



UNIVERSIDAD ABIERTA
Y A DISTANCIA DE MÉXICO



DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD,
BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

DIAGNÓSTICO DE NEMATODOS FITOPARÁSITOS ASOCIADOS AL CULTIVO DEL ROSAL (*Rosa sp.*)

PROYECTO TERMINAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA PRESENTA:

JÉSSICA LUCERO CONZUELO MIRANDA

ASESORA INTERNA: DRA. DIANA ELINOS CALDERÓN

ASESORA EXTERNA: ING. ROCÍO SARA VALENTINA
HERNÁNDEZ SÁNCHEZ

Índice

1.RESUMEN	-----5
1.1.Palabras clave	-----5
1.2.Justificación	-----5-8
2. MARCO TEÓRICO	-----9
2.1. Enfermedad en cultivo	-----9
2.2. Signos y síntomas de enfermedad en plantas	-----10
2.3. Patogenicidad y parasitismo	-----10-11
2.4. Ciclo de la enfermedad	-----11-12
2.5. Nematodos: generalidades	-----13
2.6. Caracterización de nematodos fitoparásitos	-----13
2.6.1. Morfología y anatomía	-----13-14
2.6.2. Ecología y distribución	-----14-15
2.6.3. Ciclo de nematodos fitoparásitos en cultivo	-----15-17
2.6.4. Factores físico químicos esenciales para el desarrollo del nematodo en suelo	-----18-19
2.7. Generalidades del rosal	-----20-21
2.8. Métodos de extracción de nematodos de vida libre y fitoparásitos.	-----22
2.8.1. Método de Fenwick	-----22
2.8.2. Método de Embudo de Baerman	-----23



2.8.3. Técnica de centrifugación-flotación en solución azucarada.	-----23-24
2.9. Muerte y fijación de nematodos filiformes	-----24
2.10. Aislamiento y montaje de ejemplares	-----24-25
2.11. Identificación preliminar de nematodos fitoparásitos	-----25-27
2.12. Géneros fitoparásitos relevantes	-----28
2.12.1. Nematodos parásitos del rosal.	-----29-30
2.13. Análisis previo de identificación de nematodos fitoparásitos en condiciones de invernadero.	-----31
2.13. 1. Material de estudio	-----31
2.13. 2. Área de estudio	-----31
2.13. 3. Resultados obtenidos	-----31
2.13.3.1. Características morfológicas del género de nematodo fitoparásito: <i>Aphelenchus</i> sp.	-----32
2.13.3.2. Características morfológicas del género de nematodo fitoparásito: <i>Thylenchus</i> sp.	-----32
2.13.3.3. Características morfológicas del género de nematodo fitoparásito: <i>Helicothylenchus</i> sp.	-----33-34
2.13.3.4. Características morfológicas del género de nematodo fitoparásito: <i>Meloidogyne</i> sp.	-----34-35



2.13.3.5. Características morfológicas del género de nematodo fitoparásito: <i>Criconemoides</i> sp.	-----36
2.13.3.6. Características morfológicas del género de nematodo fitoparásito: <i>Thylenchorynchus</i> sp.	-----36-37
2.13.3.7. Características morfológicas del género de nematodo fitoparásito: <i>Hemicycliophora</i> sp.	-----37-38
3. HIPÓTESIS	-----39
3.1 Objetivo general	-----39
3.1.1 Objetivos específicos	-----39
4.METODOLOGÍA	-----40
4.1. Material de estudio	-----41
4.2. Extracción por método de Tamizado-centrifugado	-----41
4.2.1. Materiales	-----42
4.2.2. Procedimiento	-----42-44
4.3. Muerte y fijación de nematodos fitoparásitos	-----44
4.4. Montaje de ejemplares en fresco o de Robbins	-----45
4.4.1. Materiales	-----45
4.4.2. Procedimiento	-----46
4.5. Identificación de ejemplares	-----47
4.6. Determinación de pH	-----47



4.6.1. Procedimiento	-----48
5. Resultados de diagnóstico	-----49
5.1. Base de diagnóstico nematológico	-----50
5.2. Plataforma de análisis	-----51
5.3. <i>Criconemoides</i> sp. género fitoparásito prevaliente en muestras de suelo de rosal de Metepec	-----52-58
5.4. Condiciones de suelo de rosal de Metepec: de fuertemente ácido a moderadamente ácido	-----60
5.5. Suelo de rosales de Villa Guerrero con mayor diversidad de géneros fitoparásitos	-----61
6. Discusión	-----62
6.1. Conclusiones	-----63
7. Bibliografía	-----63-67

1. Resumen

Las flores de corte como las rosas, se encuentran expuestas al ataque de plagas y enfermedades; entre ellas las ocasionadas por nematodos fitoparásitos. Una herramienta disponible para evitar pérdidas productivas y económicas de dicho cultivo, es realizando un diagnóstico fitonematológico en laboratorio; el cual tiene como objetivo identificar géneros parásitos.

Durante el proyecto se retoman los métodos tradicionales para identificar géneros parásitos los cuales implican; la extracción (Tamizado-centrifugado), montaje de ejemplares (Solución de Robbins), observación de características taxonómicas (microscopía) y finalmente la comparación frente a bibliografía especializada. Las muestras utilizadas en el proyecto corresponden a suelo de rosales provenientes del municipio de Metepec en el Estado de México (Conjunto SEDAGRO); y el proceso es realizado en el laboratorio de fitopatología del Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX).

1.1. Palabras clave:

Nematodos, Fitoparásitos, Microscopía, Rosal

1.2. Justificación

Los cultivos agrícolas se encuentran expuestos a daños, enfermedades y pérdidas del terreno cultivado; efectos ocasionados por agentes de tipo biótico o bien del tipo abiótico. Para algunos autores como Fernández, López, Ortiz y Yruela (2017) los daños generados en los cultivos producidos por agentes bióticos o del tipo parasítico adquieren carácter de plaga; cuando un grupo de animales fitófagos devoran un determinado cultivo produciendo pérdidas económicas. Además consideran que la enfermedad produce alteraciones en la morfología o fisiología



de las plantas por acción de cualquier agente, ya sea de origen parasítico o no. Un ejemplo de plaga parásita son los denominados nematodos fitoparásitos.

Sin embargo, es importante considerar que el suelo es un microambiente que alberga diferentes microorganismos que son benéficos para la planta (como la bacteria *Rhizobium* fijadora de nitrógeno) y otros como los nematodos fitoparásitos que le resultan perjudiciales. Retomando lo anterior CSRservicios (2015) determina que no existe suelo sin nematodos (debido a que algunos son de vida libre); sin embargo para causar daños requieren encontrarse dos condiciones: la existencia de un elevado número de nematodos fitoparásitos y que las especies de plantas sean susceptibles a los ataques de los mismos. Consideran también que las condiciones ambientales favorables para la prevalencia de nematodos fitoparásitos son: suelos con cultivo, arenosos y húmedos siendo por tanto sensibles a la sequía y a la falta de cultivo.

El rosal es susceptible a ser invadido por plagas de nematodos fitoparásitos; lo cual adquiere relevancia económica debido a que la producción de dichas plantas está sujeta a la importación o exportación. Este último punto repercute en la producción de floricultora; ya que las plantas infectadas con nematodos según Ortuño y Oros (2002) no son permitidas para la exportación, por el peligro inminente de diseminación de nematodos fitoparásitos. Los mismos autores consideran que es precisamente el medio más frecuentemente utilizado para la producción de flores ornamentales o propagación vegetativa; la forma más eficiente para la diseminación de esta plaga en concreto.

Es de relevancia para el siguiente trabajo identificar el contexto de plaga de nematodos fitoparásitos; al contrastar la diversidad de especies de nematodos y sus repercusiones económicas. Como lo consideran Guzmán, Cataño y Villegas (2012): debido a que se conocen alrededor de 4.105 especies de nematodos fitoparásitos, las cuales causan pérdidas anuales entre 11 y 14%, equivalentes a US\$80.



Más aún la diversidad de géneros y especies de nematodos fitoparásitos impulsa la búsqueda de métodos y técnicas para un diagnóstico nematológico, lo cual tiene como finalidad: la extracción e identificación de ejemplares para la preservación fitosanitaria. La forma habitual de identificación taxonómica de nematodos implica un reconocimiento utilizando caracteres morfológicos determinados de manera cualitativa y cuantitativa por medio de técnicas microscópicas. Además existen protocolos moleculares fundamentados en PCR (reacción en cadena de la polimerasa) que facilitan la diagnosis específica (Curran y Robinson, citados por Andrés y Verdejo, 2011). Sin embargo, actualmente los métodos tradicionales y moleculares deben tener carácter complementario según lo considerado por Andrés y Verdejo (2011); ya que la falta de una adecuada documentación o descripción del material descrito dificulta la interpretación de resultados obtenidos a partir de determinadas secuencias de ADN....Por tanto el manejo del microscopio y el conocimiento de la terminología morfométrica en que se basan la mayoría de las claves de identificación taxonómica de nematodos sigue siendo necesaria.

Para Hernández, Del Vallín y Hernández (2016) el diagnóstico nematológico constituye una herramienta útil para conocer el tipo y la cantidad de nematodos fitoparásitos en el suelo antes de sembrar o establecer determinado cultivo, a fin de adoptar medidas preemergentes; cuando se detectan poblaciones por encima de los niveles que causan daño económico. Por esa razón, el análisis de campo y laboratorio proporciona la ventaja de prevenir con medidas necesarias de control al suelo con un ahorro en el costo de la estrategia de manejo.

Es de resaltar lo descrito por González, 1976 y Sosa-Moss, et al., 1996 sobre la importancia de las poblaciones de nematodos fitoparásitos; debido a que la producción vegetal disminuye conforme aumentan las densidades de dichos parásitos en el suelo. Es decir, que en algunas especies vegetales se observarán pérdidas pequeñas en la producción a densidades menores de 10 nematodos por



g de suelo (límite de tolerancia) y las pérdidas mayores se presentan conforme las densidades de nematodos fitoparásitos aumentan (umbral económico). Retomando el enfoque de CSrservicios, 2015 tanto el límite de tolerancia como el umbral económico dependen; de las condiciones agronómicas y ambientales, por lo cual consideran que el éxito de un sistema predictivo estará supeditado a la existencia de datos locales sobre las pérdidas por nematodos. Sin embargo actualmente se desconoce tanto el límite de tolerancia como el umbral económico de muchas especies vegetales; por lo cual es necesario en principio conocer los géneros fitoparásitos asociados a cada especie vegetal (González, 1976; Sosa-Moss, et al., 1996).

El Estado de México es el principal productor de flor de corte en el país debido a que aporta el 80% de la producción para exportación; de la cual el municipio de Villa Guerrero contribuye con un 56% (Gomora-Jiménez citado por Tejeda-Sartorius, Ríos-Barreto, Trejo-Téllez y Vaquera-Huerta 2015). Los datos anteriores impulsan protección fitosanitaria regional utilizando un diagnóstico nematológico en flores de corte como el rosal.

Fue pertinente para este trabajo, utilizar como análisis previo los datos emitidos por el laboratorio de fitopatología del ICAMEX sobre el diagnóstico de nematodos fitoparásitos encontrados en suelo de rosales de invernaderos del CITT Rancho La Paz y Rancho El Islote ubicados en el municipio de Villa Guerrero. Además de ejecutar técnicas tradicionales de diagnóstico nematológico sobre suelo de rosales en cultivo abierto del Conjunto SEDAGRO, ubicado en el municipio de Metepec, Edo. Méx. Estos dos últimos puntos con la finalidad de tener una comparación formal sobre géneros de nematodos fitoparásitos que prevalecen en condiciones de invernadero y en cultivo abierto.



2. Marco teórico

2.1. Enfermedad en cultivo

Para Rivera-Coto (2007) el término enfermedad en cultivo es la alteración morfológica o fisiológica de la planta causada por acción de microorganismos patógenos, condiciones ambientales adversas o una acción complementaria de diversos factores. Para Riveros-Angarita (2010) dicha alteración puede ser originada por componentes de origen abiótico como factores climáticos (temperatura, humedad relativa o iluminación), edáficos (aireación, contenido de nutrientes, pH, salinidad, desfavorable, contaminantes) y atmosféricos (luz U.V., ozono, partículas de impurezas y contaminantes químicos). A su vez las plantas pueden desarrollar enfermedades del tipo biótico; cuando son invadidas por microorganismos fitopatógenos como: hongos, bacterias, virus, viroides, fitoplasmas y nematodos (Riveros-Angarita, 2010).

Guzmán-Piedrahita, et al. (2011) considera a la enfermedad como resultado de la interacción dinámica entre un patógeno virulento, un hospedante susceptible y un medio ambiente favorable la cual, causa en los hospederos cambios anormales de tipo fisiológico y morfológico. Dicha interacción es denominada por autores como Riveros-Angarita (2010) como el triángulo de la enfermedad. Donde si alguna de las tres condiciones no interacciona de manera específica la enfermedad no se produce: ya que el patógeno no podrá invadir o colonizar los tejidos del hospedante. Además de que la vulnerabilidad del hospedante está relacionada a su reservorio genético: lo cual determina la aptitud de hospedar determinado patógeno. Acentuándose en condiciones ambientales como: deficiencias nutricionales, compactación del suelo y toxicidad a cualquier factor inanimado (Rivera-Coto, 2007).



2.2. Signos y síntomas de enfermedad en plantas

Es importante resaltar que independientemente del origen de la enfermedad, las plantas expresan síntomas del tipo: morfológico o externo, histológico o interno y fisiológico, es decir que en determinadas especies vegetales la enfermedad es fácilmente identificable y en otras se encuentran en los tejidos internos de difícil acceso para su detección. (Rivera-Coto, 2007).

Según Rivera-Coto (2007) indica como síntomas morfológicos del tipo: necróticos (halos amarillos, acuosos, marchitez), hipoplásticos (enanismo, crecimiento en roseta, clorosis) e hiperplásticos (tumores, callos, enrollamiento). En cuanto a los histológicos señala los necróticos (vacuolosis, plasmólisis, citólisis) y plásticos (hiperplasia e hipertrofia). Por su parte los fisiológicos implican: la reducción o incremento de la respiración, aumento de transpiración, síntesis excesiva de hormonas y precursores, inmovilización de nutrientes, reducción de fotosíntesis por la pérdida de clorofila, área foliar o bloqueo del proceso fotosintético.

2.3. Patogenicidad y parasitismo

Retomando la definición de patogenicidad de Arauz- Caballini (2010) se tiene que es la capacidad de un organismo para causar enfermedad. Lo anterior tiene como requerimiento la relación de dos especies; donde el parasito se alimenta y absorbe nutrientes del hospedante por períodos prolongados, o bien utiliza directamente las sustancias elaboradas por el hospedante. Específicamente a los parásitos de las plantas se les denomina fitoparásitos.

