

**DETERMINACIÓN DE ESPECIES Y
PATOTIPOS DE *Meloidogyne*, EN KIWI
(*Actinidia deliciosa*) Y TOMATE
(*Lycopersicum esculentum*), MEDIANTE EL
TEST DE HOSPEDEROS DIFERENCIALES.**

Memoria para optar al título Profesional de Ingeniero Agrónomo Mención Fruticultura

Cecilia Alejandra Escobar Moreno

SANTIAGO-CHILE. 2006

PROFESOR Sr. Erwin Aballay E. Ingeniero Agrónomo, M. Sc. PROFESORES
CONSEJEROS Sra. Marcela Esterio G. Ingeniero Agrónomo, Mg.Cs. Sra. Maria
Angélica Guerrero S. Profesora de Biología y Ciencias.

RESUMEN .	1
SUMMARY . .	3
INTRODUCCIÓN .	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA . .	7
Distribución mundial de <i>Meloidogyne</i> .	8
Meloidogyne en Chile . .	9
Clasificación taxonómica . .	10
Caracterización del género <i>Meloidogyne</i> . .	10
Aspectos ecológicos importantes de <i>Meloidogyne</i> .	10
Caracteres utilizados en la identificación de <i>Meloidogyne</i> .	11
Caracteres morfológicos .	11
Caracteres citológicos y citogénicos .	12
Caracteres bioquímicos .	12
Uso de patrones perineales como medio de identificación de especies de <i>Meloidogyne</i> .	13
Características más importantes para el diagnóstico de los patrones perineales (Eisenback, 1985) .	13
Identificación de especies de <i>Meloidogyne</i> mediante el uso de electroforesis .	15
Test de Hospederos Diferenciales de Carolina del Norte . .	16
MATERIALES Y METODOS .	19
Test De Hospederos Diferenciales .	19
Condiciones del Test de Hospederos Diferenciales .	20
Inóculo e inoculación .	20
Evaluación de plantas. .	21
Identificación de <i>Meloidogyne</i> sp. . .	21
Identificación de <i>Meloidogyne</i> mediante el estudio de cortes perineales .	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .	25
Identificación de la población de <i>Meloidogyne</i> spp proveniente de Limache mediante	25

el Test de Hospederos Diferenciales .	
Identificación de la población de <i>Meloidogyne</i> spp proveniente de Boco mediante el Test de Hospederos Diferenciales .	27
Identificación de <i>Meloidogyne</i> mediante análisis de dibujos perineales .	28
CONCLUSIONES . .	31
LITERATURA CITADA .	33

RESUMEN

Para identificar dos poblaciones de *Meloidogyne* sp. procedentes de la V Región, las cuales afectaban respectivamente a kiwi y tomate, ocasionando importantes mermas en la productividad, fue realizado el Test de Hospederos Diferenciales durante la temporada 1999-2000.

Se identificaron las especies presentes en kiwi de Limache y tomate de Boco, V Región, por medio del Test de Hospederos Diferenciales de Carolina del Norte, y a través del estudio de patrones perineales. El Test fue desarrollado para la identificación de las especies y razas más comunes de *Meloidogyne* como son *M. incognita* (razas 1, 2, 3 y 4), *M. arenaria* (razas 1 y 2), *M. javanica* y *M. hapla*.

La especie presente en Boco se identificó como *Meloidogyne arenaria* raza 2. En Limache, la especie asociada a kiwi no correspondió a ninguna de las señaladas requiriéndose mayores estudios para su identificación.

Palabras clave

Meloidogyne arenaria raza 2

Meloidogyne ethiopica

Nemátodo del nudo de la raíz

Test de hospederos diferenciales

Patrones perineales

DETERMINACIÓN DE ESPECIES Y PATOTIPOS DE Meloidogyne, EN KIWI (*Actinidia deliciosa*) Y TOMATE (*Lycopersicon esculentum*), MEDIANTE EL TEST DE HOSPEDEROS DIFERENCIALES.

SUMMARY

The Differential Host Test was made during 1999-2000 season in order to identify two nematodes population of *Meloidogyne* sp. belonging to the V region, each one affecting kiwi and tomato correspondingly, and producing important damages in the production.

The present species were identified in Limache`s kiwi and Boco`s tomato both on the V region through the use of the North Carolina`s Differential Host Test, and through the use of the perennial patterns study. The test was developed to recognize the most common *Meloidogyne* species and races such as *M. Incognita* (races 1, 2, 3 and 4), *M. Arenaria* (races 1 and 2), *M. javanica* and finally *M. hapla*.

Although the present species in Boco was identified as *Meloidogyne arenaria* raza 2, the results in Limache concluded that the species associated to kiwi did not correspond to any of the species indicated previously, determining the necessity of deep studies in order to identify it.

Keywords

Meloidogyne arenaria raza 2

Meloidogyne ethiopica

Root knot nematode

Diferential Host Test

Perinneal Pattern

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el conocimiento de los agentes que disminuyen la productividad de los cultivos es vital debido a las graves pérdidas que sufre la agricultura. Entre estos agentes uno de los más importantes son los nemátodos fitoparásitos (González, 1987).

Entre los nemátodos fitoparásitos destaca *Meloidogyne* spp, por su amplia distribución geográfica y su amplio rango de hospederos, además de ser causante de importantes daños económicos en cultivos y frutales (Sasser y Carter, 1985).

Valenzuela *et al* (1992), en una prospección en la Región Metropolitana señala que *Meloidogyne* está presente en un 19% de los cuarteles de uva de mesa muestreados, con alto nivel de población. Existen zonas, como el valle de Casablanca (V Región), en donde más del 50% de la superficie cultivada se encuentra con algún grado de infestación (Aballay *et al*, 1997).

La identificación certera de especies y patotipos de *Meloidogyne* es la base para desarrollar estrategias de control, como el uso de variedades resistentes, rotación de cultivos etc.

El objetivo del presente proyecto de memoria de título fue identificar las especies y patotipos de *Meloidogyne* presentes en plantaciones de kiwi en Limache, y de tomate bajo plástico en Boco, Quillota, V Región, mediante el Test de Hospederos Diferenciales.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El conocimiento de los nemátodos como agentes causales de importantes enfermedades agrícolas comenzó a mediados del siglo pasado (Mai, 1985). Desde esa época se han realizado numerosas investigaciones con el fin de identificar y clasificar de la mejor forma posible a los nemátodos.

Según Mai, 1985 los mayores problemas causados por nemátodos fitoparásitos ocurren generalmente en aquellas zonas templadas del planeta, debido a:

- Altas temperaturas y largas temporadas de crecimiento dan como resultado un mayor número de generaciones.
- Una mayor proporción de cultivos susceptibles por temporada acrecientan las poblaciones de nemátodos.
- Algunas de las especies más dañinas, como *Meloidogyne incognita*, atacan en zonas templadas.
- Los mayores complejos de enfermedades asociadas a *Meloidogyne* ocurren en estas zonas.

A la vez, los ataques más severos de nemátodos se producen cuando existen los hospederos y sobre todo monocultivos en un mismo suelo por un largo período de tiempo.

Según Sasser y Carter (1985) las especies de nemátodos más limitantes para la producción agrícola corresponden a las pertenecientes a la familia Meloidogynidae. Las

especies de *Meloidogyne*, pueden provocar reducciones substanciales en el rendimiento de los cultivos. Se piensa que estas reducciones serían cercanas al 5%, sin embargo, agricultores de países en vía de desarrollo revelan pérdidas aún más significativas.

