las características de la cola, es de suma importancia en la taxonomía de los nematodos, ya que existen variaciones entre géneros. En el caso de *Meloidogyne* es variable; según Kumar (2009), puede tener forma sub aguda o bifurcada, o roma. En el presente trabajo se observó una cola de tipo filiforme, como se nota en la Fotografía 3.3. Todas las características antes mencionadas coinciden con las descritas por Shurtleff y Averre III (2005) y Perry y Moens (2009).



Fot. 3.1 Vista en microscópico del género de Meloidogyne macho.



Fot. 3.2. Tipo de estoma-estilete de Meloidogyne



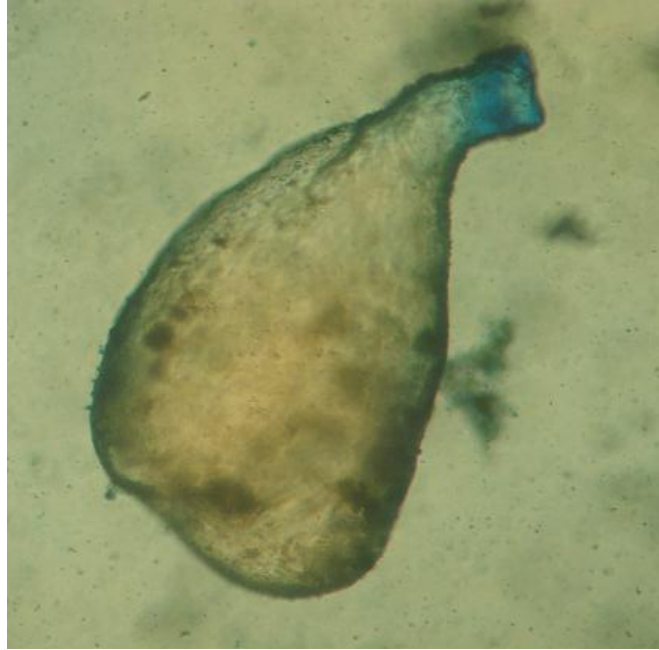
Fot. 3.3. Tipo de colas variables en Meloidogyne.

3.1.2. Reconocimiento de la hembra

La hembra es un endoparásito sedentario, que muestra una gran actividad enzimática por su gran desarrollo de glándulas esofágicas, que contribuye a modificar los tejidos del hospedante para agrandar el tejido radical (por trabajo de mitosis) y poder alimentarse (Hussey y Janssen 2001). Presentó un cuerpo redondeado de color blanco diamantado en forma de pera y un cuello pronunciado, a veces doblado, como se puede observar en la fotografía 3.3.

En las muestras de Pongora se registraron que las hembras median de 1.5mm longitud y 500 micras ancho; lo cual están dentro del rango descrito por Moens y Perry (2006); en cuanto al color del cuerpo fue oscuro opaco, debido posiblemente a las características del suelo y al tipo de alimentación (Fot 3.4). En la parte posterior del cuerpo se pudo observar un patrón cuticular o patrón perineal característico alrededor del perineo.

El estilete tenía el cono ligeramente curvado, con tres nódulos basales. La forma de los nódulos basales tenía la forma redondeada con una inclinación posterior, como lo indican Perry y Moens (2006). Las descripciones efectuadas evidencian que la morfología de la hembra de *Meloidogyne* está claramente diferenciada del macho y de igual modo, comparativamente con otros géneros (Fot 3.4).



Fot. 3.4. Vista microscópico de la hembra del género de Meloidogyne.

3.1.3. Reconocimiento de los síntomas en raíces ocasionados por Meloidogyne

Lo más característico fue la presencia de agallas o nódulos y proliferación de raíces secundarias, que es el efecto más aparente del parasitismo de este nematodo en la raíz; del mismo modo se pudo ver una reducción en el crecimiento general de la raíz de reserva (fotografías 3.5, 3.6, 3.7), que también fue observado por Bridge y Starr (2007).

Nico (2002), informa que los síntomas específicos de Meloidogyne son agallas, nódulos, bifurcaciones y proliferación de raíces, que también fueron observados en las muestras de Pongora; los síntomas de enanismo, antocianescencia y amarillamiento a nivel de las hojas, que describe el autor, no se observaron de manera consistente en las muestras.

La bifurcación no solo es causado por *Meloidogyne* si no también está reportado para *Phytium sp.* (Garcia, 2002). En las muestras de Pongora se observó este síntoma en la mayoría de las raíces, pero no se diagnosticó la presencia de *Pythium*. En este sentido, Nico (2002) indica que *Meloidogyne* es un parásito obligado, que no mata a la planta, ya que en la gran mayoría de las plantas susceptibles el síntoma más común y conspicuo es solamente la hipertrofia radicular, con proliferación de raíces secundarias acompañadas de pequeños nódulos (Fot. 3.5).