Es debido a un proceso evolutivo particular que los diferentes géneros y especies de agentes patógenos han podido desarrollar estrategias y mecanismos que les permiten utilizar las sustancias elaboradas, en los procesos metabólicos de la planta. Y es que para acceder a los tejidos y nutrirse de ellos, se requiere primero vencer las barreras del organismo vegetal; lo cual se logra mediante fuerzas mecánicas y en la mayoría de los casos al utilizar compuestos químicos



(enzimas). Cabe aclarar que no todos los patógenos tienen la capacidad para ejercer fuerza sobre la superficie vegetal: solo los nematodos, plantas parásitas y algunos hongos pueden lograrlo mediante estructuras especializadas (Rivera-Coto, 2007).

Es necesario considerar que los patógenos pueden ser muy específicos en su ataque para determinada especie vegetal, o bien tener una amplia gama de hospederos; es decir que incluyen plantas de diversos grupos taxonómicos. Además de que el desarrollo de los patógenos puede darse solo en determinadas partes del vegetal: tallos, raíces, hojas, frutos carnosos y tejidos. Son los denominados parásitos obligados o biotróficos los que son muy específicos en cuanto al hospedante (evolución paralela) siendo el desarrollo de su ciclo de vida únicamente en el tejido vivo del huésped. Por su parte los parásitos no obligados tienen una amplia gama tanto de hospedantes, sitios y estadios de desarrollo para ejecutar su ataque, además de que producen tóxicas y enzimas no específicas que alteran procesos y bioquímica metabólica del vegetal. Son los parásitos facultativos o necrotróficos los que atacan plantas previo a su colonización (Cadenas, 2011).

2.4. Ciclo de la enfermedad.

Un agente patógeno manifiesta diferentes formas de ingresar y permanecer en el vegetal, concepto conocido como ciclo de enfermedad. Este último consta de una serie de fases, las cuales varían de acuerdo a las características morfológicas o adaptaciones evolutivas al ambiente por parte del patógeno para lograr instalarse y comenzar la colonización e inducir la enfermedad en la planta. La ilustración número tres muestra las etapas generales que permiten el ingreso y permanencia del patógeno en un hospedante vegetal (Cadenas, 2011).

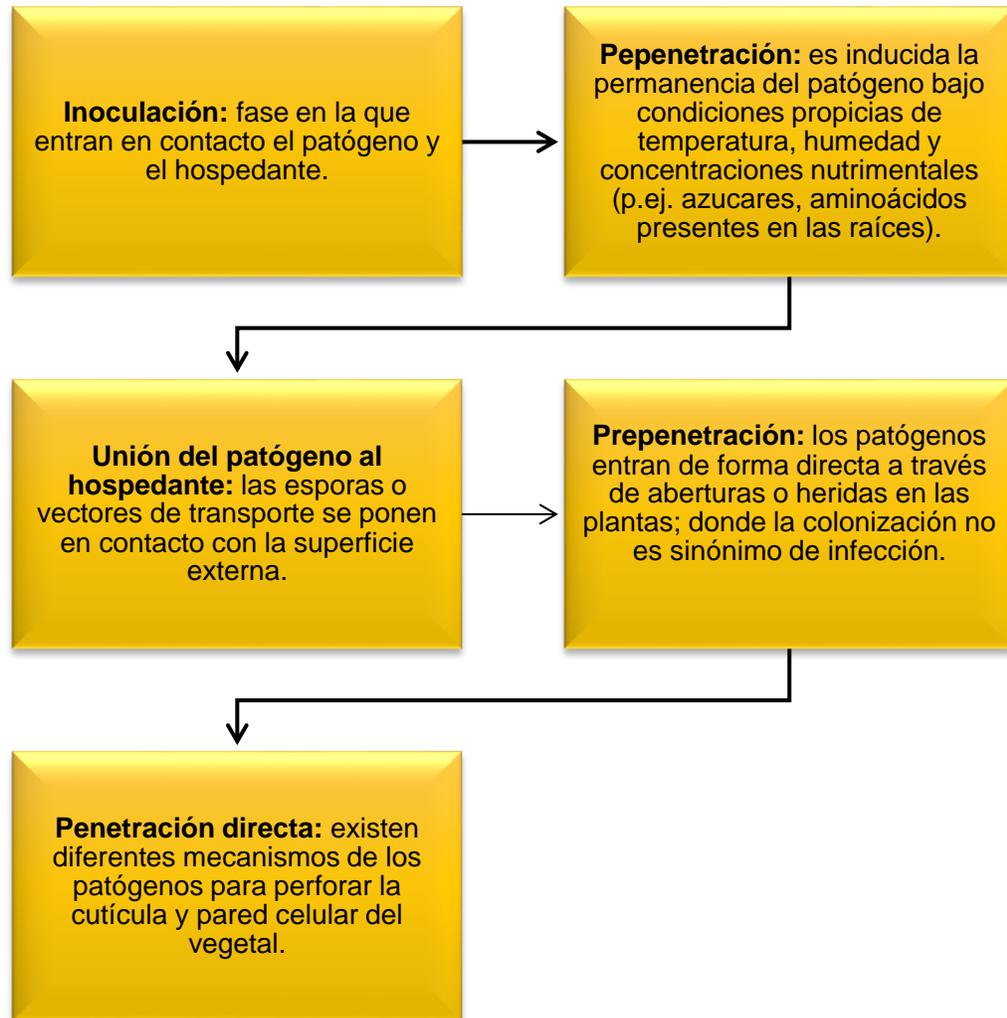


Ilustración 1. Ciclo de la enfermedad. Fuente: Elaboración propia con base en Cadenas, 2011.



2.5. Nematodos: generalidades

Los nematodos son organismos pluricelulares, clasificados dentro del reino animal, de aspecto morfológico filiforme, casi traslucido, y de tamaño variable (algunos solo son visibles en microscopio). La variabilidad del tamaño de estos organismos se relaciona a sus hábitos alimenticios. Además cuentan con adaptaciones evolutivas que les permiten proliferar en diferentes ambientes: encontrándose frecuentemente en medios acuáticos (aguas dulces o saladas) y el suelo o bien estableciendo relaciones del tipo parasítico en vegetales, animales y del ser humano. Sin embargo la mayoría son de vida libre; es decir que no causan daño ni a plantas ni animales (Peña-Sánchez y Páez-Mendieta, s.f.; Agrios, 2002). Son los nematodos fitoparásitos a los que se hace énfasis en este trabajo.

2.6. Caracterización de nematodos fitoparásitos

2.6.1. Morfología y anatomía

El tamaño de los nematodos que habitan el suelo, incluyendo a los géneros fitoparásitos es de alrededor de 0.2 a 1mm. Su cuerpo es de apariencia lisa, no se encuentra segmentado y está cubierto por una cutícula incolora, estriada e impermeable la cual presenta mudas (los nematodos la cambian en las etapas larvarias sucesivas). Dicha cutícula contiene debajo una capa muscular que le confiere movilidad al nematodo. El cuerpo de los nematodos se encuentra constituido por un tubo alargado y aguzado en los extremos: este tubo es atravesado a lo largo por un canal digestivo en el que se diferencian: cavidad bucal, esófago, intestino y ano. Por su parte la cavidad del cuerpo contiene líquido que a nivel funcional le permite al nematodo la circulación y respiración (González, 1976; Agrios, 2002).

Tanto el macho y la hembra de nematodos son muy similares, siendo el primero ligeramente más pequeño que la hembra. En los nematodos fitoparásitos sedentarios si existe diferencia morfológica entre ambos sexos; ya que la hembra



se localiza en un área de la raíz del hospedante y se ensancha hasta adquirir una forma esférica, de limón, o de pera, sin embargo los machos siempre conservan la forma alargada de gusanos. En el estado adulto las hembras y los machos son fácilmente apreciados en el microscopio compuesto debido a su aparato reproductor. Las hembras poseen uno a dos ovarios seguidos por un oviducto y útero que finaliza en vulva. Mientras que la estructura reproductora del macho es semejante a la hembra; pero está constituida por un testículo, vesícula seminal que termina en un orificio común con el intestino. Además en el macho existen un par de espículas copulatorias sobresalientes (González, 1976; Agrios, 2002).

Una característica que solo poseen los nematos fitoparásitos es una estructura hueca localizada en la región anterior (cabeza) denominada estilete. Este último les permite perforar o penetrar células vegetales y extraer nutrientes causando enfermedades en los agroecosistemas (Peña-Sánchez y Páez-Mendieta, s.f.). Con respecto a la característica morfológica más representativa de los nematodos fitoparásitos (estilete) Guerrero (2007) considera que como todos los organismos, su variabilidad morfológica depende de las adaptaciones a su medio de alimentación y al aislamiento reproductivo.

2.6.2. Ecología y distribución.

Para Guzmán-Piedrahita, et al., (2012) las estrategias evolutivas desarrolladas por los nematodos les permitieron abarcar un amplio hábitat migratorio: el cual comprende ectoparásitos, semi-endoparásitos y endoparásitos. Esto último debido a que los nematodos fitoparásitos pueden localizarse en yemas, hojas y tallos de la planta (parte aérea); sin embargo es la rizosfera el principal hábitat para la mayoría de ellos (González, 1976; Rivera-Coto, 2007).



Cuando los nematodos utilizan la parte exterior de la raíz para alimentarse se denominan ectoparásitos, teniendo como característica morfológica predominante un estilete largo como los géneros *Hemicicliophora* sp. y *Criconemella* sp., herramienta que utilizan para perforar las células vegetales. Los nematodos semi-endoparásitos solo introducen la parte anterior de su cuerpo en la raíz mientras que la sección posterior permanece en el suelo; teniendo como géneros más representativos a *Rotylenchulus* sp. y *Tylenchulus* sp. Sin embargo el proceso de perforación de las células vegetales en cualquier género es similar. Una vez finalizada la eclosión de los nematodos estos últimos se dirigen a las raíces, utilizando una forma mecánica para mover el estilete (hacia delante y hacia atrás), o en algunos casos logran su objetivo moviendo su cuerpo de forma rotativa (Rivera-Coto, 2007).

Por su parte los nematodos que penetran totalmente la raíz, se alimentan, crecen y maduran y depositan huevos dentro de la raíz o unidos a esta son llamados endoparásitos. Estos últimos se dividen claramente en dos grupos debido a su movilidad: migratorios y sedentarios. Los primeros se introducen por completo en la raíz, cambian y se desplazan del tejido continuamente, alimentándose conforme se movilizan (Ejemplos: *Pratylenchus* sp. y *Radopholus* sp.). Los nematodos endoparásitos sedentarios tienen un sitio fijo de alimentación, pierden movilidad y adquieren forma globosa; entre los géneros más representativos se encuentran *Meloidogyne* sp. y *Heterodera* sp. (González, 1976; Rivera-Coto, 2007).

2.6.3. Ciclo de nematodos fitoparásitos en cultivo

Arauz-Caballini (1998) considera el desarrollo de una población de nematodos en cultivo involucra una serie de procesos: supervivencia, diseminación, infección, alimentación y reproducción.



Una capacidad evolutiva de supervivencia de los nematodos fitoparásitos (además de abarcar un amplio hábitat migratorio), es el de permanecer viables; pese a un ambiente desfavorable, o inclusive en ausencia de hospedero (Arauz-Caballini, 1998). Según Agrios (2002) en el caso de los nematodos sedentarios especializados, los huevecillos, etapas larvarias preparasitas y machos se encuentran en el suelo durante toda su vida o gran parte de ella. Considerando lo anterior y utilizando como base el triángulo de la enfermedad (ambiente favorable, huésped susceptible, patógeno virulento), Rivera- Coto 2007 considera que en ausencia de un hospedero susceptible, los nematodos solo forman parte de la masa del suelo; pero una vez que el cultivo es sembrado, se agregan cerca de las raíces vegetales. Es de resaltar el enfoque de Arauz-Caballini (1998) acerca de que los nematodos pueden sobrevivir periodos, meses, o semanas en estados de baja actividad metabólica: como reposo (inducido por factores ambientales) o la diapausa (inducida por factores endógenos). Además de permanecer entre siembras y en diferentes hospederos.

El proceso de diseminación puede generarse a una distancia tanto corta como larga, siendo impulsada por diversos factores. Los nematodos tienen al menos un estado móvil en su ciclo de vida, el cual les permite desplazarse distancias cortas (solo algunos centímetros por año). Pese a lo anterior dicho desplazamiento puede ser favorecido por factores como: contenido de agua en el suelo, textura, tamaño del poro y pendiente (Arauz Caballini, 1998). Y es que según Agrios (2002) los nematodos se mueven con mayor rapidez en el suelo cuando los poros de esta se encuentran llenos de una película delgada de agua (micrómetros) es decir, cuando el suelo se encuentra inundado. Además de que los huevecillos de los nematodos se incuban libremente en el agua en ausencia de cualquier estímulo especial. La diseminación local de nematodos se ve favorecida por el equipo agrícola, irrigación, agua inundada de drenaje, patas de animales y tolveras. Mientras que el esparcimiento a grandes distancias se da por transporte de suelo



(maquinaria, bolsas de vivero) o de material vegetal infectado (tubérculos, semillas, cormos, plantas de vivero) (Agrios, 2002; Arauz Caballini, 1998).

El proceso de infección y patogénesis se encuentra vinculado al inicio de alimentación del nematodo fitoparásito y por tanto al desarrollo posterior de la enfermedad en las plantas. Es decir que este último inyecta una enzima digestiva (saliva) a la planta por medio del estilete, la cual promueve un tipo de digestión extraoral: otorgando mayor fluidez, fácil ingestión y asimilación del contenido celular. Sin embargo dicho proceso alimenticio al vegetal le ocasiona debilitamiento y/o muerte celular en raíces, raicillas, puntos de crecimiento. Además genera lesiones, quiebre de tejidos, abultamientos, agallas, y distorsión en ramillas y hojas. Algunos géneros de nematodos fitoparásitos inducen hipertrofias en las plantas, las cuales desarrollan células gigantes o bien detienen el crecimiento por daño a puntos meristemáticos tanto en raíces y partes aéreas (Besoain, 1999). Por su parte Talavera-Rubia (2003) indica que el nematodo al utilizar el sistema radical para alimentarse, disminuye los mecanismos de la planta para captar y transportar nutrientes al resto de sus componentes.

Por lo anterior autores como Guzmán-Piedrahita et al., (2012) y Besoain (1999) consideran que el daño mecánico causado por los nematodos fitoparásitos es de relevancia mínima, mientras que enfatizan en que la saliva segregada durante el proceso alimenticio es la causa de enfermedades en las plantas.

