

**ALTERACIONES HISTOLÓGICAS INDUCIDAS POR *MELOIDOGYNE HAPLA* Y *M. ARENARIA* EN ZANAHORIA (*DAUCUS CAROTA* L.) EN EL VALLE DE TEPEACA, PUEBLA, MÉXICO**

María Gabriela Medina-Canales<sup>1</sup>, Alicia Carvajal-Sandoval<sup>2</sup>, Ricardo Alejandro-Aguilar<sup>1</sup>, y Alejandro Tovar-Soto<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Parasitología y <sup>2</sup>Botánica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN. Carpio y Plan de Ayala S/N, Col. Santo Tomás, Del. Miguel Hidalgo, CP. 11340, México, D.F. (\*Becario COFAA-IPN). Correspondencia: alejandrotovars@hotmail.com

---

**ABSTRACT**

Medina-Canales, Ma. G., A. Carvajal-Sandoval, R. Alejandro-Aguilar, A. Tovar-Soto. 2011. Histological changes induced by *Meloidogyne hapla* and *M. arenaria* in carrot (*Daucus carota* L.) on the Tepeaca Valley, in Puebla, México. *Nematropica* 41:223-228.

The aim was to describe anatomical changes induced by *M. arenaria* and *M. hapla* in carrot roots. In 2008, 19 carrot fields from Tepeaca Valley, Puebla, central Mexico were sampled. Galled and not galled roots were collected, fixed in FAA, and embedded in paraffin for sectioning (9-10 µm) in longitudinal and transverse planes. Sections were stained with fuchsin-fast green and mounted in synthetic resin. *M. hapla* was identified in six of the 19 fields (31.6%) inducing small galls (diameter 1-4 mm) and proliferation of lateral roots; 2-9 giant cells with dense granular cytoplasm were observed and a large compact mass of nuclear material in the center was observed in most cases. Giant cells were located in vascular cylinder replacing the xylem and phloem. *Meloidogyne arenaria* was mixed with *M. hapla* in four fields (21.1%) and induced galls larger than those induced by *M. hapla* (0.5-1.5 cm diameter) and with no lateral roots. Four to twelve multinucleate giant cells were observed, containing dense granular cytoplasm and thick walls; nuclei and nucleoli were enlarged. These cells were located in cortical tissue mainly, but sometimes also invaded the vascular cylinder.

*Key word:* histopathology, *Daucus carota*, multi-nucleate giant cells, root-knot nematodes.

---

**RESUMEN**

Medina-Canales, Ma. G., A. Carvajal-Sandoval, R. Alejandro-Aguilar, A. Tovar-Soto. 2011. Alteraciones histológicas inducidas por *Meloidogyne hapla* y *M. arenaria* en zanahoria (*Daucus carota* L.) en el Valle de Tepeaca, Puebla, México. *Nematropica* 41:223-228.

El objetivo fue describir las alteraciones histológicas que *M. hapla* y *M. arenaria* inducen en las raíces de zanahoria. En 2008 se muestrearon 19 campos de zanahoria en la zona agrícola del Valle de Tepeaca, Puebla, en el centro de México. Para el estudio, se recolectaron raíces con y sin agallas, se fijaron en FAA y se incluyeron en parafina para realizar cortes de 9-10 µm de espesor en el plano longitudinal y transversal. Los cortes se tiñeron con fucsina-verde rápido y se montaron en resina sintética para su observación y análisis. Se identificó *M. hapla* en seis de los 19 campos muestreados (31.6%) e indujo la formación de agallas pequeñas de 1-4 mm de diámetro con proliferación de raíces laterales; en los cortes al microscopio óptico se observaron 2-9 células gigantes con el citoplasma denso y granuloso, en la mayoría de los casos con una masa grande y compacta de material nuclear en el centro. Las células gigantes se ubicaron en el cilindro vascular reemplazando al xilema y al floema. *Meloidogyne arenaria* apareció mezclada con *M. hapla* en cuatro de los campos muestreados (21.1%), e indujo agallas de mayor tamaño que *M. hapla* en las raíces (diámetro de 0.5-1.5 cm) y sin presencia de raíces laterales. En los cortes se observaron 4-12 células gigantes multinucleadas con citoplasma denso, granuloso y paredes engrosadas; los núcleos y nucléolos se observaron hipertrofiados. Estas células se ubicaron principalmente en el tejido cortical, aunque algunas veces invadieron también el cilindro vascular.