Gómez y Martin (1998) indican que *Meloidogyne* causa nódulos grandes, irregulares y generalmente confluyentes, que tienen el mismo color de las raíces (fot. 3.8).



Fot. 3.6. Presencia de nódulos con hojas en normal desarrollo.



Fot.3.5. zanahoria con bifurcación en raíz y hojas cloróticas.



Fot 3.7. Muestra de zanahoria con síntoma de Meloidogyne.



Fot. 3.8. Presencia de nódulos y proliferación en la raíz de la zanahoria.

3.2. Reconocimiento de la especie

Aunque se reporta que *Meloidogyne incognita* es predominante en suelos de costa y de los valles interandinos del Perú, también se ha evidenciado la presencia de *M. arenaria*, *M. hapla* y *M. javanica*. Como lo indican Vera (2014), Verdejo y Castillo (2011) existen especies de climas fríos, templados y cálidos; en nuestro País se le puede encontrar en la costa, sierra (valles interandinos) y zonas de montaña; por ello, las condiciones de Pongora (clima templado) son propicias para la existencia de esta especie de nematodo.

En cuanto al reconocimiento de especies, Vera (2014) indica que existen diversos métodos de estudio: morfológico-morfométrico, análisis molecular de ácidos nucleicos (PCR), prueba de hospedantes diferenciales y análisis electroforéticos de proteínas e isoenzimas.

Para la determinación de la especie de *Meloidogyne*, en las muestras de Pongora, se usaron las características morfológicas, especialmente la forma del patrón perineal, ya que es la más determinante para este género y la más utilizada hasta la actualidad (Harshman, 2011).

Para identificar la especie de *Meloidogyne* se extrajeron hembras adultas de las agallas o nódulos de las raíces de zanahoria que presentaran las características más frecuentes de tamaño y forma, de acuerdo a las indicaciones de publicaciones especializadas sobre nematología vegetal (Plant Nematology y Root-Knot Nematodes de Perry y Moens, 2006). Las características de los patrones perineales de hembras se compararon con las descritas en la imagen del patrón perineal ofrecida por Shurtleff y Averre (2005); Fot 3.9.

Otra consideración plantea que las hembras no están sujetas a los mismos parámetros de identificación morfológica que los machos y juveniles, puesto que la característica más importante para la identificación de las especies, a partir de hembras, es el patrón perineal (Kumar, 2009).

3.2.1. Parámetros para la identificación a nivel de especie en hembras

Los caracteres morfológicos del patrón perineal que se usan en la identificación son la forma del diseño perineal, que pueden ser rectangular, circular, oval, piriforme, de reloj de arena; arco dorsal (alto,

bajo redondeado, aplanado, cuadrado); líneas laterales (presentes o ausentes); forma de las estrías (finas, gruesas, cortas, quebradas, lisas, onduladas, en zigzag); hombreras (presentes o ausentes); puntuaciones al término de la cola (presentes o ausentes) y alas en uno o ambos lados del diseño (presentes o ausentes).

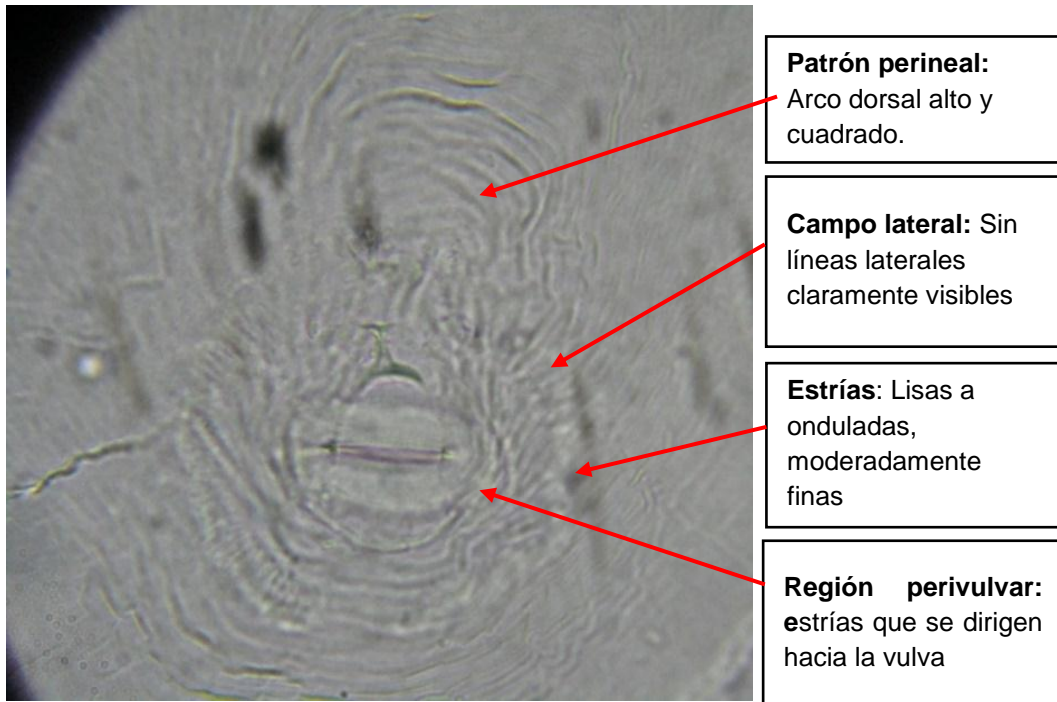
El criterio de diagnóstico de los individuos de *Meloidogyne* fue considerar que las características del patrón perineal de los nematodos de Pongora estuvieran en el rango de las características del patrón perineal descrito por Einsenback (1983). De este modo, se determinó coincidencia en la mayoría de los caracteres establecidos por Hunt y Handoo (2009) para la especie *Meloidogyne incognita*, que se exponen en el Cuadro 3.1.