Araúz-Caballini (1998) indica que el proceso reproductivo del nematodo es sexual en forma anfimíctica (involucra ambos sexos), partenogénicamente, pero nunca asexualmente. Su ciclo de vida tiene una duración de unas 3 a 4 semanas el cual corresponde a: huevo, 4 estadios juveniles (etapa donde se generan mudas previo a la etapa adulta) y adultos (estado en el cual son fácilmente identificables por la presencia de un sistema reproductor). Es importante resaltar que la primera y segunda muda se realiza dentro del huevo, del que posteriormente eclosionan y



es justo esta etapa la más infectiva en la mayoría de las especies (CSRservicios, 2015; Talavera-Rubia, 2003).

2.6.4. Factores físico-químicos esenciales para el desarrollo del nematodo en suelo

Los nematodos fitoparásitos son habitantes exclusivos del suelo, el cual se encuentra en constante cambio (Ferris et. al, 2007 citado por González- Guitrón, 2013), además se considera un microambiente en el cual pueden sobrevivir, proliferar o por el contrario desaparecer determinadas especies de organismos.

Si se considera el suelo como un sistema viable para albergar determinados géneros y especies de nematodos se deben analizar parámetros clave como: textura, contenido de humedad, capacidad de intercambio catiónico, pH y materia orgánica del mismo (González-Guitrón, 2013).

González-Guitrón, 2013 vincula el factor de humedad del suelo al aumento o disminución de poblaciones de nematodos. Especificando, que cuando la humedad del suelo disminuye la población de nematodos decrece y solo los huevos persisten en condiciones adversas. Y es que a pesar de que los nematodos no poseen órganos especializados para respirar, utilizan la cutícula para difundir y asimilar el oxígeno disponible. Además estos organismos tienen un consumo elevado de oxígeno: alrededor de 1000 ml/kg/h (Rivas, Serrano, Paniagua y Villacorta, 2002).

Otro factor que influye para el aumento de la población de nematodos es la temperatura la cual debe ser óptima para el desarrollo de determinadas especies. En el caso de los fitoparásitos se ha encontrado que se inactivan a temperaturas extremas entre 5-15° C Y 30 -40° C, siendo el óptimo de actividad de entre 15 a 30° C (Rivas, et al., 2002).



La textura de los suelos es una mezcla de arenas, limos y arcillas lo cual genera un efecto importante en la microbiota y en el movimiento de los nematodos (González-Guitrón, 2013). Es la textura Franco-arenosa la más beneficiosa para el movimiento de los nematodos; por el contrario la arcilla o muy gruesa inhibe su desplazamiento (Georgis et al.1983; Choo et al., 1995 citados por González-Guitrón, 2013). Y es que los nematodos debido a sus características filiformes pueden aprovechar la porosidad del suelo (tamaño óptimo de partícula de acuerdo a la especie) para desplazarse. Es decir que el movimiento de los nematodos se encuentra vinculado al diámetro de los poros del suelo, la cantidad de agua en el espacio poroso y al diámetro del mismo nematodo (Sasser, 1989 citado por González-Guitrón, 2013).

Con respecto al pH Vander Wal citado por Arayo-Blanco, 2008 indica que la acidez del suelo no solo influye en el desarrollo vegetal, sino también repercute indirectamente en los nematodos que se alimentan de este. Norton (1989) considera que el pH está implicado no solo en la disponibilidad de nutrientes, la sobrevivencia de las plantas y la respuesta de los nematodos; este factor también es afectado por la incorporación de materia orgánica.



2.7. Generalidades del rosal

Actualmente las rosas son una de las especies vegetales más conocidas, cultivadas y solicitadas como flor de corte; debido a su atractivo follaje, diversidad de colores y agradable aroma. Según datos de Young, 2004 la producción mundial de floricultura es de aproximadamente 190 000 hectáreas, de las cuales 4 000 se destinan solamente al cultivo de la rosa.

Pertenciente a la familia de las Rosáceas, la rosa (*Rosa spp.*) es un arbusto leñoso, el cual puede diversos tamaños, los cuales se encuentran sujetos a las múltiples variedades existentes en todo el mundo. Sin embargo pueden alcanzar de 2 a 3 metros de altura (Aguilar y Aguilar, 2008).

Por su parte la raíz se caracteriza por ser pivotante (alcanza de 1 a 2 metros la parte subterránea), y permite anclar y sostener la planta hacia el suelo. A nivel funcional le permite al vegetal extraer agua y nutrientes del suelo, acumular sustancias nutritivas y conducir las hacia el tallo (Martínez citado por Rocha-Rocha 2018).

Su tallo es de crecimiento erecto, de ramas lignificadas con espinas más o menos desarrolladas. Su coloración abarca desde verde-tintes marrón en plantas jóvenes y pardo a grisáceo en etapas adulta (Young, 2004). Las hojas que contiene el tallo tienen un número variable de folíolos, y su coloración varía de color brillante a mate (Aguilar y Aguilar, 2008; Young, 2004). Las flores sobresalen del tallo de manera individual o solitaria, y tienen un número variable de sépalos, pétalos y colores lo cual se encuentra en función a las distintas variedades (Aguilar y Aguilar, 2008).

Es resaltable la clasificación de las rosas en jardinería en tres grupos: rosas silvestres, antiguas (variedades anteriores a 1867) y modernas o posteriores a la fecha de las antiguas (Aguilar y Aguilar, 2008).



Un factor fisicoquímico importante para el desarrollo de plantas cultivadas es el pH, el cual indica el grado de acidez o alcalinidad del suelo. Considerando una escala con valor máximo de 14, un valor de 7 indica neutralidad y los valores por encima de este especifican alcalinidad. En caso de valores inferiores a 7 confirman un suelo ácido.

Garrido-Valero, 1993 confirma que las plantas cultivadas en general expresan un mejor desarrollo en valores cercanos a la neutralidad; debido a que los elementos nutritivos se encuentran más fácilmente disponibles y en un equilibrio adecuado. Por otro lado en un suelo excesivamente ácido abundan hidrogeniones y aluminio: impidiendo que elementos como calcio, magnesio, sodio o potasio permanezcan en el (pasando a la fracción soluble y eliminados con agua de lluvia o riego).

Con respecto a los cultivos de rosales su adaptabilidad y supervivencia es en suelos de ligeramente ácidos a ligeramente alcalinos; siendo ideal que el pH se encuentre entre 6,5 y 7,5 (Rau, 2004).



2.8. Métodos de extracción de nematodos de vida libre y fitoparásitos

Actualmente existen métodos que se utilizan de manera universal para extraer nematodos de porciones de suelo y raíces de plantas para determinar si dichos ejemplares son de vida libre o fitoparásitos. Entre los métodos de extracción empleados de manera general en los laboratorios de nematología según Mcsorlen (citado por Hernández-Ochadía, Rodríguez - Hernández, Miranda-Cabrera, 2016) se encuentran: centrifugación-flotación, aparato de Fenwick, tamizado, decantación, embudo de Baerman. Además señala que los métodos de extracción están basados en utilizar las características propias de estos organismos: como tamaño de sus cuerpos, movilidad, hábitos de vida, entre otros. Especifica que los métodos de extracción deberían de remover los estados de todas las especies con 100% de eficiencia; sin embargo en la práctica rutinaria dentro del laboratorio repercutirá (en la eficiencia de los mismos): el tipo de suelo, temperatura, momento del muestreo y el tipo de cultivo seleccionado. Es de resaltar el enfoque con respecto a los métodos de extracción de Besoaim-Canales, 1999 el cual enfatiza que dichos métodos presentan un rango de eficiencia característico para cada género de nematodo. Resulta pertinente para el siguiente trabajo el mencionar las generalidades de los métodos de extracción: Fenwick, embudo de Baerman y Tamizado-centrifugado con solución azucarada.

2.8. 1. Método de Fenwick

Para Muñoz et al., 2017 la técnica utiliza como dispositivo un embudo colocado sobre una jarra trapezoidal, presenta unos soportes del embudo y una aleta que bordea la jarra el cual termina en un solo conducto. Es en el embudo que se coloca el tamiz con la muestra de suelo seca. Autores como Eck, Equiguren, Défaz, Revelo y Cedeño, 1984 señalan que el método de Fenwick tiene como fundamento que los quistes secos de nematodos flotan y la tierra mojada se precipita al fondo del tanque. Los quistes que flotan al rebotar en el tanque salen por el collar del aparato y son recolectados en tamices de 175 a 250 micras.



2.8. 2. Método de Embudo de Baerman

Esta técnica recolecta la muestra de suelo o tejido macerado dentro de una envoltura o filtro poroso, ubicada en la parte superior de un embudo lleno de agua con un cierre en la parte inferior. Una vez que han transcurrido 24 horas los nematodos presentes en la muestra migran por fuerza de la gravedad hacia la base del embudo, donde son recolectados en un vaso de precipitados para su observación. Bezcoijen citado por Hernández-Ochadía, Rodríguez - Hernández, Miranda-Cabrera, 2016 refiere que la eficiencia de dicho método es baja; pero resulta una técnica de bajo costo y poco consumo de agua.

2.8. 3. Técnica de centrifugación-flotación en solución azucarada

Para Talavera-Rubia, 2003 este método tiene como fundamento el utilizar la densidad específica; mediante centrifugaciones diferenciales en gradientes de sacarosa o sales. Para autores como Sosa-Moss, Perdomo- Roldán, Brathwaite y Salazar-Cruz, 1996 resulta un método muy preciso para extraer nematodos de muestra de suelo y órganos vegetales infestados; debido al alto porcentaje de ejemplares recuperados (vivos o muertos). Además de que es posible utilizar una submuestra más grande que resulta ser más representativa. Otras ventajas según Hernández-Ochardía et al., 2016 es que resulta favorable por el número de especímenes recuperado de suelo de tipo Ferralítico (150, 250, 350g de suelo). Mencionan además que la recuperación de nematodos es limpia lo cual permite la visualización fácil de ejemplares en el microscopio, la extracción de nematodos lentos (como Criconematidae) y de las formas inactivas.

Sin embargo considerando las desventajas del método Hernández-Ochardía et al., (2016) mencionan que la técnica debe realizarse con rapidez; debido a que los nematodos se pueden deformar y por tanto ser difíciles de identificar. Para autores como Sosa-Moss et al., (1996) uno de los dispositivos esenciales de



la técnica es la centrífuga, herramienta de costo elevado y que no se encuentra disponible en todos los laboratorios de diagnóstico fitosanitario de América Latina.

2.9. Muerte y fijación de nematodos filiformes

La solución obtenida producto de la extracción de las muestras de suelo, se somete a calentamiento para matar los nematodos presentes en la muestra. ICAMEX, 2008 resalta que el objetivo de dicho procedimiento es clave para la establecer la identidad de los nematodos. Debido a que el cuerpo de los nematodos adquiere una forma característica dependiendo del género; lo cual es muy importante en la diferenciación de los especímenes parásitos y los de vida libre. Existen técnicas diferentes para matar nematodos, como por ejemplo Echandi (1967) señala que la muerte se realice posterior a la recolección. Es decir una vez obtenido el ejemplar vivo de la solución (dentro del disco de siracusa), se coloque sobre un portaobjeto calentado sobre una lámpara de alcohol (entre 5 y 6 segundos); para inactivar y relajar al nematodo.

2.10. Aislamiento y montaje de ejemplares

Una vez finalizado el proceso de extracción de nematodos, se requiere realizar un montaje; esto implica añadir la solución extraída a un disco de Siracusa, capturar uno a uno los nematodos con la ayuda de una ajuga de disección y colocarlos sobre una preparación microscópica la cual puede utilizar desde glicerina hasta solución Robbins (Echanti, 1967; ICAMEX, 2018).

Corney, Nicol y Claudius-Cole (2007) señalan que existe diversidad de utensilios para capturar o pescar nematodos como; alfiler fino de los utilizados para insectos, una astilla de bambú, una pestaña o cerda de pincel fino pegada al extremo de una aguja enmangada, un palillo de dientes afilado o la parte central de una pluma



de pájaro. Además recomiendan para facilitar la técnica localizar el nematodo y levantarlo son delicadeza, dirigirlo hacia fuera del agua; procurando que el nematodo quede en la punta del instrumento seleccionado para la captura.

Debido a la naturaleza translúcida de los nematodos (se ve a través de ellos) es difícil identificarlos a simple vista; por lo cual la observación con luz transmitida colocada debajo de la platina de una lupa binocular ayuda visualizarlos. El microscopio estereoscópico permite visualizar, recolectar e identificar los nematodos en la solución acuosa; siempre y cuando se ajuste el objetivo del mismo para mantener enfocado el ejemplar (Corney, Nicol y Claudius-Cole, 2007). Para ejecutar el proceso de montaje Echanti (1967) recomienda utilizar una gota de glicerina dispuesta sobre el centro de un portaobjetos e ir transfiriendo los nematodos del mismo diámetro a dicha gota. Posteriormente indica que se requiere colocar tres varillas de vidrio (de diámetro mayor al de los nematodos) las cuales sirven como soporte del cubreobjetos que cubre la gota que contienen a los nematodos recién capturados. Para sellar la preparación señalan que debe realizarse con zut coloreado.

2.11. Identificación preliminar de nematodos fitoparásitos

Los nematodos fitoparásitos en su mayoría exhiben un aspecto filiforme (de entre 0,1 y 3mm), y al ser vistos en microscopio lucen traslucidos. Es decir que se puede ver a través de ellos los órganos que los conforman (sin membranas), envueltos en una cavidad pseudocelómica y carentes de sistema respiratorio y circulatorio (Rivas, Sermeño, Paniagua y Villacorta, 2002).

Para comenzar el reconocimiento de los órganos que integran el cuerpo del nematodo es necesario ubicar la cabeza y la cola del nematodo (ilustración 2). Posteriormente dividir de manera imaginaria su cuerpo en dos partes iguales, donde de la cabeza hacia la mitad del cuerpo corresponde a la parte anterior y de la mitad del ejemplar hacia la cola se denomina parte posterior. Es en la región cefálica donde se encuentra la característica que define la identidad de los

nematodos fitoparásitos denominada estilete. Dicha estructura termina en nódulos basales (los cuales permiten el movimiento del estilete). Tanto el estilete como los nódulos basales en algunos géneros de nematodos fitoparásitos se encuentran de manera muy acentuada y en otros casos son elementos ligeramente visibles. (Avena-Arambul, et al., 2016; Rivas et al., 2002). En la ilustración número 3 nos muestra cómo se encuentra conformado un nematodo fitoparásito hembra desde su región anterior (estilete, procorpus, metacorpus, anillo nervioso, poro excretor, glándula esofágica) hasta la parte posterior (oviducto, espermateca, útero, vulva y cola).

Es posible diferenciar los estadios juveniles de la etapa madura en los nematodos; debido a que la vulva en la hembra, la espícula del macho y el ano son visibles únicamente en adultos; siendo estos criterios utilizados para la clasificación. Algunas especies presentan dimorfismo sexual; donde la hembra muestra una apariencia globosa y el macho es siempre vermiforme (Rivas et al., 2002).