Distribución mundial de *Meloidogyne*

El género *Meloidogyne* está ampliamente distribuido en el mundo. En climas fríos, donde la temperatura media en invierno es cercana a 0° C y en verano está por sobre los 15° C, la especie más común correspondería a *Meloidogyne hapla*. En las zonas más cálidas, desde los 30° N hasta los 40° latitud sur, las especies frecuentemente encontradas son *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica* y *Meloidogyne arenaria*. Sin embargo, se han citado más de setenta especies de *Meloidogyne* a nivel mundial, las que afectan a diversos cultivos (Sasser y Taylor, 1978).

Dada la adaptabilidad de *Meloidogyne* a diferentes condiciones y climas es que Sasser y Carter (1985) lo reconoce como un problema global, prácticamente distribuido por todo el mundo.

Se ha establecido que las especies más comunes e importantes que causan mayor daño son *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla* identificando cuatro razas de *M. incognita* y dos de *M. arenaria* (Sasser y Carter, 1985).

En la Figura 1, se muestra la distribución aproximada del género *Meloidogyne* propuesta por el Proyecto Internacional *Meloidogyne* (IMP):

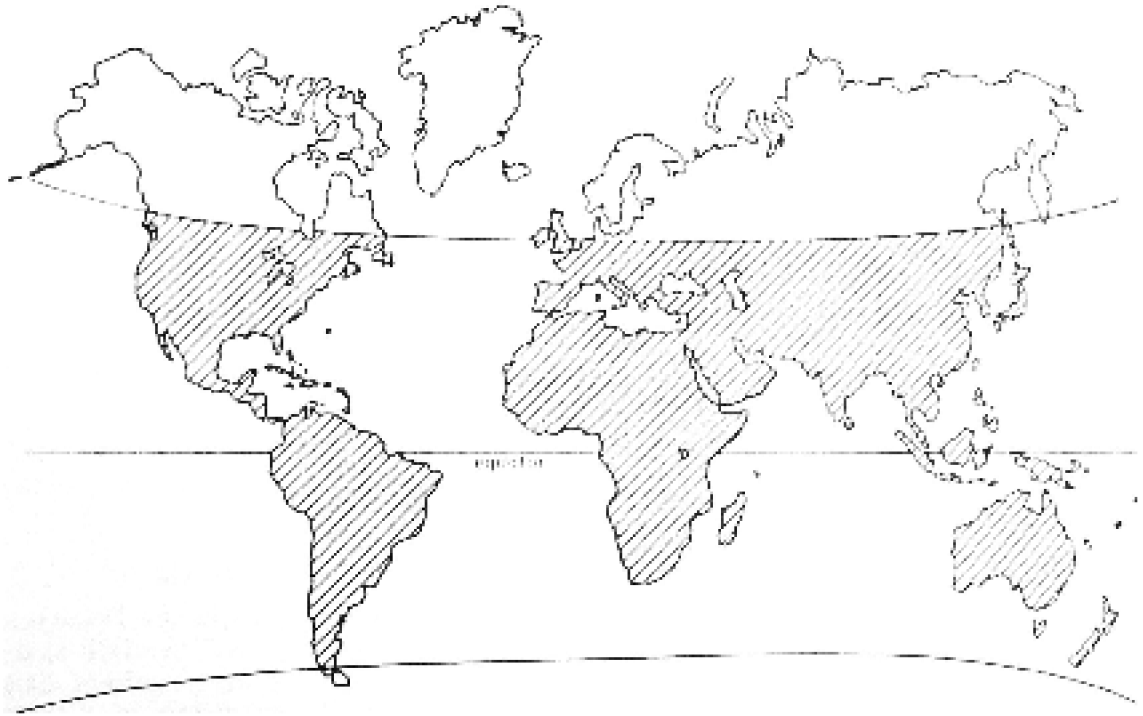


Figura 1. Distribución de *Meloidogyne* a nivel mundial (Sasser y Carter, 1985).

Meloidogyne en Chile

En Chile, el INIA, en colaboración con el proyecto Internacional de *Meloidogyne* ha llegado a determinar la presencia de las razas 2 y 3 de *M. incognita* y la raza 2 de *M. arenaria* (González, 1987).

Jiménez y Gallo (1983) en un estudio realizado en la I Región, determinaron que *M. javanica*, y *M. arenaria* son las dos especies que están predominando en los cultivos de la región.

Según Magunacelaya (1996) además de las especies antes mencionadas puede encontrarse en Chile, aunque en una menor proporción *Meloidogyne naasi*. Estos

nemátodos se presentan generalmente como una mezcla de poblaciones de 2 ó más especies que sobreviven en el mismo hospedero. También señala que dada su preferencia climática, *M. incognita* destaca por su ataque en cultivos de hortalizas bajo plástico y *M. hapla* en frutales como la vid y el kiwi. Además, *Meloidogyne* es un problema importante en viveros, lo que constituye en muchos casos la principal vía de dispersión del nemátodo.

Recientemente en Brasil, fue descrita la presencia de *Meloidogyne ethiopica* en plantas de kiwi provenientes de Chile. En Chile se encuentra dañando severamente viñas de la V región situadas en el valle de Casablanca (Mancilla, 2004). *M. ethiopica* se separa genéticamente de las especies clásicas de *Meloidogyne*, no ha perfeccionado muy bien su capacidad parasítica, atacando las plantas hasta ocasionarles la muerte en corto tiempo (Carneiro, 2004).

Clasificación taxonómica

Las especies del género *Meloidogyne* conforman una pequeña parte del Phylum Nemata, Clase Secernentea, Orden Tylenchida, Superfamilia Tylenchoidea, y Familia Meloidogynidae (Taylor y Sasser, 1983).

Son endoparásitos sedentarios, caracterizados por penetrar la raíz, fijarse, desarrollarse y multiplicarse dentro de ella (Taylor y Sasser, 1983).

Caracterización del género *Meloidogyne*

La morfología del nemátodo cambia durante su ciclo de vida. El primer estado juvenil se forma en el huevo al final de la embriogénesis. El segundo estado juvenil surge al eclosionar el huevo, inicialmente es vermiforme y con motilidad para posteriormente pasar a un estado sedentario.

Los machos son vermiformes, móviles y no se alimentan. En las especies más comunes de *Meloidogyne* los machos no son necesarios para la reproducción ya que por lo general se reproducen por partenogénesis (Eisenback, 1985).

Las hembras son sedentarias después de establecerse en el hospedero. Su sistema digestivo está especializado para mantener la relación parásito-hospedero. La mayor parte de los nutrientes obtenidos son destinados a la reproducción (Eisenback, 1985).

Aspectos ecológicos importantes de *Meloidogyne*

Es un género ampliamente distribuido en el mundo, parasita a más de 2000 especies

vegetales, hortícolas, frutícolas, forestales, ornamentales, arbustos silvestres, hierbas y muchas malezas (Magunacelaya y Dagnino, 1999). La población se concentra en la zona radical entre los 5 y 30 cm. de profundidad decreciendo en su número hasta 1m., en algunos casos se han encontrado hasta a 5 m. de profundidad e incluso más (Taylor y Sasser, 1983).

La temperatura es determinante en el desarrollo, reproducción y sobrevivencia de los nemátodos. La temperatura óptima para la embriogénesis fluctúa entre 25 y 30° C para las cuatro especies más importantes. *M.hapla*, muestra preferencias por temperaturas más bajas que las otras tres especies (Van Gundy, 1985).

Los nemátodos permanecen activos en suelos que presentan un 40 a 60 % de humedad. Cambios de humedad en el suelo provocan disminución en la actividad de los nemátodos, con un alto porcentaje de humedad la actividad de los nemátodos disminuye, pudiendo ocasionarles la muerte, en situaciones de sequedad ambiental los juveniles de *Meloidogyne* pueden entrar en estado de anhidrobiosis y prologar su sobrevivencia (Van Gundy, 1985).