Cuadro 3.1. Principales características del patrón perineal de *Meloidogyne incognita*, según Hunt y Handoo (2009).

Especie	<i>Meloidogyne incognita</i>
Patrón perineal	Arco dorsal alto y cuadrado
Campo lateral	Sin líneas laterales claramente visibles
Estrías	Lisas a onduladas, moderadamente finas
Región perivulvar	estrías que se dirigen hacia la vulva

Las características de los nematodos de raíces de zanahoria de Pongora fueron un arco dorsal alto formado por estrías, de textura lisa y medio ondulada. Algunas estrías se bifurcan cerca de las líneas laterales, las que no estaban claramente visibles. Es frecuentemente las estrías que se dirigen hacia la vulva, como se puede observar (fotografía 3.10). Por ello,

la investigación efectuada con muestras de zanahorias infectadas de Pongora establece que el parásito causante de la enfermedad es la especie *Meloidogyne incognita*, probablemente una de las razas establecida en los valles interandinos de Ayacucho.



Fot. 3.9. Imagen del patrón perineal de la especie *Meloidogyne incognita*. Pongora-Ayacucho.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES.

1. La determinación específica de *Meloidogyne* en zanahoria tuvo como indicador primario la sintomatología de agallas, bifurcación, deformación de raíces y proliferación de raíces secundarias.
2. Se determinó la presencia de la especie *Melodogne incognita* como el nematodo parásito asociado a la sintomatología de zanahorias enfermas de la localidad de Pongora.

4.2. RECOMENDACIONES

1. Realizar investigaciones orientadas a prevención y erradicación de *Meloidogyne incognita* en cultivos de zanahoria.
2. Investigar la interacción de *Melodogyne incognita* con otros fitopatógenos de suelo, en la deformación radicular y producción de agallas en raíces de zanahoria.

3. Realizar la identificación molecular de *Meloidogyne incognita* de los valles interandinos de Ayacucho, para determinar las razas existentes.
4. Efectuar investigaciones para el tratamiento de la enfermedad en todas las zonas de valle donde se cultiva zanahoria en forma comercial.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Anwar, S., y McKenry, M. (2010). Incidence and reproduction of *Meloidogyne incognita* on vegetable crop genotypes. *Pakistan J. Zool.* 42(2):135 – 141.
- Bridge, J., y Starr, J. (2007). Plant Nematodes of Agricultural Importance. Academic Press. Boston, EE.UU. 146 p.
- Castillo, P., y Verdejo, S. (2011). Nematodos fitoparásitos. En: Enfermedades causadas por nematodos fitoparásitos en España. (Eds. Andrés).
- Coyne, D. (2007). Nematología práctica: Una guía de campo y laboratorio. Instituto Internacional de Agricultura y el Centro Internacional de mejora del Maíz y Trigo. Cotonou, Benin. 82 p.
- Canto, M. (2010). Separatas del Curso de Nematología. Lima, Perú. Escuela de Posgrado. Especialidad de Fitopatología. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Casseres, E. (1980). Producción de Hortalizas. Edit. IICA. Turrialba – Costa Rica.
- Chitwood, D., y Perry, N. (2009). Reproduction, Physiology and Biochemistry Root-knot nematodes. London, UK. CAB International. p. 182-194.
- Eisenback, J. (2009). Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. Pages 191-274 In: Manual of Agricultural Nematology. W. R. Nickle, ed. Marcel Dekker, Inc., New York.