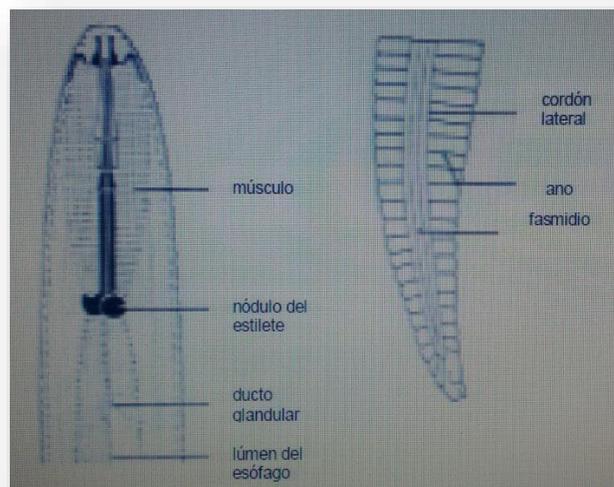


Ilustración 2. Morfología y anatomía de la parte anterior (cabeza) y posterior (cola) de nematodos tomada del Manual técnico: nematodos asociados a limón pécrico y otros cítricos en Fincas de el Salvador de Rivas. Sermeño, Paniagua y Villacorta, 2002.

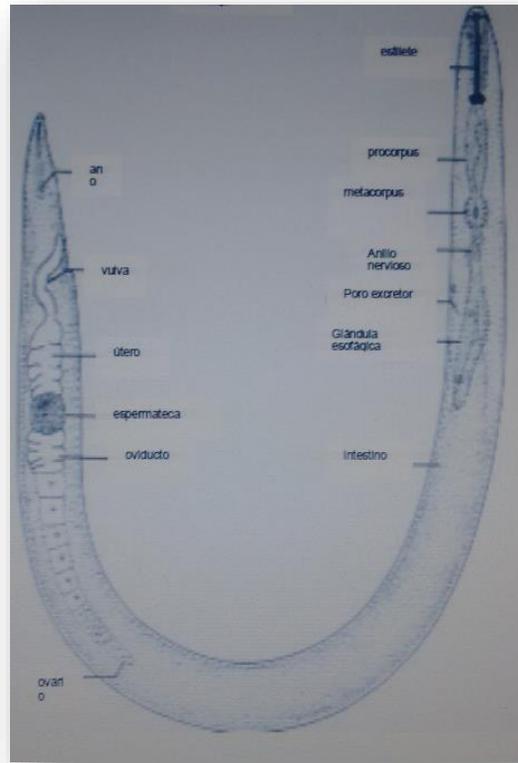


Ilustración 3. Morfología y anatomía completa de un nematodo fitoparásito tomada del Manual técnico: nematodos asociados a limón pèrsico y otros cítricos en Fincas de el Salvador de Rivas, Sermeño, Paniagua y Villacorta, 2002.



2.12. Géneros fitoparásitos relevantes

Según datos de Arauz-Caballini (1998) se reconocen poco más de cien géneros de nematodos fitoparásitos. Con respecto a la clasificación taxonómica Rivera-Coto describe que los nematodos fitoparásitos se encuentran agrupados en tres órdenes principales: Aphelenchida, Tylenchida y Dorylaimida. El mismo autor señala que es el orden Tylenchida el que contiene el mayor número de géneros y especies parásitas y el de mayor relevancia a nivel económico. Arauz-Caballini (1998) considera que las diferencias entre familias se basan en características morfológicas tales como: región cefálica, fusión del procorpus con el metacorpus, presencia de uno o más ovarios, tipo de traslape entre esófago e intestino, tipo de estilete, forma de la hembra, profundidad de anillos cuticulares y presencia del ducto de la glándula esofágica dorsal en procorpus.

Rivera-Coto (2007) remarca que existen 10 géneros de nematodos fitoparásitos de importancia mundial: *Meloidogyne* sp., *Pratylenchus* sp., *Heterodera* sp., *Ditylenchus* sp., *Globodera* sp., *Tylenchulus* sp., *Xiphinema* sp., *Radopholus* sp., y *Helicotylenchus* sp. Para INTA, 2018 entre los géneros más representativos de nematodos fitoparásitos que se encuentran para el sistema radicular *Meloidogyne* sp. (nematodo del nódulo de la raíz), *Nacobbus* sp. (falso nematodo del nódulo de la raíz) y *Pratylenchus* sp. (nematodo de la lesión radicular). Por su parte considera nematodos quiste a *Heterodera* sp. y *Globodera* sp. y especifica con respecto al tallo al nematodo *Ditylenchus* sp. Y basándose en una peculiaridad morfológica señala a *Xiphinema* sp. (nematodo daga), *Rotylenchulus* sp. (nematodo reniforme), y *Helicotylenchus* sp. (nematodo espiral).

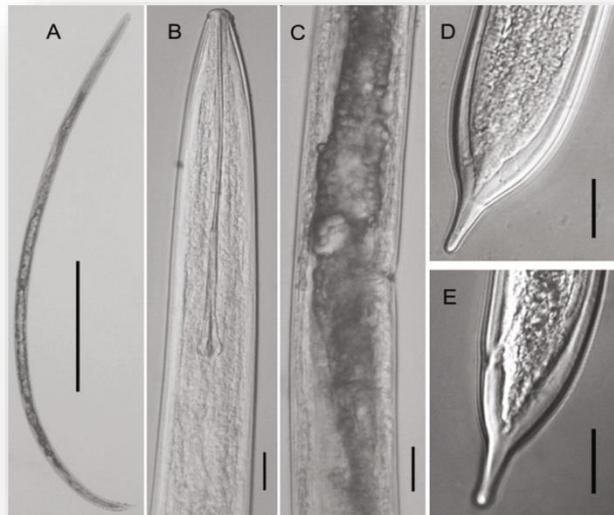
2.12. 1. Nematodos parásitos del rosal.

Para Monrroy-Rojas (2010) los nematodos fitoparásitos que atacan el cultivo del rosal son: *Meloidogyne* sp., *Pratylenchus* sp., *Xiphinema* sp., los cuales penetran e invaden sus raíces. En específico considera que *Meloidogyne* sp. y *Xiphinema* sp. generan un hinchamiento o agallas de la raíz debido a las alteraciones del metabolismo de los compuestos hormonales (dentro o fuera de las agallas). Y menciona que *Pratylenchus* sp. causa lesiones de la raíz visualizadas como áreas pigmentadas con células muertas.

Por su parte la Fundación PRODUCE Chiapas, a. c., 2016, reconoce 4 especies de nematodos fitoparásitos identificados en la rosa: *Meloidogyne hapla* (Ilustración 4), *Xiphinema diversicaudatum* (Ilustración 5), y de lesión señala a *Pratylenchus penetrans* (Ilustración 6) y *Pratylenchus vulnus*. A continuación son presentadas las fotomicrografías de los últimos tres nematodos fitoparásitos anteriormente señalados.



Claire, E. (2016). *M. hapla* [Ilustración 4]. Recuperado de <http://blogs.cornell.edu/pethybridgelab/pre-pant-risk-of-root-knot-nematode-to-potato-and-carrot/m-hapla/>



Zeng, Y., Ye, W., Zhang, Z., Sun, H, Yong, L., Huang, Y. Zhao, K., Liang, H., Kern, J. (2016). Morphological and molecular characterization of *Xiphinema* species from Shenzhen, China. [Ilustración 5]. Recuperado de <https://content.sciendo.com/view/journals/helm/53/1/article-p62.xml>



Departament of Primary Industries and Regional Development. *Pratylenchus penetrans*: a horticulturally significant root lesion nematode. [Ilustración 6]. Recuperado de <https://www.agric.wa.gov.au/carrots/pratylenchus-penetrans-horticulturally-significant-root-lesion-nematode>



2.13. Análisis previo de identificación de nematodos fitoparásitos en condiciones de invernadero.

2.13. 1. Material de estudio

El laboratorio de fitopatología de ICAMEX durante el periodo de junio-agosto de 2018 realizó el diagnóstico de nematodos fitoparásitos, utilizando como material de estudio 20 muestras de suelo de cultivo de rosales establecidos bajo condiciones de invernadero dentro del CITT Rancho La Paz y CITT Rancho El Islote (ubicados en el municipio de Villa Guerrero, Edo. Méx.). De las 20 muestras 4 corresponden a CITT Rancho La Paz y 16 al Rancho El Islote

2.13. 2. Área de estudio

Según datos del INEGI, 2009 el municipio de Villa Guerrero tiene un clima templado y una temperatura de entre 6 a 22°C. Por su parte las condiciones de invernadero del cultivo del rosal requieren conservar una temperatura ambiente de entre 18 a 21°C. Dentro del invernadero del CITT Rancho La Paz y 16 CITT Rancho El Islote la recolección de muestras se realizó mediante un muestreo aleatorio de diferentes variedades de rosa, donde la edad de los cultivos ronda aproximadamente 4 años. Dicha recolección de muestras se realizó durante los meses de junio, julio y agosto del 2018.

Dentro de las variedades de rosas que se cultivan en el invernadero “Rancho La Paz” destacan: Grandeza, Pureza, Coral. Por su parte en “Rancho El Islote” se cultivan variedades como: Vendella, Could Water, Prow, Hummer, Caricia, Abnesia y Nautica.

2.13. 3. Resultados obtenidos

Se encontraron 8 géneros de nematodos fitoparásitos asociados al cultivo de rosa en los invernaderos del CITT Rancho La Paz y CITT Rancho El Islote En el primero se encontraron presentes: *Tylenchus sp.*, *Aphelenchus sp.* , *Meloidogyne*

sp y *Helicotylenchus* sp. Por su parte en “Rancho El Islote” se emitió diagnóstico positivo a nematodos fitoparásitos los géneros: *Criconemoides* sp., *Ditylenchus* sp., *Tylenchus* sp., *Thilenchorynchus* sp., *Aphelenchus* sp. , *Meloidogyne* sp., *Helicotylenchus* sp. y *Hemicyclophora* sp.

A continuación se presentan las características morfológicas de los géneros fitoparásitos encontrados.

2.13.3.1. Características morfológicas del género de nematodo fitoparásito: *Aphelenchus* sp.

Según Espinosa, Fuentes, Jaraba y Lozano (2004) este nematodo exhibe un cuerpo cilíndrico, el bulbo esofágico desarrollado el cual ocupa tres cuartas partes del ancho del cuerpo, el estilete carece de nódulos. Por su parte mencionan que las hembras tienen cola con fasmidios terminales y los machos poseen una espícula ligeramente arqueada. Para Avena-Arambul, Ceceña-Durán, González-Mendoza, Grimaldo-Juárez y Durán-Hernández, 2016 enfatizan en que este género tiene el bulbo medianamente grande y muy redondeado como se hace evidente en la ilustración 7(A).



Ilustración 7. Fotomicrografía de la estructura de nematodo fitoparásito *Aphelenchus* sp donde se aprecia la cabeza (A) y cola (B) de la colección del laboratorio de fitopatología del ICAMEX, 2018.

2.13.3.2. Características morfológicas del género de fitoparásito: *Tylenchus* sp.

Entre las características morfológicas más representativas de este ejemplar se encuentra un estilete delgado y pequeño Avena-Arambul, et al., (2016). En cuanto a las hembras señalan que la vulva de las hembras se encuentra entre 55 y 60% de la parte anterior de la cabeza. Para Espinosa, et al., (2004) los machos presentan bursa conspicua y cola filiforme. En la ilustración 8 se hacen evidentes dichas características morfológicas.

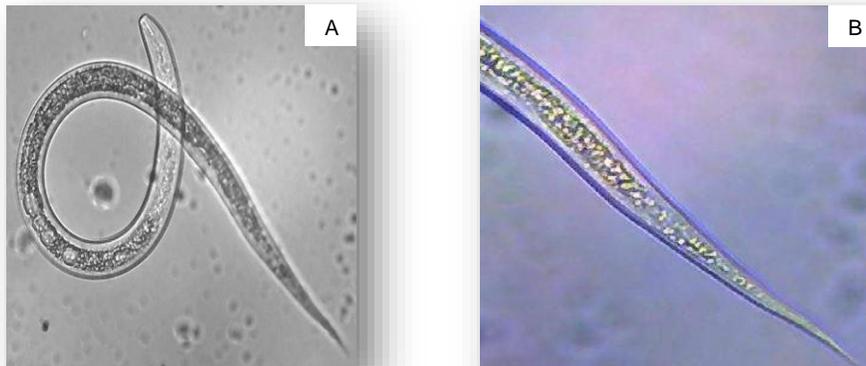


Ilustración 8. Fotomicrografía del cuerpo completo de un fitoparásito *Tylenchus* sp. (A) y de la cola (B), de la colección del laboratorio de fitopatología del ICAMEX, 2018.

2.13.3.3. Características morfológicas del género de fitoparásito: *Helicotylenchus* sp.

La caracterización morfológica de este género para Espinosa, et al., (2004) es claramente identificable debido a que su cuerpo adquiere una forma de espiral cuando se encuentra en reposo cómo es posible visualizar en la ilustración 9 (A). Señalan que la región labial es redondeada o anteriormente aplanada o truncada y estilete es moderadamente largo. Con respecto a las hembras señalan que la vulva está localizada posterior al punto medio del cuerpo, la cola es redondeada o casi puntiaguda.



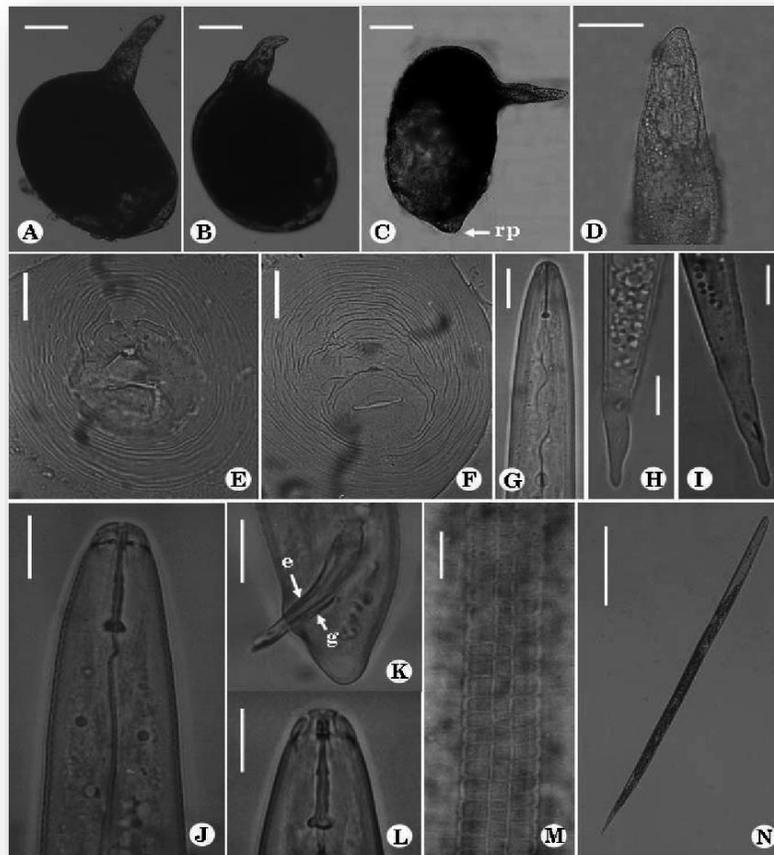
Ilustración 9. Fotomicrografía del cuerpo completo de un fitoparásito *Helicotylenchus sp.* obtenido de una preparación temporal realizada dentro del laboratorio de fitopatología del ICAMEX (2018). La muestras de suelo de rosas es proveniente de Villa Guerrero, Edo. Méx. en condiciones de invernadero.