Las especies de *Meloidogyne* se caracterizan por producir agallas a nivel de las raíces de su hospedero. Sus huevos están incorporados dentro de una matriz gelatinosa depositada generalmente sobre la agalla. Dicha matriz puede contener hasta 1500 huevos. El desarrollo embrionario de éstos va a depender de la temperatura, ocurriendo entre 9 y 31 días. Una vez que los juveniles de segundo estado eclosionan de las masas de huevos infestan las raíces de las plantas susceptibles, éstos no se mueven por azar, ya que sus movimientos obedecen a estímulos emanados por las raíces, que son captados por eficientes quimiorreceptores. Luego de la penetración el juvenil migra por el interior de la raíz sin romper células. Cuando se establecen, para alimentarse y protegerse causan hiperplasia e hipertrofia del tejido vegetal (Hussey, 1985).

Caracteres utilizados en la identificación de *Meloidogyne*

Caracteres morfológicos

En el caso de hembras, los caracteres utilizados son: la forma corporal que en la mayoría de las especies es piriforme y en otras ovalada; los patrones perineales, según Eisenback (1985) constituyen el rasgo morfológico más importante en la identificación de especies; la posición del poro excretor (Hirschmann 1985b); diferencias entre largo y ancho del metacarpus, diferencias morfológicas de la región cefálica en general de pigmentación oscura, aunque para apreciar detalles debe usarse microscopio de barrido; la forma del estilete, especialmente de los nódulos; y, en algunos grupos de especies, el orificio de la glándula esofágica dorsal; y la distancia entre la base del estilete y aquella.

En machos los caracteres morfológicos utilizados son: largo del cuerpo, poro

excretor, campo lateral, cefálicas, metacorpúsculo región cefálica, estilete y orificio de las glándulas esofágicas dorsales. Sin embargo la identificación de estos pierde importancia debido a que su presencia en las poblaciones del suelo es ocasional.

Caracteres citológicos y citogénicos

La identificación de especies mediante métodos citológicos y citogénicos es excelente complemento al uso de métodos morfológicos y permite además determinar relaciones filéticas.

Meloidogyne incognita, se reproduce exclusivamente por partenogénesis mitótica, y puede ser fácilmente diferenciado por el comportamiento de sus cromosomas en la profase de la primera división de la maduración. A diferencia de otras especies, sus cromosomas se agrupan en un área muy visible, y la profase es mucho más larga que la de otras especies (Triantaphyllou, 1985).

Meloidogyne javanica al igual que *Meloidogyne incognita*, se reproduce exclusivamente por partenogénesis mitótica. Sus cromosomas son diploides y varían entre un número de 41-46 que aparecen delgados y largos, sin embargo, la identificación no puede ser basada exclusivamente en la forma de éstos.

Meloidogyne arenaria también se reproduce exclusivamente por partenogénesis mitótica. Por ser triploide puede ser diferenciado de otras especies de *Meloidogyne*, sobre la base de un alto número de cromosomas que varían entre 30 -38, 40-48 y 51-56.

Meloidogyne hapla citológicamente es la especie más diversificada del género *Meloidogyne*. Se reproduce por partenogénesis meiótica facultativa, y menos frecuentemente por fertilización cruzada, posee un número de cromosomas haploide que varían entre 13 y 17, poliploide de 28 y 34, y un número diploide que varían entre 30-32 y 43-48. Estos factores llevan a una problemática para su identificación con métodos citológicos (Triantaphyllou, 1985).

Caracteres bioquímicos

Se ha establecido que ciertos caracteres químicos de Nemata dependen de la edad, siendo importante separar estados de desarrollo antes de la aplicación de estas técnicas. En el caso de *Meloidogyne* es fácil, porque se diferencian claramente los diferentes estados de desarrollo debido a sus grandes diferencias morfológicas (Magunacelaya y Dagnino, 1999).

Las técnicas bioquímicas se basan en la comparación de aminoácidos por electroforesis y serología. La electroforesis en gel de polyacrylamida provee de una técnica de alta resolución para separar moléculas proteicas en base a su peso molecular y carga neta (Magunacelaya y Dagnino, 1999).

Uso de patrones perineales como medio de identificación de especies de *Meloidogyne*

El patrón perineal comprende el área del extremo de la cola, fasmidios, líneas laterales, ano, y vulva, todo rodeado por pliegues cuniculares o estrías (Hirschmann, 1985b).

La observación de patrones perineales es la técnica más utilizada por los nematólogos para identificar una especie de *Meloidogyne*. Para obtener patrones perineales “típicos” es necesario coleccionar una muestra representativa de la población (Taylor y Sasser, 1978). En seguida, se deben realizar cortes a un número de entre diez y veinte hembras con el objeto de obtener una cantidad de patrones perineales que permitan una adecuada identificación de manera segura. Según Hirschman (1985b) aunque los patrones perineales de individuos y poblaciones dentro de una especie varíen, las características básicas de cada especie no lo hacen.

Las características más comunes a visualizar en los patrones perineales corresponden a la forma global (circular, oval, piriforme, reloj de arena), la presencia o ausencia de marcas o líneas en el espacio lateral y de puntuaciones en el extremo de la cola, la forma de la estría (lisa, quebrada, ondulada, zigzag) y esta puede o no formar alas en uno o ambos lados del patrón (Hirschman, 1985b).

Según Taylor y Sasser (1978) las especies más comunes de *Meloidogyne* presentan características específicas en sus patrones perineales, permitiendo así una identificación precisa.

Características más importantes para el diagnóstico de los patrones perineales (Eisenback, 1985)

Meloidogyne hapla se caracteriza por su forma hexagonal redondeada a ovoide achatada, presenta estrías muy finas y puntuaciones subcuticulares en el área lisa del extremo de la cola. El arco dorsal es relativamente bajo y redondeado, pero puede ser alto y cuadrado. Las líneas laterales están ausentes pero el espacio lateral está marcado por estrías irregulares. Las estrías dorsales y ventrales a menudo se unen en un ángulo, y son lisas o levemente onduladas. Algunos patrones pueden formar alas en uno o ambos lados.

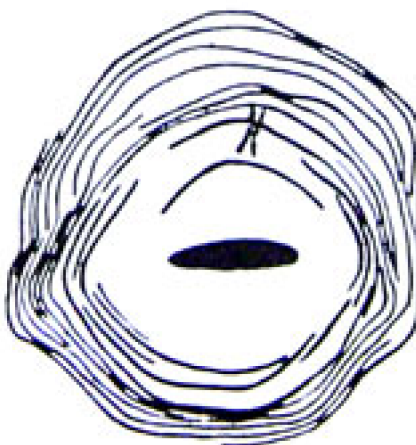


Figura 2. Dibujo perineal de *Meloidogyne hapla*.

Meloidogyne incognita presenta un arco dorsal alto y cuadrado. Las líneas laterales están ausentes y el espacio lateral está cubierto por estrías con quiebres y bifurcaciones. Las estrías son lisas a onduladas, a veces, en zigzag y a menudo algunas se pliegan hacia los extremos de la vulva.



Figura 3. Dibujo perineal de *Meloidogyne incognita*.

Meloidogyne javanica su patrón perineal es el único que posee una línea lateral que separa las estrías dorsales de las ventrales. Generalmente la línea cubre el ancho del patrón pero va desapareciendo gradualmente hacia el extremo de la cola. El arco dorsal es bajo y redondo a alto y cuadrado y a menudo posee un círculo en el área del extremo de la cola. Las estrías son lisas a ligeramente onduladas, y algunas pueden plegarse hacia los extremos de la vulva.