*Palabras clave:* células gigantes multinucleadas, *Daucus carota*, histopatología, nematodos agalladores.

---

En el estado de Puebla el cultivo de zanahoria es de gran importancia socioeconómica, ya que es el principal productor de esta hortaliza a nivel nacional y en donde se dedican anualmente más de 15,000 ha (SAGARPA, 2009). A nivel estatal destacan en la producción de zanahoria los municipios de Acatzingo, Los Reyes de Juárez, Quecholac, San Salvador el Seco, Palmar del Bravo, entre otros (SAGARPA, 2009). En la zona de estudio está documentada la presencia de *M. hapla* y *M. chitwoodi* en este cultivo (Montes-Belmont, 2000); sin embargo, Medina-Canales (2009) y Medina-Canales *et al.* (2009) sólo identificaron a *M. hapla* y *M. arenaria* asociadas a zanahoria. Un estudio realizado por Medina-Canales *et al.* (2010), mostró que la zanahoria es un cultivo muy susceptible al ataque de esta última especie, lo que representa un riesgo potencial para el cultivo. En esta nota se describen las alteraciones anatómicas que *M. hapla* y *M. arenaria* inducen en las raíces de zanahoria.

En el 2008 se llevó a cabo una exploración nematológica en la zona hortícola del Valle de Tepeaca, Puebla, en la zona centro de México. Esta exploración incluyó la toma de muestras de varias localidades de los municipios de Acatzingo, Los Reyes de Juárez, Quecholac y Palmar del Bravo, en las que se recolectaron plantas y suelo de 19 campos sembrados con zanahoria. En cada campo seleccionado se tomaron de manera aleatoria ocho a diez submuestras de suelo y raíces, lo que conformó la muestra representativa. Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Nematología Agrícola del Departamento de Parasitología, ENCB-IPN (De la Jara-Alcocer *et al.*, 1994). La identificación de las especies se llevó a cabo tomando en cuenta caracteres morfológicos y morfométricos de hembras, juveniles (J2) y machos (Eisenback *et al.*, 1983; Cliff y Hirschmann, 1985; Jepson, 1987; Perry *et al.*, 2009). Raíces con y sin agallas se fijaron con FAA (Formol 40%, Alcohol etílico 96%, Ácido acético), se deshidrataron en etanol (70%, 80%, 96%, 100%), dejándolas diez minutos en cada concentración, luego se incluyeron en parafina iniciando con una mezcla de parafina xilol v/v por 30 minutos. Posteriormente, se realizó un primer cambio de parafina durante dos horas, un segundo cambio durante dos horas y uno final por 24 horas. Una vez incluidas las raíces, se realizaron cortes de 9-10  $\mu\text{m}$  de espesor en el plano longitudinal y transversal utilizando un micrótopo de rotación. Los cortes se adhirieron en laminillas de vidrio utilizando un baño de flotación con gelatina Difco; después todas las series de los cortes se tiñeron con fucsina-verde rápido (Carvajal-Sandoval, 1996). Finalmente, los cortes se deshidrataron y montaron en resina sintética para su observación y análisis a 10x y 40x, con ayuda de un microscopio óptico.

De los 19 campos de zanahoria muestreados, se identificó a *M. hapla* en seis de ellos (31.6%), mientras que en cuatro se encontraron mezcladas *M. arenaria* y *M. hapla* (21.1%). Las raíces de las plantas infectadas por *M. hapla* mostraron agallas pequeñas (1-4 mm)

con proliferación de raíces laterales; en tanto que *M. arenaria* formó agallas de mayor tamaño (0.5-1.5 cm de diámetro) y sin presencia de raíces laterales. En el resto de los campos muestreados (43.3 %), las plantas no presentaron infección por nematodos agalladores.

*Anatomía del tejido sano.* En el plano transversal, se observó la epidermis como la capa más externa, formada por células isodiamétricas y acuticulares (Fig. 1A). La corteza o tejido cortical estuvo conformada por aproximadamente 25 capas de células asimétricas dispuestas en filas radiales, mientras que la endodermis fue uniseriada y localizada después de la corteza (Fig. 1A). El periciclo se ubicó hacia la parte central de la raíz, rodeando al cilindro vascular, constituido por una capa de células uninucleadas. El cilindro vascular formado por floema y xilema, este último con arreglo poliarca (Fig. 1A). En el plano longitudinal, las células de la epidermis se mostraron alargadas e irregulares y sin presencia de cutícula. Las células del tejido cortical fueron uninucleadas, alargadas y delgadas. En el tejido vascular el xilema se observó formado por vasos con puntuaciones escalariformes, mientras que el floema se presentó adyacente al xilema formando vasos delgados y alargados (Fig. 2A).