2.13.3.4. Características morfológicas del género de fitoparásito:

Meloidogyne sp.

Las hembras de este género son identificables debido a que tienen un cuerpo redondo en forma de pera (fácilmente visibles en la etapa madura) y cuello prominente. La región de la cabeza no se encuentra separada del cuello. Contienen anillos de la cutícula en la región de la cabeza y la parte posterior (patrón perineal). El patrón perineal es utilizado para establecer la especie de *Meloidogyne sp.* (Castillo-Marroquín, 2014; Rosas-Hernández, 2015). Para Rosas-Hernández (2015) en los machos se visualiza un cuerpo piliforme, disco labial alto y redondeado. Este último se encuentra fusionado con los labios medios formando una región labial alargada y ligeramente separada del cuerpo. Su estilete es fuerte, cono recto y agudo, columna cilíndrica, los nódulos son alargados redondeados y separados de la columna. Además presentan uno o dos testículos, espículas arqueadas, cola corta y redondeada. Según la ilustración

número 10 de Medina, Renato, Perichi y Jáuregui (2011) muestra al nematodo fitoparásito de *Meloidogyne salasi*. Para lo cual ubica a la hembra en las letras A,B,C: Cuerpo entero (rp=región perineal); D: región anterior; E,F: Patrones perineales. Juvenil de segundo estadio. G: Región anterior; H,I: Cola; N: Cuerpo entero. Macho. J: Parte anterior; L: Región cefálica; K: Extremo posterior (e=espículas, g=gubernáculo); M: Campos laterales con aerolación (Barras en A,B,C,N = 100 μ m; en D = 50 μ m, en E,F 20 μ m; en G,H,I,J,K,L,M = 10 μ m).



Medina, Renato, Perichi y Jáuregui. (2011). *Meloidogyne salasi* (nematoda: meloidogynidae) en arroz en Venezuela [Ilustración 10]. Recuperado de https://www.researchgate.net/figure/Meloidogyne-salasi-Hembra-A-B-C-Cuerpo-entero-rpregion-perineal-D-region_fig1_269101634

2.13.3.5. Características morfológicas del género de fitoparásito:

***Criconemoides* sp.**

Este ejemplar de fitoparásito tiene como característica representativa para Taylor (1971): grandes anillos en las hembras y larvas, y pequeños en machos alrededor de su cuerpo como se hace evidente en la ilustración número 11. Menciona que el estilete es de tamaño mediano y que frecuentemente hace falta en machos. La vulva de la hembra se encuentra cerca de la parte posterior del cuerpo con anillos modificados en la abertura. La cola es de redondeada a puntiaguda en las hembras.



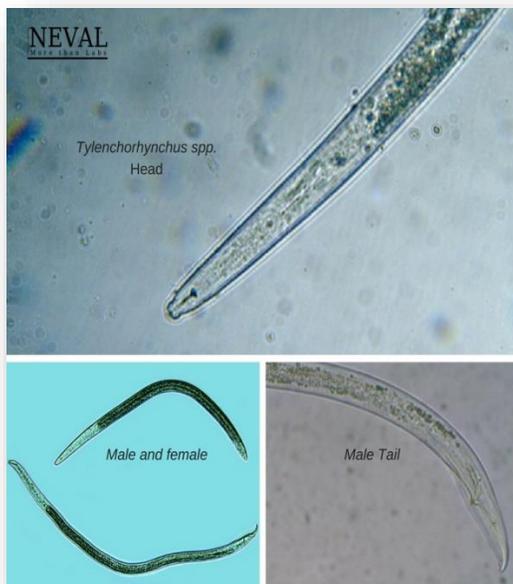
Ilustración 11. Fotomicrografía del cuerpo completo de un fitoparásito *Criconemoides* sp obtenido de una preparación temporal realizada dentro del laboratorio de fitopatología del ICAMEX (2018). La muestra de suelo de rosales es proveniente de Villa Guerrero, Edo. Méx. en condiciones de invernadero. Elaboración propia

2.13.3.6. Características morfológicas del género de fitoparásito:

***Thylenchorynchus* sp.**

Considerando la descripción de Rivas et al., 2002 este género contiene un estilete bien desarrollado, el cual disminuye anteriormente de forma acicular y no de forma tubular como es visible en la primer imagen de la ilustración número 12. Mencionan que los nódulos basales pueden ser redondeados o con la parte anterior en forma de copa. Indican que la cola es cilíndrica conoide. Por su parte las hembras contienen campos laterales de entre 2 o 5 líneas, una región labial

redondeada y separada por una constricción leve o continua en el cuerpo. De los machos remarcan que las espículas y la cola se encuentran ligeramente arqueadas y cubiertas por bursa.



NEVAL (2017). Daños provocados por *Tylenchorhynchus* spp. [Ilustración 12]. Recuperado de <http://www.ne-val.com/danos-provocados-tylenchorhynchus-spp/>

2.13.3.7. Características morfológicas del género de fitoparásito: *Hemicycliophora* sp.

Para Taylor (1971) el cuerpo de estos fitoparásitos se encuentra cubierto por una vaina semejante a una cutícula en vías de muda, carente en machos como se muestra en la ilustración número 13 (de la región cefálica del nematodo). El estilete es delgado, alargado y con bulbos basales bien desarrollados en las hembras, y ausente en machos. La vulva en las hembras de este género se encuentra situada en el cuarto posterior del cuerpo. La cola varía entre hembras y machos, donde las primeras puntiaguda a truncada y redondeada, mientras que en los segundos es cónica, puntiaguda y frecuentemente de longitud igual a varias veces la anchura de la región anal. Los machos presentan espículas grandes y curvadas y una aleta casi al final del cuerpo.



Ilustración 13. Fotomicrografía del cuerpo completo de un nematodo fitoparásito *Hemicycliophora* sp obtenido de una preparación temporal realizada dentro del laboratorio de fitopatología del ICAMEX (2018). La muestra de suelo de rosal utilizada es proveniente de Villa Guerrero, Edo. Méx. en condiciones de invernadero. Fuente propia.

3. Hipótesis

Un diagnóstico fitonematológico utilizando métodos tradicionales permitirá identificar géneros de nematodos fitoparásitos presentes en muestras de suelo de rosal.

3.1 Objetivo general

Determinar mediante un diagnóstico fitosanitario, nematodos fitoparásitos asociados al cultivo del rosal (*Rosa sp.*) provenientes de muestra de suelo del Conjunto SEDAGRO, en el municipio de Metepec, Edo. Méx.

3.1.1. Objetivos específicos

- Extraer nematodos fitoparásitos de 20 muestras de suelo de rosal utilizando la técnica Tamizado – centrifugado.
- Realizar montaje en preparaciones en fresco o de Robbins.
- Identificar los géneros de nematodos fitoparásitos presentes en muestras de suelo de rosal (*Rosa sp.*) mediante microscopía (microscopio estereoscópico y compuesto) claves taxonómicas bibliografía especializada.
- Especificar el pH de suelo de los rosales (*Rosa sp.*) de Metepec, Edo. Méx. y los géneros de nematodos fitoparásitos prevalecientes.
- Comparar géneros de nematodos fitoparásitos encontrados en muestras de suelo de rosales provenientes del invernadero del CITT Rancho la Paz y Rancho el Islote (Villa Guerrero, Edo. Méx.) y los prevalecientes bajo un cultivo abierto del Conjunto SEDAGRO del municipio de Metepec, Edo. Méx.

4. Metodología

El protocolo señalado por el Manual de nematología del laboratorio de fitopatología del ICAMEX, 2008 para realizar diagnóstico de nematodos fitoparásitos, requiere seguir cuatro pasos fundamentales: extracción, montaje de ejemplares en preparaciones microscópicas (aislamiento), visualización de características morfológicas y la posterior comparación con literatura especializada. La ilustración 14 nos muestra la metodología general para aplicar dicho diagnóstico en muestras de suelo de rosales.

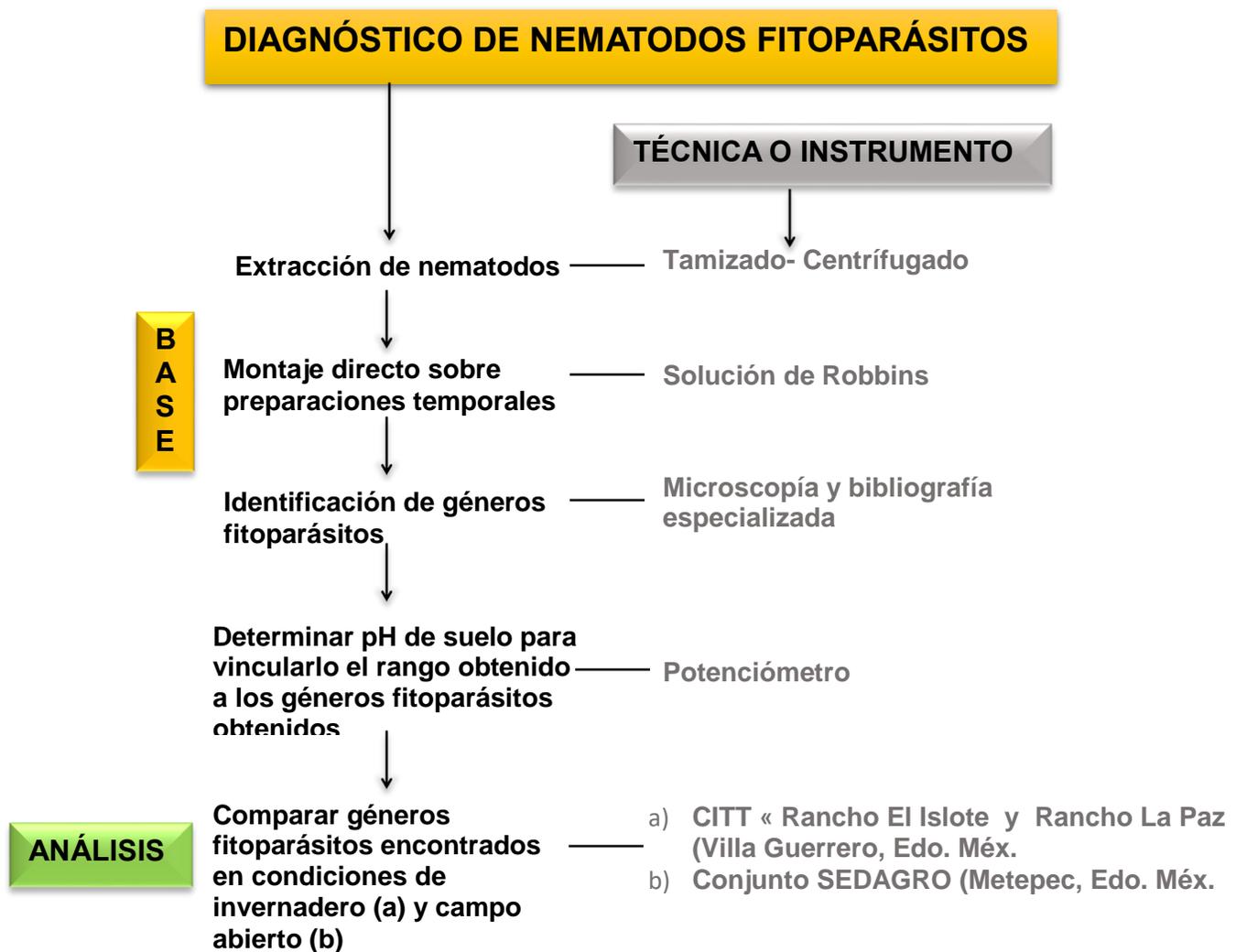


Ilustración 14. Protocolo para realizar diagnóstico cualitativo de nematodos fitoparásitos. Fuente: Elaboración propia con base en el Manual operativo del laboratorio de fitopatología del ICAMEX, 2008.



4.1. Material de Estudio

El manual operativo para el laboratorio de fitopatología del ICAMEX (2018) correspondiente a nematodos indica que las muestras a procesar deben ser recolectadas de suelo y corresponder al área que rodea la raíz de la especie vegetal seleccionada. Además recomienda que en caso de utilizar partes vegetales; el tejido de las mismas debe conservarse turgente, y no en estado de descomposición. Para ejecutar el protocolo se utilizan 20 muestras de suelo del cultivo de rosales en campo abierto del conjunto SEDAGRO en el municipio de Metepec; Edo. Méx.

4.2. Extracción por método de Tamizado- centrifugado

Según Esquivel, 2013 la elección del método de extracción depende de varios factores: objetivo del estudio, eficiencia deseada, equipo disponible y condición de la muestra entre otros. Dentro de los objetivos del presente trabajo se encuentra la identificación de géneros de nematodos fitoparásitos utilizando únicamente muestras de suelo de rosales y métodos tradicionales. Considerando lo anterior para la obtención de resultados no se requiere aislar a nematodos en fases móviles; por lo cual la técnica de tamizado y centrifugación con solución azucarada resulta pertinente. A nivel operativo dicho método utiliza soluciones de gravedad específica superior a los fluidos de los nematodos, y es eficaz para extraer huevos, estados inmóviles, formas inactivas y nematodos muertos, siendo además de bajo costo en comparación a técnicas moleculares (ICAMEX, 2008).

La muestra de suelo que se ingresa a laboratorio de fitopatología debe estar contenida en una bolsa de plástico, rotulada (sitio de recolección y tipo de muestreo, especie vegetal seleccionada, periodo o temporada de recolección), y superar la cantidad de 500 g por muestra. Se requiere además retirar basura, piedras, raíces, y homogenizarla de tal forma que se deshagan los terrones de tierra.