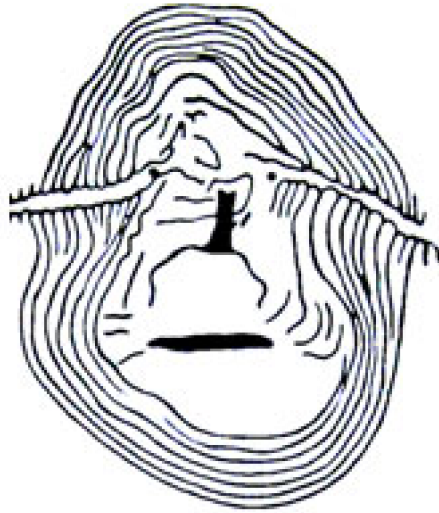


Figura 4. Dibujo perineal de *Meloidogyne javanica*.

El patrón perineal de *Meloidogyne arenaria* presenta un arco dorsal bajo, ligeramente dentado hacia el espacio lateral formando hombros redondeados. Las estrías dorsales y ventrales, a menudo, se unen en un ángulo. Las líneas laterales están ausentes, pero estrías cortas, irregulares, y bifurcadas cubren el espacio lateral. Las estrías son lisas a levemente onduladas y algunas pueden plegarse hacia la vulva. A veces, los patrones se extienden lateralmente y forman una o dos alas.

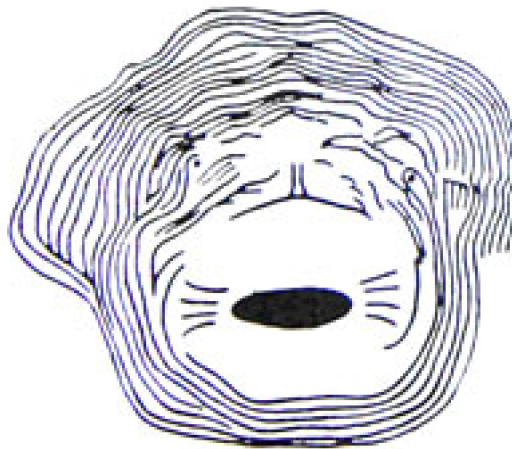


Figura 5. Dibujo perineal de *Meloidogyne arenaria*.

Identificación de especies de *Meloidogyne* mediante el uso de electroforesis

Hussey (1985) indica que los mayores problemas asociados a la taxonomía de las especies de *Meloidogyne* están relacionados con la gran variabilidad de las características

morfológicas que poseen. Por tal motivo se han desarrollado técnicas bioquímicas para la caracterización y taxonomía de *Meloidogyne*.

Los primeros estudios taxonómicos en especies de *Meloidogyne* utilizando técnicas bioquímicas fueron llevados a cabo por Dickson *et al.* (1971) y por Hussey *et al.* (1972) mediante la comparación de proteínas y de enzimas de varias especies de nemátodos.

Según Hussey (1985) las técnicas bioquímicas dependen de la identificación de diferencias moleculares que comprueben variaciones taxonómicas. Con relación a los nemátodos, no se aprecian secuencias claras en sus proteínas, las que según Avise (1974) son un reflejo de la secuencia de nucleótidos que conforman el ADN del organismo. Por tal motivo, las técnicas bioquímicas se limitan a una comparación entre los aminoácidos que conforman las proteínas mediante análisis por electroforesis y serología (Hussey, 1985).

La electroforesis en gel de polyacrylamida es una herramienta útil para separar moléculas proteicas en base a tamaño y a carga. Estudios comparativos de proteínas de los nemátodos pueden proveer información clave para la caracterización y taxonomía de distintas especies de *Meloidogyne*.

Test de Hospederos Diferenciales de Carolina del Norte

La importancia de *Meloidogyne* quedó reflejada en el reconocimiento mundial que hubo del Proyecto Internacional *Meloidogyne* (IMP) que se desarrolló por nueve años, entre 1975 y 1984, en el que participaron más de cien científicos de distintas universidades del mundo, colaborando estrechamente con los nematólogos del IPM .

Este proyecto permitió conocer la distribución, respuestas de los hospederos, morfología, bioquímica, relaciones ecológicas y principales especies y razas más comunes de *Meloidogyne* a nivel mundial (Sasser y Carter, 1985).

El IMP ha dado especial énfasis en el desarrollo de variedades resistentes, sistemas de rotación de cultivos y transferencia tecnológica, todo ello gracias al apoyo de numerosos investigadores en el mundo (Sasser y Carter, 1985).

Muchas veces las técnicas de identificación y caracterización de especies de *Meloidogyne* no son lo suficientemente precisas dada la gran variabilidad que presentan estos organismos a través de las distintas poblaciones en el mundo. Se han citado más de setenta especies de *Meloidogyne* que afectan un amplio rango de hospederos, algunos de ellos de gran importancia económica, por lo que se ha hecho necesaria una precisa y acuciosa identificación de especies y razas para seleccionar la más apropiada estrategia de control (Sasser y Carter, 1985).

Como herramienta útil y eficaz en la identificación de especies y razas de *Meloidogyne* se utiliza de preferencia el Test de Hospederos Diferenciales de Carolina del Norte, y si, posteriormente es necesario, se corrobora con algún carácter diferenciante.

Este Test consiste en la inoculación de seis plantas hospederas estándar (Sasser y Carter, 1985).

Poblaciones puras de *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne arenaria* y *Meloidogyne hapla* pueden ser fácilmente distinguidas. La susceptibilidad y resistencia de las plantas están basadas en los índices de nódulos y masa de huevos (Sasser y Carter, 1985).

El test de hospederos diferenciales junto con la morfología de patrones perineales, tiene por objetivo:

1. Dar una referencia preliminar de las cuatro especies más comunes, basada en la respuesta del hospedero.
2. Detecta poblaciones mixtas.
3. Detecta especies nuevas y no descritas.
4. Detecta razas de hospederos y otras variaciones de patógenos dentro de las especies comunes como las evidenciadas por una inesperada diferencia de respuestas del hospedero.

Este test no es seguro para la identificación de poblaciones de *Meloidogyne* donde estén presente una o varias especies no comunes. Ellas no podrían ser discriminadas con el test.

El resultado de cientos de evaluaciones, ha probado que el Test de Hospederos Diferenciales es certero en la identificación de especies y razas de poblaciones, siempre que pertenezca a una de las cuatro especies más comunes. Cuando la población estudiada es identificada, la respuesta se complementa con estudios morfológicos, como los patrones perineales.

MATERIALES Y METODOS

La presente memoria de título se realizó en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, Campus Antumapu, Región Metropolitana, Santiago de Chile, entre los años 1999-2000.

Test De Hospederos Diferenciales

El Test de Hospederos Diferenciales se realizó para dos poblaciones de *Meloidogyne*, una proveniente de kiwi de Limache y otra proveniente de tomate de Boco.

Para la realización del Test de Hospederos Diferenciales de Carolina del Norte se necesitaron seis especies de plantas hospederas correspondientes a las siguientes:

- 1.-Tabaco NC 95. (*Nicotina tabacum* cv. NC 95).
- 2.-Algodón Deltapine 16. (*Gossypium hirsutum* cv. Deltapine 16).
- 3.-Pimiento California Gonder. (*Capsicum frutescens* cv. California Gonder).
- 4.-Sandía Charleston Gray. (*Citrullus vulgaris* cv. Charleston Gray).
- 5.-Maní Florruner. (*Arachis Hipogaea* cv. Florruner).
- 6.-Tomate Rutgers. (*Lycopersicon esculentum* cv. Rutgers).

Las plantas hospederas fueron sembradas en Septiembre de 1999, en speedlings de

aislapol, transcurridos 15 a 21 días germinaron los distintos cultivares y fueron transplantados a bolsas de polietileno de un litro, con orificios para el drenaje, que contenían suelo compuesto por la mezcla de 50% de suelo franco y 50% de suelo arenoso, esterilizado con vapor de agua (Sasser y Carter, 1985).