*Cortes de raíz de zanahoria infectada con M. arenaria.* En el plano transversal se apreciaron de 1-3 hembras por agalla con la parte anterior del cuerpo hacia el cilindro vascular y la posterior orientada hacia la corteza (Fig. 1B, 1C). Cercana a la parte anterior de las hembras se formaron 4 a 12 células gigantes multinucleadas, con citoplasma denso y granuloso, núcleos y nucléolos hipertrofiados y paredes celulares engrosadas (Fig. 1F), ubicadas principalmente entre el cilindro vascular y la corteza (Fig. 1B, 1C, 1D). En algunos cortes las células gigantes desplazaron al cilindro vascular, lo que provocó el rompimiento en dos (Fig. 1B); en otros casos aparecieron algunos huecos ocupando aproximadamente el 30% del diámetro de la raíz, correspondientes a células gigantes (Fig. 1B, 1D). También se observaron pequeñas zonas lignificadas cercanas a los nematodos (Fig. 1E). En el plano longitudinal, el nematodo apareció ubicado de manera similar a la del plano transversal, formando células gigantes típicas (Fig. 2C, 2F), en algunos casos las células gigantes obstruyeron en su totalidad al cilindro vascular (Fig. 2B, 2C, 2D). Hubo lignificación en zonas cercanas a los nematodos (Fig. 2E).

*Cortes de raíz de zanahoria infectada con M. hapla.* En el plano transversal aparecieron 1-2 hembras por agalla, ubicadas en el tejido de manera similar a *M. arenaria* (Fig. 1G, 1H). Se observó la formación de 3 a 7 células gigantes, cuyo material nuclear estuvo formado principalmente por una masa compacta en donde hubo varios nucléolos (Fig. 1H, 1I, 1J). En la mayoría de los cortes, las células gigantes se encontraron invadiendo el cilindro vascular, reemplazando casi por completo al xilema y floema, y adquiriendo forma de roseta (Fig. 1I, 1J, 1K). En algunas células gigantes no se observó material nuclear en su interior, debido al nivel al que se