4.2.1. Materiales.

Son requeridos dentro del procedimiento de extracción probeta de 1000 ml aforada con agua potable a 500 ml (a), juego ordenado de tamices de 20, 60, 100, 200, 325 mallas (b), espátula (c), vaso de precipitados de 200 ml (d), 100 g de suelo de rosales (e), tamiz de 500 mallas.

Para el proceso de centrifugación por cada muestra de 150 ml se requiere: centrífuga, balanza granataria, balanza analítica, 3 tubos para centrífuga de 50 ml, agitador magnético, matraz Erlenmeyer de 200 ml, 3 g de talco, solución azucarada (22.8 g azúcar + 50 ml de agua por tubo).

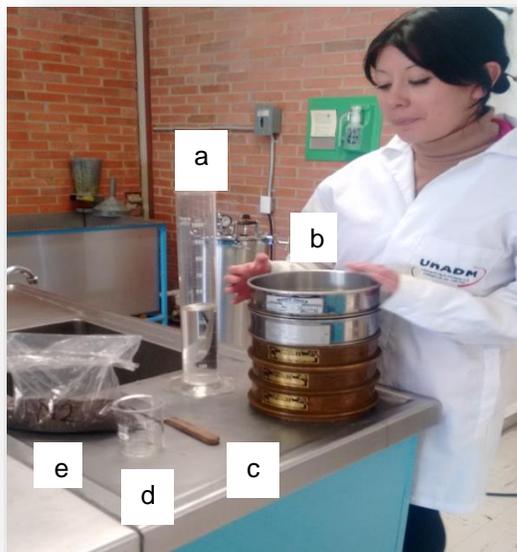


Ilustración15. Materiales para extracción utilizando columna de tamices. Fuente propia

4.2.2. Procedimiento

Se rellena una probeta de 1000 ml siendo 500 ml de agua, aforando la muestra con suelo hasta los 600 ml y se procede a homogenizar. Una vez que se logra la combinación del agua y el suelo, dicha solución se vacía dentro de tamices, los



cuales requieren un ordenamiento específico: comenzando por la parte superior en orden creciente de 20, 60, 100, 200, 325 mallas (ilustración inferior a). La única muestra que se conserva es la que corresponde a los tamices de 200 y 325 mallas los cuales con ayuda de una piseta y agua se recolecta en un vaso de precipitados en una porción no mayor a 150 ml (ilustración inferior b). La solución obtenida de 150 ml se divide y se vierte en tres vasos de precipitados de 50 ml, añadiendo 1.0 g de talco y se agita con las manos para homogenizarla (ilustración inferior c). A continuación los tres tubos se colocan dentro de la centrífuga utilizando 2900 rpm durante cinco minutos (ilustración inferior d). Una vez finalizada la primera centrifugación se elimina el sobrenadante y se sustituye por una solución azucarada (ilustración inferior e). Los vasos que ya contienen la solución azucarada se someten a una segunda centrifugación de 2900 rpm. solo por tres minutos. Entre los objetivos de realizar dos centrifugaciones sucesivas según INTA, 2018 se tiene; que durante la primera los nematodos se separan de la arcilla, de la materia orgánica y de la fase acuosa. Por su parte durante la segunda centrifugación los nematodos son separados de la fase mineral. Una vez finalizada la segunda centrifugación las soluciones se vierten en el tamiz de 500 mallas, eliminándose la solución azucarada con una piseta y recolectando la solución en un vaso de precipitados, evitando exceder 20 ml (ilustración inferior f). (ICAMEX, 2018).



Ilustración16. Serie de fotografías ejecutando protocolo de Tamizado-Centrifugado con solución azucarada, realizado en el laboratorio de fitopatología del ICAMEX. Fuente propia

4.3. Muerte y fijación de nematodos

El método de tamizado-centrifugado permite obtener en un vaso de precipitado 20 ml de una solución incolora que contiene nematodos (imperceptibles a simple vista). Para obtener los nematodos inactivos o muertos, la muestra contenida en un vaso de precipitados se somete a un calentamiento dentro de otro vaso de precipitados (durante un minuto) el cual contiene agua calentada a 80°C. El vaso que contiene los nematodos se deja dentro del vaso de precipitados (generalmente del doble de volumen) que solo contienen agua hirviendo, durante un minuto. Trascurrido el tiempo se quita y se colocan 10 gotas de lactofenol (ICAMEX, 2008).

4.4. Montaje de ejemplares en fresco con solución de Robbins.

Debido a su microscópico tamaño y naturaleza transparente es muy difícil distinguir los nematodos a simple vista; por lo cual es necesario elaborar una preparación microscópica; la cual consiste en colocar el nematodo de estudio entre el portaobjeto y cubreobjetos utilizando un medio líquido aclarador de ejemplares denominado solución de Robbins (ICAMEX, 2008).

4.4.1. Materiales

En la ilustración número 17 se muestran los materiales de montaje: pescador de nematodos (1), barniz transparente (2), disco de Siracusa para añadir la muestra (3) y otro que contiene pelo de ángel con agua (4), solución de Robbins (5), vaso de precipitados de 100 ml que contiene 20 ml de solución con nematodos (6), microscopio estereoscópico (7), porta y cubreobjetos (ICAMEX, 2008).



Ilustración17. Fotografía de materiales para ejecutar protocolo de montaje, realizado en el laboratorio de fitopatología del ICAMEX. Fuente propia

4.4.2. Procedimiento

Una vez finalizado los procedimientos de extracción, muerte y fijación de nematodos una parte mínima de este líquido se vierte en el disco de Siracusa (ilustración a). El disco de Siracusa se coloca en el microscopio de disección y de este se recolectan los nematodos utilizando una aguja de disección (ilustración b) y se trasladan a una gota de solución de Robbins colocada sobre el portaobjeto (ilustración c). La composición de la solución Robbins para el montaje contiene: 165 ml de formaldehído al 37%, 15 ml de glicerina. Se requiere como mínimo recolectar 5 nematodos de diferentes tamaños, rodeándolos con tres varillas de pelo de ángel, de forma que queden en los vértices de un triángulo equilátero, y se coloca un cubreobjetos. Este último se fija utilizando cuatro toques de barniz transparente en cada una de las esquinas del mismo (ilustración d), quedando de esta forma la preparación temporal para la identificación morfológica en el microscopio compuesto (ICAMEX, 2008).



Ilustración18. Serie de fotografías ejecutando protocolo de montaje, realizado en el laboratorio de fitopatología del ICAMEX. Fuente propia

4.5. Identificación de ejemplares

Una vez obtenida la preparación temporal la cual contiene al menos 5 nematodos, esta se coloca en el microscopio compuesto y se localiza cada nematodo utilizando el objetivo 10x; se ubican las características morfológicas propias de cada género con el objetivo 40x. Es utilizando el objetivo que 100x son visualizadas las peculiaridades que definen la identidad del nematodo a considerar en el diagnóstico (fotografía 1). Cuando se pretende obtener una imagen detallada del estilete del nematodo fitoparásito es necesario colocar a la preparación temporal una gota de aceite de inmersión. Además para la recolección de evidencia de microscopía se utiliza un microscopio compuesto con cámara digital como el de la fotografía inferior numero 2 (ICAMEX, 2008).



Ilustración19. Serie de fotografías ejecutando microscopía, realizado en el laboratorio de fitopatología del ICAMEX. Fuente propia

4.6. Determinación de pH

4.6.1. Materiales

Tamiz de 20 mallas, vaso de precipitados de 100 ml, vaso de precipitados de 400 ml, balanza analítica, potenciómetro, toalla absorbente, hoja blanca de papel.

4.6.2. Procedimiento

En un tamiz de 20 mallas se agrega suelo seco; tamizando hasta lograr obtener 20 g del mismo, colocando el resultado sobre una hoja blanca de papel (fotografía 1). Se verifica en la balanza analítica que el contenido corresponda a 20 g (fotografía 2), el cual posteriormente se coloca en un vaso de precipitados y se agrega 40 ml de agua destilada. La muestra se deja reposar 30 min, posteriormente se homogeniza y se le introduce el electrodo del potenciómetro, esperando que los resultados numerales dejen de variar para registrarlos y repetir nuevamente el procedimiento (fotografía 3). Se debe obtener el promedio de los dos valores muestra. Una vez que se termina de tomar la medida de pH, entre cada muestra se debe limpiar el electrodo con agua destilada y secar con una toalla absorbente.



Ilustración 20. Serie de fotografías ejecutando protocolo para obtener pH de suelo de rosales realizado en el laboratorio de Fitopatología de ICAMEX. Fuente propia

5. Resultados de diagnóstico nematológico

Las 20 muestras de suelo de rosas recolectadas del Conjunto SEDAGRO de Metepec, Edo. Méx. fueron utilizadas para diagnóstico nematológico; con la premisa de identificar géneros fitoparásitos predominantes de dicha región. Se ejecutó la extracción utilizando el método de Tamizado-centrifugado, el cual demostró ser adecuado para la recuperación de ejemplares. La solución de 20 ml (producto de la extracción) permitió realizar 20 preparaciones temporales de cada muestra, la cual tuvo como previo el montaje y el aclaramiento de ejemplares utilizando solución de Robbins. Durante la microscopía se realizó la visualización en base a las siguientes características: forma de la cabeza y del cuerpo, presencia o ausencia de anillos en la cutícula, presencia o ausencia de estilete, forma de nódulos basales, posición de glándulas esofágicas, presencia de líneas de campos laterales y forma de terminación de la cola según lo propuesto por Espinosa, Fuentes, Jaraba y Lozano, 2004; Zuckerman, Mai y Harrison (1987); Rivas et al., (2002).

Las características morfológicas visualizadas se compararon con las descripciones de literatura especializada: Morfología de los nematodos curso de identificación de Bongers & Esquivel, Manual de nematodos fitoparásitos identificación de especies cuarentenarias de Guerrero, Manual de prácticas de laboratorio de nematodos fitopatógenos de Cid del Prado-Vera y Fitonematología de Zuckerman, Mai y Harrison.

5.1. Base de diagnóstico nematológico

Utilizando como base 100 g de suelo de rosas durante el proceso de extracción, se recuperaron 20 ml de solución con nematodos por cada muestra de suelo procesado, previo al análisis como se muestra en la ilustración 21.

PROCESO	BASE	MÉTODO	RESULTADOS
EXTRACCIÓN	100 g de suelo de rosas	Tamizado-centrifugado	20 ml de solución <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">   </div>

Ilustración 21. Resultados de procedimiento extractivo de muestras de suelo de rosas realizados dentro del laboratorio de fitopatología del ICAMEX. Fuente propia

5.2. Plataforma de análisis

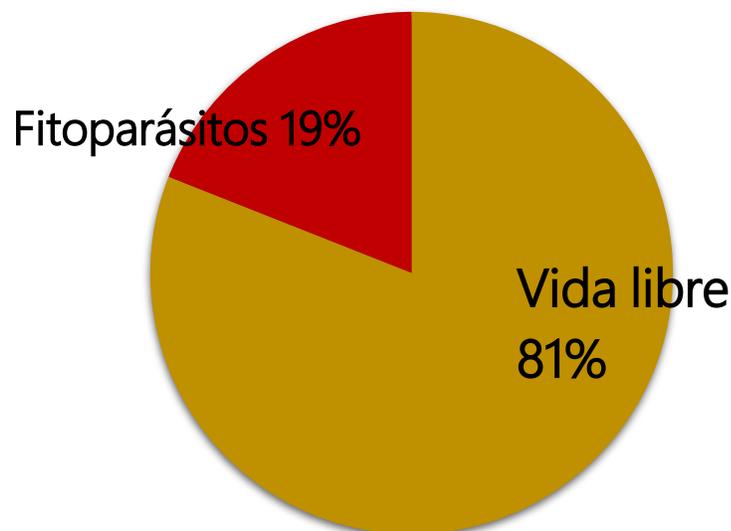
Con los 20 ml de solución del resultado del protocolo de extracción por cada muestra se elaboró una preparación temporal (recolectando 5 especímenes) como se muestra en la ilustración 22 para realizar posterior análisis morfológico de cada ejemplar.

PROCESO	BASE	MÉTODO	RESULTADOS
MONTAJE TEMPORAL	100 g de suelo de rosas	Solución de Robbins	20 Preparaciones temporales (5 ejemplares en cada una)



Ilustración 22. Tabla de resultados de montaje realizado en el laboratorio de Fitopatología de ICAMEX. Fuente propia

Relación de nematodos encontrados en muestras de suelo de rosas de Metepec, Edo. Méx.



Gráfica 1. Resultados porcentual del nematodos fitoparásitos encontrados en preparaciones temporales en el laboratorio de Fitopatología de ICAMEX. Elaboración propia

5.3. *Criconemoides* sp. género fitoparásito prevaleciente en muestras de suelo de rosal de Metepec, Edo. Méx.

De las 20 preparaciones temporales analizadas, se emitió un diagnóstico positivo de nematodos fitoparásitos en 16 y un diagnóstico negativo solo en 4 como se muestra en la ilustración 23. Se encontró evidencia de los géneros fitoparásitos *Aphelenchus* sp., *Paratylenchus* sp., *Tylenchus* sp., y *Criconemoides* sp. Este último género de nematodo fitoparásito es el más prevaleciente en las muestras de suelo de Metepec (ya que su presencia se corroboró en 12 preparaciones temporales).

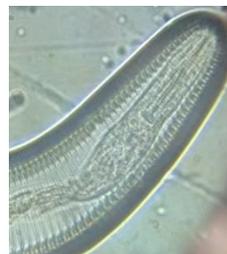
PROCESO	BASE	MÉTODO	RESULTADOS
IDENTIFICACIÓN DE CARACTERES MORFOLÓGICOS (A, B, C, D).	20 preparaciones temporales	Microscopía	16 preparaciones con diagnóstico positivo y 4 con diagnóstico negativo a nematodos fitoparásitos.