Se establecieron 5 repeticiones inoculadas para cada planta hospedera. Para comprobar la esterilidad del suelo se trasplantaron 4 plántulas de tomate Rutgers que se mantuvieron sin inocular, y se mantuvo un testigo para cada cultivar.

Se usaron como inóculo de aproximadamente 10.000 huevos de *Meloidogyne* sp. recolectados de raíces provenientes de un huerto de Kiwi de Limache y de plantaciones de Tomate de Boco infestadas con *Meloidogyne*.

Condiciones del Test de Hospederos Diferenciales

Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero, con temperaturas entre 12 y 35° C, que permitieron a los nemátodos y las plantas desarrollarse en forma óptima (Taylor y Sasser, 1983). Según estos mismos autores la muerte de huevos y larvas de *Meloidogyne* se produce entre 0 y 5° C y la inactivación, que impediría su acción infestiva, con temperaturas superiores a 40° C.

Cada Test de Hospederos Diferenciales se mantuvo sobre mesas de madera aislado uno del otro y del suelo, evitando la contaminación de agentes externos, o entre las bolsas. Los ensayos que permanecen sobre el suelo o superficies de plástico sobre el suelo, frecuentemente son contaminados, como indican Taylor y Sasser (1983).

Los riegos se realizaron para mantener la humedad del suelo y cubrir las necesidades hídricas de las plantas. Se usó agua potable para minimizar el riesgo de contaminación.

Con posterioridad al trasplante, se fertilizó en tres ocasiones con abono foliar completo, hasta antes el momento de la inoculación. Fertilizar con posterioridad a la inoculación podría interferir en la infestividad de los nemátodos.

Las plantas hospederas fueron mantenidas por 55 días después de inoculadas. Según Sasser y Carter (1985) este tiempo es suficiente para la reproducción del nemátodo. En el caso del test realizado para el inóculo proveniente de Limache las plantas se mantuvieron desde el 14 de Octubre al 8 de Diciembre y en la población proveniente de Boco desde el 27 de Octubre al 21 de Diciembre.

Inóculo e inoculación

Se colectó inóculo de Limache y de Boco. De cada localidad se extrajeron muestras de cinco puntos distintos del campo, cada una compuesta por 1000 grs. de suelo y 500 grs.

de raíces.

Se lavaron las raíces agalladas de plantas de tomate y kiwi infestadas, y se siguió el método para la extracción de huevos descrito por Taylor y Sasser, 1983. Se calculó cuantos gramos de raíz son necesarios para inocular con 10.000 huevos. En el caso de Limache fue necesario inocular con 20 grs. y en caso de Boco con 40 grs.

La inoculación tuvo lugar una vez que las plantas hospederas lograron un desarrollo de 8 hojas.

La inoculación consistió en colocar las raíces picadas, en dos hoyos hechos en el sustrato cerca del tallo de la planta hospedera, que posteriormente fueron cubiertos con suelo

Evaluación de plantas.

Cumplidos 55 días desde la inoculación, se extrajeron las plantas hospederas desde sus contenedores. El sistema radical se retiró del sustrato y fue lavado suavemente sin dañar las raíces. Se examinó bajo microscopio estereoscópico contando el número de nódulos y masas de huevos. Para determinar la presencia de masas de huevos se procedió a la disección del 10% de los nódulos, y de esta manera confirmar si hubo reproducción del nemátodo en la planta hospedera. Luego se calificó la raíz de todas las plantas hospederas según lo descrito por Sasser y Taylor (1983) conforme al Cuadro 1.

Cuadro 1. Índices de calificación de raíces.

Nº de nódulos o masas de huevo s	Índice
0	0
1-2	1
3-10	2
11-30	3
30-100	4
100 y más	5

El índice de calificación de raíces se asignó según el número de nódulos o masas de huevos que presentaron éstas, conforme a la escala expuesta en el Cuadro 1.

Identificación de *Meloidogyne* sp.

En el Cuadro 2 se asignó una cruz (+) a aquellas plantas que fueron calificadas con un índice igual o superior a 4, y signo menos (-) aquellas que obtuvieron una calificación de 0, 1, 2 ó 3. En cada cultivo se contó el número de nódulos y de masas de huevos, con el

DETERMINACIÓN DE ESPECIES Y PATOTIPOS DE *Meloidogyne*, EN KIWI (*Actinidia deliciosa*) Y TOMATE (*Lycopersicum esculentum*), MEDIANTE EL TEST DE HOSPEDEROS DIFERENCIALES.

fin de determinar el índice en ambos casos. Según el signo obtenido se distinguen las especies vegetales resistentes y susceptibles, las susceptibles fueron calificadas con signo (+) y las resistentes con signo (-).

Cuadro 2 Clave de identificación de razas y especie de *Meloidogyne* sp. mediante el Test de Hospederos Diferenciales (Sasser y Carter, 1985).

Cultivares de plantas Hospederas						
Especies y razas de <i>Meloidogyne</i>	Tabaco NC 95	Algodón Deltapine 16	Pimiento California Gonder	Sandía Charleston Gray	Maní Florruner	Tomate Rutgers
<i>M. incognita</i>						
Raza 1	-	-	+	+	-	+
Raza 2	+	-	+	+	-	+
Raza 3	-	+	+	+	-	+
Raza 4	+	+	+	+	-	+
<i>M. arenaria</i>						
Raza 1	+	-	+	+	+	+
Raza 2	+	-	-	+	-	+
<i>M. javanica</i>	+	+	-	+	-	+
<i>M. hapla</i>	+	-	+	-	+	+

Identificación de *Meloidogyne* mediante el estudio de cortes perineales

Se realizaron cortes perineales de hembras de *Meloidogyne* extraídas de Limache y Boco para la realización del test de hospedados diferenciales, y de aquellas que se desarrollaron en las plantas hospederas. Se aislaron los nódulos de las raíces, y se extrajeron las hembras a través de cortes transversales hechos a los nódulos. Mediante la metodología descrita por Sasser y Carter (1985), se procedió a realizar los cortes perineales como se muestra en la siguiente figura:

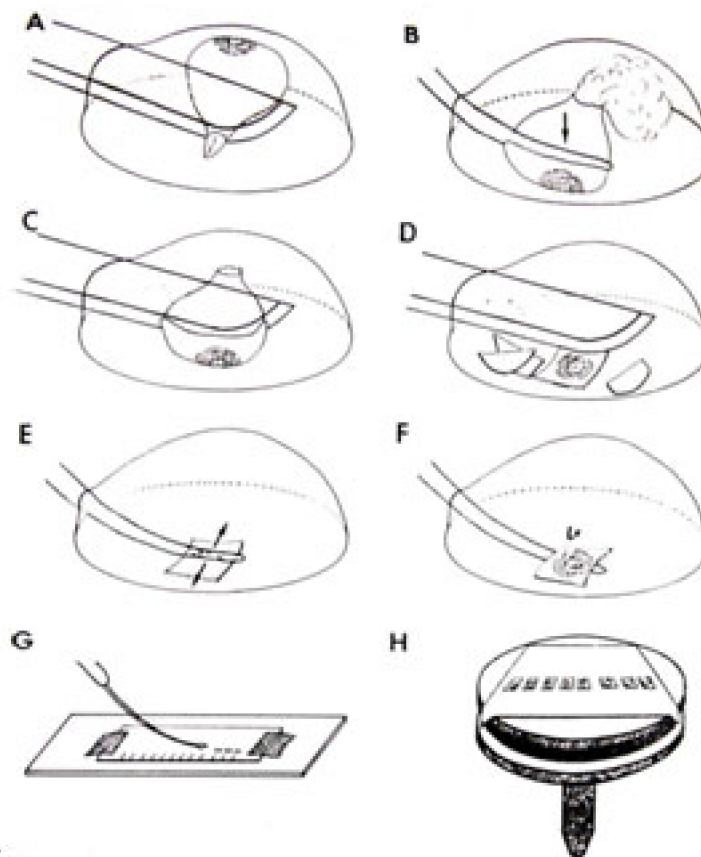


Figura 6. Esquema para la obtención de cortes perineales (Hartman y Sasser, 1985).