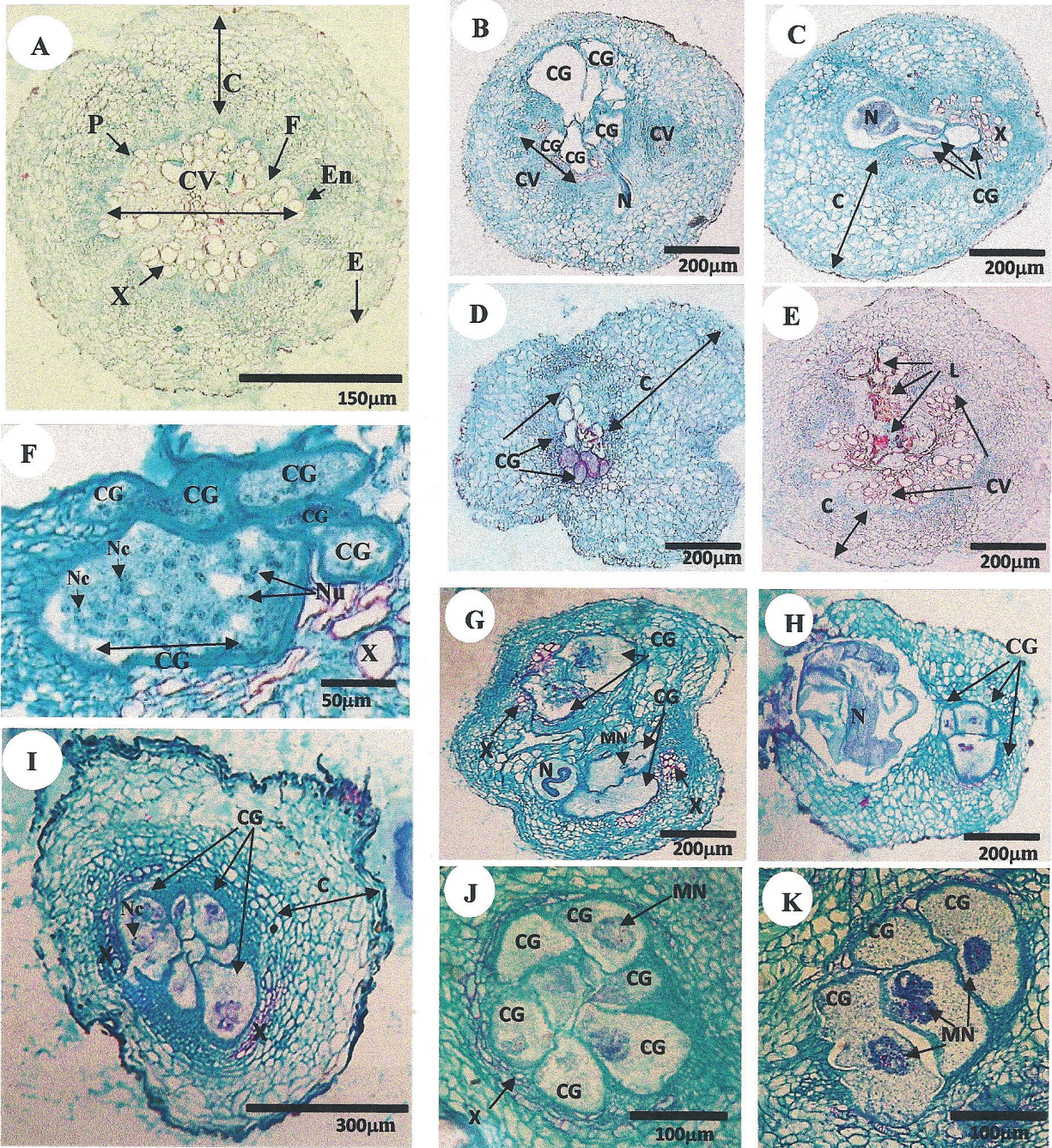


Figura 1. Cortes histológicos en el plano transversal de raíz de *Daucus carota*. A) Testigo. B-F) Cortes transversales de raíz infectada con *M. arenaria*. B-D) Células gigantes invadiendo xilema y parte del periciclo. B) Huecos correspondientes a células gigantes. E) Zonas de lignificación entre el xilema, periciclo y corteza. F) Células gigantes multinucleadas con paredes engrosadas y citoplasma denso y granuloso. G-K) Cortes transversales de raíz infectada con *M. hapla*. G-J) Células gigantes multinucleadas invadiendo en su totalidad el cilindro vascular. Estas células presentan paredes engrosadas, citoplasma denso y granuloso, y material nuclear compacto en su interior. C = corteza, CG = célula gigante, CV = cilindro vascular, E = epidermis, En = endodermis, F = floema, L = lignificación, MN = material nuclear, N = nematodo, Nc = nucléolo, Nu = núcleo, P = periciclo, X = xilema.