- Gomez, T., y Martin, A. (1998). Problemas nematológicos en cultivos de Costa, Sierra y Selva del Perú. Revista Peruana de Entomología.
- García, M. (2002). El cultivo de la zanahoria. Universidad de la Republica Facultad de Agronomía. Departamento de producción vegetal Centro regional sur. Curso Horticultura. Uruguay.
- Gaviola, J. (2013). Manual de producción de zanahoria. Capítulo seis. Plagas de la zanahoria y su manejo. INTA, Argentina. 152p.
- Hussey R., y Grundler F.(1998). Nematode parasitism of plants. In: Perry,R.N. and Wright, D. J. (eds.) . Physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes. England, CAB International.
- Harshman, D. (2011). Curso de identificación de nematodos fitoparásitos, patrón perineal de especies de *Meloidogyne*. Clemson University. Carolina del Sur, Estados Unidos.
- Holdridge, L. (1999). Ecología basada en zonas de vida. Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura, San José. Costa Rica. 216 pp.
- Hunt J., y Handoo Z. (2009). Taxonomy, identification and principal species. In Root-knot nematodes. London, UK. CAB International. p. 55-88.
- Hussey S., y Janssen, G. (2001). Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. In: Plant Resistance to Parasitic Nematodes. London, UK. CAB International. p. 43-70.

- Karssen G., y Moens, M. (2006). Root-knot nematodes in Plant Nematology. London, UK. CAB International. p. 59-88.
- Melakerberhan H., y Webster J. (1993). The phenology of plant-nematode interaction and yield loss. In Khan, MW, ed. Nematode interactions. New York. EE.UU. Chapman & Hall. p. 26-41.
- Moens M., y Perry R., N. (2009). *Meloidogyne* species-a diverse group of novel and important plant parasites. In Perry, RN; Moens, M; Starr, JL. Root-knot nematodes. London, UK. CAB International, p. 1-13.
- Nico, A. (2009). Incidencia y patogenicidad de nematodos fitopatógenos en plantones de olivo (*Olea europea* L.) en viveros de Andalucía y estrategias para su control. Tesis Grado de Doctor. Córdoba, España. Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales ETSIAM, Universidad de Córdoba. Instituto de Agricultura Sostenible CSIC. 291 p.
- Perry R., y Moens, M. (2006). Plant Nematology. First edition. CABI. London, United Kingdom. 440 p.
- Rodríguez, M. (2000). Identificación y caracterización de *Meloidogyne mayaguensis* (Nemata: Meloidogynidae) en el café en Cuba. Tesis Grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. Cuba, Universidad Agraria de la Habana Fructuoso Rodríguez Pérez, 145 p.
- Sasser, J. (1989). Plant – Parasitic Nematodes: The Farmer's Hidden Enemy. Raleigh, USA. Department of Plant Pathology, North Carolina State University. 115 p.

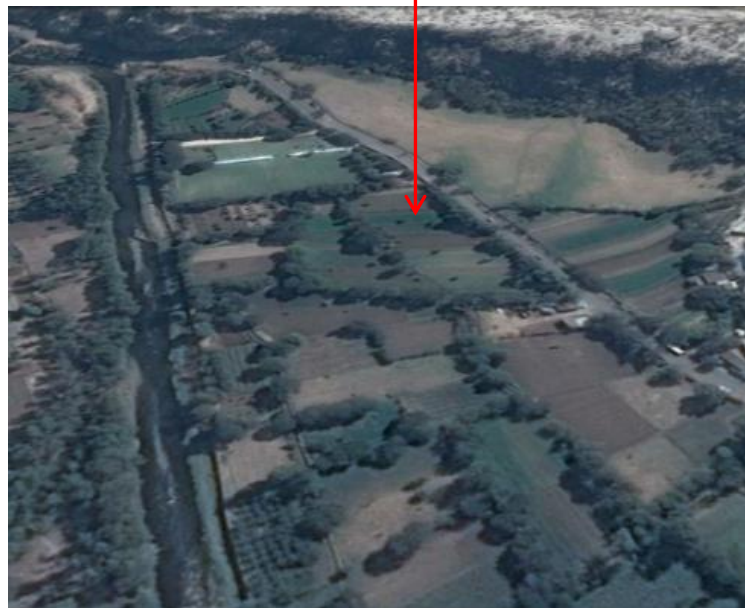
Siviero P., y Donelli, L. (1997). La coltivazione de la carota in Italia
L'Informatore Agrario 24: 54 – 77.

Verdejo S., y Castillo, P. (2011). Nódulos en las raíces de tomate
(*Meloidogyne spp.*). En enfermedades causadas por nematodos.

ANEXOS

ANEXO 1.

Mapa de ubicación donde se realizó el trabajo de investigación



ANEXO 2.

Parcela del cultivo de la zanahoria en los primeros días de evaluación.



ANEXO 3.

Raíces de zanahoria infectada en las parcelas de Pongora-Ayacacucho