- A. Corte de la cabeza de la hembra
- B. Vaciado del contenido de la hembra
- C. Corte de la cutícula posterior del cuerpo
- D. Ubicación del dibujo perineal y recorte del exceso de cutícula
- E. Limpieza del corte de restos viscerales
- F. Traslado de corte con dibujo perineal al portaobjeto
- G. Montaje de varios cortes perineales sobre el portaobjeto
- H. Colocación de cubreobjeto y sellado de la preparación

Las preparaciones montadas en portaobjetos, fueron estudiadas en un microscopio óptico compuesto y fotografiadas con una cámara digital

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de la población de *Meloidogyne* spp proveniente de Limache mediante el Test de Hospederos Diferenciales

En el Cuadro 3, se puede observar que tabaco, sandía y tomate presentaron una alta tasa de nodulación. En el caso de tabaco se observó una gran cantidad de nódulos muy pequeños, y en sandía un menor número de ellos pero de mayor tamaño. Al disectar los nódulos de tabaco y sandía no se encontraron masas de huevos, sólo hembras inmaduras y algunos machos. Taylor y Sasser (1978) y Triantaphyllou (1985), explican la aparición de machos como una estrategia de adaptación del nemátodo a medios adversos, que intenta por medio de la reproducción sexuada obtener la diversidad genética necesaria para poder romper la resistencia que estaría ofreciendo la planta hospedera. Esta presencia de machos se asocia a factores ambientales como disponibilidad de alimento, intensidad del ataque, temperatura, nutrición del hospedero y, radiación y aplicación exógena de inhibidores de crecimiento de las plantas (Rhode, 1960; Huang, 1985).

Cuadro 3. Índice de calificación de raíces de *Meloidogyne* de Limache

DETERMINACIÓN DE ESPECIES Y PATOTIPOS DE *Meloidogyne*, EN KIWI (*Actinidia deliciosa*) Y TOMATE (*Lycopersicum esculentum*), MEDIANTE EL TEST DE HOSPEDEROS DIFERENCIALES.

Plantas Hospederas						
Plantas Hospederas	Tabaco	Algodón	Pimentón	Sandía	Maní	Tomate
Masas de huevos	0	0	0	0	0	5
Nódulos	5	0	0	5	0	5

En las raíces de tomate nueve de cada diez nódulos presentaron masas de huevos, indicativo de que la variedad Rutgers es susceptible al ataque de todas las especies de *Meloidogyne* (Sasser y Carter, 1985). De este modo se comprobó que el inóculo de huevos y las condiciones en que se mantuvo el test fueron óptimas para la infestación de raíces y desarrollo de *Meloidogyne*.

El índice reproductivo de maní, algodón y pimiento fue 0, al no presentar nódulos ni masas de huevos, no hubo reproducción de *Meloidogyne* en las raíces de estas plantas, y se comprobó tal como lo señalan Taylor y Sasser (1983), que son resistentes al ataque de *Meloidogyne*. Estos autores han definido la resistencia y susceptibilidad según la capacidad de reproducción del nemátodo en las raíces, cuando el nemátodo puede reproducirse en la planta hospedera, es considerada susceptible.

En las plantas testigo no hubo nódulos ni huevos, comprobando que el suelo estaba libre de nemátodos y no existió contaminación.

Cuadro 4. Comparación clave de Limache con clave de identificación de razas y especies de *Meloidogyne* de Sasser y Carter, (1985).

Cultivares de plantas Hospederas						
Especies y razas de <i>Meloidogyne</i>	Tabaco NC 95	Algodón Deltapine 16	Pimiento California Gonder	Sandía Charleston Gray	Maní Florruner	Tomate Rutgers
<i>Meloidogyne</i> sp. pobl. de Limache	-	-	-	-	-	+
<i>M. incognita</i>						
Raza 1	-	-	+	+	-	+
Raza 2	+	-	+	+	-	+
Raza 3	-	+	+	+	-	+
Raza4	+	+	+	+	-	+
<i>M. arenaria</i>						
Raza 1	+	-	+	+	+	+
Raza 2	+	-	-	+	-	+
<i>M. javanica</i>	+	+	-	+	-	+
<i>M. hapla</i>	+	-	+	-	+	+

La población de Limache no correspondió a ninguna de las especies y razas de *Meloidogyne* posibles de identificar con el test de hospederos diferenciales (Sasser y

Carter, 1985), tampoco correspondió a *M. ethiopica* que responde al test al igual que *M. arenaria* raza 2 (Carneiro, 2003). Se comprobó la pureza de la población de Limache. En el caso que coexistieran dos o más especies el test arrojaría muchos signos positivos.

Cuadro 5. Índices de calificación de raíces de *Meloidogyne* de Boco.

Plantas Hospederas						
Plantas Hospederas	Tabaco	Algodón	Pimentón	Sandía	Maní	Tomate
Masas de huevos	5	0	0	5	0	5
Nódulos	5	0	0	5	0	5

Según el Cuadro 5, tabaco, sandía y tomate obtuvieron un índice de calificación de raíces igual a 5. Las tres especies presentaron alta nodulación, y se encontró masas de huevos y huevos en 8 de cada 10 nódulos disectados.

Las raíces del algodón presentaron sinuosidades originadas por los juveniles de 2º estado de *Meloidogyne* que en su intento de penetrar la raíz causaron deformaciones en éstas. No hubo desarrollo del nemátodo por lo tanto se le asignó el índice 0.

Maní y pimentón presentaron raíces normales con ausencia de nódulos y masas de huevos obteniendo el índice 0.

No hubo contaminación de ningún tipo y el suelo se mantuvo libre de nemátodos ya que las plantas indicadoras y testigos no presentaron formación de nódulos ni de masas de huevos.

Identificación de la población de *Meloidogyne* spp proveniente de Boco mediante el Test de Hospederos Diferenciales

Cuadro 6. Comparación clave de Boco con clave de identificación de razas y especies de *Meloidogyne* de Sasser y Carter, (1985).

DETERMINACIÓN DE ESPECIES Y PATOTIPOS DE *Meloidogyne*, EN KIWI (*Actinidia deliciosa*) Y TOMATE (*Lycopersicum esculentum*), MEDIANTE EL TEST DE HOSPEDEROS DIFERENCIALES.

Cultivares de plantas Hospederas						
Especies y razas de <i>Meloidogyne</i>	Tabaco NC 95	Algodón Deltapine 16	Pimiento California Gonder	Sandía Charleston Gray	Maní Florruner	Tomate Rutgers
<i>Meloidogyne</i> sp. pobl. de Boco	+	-	-	+	-	+
<i>M.incognita</i>						
Raza 1	-	-	+	+	-	+
Raza 2	+	-	+	+	-	+
Raza 3	-	+	+	+	-	+
Raza4	+	+	+	+	-	+
<i>M.arenaria</i>						
Raza 1	+	-	+	+	+	+
Raza 2	+	-	-	+	-	+
<i>M. javanica</i>	+	+	-	+	-	+
<i>M. hapla</i>	+	-	+	-	+	+

La población de Boco, correspondió a *M. arenaria* raza 2, como lo indica el Cuadro 6, donde se observa que los signos que identifican a la población de Boco coinciden con los de *M. arenaria* raza 2. Situación que se confirmó en el estudio de patrones perineales.