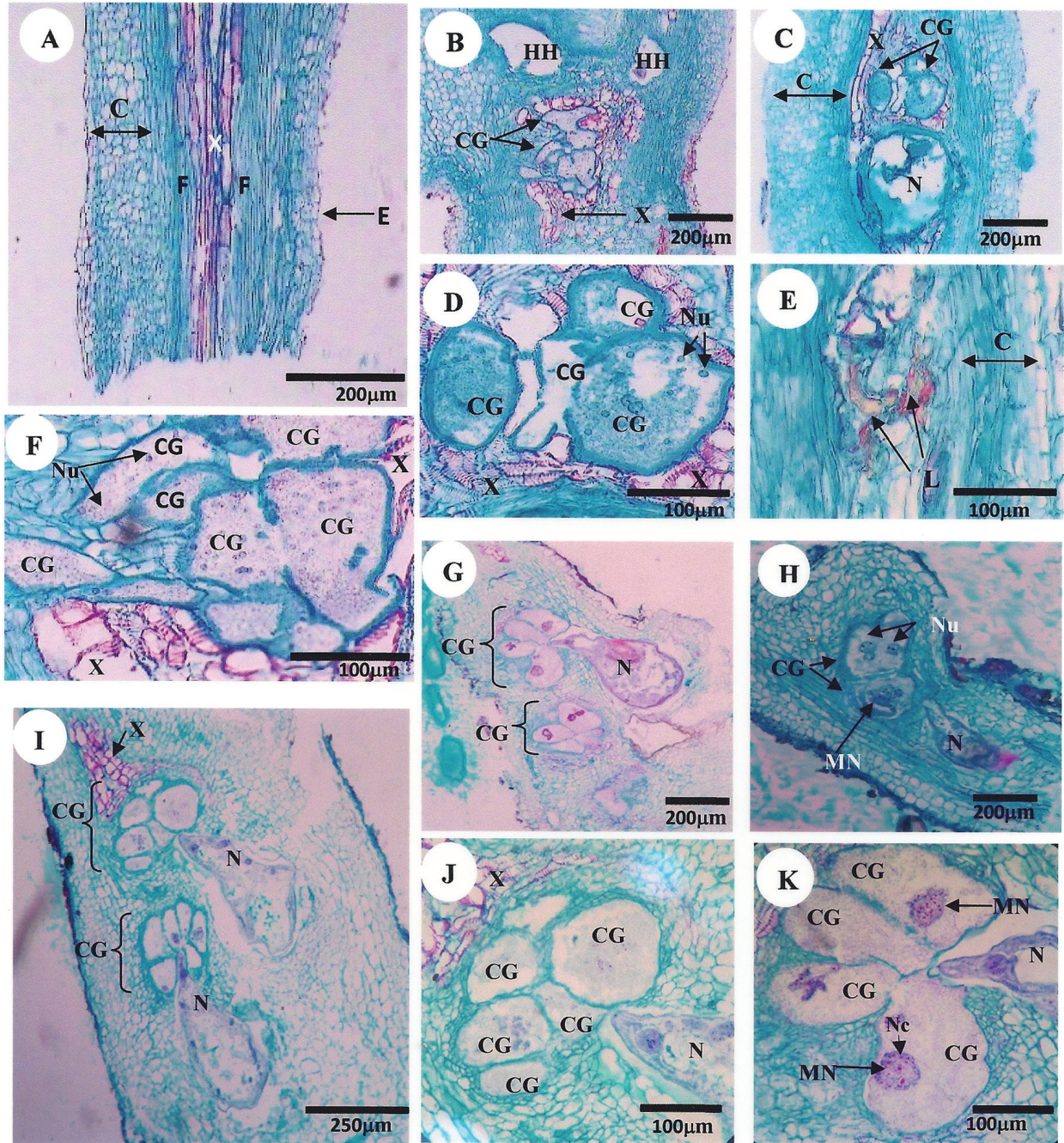


Figura 2. Cortes histológicos en el plano longitudinal de raíz de *Daucus carota*. A) Testigo. B-F) Cortes longitudinales de raíz infectada con *M. arenaria*. B-D, F) Hembras invadiendo el cilindro vascular e induciendo células gigantes con variación en el número, forma y tamaño de núcleos; presentan citoplasma denso, granuloso, con paredes engrosadas. E) Zonas de lignificación. G-K) Cortes longitudinales de raíz infectada con *M. hapla*. Células gigantes en forma de roseta con citoplasma denso y granuloso, paredes engrosadas, algunas con masa de material nuclear en el centro y otras con núcleos. C = corteza, CG = célula gigante, E = epidermis, F = floema, HH = hueco de la hembra, L = lignificación, MN = material nuclear, N = nematodo, Nc = nucléolos, Nu = núcleo, X = xilema.

hizo el corte (Fig. 1G, 1K). En el plano longitudinal, las células gigantes también oscilaron de 2 a 7 tomando forma de roseta e invadiendo gran parte del cilindro vascular (Fig. 2G, 2H, 2I, 2J, 2K); en pocos cortes hubo presencia de células gigantes multinucleadas (Fig. 2H).