A) Forma de cuerpo



B) Forma de la cabeza



C) Estilete



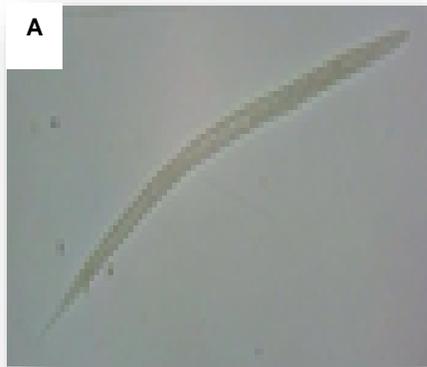
D) Forma de terminación de la cola

Ilustración 23. Tabla de resultados de microscopía realizada en el laboratorio de Fitopatología de ICAMEX. Elaboración propia

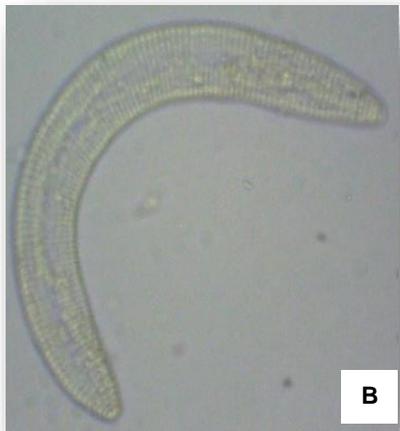
A continuación se presenta la detallada de la evidencia recolectada con microscopía de los ejemplares, partiendo de los géneros menos encontrados hasta los más prevalentes como nos muestran las

EVIDENCIA DE MICROSCOPIA (M1)

DESCRIPCIÓN



El ejemplar *Tylenchus* sp. (Fotografía A) muestra cuerpo en una forma ligeramente arqueada con longitud de entre 0.9-1.3 mm. La característica mas representativa de este género es la cola filiforme y alargada. Su estilete tiene muy marcados los nodulos basales (Avena-Arambul et al. 2016; INIFAP, 1980; Rivas, et al. 2002).



La fotografía B muestra un ejemplar del género *Criconemoides* sp., cuyas características mas representativas son: cuerpo robusto, corto, generalmente arqueado y con estrías muy grandes en todo su cuerpo. El estilete es largo en comparación a todo su cuerpo (Ferris & Cid del Prado Vera, 2018; OIRSA,2003; Rivas, et al. 2002).

Ilustración 24. Resultado de microscopía M1 realizada en el laboratorio de fitopatología de ICAMEX. Elaboración propia

EVIDENCIA DE MICROSCOPIA (M5)



C



D

DESCRIPCIÓN

La preparación temporal M5 tiene diagnóstico positivo de géneros fitoparásitos *Tylenchus* sp. (fotografía C) y *Paratylenchus* sp. (fotografía D).

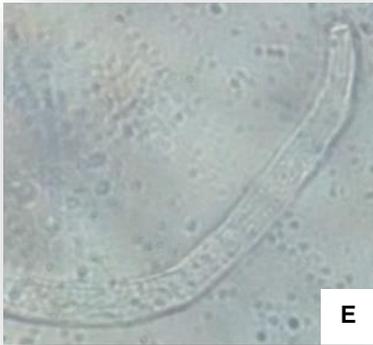
Tylenchus sp. es considerado un nematodo pequeño cuya característica morfológica más representativa es la cola alargada y filiforme. Tiene un estilete esbelto, con nódulos basales pequeños pero fuertemente marcados (Avena-Arambul et al. 2016; INIFAP, 1980; Rivas, et al. 2002; Rivas, et al. 2002).

En el caso de *Paratylenchus* sp. su cuerpo es alargado en forma de c. Por su parte el estilete es alargado con nódulos basales muy redondeados y fuertemente marcados (INIFAP, 1980; Rivas, et al. 2002).

Ilustración 25. Resultado de microscopía M 5 realizada en el laboratorio de fitopatología de ICAMEX. Elaboración propia

EVIDENCIA DE MICROSCOPIA (M7)

DESCRIPCIÓN



En la preparación temporal M7 se encontraron dos géneros fitoparasitos *Aphelenchus* sp. (fotografías E y F) y *Criconemoides* sp. (fotografía 4).

Aphelenchus sp. es un nematodo de tamaño pequeño (de 0.8 a 1.0 mm), de cuerpo alargado y cilíndrico. Una característica representativa de este género, es un bulbo medio redondeado y grande con respecto a al ancho de su cuerpo. El estilete y los nódulos basales son poco visibles y de tamaño pequeño. (Avena-Arambul et al. 2016; INIFAP, 1980; Rivas, et al. 2002). La fotografía E corresponde a la parte anterior del nematodo y la fotografía F a la parte posterior.

La fotografía G muestra el género *Criconemoides* sp. de cuerpo ancho, anillos alrededor de todo el cuerpo y cola de forma conoide. El estilete es largo y los nodulos basales se encuentran orientados hacia la parte anterior (Ferris & Cid del Prado Vera, 2018; OIRSA, 2003; Rivas, et al. 2002).

Ilustración 26. Resultado de microscopía M7 realizadas en el laboratorio de fitopatología de ICAMEX.
Elaboración propia

EVIDENCIA DE MICROSCOPIA (M11)



DESCRIPCIÓN

En la preparación temporal M11 se recolectaron ejemplares fitoparásitos del género *Paratylenchus* sp. Este nematodo tiene cuerpo cilindrico elongado; la región labial se encuentra redondeada y la terminación de la cola es puntiaguda. Con respecto a otros nematodos fitoparásitos es de tamaño pequeño (< 1mm). El ejemplar de la fotografía H es una hembra, la cual exhibe una vulva ubicada en el cuarto posterior del cuerpo. En este género el estilete se encuentra bien desarrollado y los nódulos basales son redondeados; la fotografía I la que muestra el estilete del nematodo traspasando la región labial. (Avena-Arambul et al. 2016; Rivera-Coto, 2007; Rivas, et al. 2002).

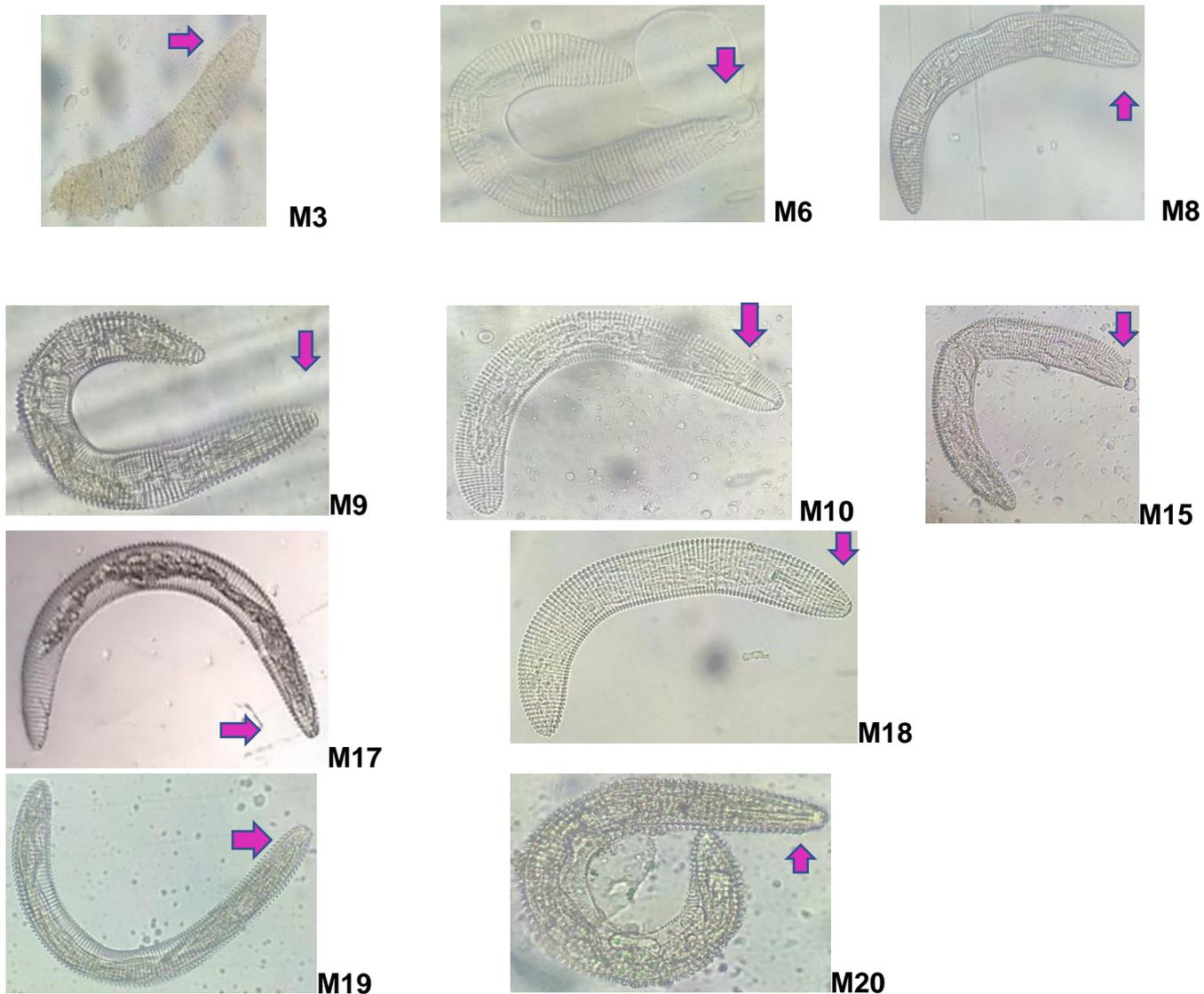
EVIDENCIA DE MICROSCOPIA (M4, M12)



DESCRIPCIÓN

En la muestra M4 Y M12 se encontró el género fitoparásito *Tylenchus* sp. La fotografía J muestra al nematodo de cuerpo vermiforme, ligeramente arqueado y la región cefálica no se encuentra esclerotizada. Con respecto a su estilete es ligero y pequeño. El aspecto de la cola es filiforme lo cual origina que algunos autores le denominen “nematodo cola de ratón” (Avena-Arambul et al. 2016; INIFAP, 1980; Cepeda 1996 y Zumaran 2006 citados por Arias, 2015; Rivas, et al. 2002.)

EVIDENCIA DE MICROSCOPIA DE DIEZ PREPARACIONES TEMPORALES



Las preparaciones temporales **M3, M6, M8, M9, M10, M15, M17, M18, M19, M20** exhibieron ejemplares del género *Criconemoides* sp. Este género tiene como principales características un cuerpo robusto, corto, y una cutícula intensamente anillada. La presencia de estiles en este fitoparásito resulta de mayor longitud con respecto al resto del cuerpo; además de tener los nódulos basales con proyecciones hacia la parte anterior. El estilete de aspecto fuerte se verifica claramente en los ejemplares de las muestras **M8, M10, M18 y M20** siendo una característica presente en las hembras y ausente en machos. La cola tiene aspecto conoide, con terminación en punta en el caso de los machos (Ferris & Cid del Prado Vera, 2018; OIRSA, 2003; Rivas, et al. 2002). Nota: La fecha rosa en todas las fotografías señala la región cefálica del nematodo.

Ilustración 28. Resultado de 10 microscopías realizadas en el laboratorio de fitopatología de ICAMEX. Elaboración propia



Parte anterior



Parte posterior

M2



M13



M14



M16

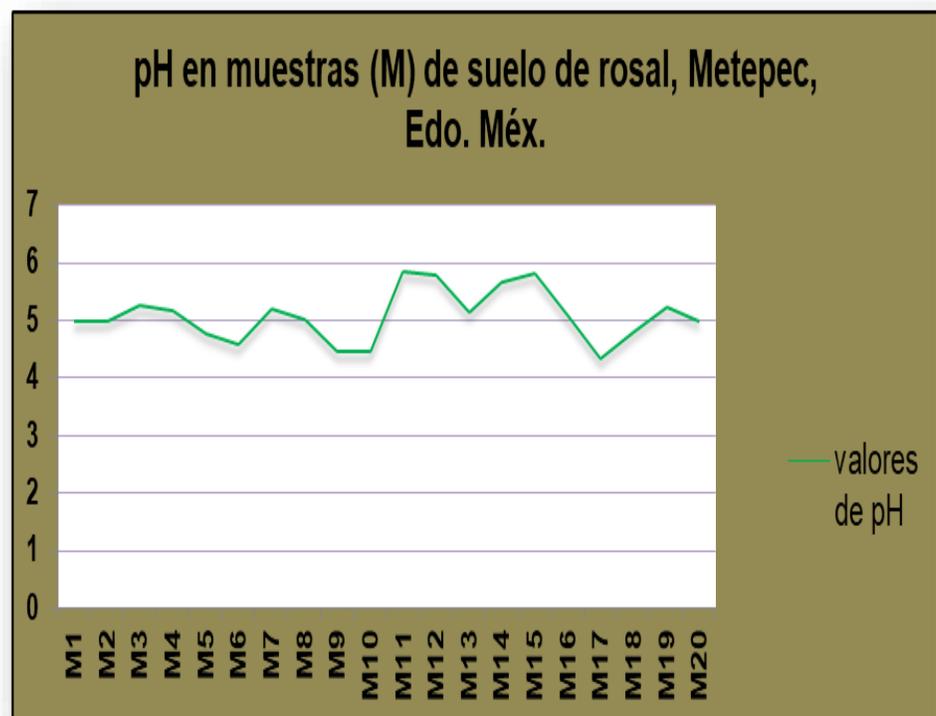
Las preparaciones temporales M2, M13, M14 Y M16 tienen diagnóstico negativo a la presencia de nematodos fitoparásitos del suelo; ya que ningún ejemplar exhibe estilete.

Ilustración 29. Resultado de microscopía en muestras M2, M13, M16 realizadas en el laboratorio de fitopatología de ICAMEX. Fuente propia

5.4. Condiciones de suelo de rosas de Metepec: de fuertemente ácido a moderadamente ácido

Al analizar 20 muestras de suelo de rosas recolectadas en Metepec, Edo. Méx., se encontró un pH de 4,33 considerado fuertemente ácido o <5 a 5,84 condición de suelo moderadamente ácido (valores de 5 a 6.0) según lo descrito por Casón-Olivo, 2005. La ilustración 30 nos muestra los valores obtenidos de forma detallada y al lado se encuentran los valores graficados (gráfica 2)

Muestra (M)	pH (suelo + agua destilada)
M1	4,97
M2	4,98
M3	5,24
M4	5,16
M5	4,77
M6	4,56
M7	5,18
M8	5,02
M9	4,44
M10	4,44
M11	5,84
M12	5,78
M13	5,12
M14	5,67
M15	5,8
M16	5,07
M17	4,33
M18	4,8
M19	5,23
M20	4,99



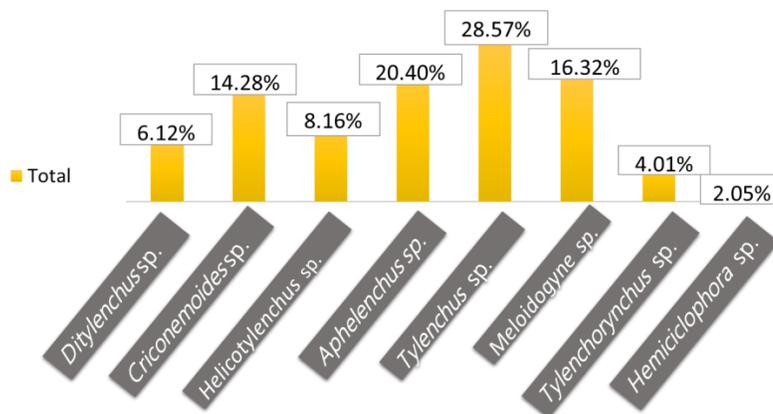
Gráfica 2. Resultados de toma de pH realizados en el laboratorio de Fitopatología de ICAMEX. Elaboración propia

Ilustración 30. Resultados detallado de pH realizadas en el laboratorio de fitopatología de ICAMEX. Elaboración propia

5.5. Suelo de rosales de Villa Guerrero con mayor diversidad de géneros fitoparásitos.

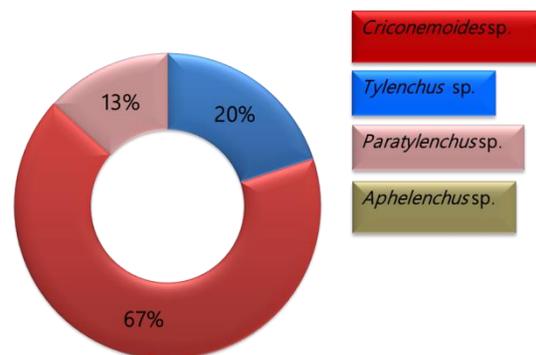
Al comparar los resultados obtenidos de géneros fitoparásitos en Villa Guerrero y Metepec. Se encontró 8 géneros fitoparásitos en Villa Guerrero y solo 4 en Metepec, es decir se encontró mayor diversidad de géneros fitoparásitos en condiciones de invernadero que en campo abierto. Además en el suelo de Metepec proliferó el género *Criconemoides* sp., mientras que en Villa Guerrero fueron *Aphelenchus* sp. y *Tylenchus* sp., datos observables en las gráficas 3 y 4.