Identificación de *Meloidogyne* mediante análisis de dibujos perineales

El dibujo perineal, que muestra la Figura 7, hallado en las hembras de Limache podría corresponder a *M. ethiopica*, especie recientemente descrita en Chile (Carneiro, 2003), para confirmarlo es necesario complementar con otros estudios.

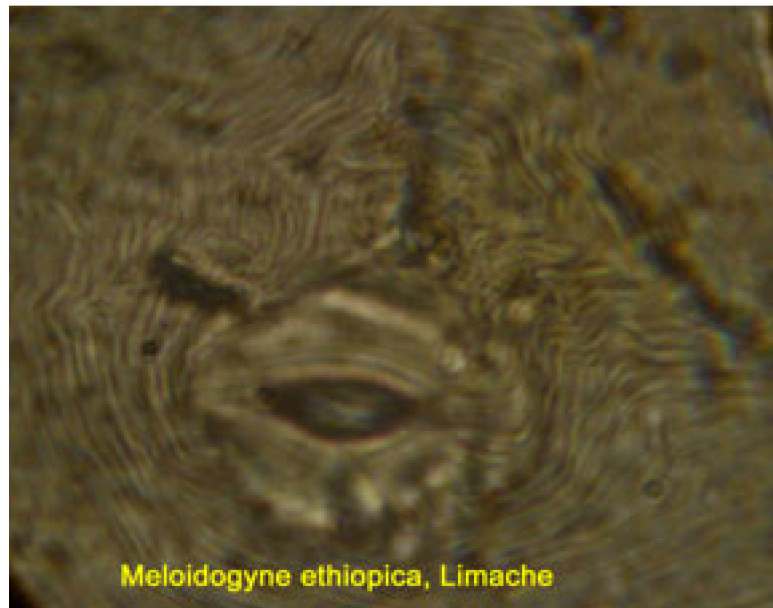


Figura 7 Fotografía de dibujo perineal extraído de hembra de Limache.

M. ethiopica, agrícolamente se caracteriza por la gran agresividad con que ataca a su hospedero, especialmente algunas especies o variedades más sensibles, pudiendo ocasionar la muerte en un período corto de tiempo (Mancilla, 2004).

El dibujo perineal de *M. ethiopica*, Figura 8A tiene forma ovalada o redondeada, con un arco dorsal (a) bajo redondeado a cuadrado, estrías (d) onduladas, cortas bifurcadas que se presentan como verdaderos picos en un costado o en ambos. En caso de no presentar los picos se observó estrías cortas irregulares onduladas que semeja un caparazón pero en desorden, con ausencia de líneas laterales (b). Y la presencia de notorios fasmidios.

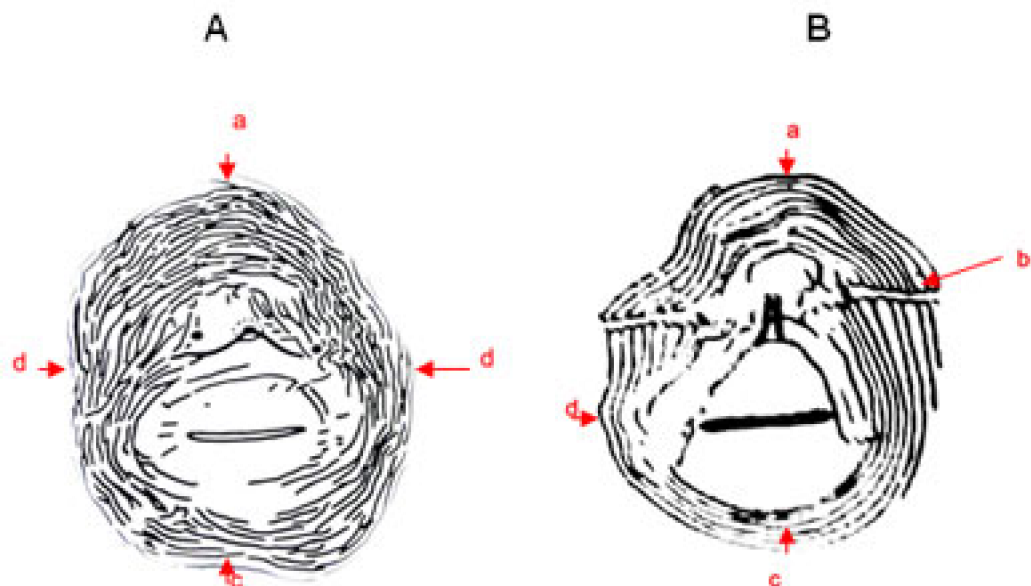
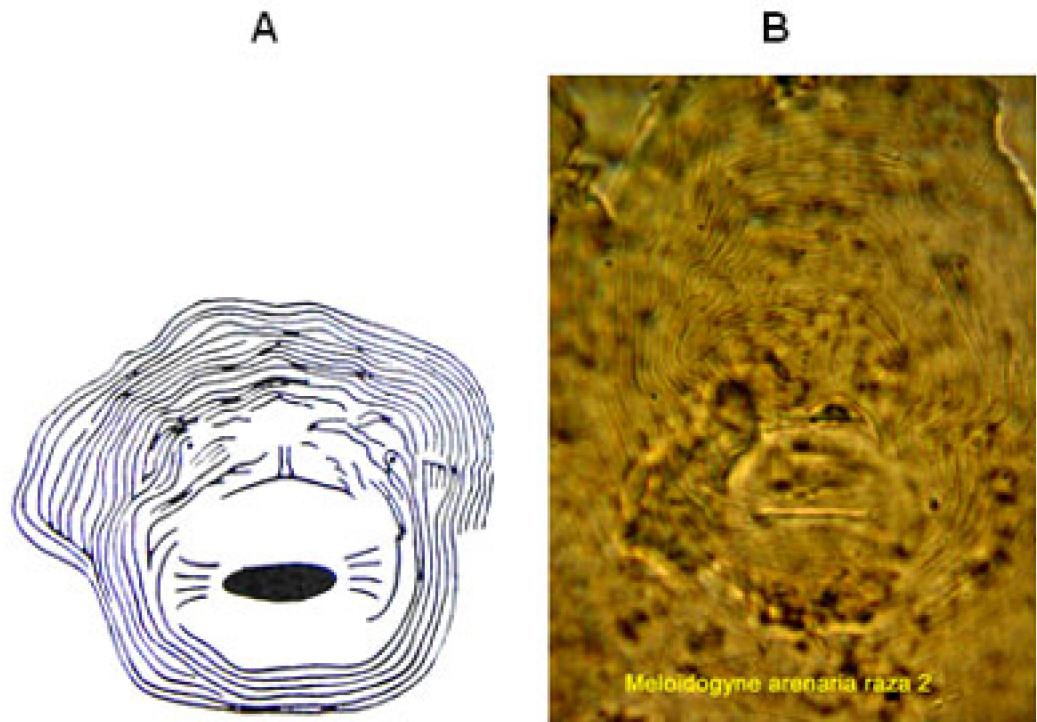


Figura 8. Dibujo perineal de hembras de Meloiodgyne. **A** *M. ethiopica* **B** *M. javanica*. Taylor y Sasser 1978.

DETERMINACIÓN DE ESPECIES Y PATOTIPOS DE *Meloidogyne*, EN KIWI (*Actinidia deliciosa*) Y TOMATE (*Lycopersicum esculentum*), MEDIANTE EL TEST DE HOSPEDEROS DIFERENCIALES.

- a: Arco dorsal.
- b: Línea lateral
- c: Arco ventral.
- d: Estrías.