*Meloidogyne arenaria* indujo la formación de 4-12 células gigantes, número diferente a lo reportado por Pedrosa *et al.* (1996), quienes observaron 5-8 células gigantes en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Por su parte, Abrantes *et al.* (1994) reportaron 3-6 células gigantes en col (*Brassica oleracea* L.) infectada con la misma especie; este número coincide con el reportado por Castillo *et al.* (2001) en raíces de mora blanca (*Morus alba* L.), en la que se mencionan 3-8 células gigantes, o lo registrado por Vovlas *et al.* (2005) en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) infectado con *M. arenaria*, en cuyas raíces se observaron 4-6 células gigantes. Está documentado en la literatura que a mayor susceptibilidad del cultivo, el número de células gigantes incrementa (Sosa-Moss *et al.*, 1983; Pedrosa *et al.*, 1996); ésto probablemente explica la susceptibilidad de la zanahoria a *M. arenaria*. Las células gigantes observadas en el estudio mostraron características similares a lo mencionado en la literatura: multinucleadas, citoplasma denso y granuloso, ubicación principalmente entre el cilindro vascular y la corteza (Sosa-Moss *et al.*, 1983; Taylor y Sasser, 1987; Abrantes *et al.*, 1994; Pedrosa *et al.*, 1996; Castillo *et al.*, 2001; Vovlas *et al.*, 2005). La cantidad de núcleos en las células gigantes observadas varió entre 40 y 60, un número mayor al reportado en garbanzo, en donde se encontraron 20-30 (Vovlas *et al.*, 2005); en el caso de frijol infectado con *M. arenaria* raza 2, hubo 16-64, mientras que con *M. arenaria* raza 1 sólo hubo 8-34 núcleos por célula gigante (Pedrosa *et al.*, 1996). La cantidad de núcleos en las células gigantes muestra la capacidad que éstas tienen para la producción de tubulina utilizada en la síntesis de las fibras del huso acromático o bien para unir las fibras del huso acromático al cinetocoro (Starr, 1993). En el estudio también aparecieron pequeñas zonas lignificadas alrededor de las hembras, condición que se ha puesto de manifiesto en otros estudios histopatológicos (Castillo *et al.*, 2001; Vovlas *et al.*, 2005; Tordable *et al.*, 2008). De acuerdo con Ride y Barber (1987), la lignificación del tejido se debe a que la pared celular de los vegetales constituye una barrera física contra el ataque de patógenos, ya que ante la agresión de éstos se incrementa la formación de lignina y suberina para restringir su penetración. Por su parte, *M. hapla* indujo la formación de células gigantes en el cilindro vascular y periciclo de las raíces de zanahoria, ocasionando desorganización y desplazamiento de los vasos del xilema y del floema hasta lograr la desaparición de éstos en algunos casos. Este fenómeno está bien documentado para las cuatro especies más importantes de *Meloidogyne* (Sosa-Moss *et al.*, 1983). Las células gigantes variaron de tres a siete, fueron ovaladas, con paredes engrosadas y con citoplasma denso y granuloso; en la gran mayoría

de los casos con una sola masa nuclear en el centro de la célula y con 5 a 10 nucléolos. Sosa-Moss *et al.* (1983) encontraron en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) infectado con *M. hapla*, 1-2 núcleos, algo inusual para otras especies del género (Huang y Maggenti, 1969). Vovlas *et al.* (2005) atribuyen este fenómeno a la fusión irregular de los cromosomas en la metafase, dando como resultado un cambio en la orientación del huso acromático y una distribución desigual de los cromosomas en la anafase; este fenómeno también ha sido documentado en margaritón (*Chrysanthemum maximum* Rammond) infectado con *M. hapla* (Medina-Canales, 2007).

*M. arenaria* y *M. hapla* indujeron en las raíces de zanahoria la formación de células gigantes, en donde para cada especie varió el número y la disposición de las mismas en la raíz. Este es el primer registro para *M. arenaria* atacando zanahoria en la zona de estudio y en México. Si bien esta especie no presenta una amplia distribución en la zona, habrá que tomar en cuenta algunas prácticas culturales para evitar su dispersión.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado con beca para la realización de los estudios de maestría. También se reconoce el apoyo económico de la Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN, quien otorgó financiamiento para realizar la presente investigación como parte de los proyectos SIP-IPN: 20070929, 20080553 y 20091165.