GÉNEROS FITOPARÁSITOS ENCONTRADOS EN VILLA GUERRERO, EDO. MÉX.



Gráfica 3. Resultados de diagnóstico de géneros fitoparásitos prevalentes en suelo de Villa Guerrero. Edo. Méx. emitidos en el laboratorio de Fitopatología de ICAMEX.

PORCENTAJE DE GÉNEROS FITOPARÁSITOS EN SUELO DE METEPEC, EDO. MÉX.



Gráfica 4. Resultados porcentual de géneros fitoparásitos prevalentes en suelo de Metepec emitidos en el laboratorio de Fitopatología de ICAMEX. Elaboración propia



6. Discusión

Según resultados emitidos del diagnóstico de 20 muestras de suelo de rosas provenientes del CITT Rancho La Paz y Rancho El Islote de Villa Guerrero, Edo. Méx. (condiciones de invernadero) dieron como positivo los géneros fitoparásitos: *Aphelenchus* sp., *Criconemoides* sp., *Ditylenchus* sp., *Meloidogyne* sp., *Tylenchus* sp., *Tylenchorynchus* sp., *Helicotylenchus* sp., y *Hemicyclophora* sp.

Por su parte el diagnóstico en 20 muestras utilizando suelo de rosales provenientes Conjunto SEDAGRO en Metepec, Edo. Méx.; genero positivo a fitoparásito solo 16 muestras. Los géneros fitoparásitos encontrados fueron: *Aphelenchus* sp., *Criconemoides* sp., *Pratylenchus* sp. y *Tylenchus* sp. Es decir que en condiciones de invernadero se presentaron 4 géneros fitoparásitos más que en condiciones de campo abierto, a pesar de tener un control nutricional del vegetal y de condiciones fitosanitarias más estrictas (de rosales y de instrumentos para cultivo).

Rivera Coto (2007) señala diez géneros de nematodos fitoparásitos de importancia mundial: *Meloidogyne* sp., *Pratylenchus* sp., *Heterodera* sp., *Ditylenchus* sp., *Globodera* sp., *Tylenchulus* sp., *Xiphinema* sp., *Radopholus* sp. *Rotylenchulus* sp. y *Helicotylenchus* sp. En las muestras de suelo de rosas de Villa Guerrero fueron encontrados cuatro de los géneros mencionados por el autor: *Meloidogyne* sp., *Pratylenchus* sp., *Ditylenchus* sp., *Helicotylenchus* sp.

Monroy-Rojas (2010) señala que los nematodos fitoparásitos que atacan el cultivo del rosas son: *Meloidogyne* sp., *Pratylenchus* sp., *Xiphinema* sp. Sin embargo ejemplares de los géneros *Meloidogyne* sp, y *Pratylenchus* sp solo se encontraron en suelo de rosales de Villa Guerrero. Por su parte en ninguno de los dos suelos utilizados en el estudio se encontraron ejemplares fitoparásitos del género *Xiphinema* sp.; género que también es mencionado por la Fundación PRODUCE Chiapas, a.c. (2019) de estar asociado al cultivo del rosas.

6.1. Conclusiones

- Este estudio demostró que es viable económicamente utilizar métodos tradicionales para: extracción, montaje e identificación de nematodos, utilizando como base 100 g de suelo rosal, tanto en condiciones invernadero como de campo abierto.
- Se corroboró las ventajas del método Tamizado-Centrífugado para la extracción de nematodos fitoparásitos; adecuado para la obtención de ejemplares pequeños (*Aphelenchus* sp. y *Tylenchus* sp.) de gran tamaño y lentos como *Criconemoides* sp. según lo descrito por Coyne, et al., 2019; Hernández-Ochandía, et al., 2016).
- Se comprobó que el suelo del municipio de Metepec, Edo. Méx. tiene un pH de fuertemente ácido a moderadamente ácido, donde el género fitoparásito predominante es *Criconemoides* sp. Sin embargo en este suelo también fueron encontrados los géneros fitoparásitos: *Aphelenchus* sp., *Paratylenchus* sp. y *Tylenchus* sp.
- Los datos referenciales de Villa Guerrero presentaron ocho géneros fitoparásitos: *Aphelenchus* sp., *Criconemoides* sp., *Meloidogyne* sp., *Ditylenchus* sp., *Hemiciclofora* sp., *Paratylenchus* sp., *Pratylenchus* sp., *Tylenchus* sp. (el doble que en Metepec).
- No se encontraron ejemplares fitoparásitos asociados al rosal del género *Xiphinema* sp.; según lo descrito por Monrroy-Rojas, 2010 y Fundación PRODUCE Chiapas, 2019.

7. Bibliografía.

1. Agrios, G.N. (2002). Fitopatología. México: Limusa
2. Arauz-Cavallini (1998). Fitopatología un enfoque agroecológico. Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica.
3. Andrés-Yeves, M.F., Verdejo-Lucas, S. (2011). Enfermedades causadas por nematodos fitoparásitos en España. España: Phytoma.
4. Avena-Arambul, C., Ceceña- Duràn, D., González-Mendoza, D., Grimaldo-Juárez, O., Duán-Hernández, D. (2016). Conducta poblacional en cultivos agrícolas en el valle de Mexicali, Baja California. México: OmniaScience.
5. Besoain-Canales, X. (1999). Fitopatología general. Chile: Facultad de agronomía Universidad Católica de Valparaíso.
6. Bongers, T & Esquivel A. (2015). Morfología de nematodos curso de identificación. Costa Rica: Universidad Nacional de Costa Rica.
7. Cadenas. (2018). Fitopatología general. [pdf en línea]. Recuperado 09 de septiembre 2018 de <https://tarwi.lamolina.edu.pe/~fonz/fitogen/PDF/APUNTES%20DE%20CLAS ES1.pdf>
8. Casona-Olivo, E.F. Introducción a la ciencia del suelo.(2005). Caracas: Universidad Central de Venezuela.
9. Cid del Prado-Vera. Manual de práctica de laboratorio de nematodos fitopatógenos. (2011). México: COLPOS.
10. Coyne, D.L., Nicol, J.M. and Claudius-Cole, B. 2007. Nematología práctica: una guía de campo y laboratorio. SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Cotonou, Benin.
11. CRSservicios. (2015). Laboratorio de análisis agrícolas: muestreo de nematodos de suelo. [pdf en línea]. Recuperado 21 de septiembre 2018 de http://www.crservicios.es/LABORATORIO/DESCARGAS/MUESTREO_NEMATODOS_SUELO.pdf



12. Esquivel, A. (2013). Práctica número 1 método de extracción de nematodos. [pdf en línea] Recuperado 29 de agosto de <http://nemaplex.ucdavis.edu/Courseinfo/Curso%20en%20Espanol/LAB%201%20%20Extracci%C3%B3n%202013.pdf>
13. Echandi, E. Manual de laboratorio de fitopatología general. (1967). México: Herrero Hermanos Sucesores.
14. Fagro. (2018). Nematodos fitopatógenos, factores ambientales patogénicos y fanerógamas parasitas. Uruguay: Soporte de apoyo a las prácticas de fitopatología. [pdf en línea] Recuperado 21 de enero 2019 de: <http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursos/fitopato/practicas/nema-amb-fanerogamas.html>.
15. Fernández-Fernández, M., López-Infante, M., Ortiz-Berriozabal, F., Yruela-Campo, M. (2018). Aplicación de productos fitosanitarios a nivel básico. Sevilla: Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura, pesca y desarrollo Rural Instituto de Investigación y formación Agraria y Pesquera.
16. Fundación PRODUCE, Chiapas, a.c. (2019). Manual de producción de rosa. [pdf en línea] Recuperado 13 de marzo de 2019 de: <https://www.yumpu.com/es/document/read/14364081/manual-rosapdf-fundacion-produce-chiapas>
17. González, L.C. (1976). Introducción a la fitopatología. Costa Rica: IICA.
18. González-Guitrón, U. Diversidad de nematodos fitoparásitos asociados al cultivo de maíz en el municipio de Guasave Sinaloa. Tesis de maestría IPN. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa, México, 2013.
19. Guerrero, R. (2017). Manual de nematodos fitoparásitos, identificación de especies cuarentenarias. Ecuador, Quito: Agrocalidad.
20. Guzmán-Piedrahita, O.A., Castaño-Zapata, J., Villegas-Estrada, B. (2011, 4 de julio) Principales nematodos fitoparásitos y síntomas ocasionados en cultivos de importancia económica. *Agron.* Recuperado 4 de agosto 2018



de

https://www.researchgate.net/publication/271203100_PRINCIPALES_NEMATODOS_FITOPARASITOS_Y_SINTOMAS_OCASIONADOS_EN_CULTIVOS_DE_IMPORTANCIA_ECONOMICA

21. Hernández-Hernández, R., Del Vallín, G., Hernández, D. Diagnóstico de fitonematodos en suelos de cultivos frutales. (2006, 4 de diciembre). *Fitosanidad* (10). p. 261-264.
22. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. (2018). Análisis de laboratorio, estudio de nematodos. Argentina. *INCA*. Recuperado 25 de febrero de <https://inta.gob.ar/servicios/estudio-de-nematodos>
23. ICAMEX (2008). Manual operativo del laboratorio de nematología. México: ICAMEX.
24. INEGI (2009). Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos clave geo estadística 15113. México: INEGI.
25. Lezaun, J. (2016). Nematodos fitoparásitos. Colombia: Croplife. [pdf en línea] Recuperado 13 de agosto de: <https://www.croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/280-nematodos-fitoparasitos>
26. Mena-Adriano, J.D. (2008). Manual de prácticas de nematología. [pdf en línea]. Recuperado 14 de septiembre 2018 de <https://es.slideshare.net/themena1/antologia-practicas-nematologa>
27. Monroy-Rojas, L.M. (2010). Parasitología del rosal. México. *TecnoAgro*. Recuperado de <https://tecnoagro.com.mx/revista/2010/no-61/parasitologia-del-rosal/>
28. Ortiz-Paz, R.A., Guzmán-Piedrahita, O.A., Ocampo, J.A. (2012, 30 de noviembre). Identificación de nematodos fitoparásitos en el Banco de germoplasma de Maracuyá. *Acta. Agron.* Recuperado 21 de agosto 2018 https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/38127/40292



29. Ortuño, N., Oros, R. (2002). Nematodos que atacan cultivos ornamentales. *Manejo Integrado de plagas y Agroecología*. (66), p.76-81.
30. Peraza-Padilla, W; Rosales-Flores, J.; Esquivel-Hernández, A.; Hilje-Hernández, R.; Molina-Bravo, R.; Catillo-Castillo, P. Identificación morfológica, morfométrica, y molecular de *Meloydogyne* incógnita en Higuera (*Ficus carina* L.) en Costa Rica. (2013). Costa Rica: Agronomía Mesoamericana. Recuperado 11 de octubre de <file:///C:/Users/acer/Downloads/Dialnet-IdentificacionMorfologicaMorfometricaYMolecularDeM-5039745.pdf>
31. Piedra- Naranjo, R. (10 de octubre 2007). Manejo biológico de nematodos con hongos y bacterias. *Tecnología en marcha*. (21,1), p. 123-132.
32. Rivas, A.W., Sermeño, J.M., Paniagua, M.R., Villacorta, J.L. (2002). Manual técnico: nematodos asociados a limón pérsico y otros cítricos en fincas del Salvador. Salvador: Universidad de el Salvador Facultad de ciencias agronómicas.
33. Rivera-Coto, G. (2007). Conceptos introductorios a la fitopatología. Costa Rica: EUNED.
34. Riveros-Angarita, A.S. (2010). Inducción de resistencia en plantas interacción planta patógeno. Colombia: Universidad de Ibagué, Tolima.
35. Rocha-Rocha, L. B. Identificación de nematodos fitoparásitos asociados al cultivo de Rosa (*Rosa* sp). en el sector Lasso provincia de Catopaxi. Tesis de ingeniero agrónomo UTA. Facultad de ciencias agropecuarias, Cevallos, Ecuador, 2018.
36. Sosa-Moss, C., Perdomo-Roldán, F., Brathwaite, C.W.D., Salazar-Cruz, J.J. (1996). Manual de técnicas para el diagnóstico de enfermedades de plantas. México: IICA.
37. Talavera-Rubia. (2003). Manual de nematología agrícola: introducción al análisis nematológico para agricultores y técnicos de agrupaciones de defensa vegetal. España: CAIB.



38. UAEMEX (2017). Proyecto de exportación de rosas de invernadero de Coatepec Harinas, Edo. Mex a san Petersburgo. México: UAEMEX.
39. Uribarren-Berrueta. (2018). Generalidades de nematodos. México: UNAM Depto. De microbiología y parasitología-recursos de parasitología. Recuperado 13 de agosto 2018 de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/nematodos-generalidades.html>
40. Young, A. (2004). Revisión bibliográfica el cultivo del rosal y su propagación. [pdf en línea]. Recuperado 04 de septiembre 2018 de <http://www.redalyc.org/pdf/1932/193217832008.pdf>
41. Zuckerman, B.M., Mai, M.B., Harrison, M.B. (1987). Fitonematología. Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialloa (CATIE).