La especie presente en Boco fue *Meloidogyne arenaria* raza 2, lo que confirma la presencia de esta especie en el territorio nacional como lo estableció González en 1987 y posteriormente lo reafirmó Muñoz en 1999.



Meloidogyne arenaria (Sasser y Taylor, 1978).

Figura 9. A Dibujo perineal Meloidogyne arenaria. B Fotografía de dibujo perineal de Meloidogyne arenaria raza 2.

CONCLUSIONES

La especie de *Meloidogyne* presente en Boco se identificó como *M. arenaria* raza 2.

No se identificó adecuadamente la población proveniente de Limache, pudiendo tratarse de una especie o raza nueva no descrita.

Para la correcta identificación de nemátodos es necesario estudiar más de un aspecto morfológico y complementarlo con estudios bioquímicos.

LITERATURA CITADA

AVISE, J. C. 1974. Systematic Value of Electrophoretic Data. *Syst. Zool.* 23:465-481.

ABALLAY, E.; BAETTIG, H. y VIEIRA, A. 1997. Evaluación de la tolerancia de ocho portainjertos de vid al nemátodo del nódulo de la raíz (*Meloidogyne* spp.). *Aconex* 56:15-20.

BARKER, K. R. 1985. Nematode Extraction and Bioassays. p 19-35. **In:** Barquer, K. R., Carter, C. C. And Sasser, J.N.(eds) *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. Department of Plant Pathology and the United State Agency for International Development. North Carolina State University Graphics. North Carolina. U.S.A. 223p.

CARNEIRO, R.; GÓMEZ, C.; ALMEIDA, M.; GÓMES, A. y MARTINS, I. 2003. Primeiro registro de *Meloidogyne ethiopica* Whitehead, 1968, em plantas de quivi no Brasil e Reação em diferentes plantas cultivadas. *Nematologia Brasileira* 27(2): 151-158.

CARNEIRO R., RANDIG O., ALMEIDA M. R., GOMES A.C. 2004. Additional information on *Meloidogyne ethiopica* Whitehead, 1968 (Tylenchida: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitising kiwi fruit and grape-vine from Brazil and Chile. *Nematology*, V.6 (1) p. 109-128.

DICKSON, D. W., HUSING, D. And SASSER, J. N. 1971. Dehydrogenases, Acid and Alkaline Phosphatases and Estruses for Chemotaxonomy of selected *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Heterodera* and *Aphelenchus* spp. *J. Nematol* 1:1-16.

EISENBACK, J.D. 1985. Diagnostic Characters Usefull in the Identification of the Four most common species of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* spp). P 95-112. **In:**

SASSER J.N. and CARTER C.C. An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Volume I: Biology and Control. North Carolina State University Graphics, Department of Plant Pathology. Carolina del Norte. USA. 422 p.

GONZÁLEZ, H. 1987. Importancia de las Especies y Razas del Nemátodo de la Raíz. IPA La Platina 39: 40-41.

HARTMAN y SASSER, 1985. Identificación of *Meloidogyne* species on the basis differential host test and perineal pattern morphology p: 69-77 . *In*: capítulo n° 5, *In* : SASSER J.N. y CARTER C.C. 1985. An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Volume II: Methodology. North Carolina State University Graphics. North Carolina. U.S.A. 223p.

HIRSCHMANN, H. 1985a. The Classification of the Family MELOIDOGYNIDAE. An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Vol 1: 35-45.

HIRSCHMANN, H. 1985b. The genus *Meloidogyne* and morphological characters differentiating its species. An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Vol 1: 79-93.

HIRSCHMANN, H. 1985c. Some Taxonomic principles. An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Vol 1: 27-33.

HUANG, J. 1985. Mechanisms of Resistance to Root-knot Nematodes. p.165-174. *i n*: An advanced Treatise on *Meloidogyne*. V. 1: Biology and control. Sasser, J. N. and Carter, C. C. (Ed.). North Carolina State University. Department of Plant Pathology. 422 p.

Hussey, R. S. 1985. Host Parasite Relationships and Associated Physiological Changes. p. 143-153. *i n*: An advanced Treatise on *Meloidogyne*. V. 1: Biology and control. Sasser, J. N. and Carter, C. C. (Ed.). North Carolina State University. Department of Plant Pathology. 422 p.

HUSSEY, R. 1985. Biochemistry as a technique in Identification and its probably usefulness in understanding the nature of Parasitism. An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Vol 1: 127-133.

HUSSEY, R. S. , SASSER, J. N., and HUSINGH, D. 1972. Disc Electrophoretic Studies of soluble Proteins and Enzymes of *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne arenaria*. J. Nematol. 4:183-189.

JIMENEZ, M. y GALLO, P. 1983. Nemátodos de la Iª Región de Chile. Predominancia de Especies del género *Meloidogyne*. Idesia7:5-14.

Magunacelaya, J. C. y DAGNINO, E. 1999. Nematología Agrícola en Chile. Universidad de Chile. Serie Ciencias Agronómicas N°2. Santiago. Chile. 288 p.

Magunacelaya, J. C. 1996. Nematología Agrícola en Chile, Resumen histórico y situación actual. Revista Nematológica Brasileira 20 (2): 107-120.

MAI, W. F. 1985. Plant-Parasitic Nematodes: they threat to agriculture. p. 11-17. *i n*: An advanced Treatise on *Meloidogyne*. V. 1: Biology and control. Sasser, J. N. and Carter, C. C. (Ed.). North Carolina State University. Department of Plant Pathology. 422 p.

MANCILLA, R. 2004. Evaluación de la resistencia de seis portainjertos de vid al nemátodo de la raíz *Meloidogyne ethiopica*, Whitehead, 1968 en condiciones de campo e invernadero. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. 51 p.

MUÑOZ, C. 1999. Determinación de especies y patotipos de *Meloidogyne* sp. en Casablanca y Limache, V Región, mediante el test de hospederos diferenciales. Tesis Ing. Agrónomo, Santiago, Chile, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. 63 p.

RHODE, R. A. 1960. Mechanisms of resistance to plant-parasitic nematodes. p. 447-453. *In: Nematology: fundamentals and recent advances with emphasis on plant parasitic and soil forms.* Sasser, J. N. and Jenkins, W. R. (Ed.) University of North Caroline, Durham, N. C. 480 p.

SASSER, J.N. and CARTER, C. C. 1985. Overview of the International *Meloidogyne* Proyect 1975-1984. *An Advanced Treatise on Meloidogyne.* Vol 1: 19-24.

TAYLOR,A.L. y SASSER, J.N. 1978. Biología, identificación y control de los nemátodos de nódulo de la raíz. Artes gráficas de la Universidad del Estado de Carolina del Norte. 111p.

TAYLOR,A.L. y SASSER, J.N. 1983. Biología, identificación y control de los nemátodos de nódulo de la raíz. Artes gráficas de la Universidad del Estado de Carolina del Norte. 111p.

TRIANAPHYLLOU, A. 1985. Cytogenetics, Cytotaxonomy and Phylogeny of Root-Knot Nematodes. *An Advanced Treatise on Meloidogyne.* Vol 1: 113-126.

VALENZUELA, A., ABALLAY, E. y TORRES, M. 1992. Identificación y Frecuencia de Nemátodos Asociados a la Vid en la región Metropolitana, Chile. *Investigación Agrícola* 12(1): 15-17.

VAN GUNDY, S.D. 1985. Ecology of *Meloidogyne* spp. emphasis on environmental factors affecting survival and pathogenecity. Capítulo n° 15, p: 177-182. *In: SASSER J.N. and CARTER C.C. An Advanced Treatise on Meloidogyne.* Volume II: Biology and Control. North Carolina State University Graphics, Department of Plant Pathology. Carolina del Norte. USA. 422 p.