#### LITERATURA CITADA

- Abrantes, I. M. De O., N. Vovlas, M. S. N. De A. Santos, and S. N. Espirito Santo. 1994. *Meloidogyne arenaria* and *Plasmodiophora brassicae* causal agents of gall development on cabbage roots in the Republica Democratica de São Tomé e Príncipe. *Nematologia Mediterranea* 22:115-118.
- Carvajal-Sandoval, A. 1996. Manual de Histología Vegetal. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F., México. 42 p.
- Castillo P., M. Di Vito, N. Vovlas, and R. M. Jiménez-Díaz. 2001. Host-parasite relationships in root-knot disease of white mulberry. *Plant Disease* 85:277-281.
- Cliff, M. G. and H. Hirschmann. 1985. Evaluation of morphological variability in *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology* 17:445-459.
- De la Jara-Alcocer, F., F. Zeron-Bravo, R. Torres-Coronel, y A. Tovar-Soto. 1994. Manual de Prácticas de Nematología Agrícola. 2a. Edición. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN. México, D.F., México. 107 p.
- Huang, C. S., and R. A. Maggenti, 1969. Mitotic aberrations and nuclear changes of developing

- giant cells in *Vicia faba* caused by root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*. *Phytopathology* 59:447-455.
- Eisenback, J. D., H. Hirschmann, N. J. Sasser and A. C. Triantaphyllou. 1983. Guía para la identificación de las cuatro especies más comunes del nematodo agallador (*Meloidogyne* especies) con una clave pictórica. Raleigh North Carolina. Press, Raleigh. USA. 48 p.
- Jepson, B. S. 1987. Identification of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* species). CAB International. Wallingford Oxon, U.K. 265 p.
- Medina-Canales, Ma. G. 2007. Histopatología e identificación de la (s) especie (s) de *Meloidogyne* que atacan al margaritón (*Chrysanthemum maximum*) Rammond, en Villa Guerrero, Estado de México. Tesis de licenciatura. Instituto Politécnico Nacional. México, D. F., México. 59 p.
- Medina-Canales, Ma. G. 2009. Histopatología y patogenicidad del nematodo agallador *Meloidogyne* spp. en zanahoria (*Daucus carota* L.) en el Valle de Tepeaca, Puebla. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. México D.F., México. 110 p.
- Medina-Canales, Ma. G., A. Tovar-Soto, y R. Torres-Coronel. 2009. Distribución del Nematodo Agallador *Meloidogyne* spp. en la Zona Hortícola del Estado de Puebla, México. Memorias XI Congreso Internacional/XXXVI Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. celebrado en Acapulco, Guerrero, México. Resumen L-20.
- Medina-Canales, Ma. G., A. Tovar-Soto, E. Ramírez-San Juan y R. Torres-Coronel. 2010. Patogenicidad de *Meloidogyne arenaria* en cuatro variedades de zanahoria (*Daucus carota* L.) en México. Memorias XII Congreso Internacional/XXXVII Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. celebrado en Mérida, Yucatán, México. Resumen C-72.
- Montes-Belmont, R. 2000. Nematología Vegetal en México. Investigación documental. Sociedad Mexicana de Fitopatología. México. D.F., México. 93 p.
- Pedrosa, E. M. R., R. S. Hussey, and H. R. Boerma. 1996. Cellular responses of resistant and susceptible soybean genotypes infected with *Meloidogyne arenaria* races 1 and 2. *Journal of Nematology* 28:225-232.
- Perry, N. R., M. Moens, and J. L. Starr. 2009. Root-Knot Nematodes. CABI. Wallingford, UK. 488 p.
- Ride, J. P., and M. S. Barber. 1987. The effects of various treatments on induced lignification and resistance of wheat to fungi. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 31:349-360.
- SAGARPA. 2009. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [en línea] www.sagarpa.gob.mx.
- Sossa-Moss, C., K. R. Barker, and M. E. Daykin. 1983. Histopathology of selected cultivars of Tobacco infected with *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 15:392-397.
- Starr, J. L. 1993. Dynamics of the nuclear complement of giant cells induced by *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology* 25:426-421-426.
- Taylor, L. A., y N. J. Sasser. 1983. Biología, Identificación y Control de los Nematodos del Nódulo de la Raíz (Especies de *Meloidogyne*). Proyecto Internacional de *Meloidogyne*. Impreso por Artes Graficas de la Universidad del Estado de Carolina del Norte, Raleigh, USA. 111 p.
- Tordable, M. del C., P. Lax, y M. E. Doucet. 2008. Análisis histopatológico en tubérculos de dos variedades de papa andina (*Solanum tuberosum* subsp. *andigenum*) infectadas por especies del género *Meloidogyne*. *Nematropica* 38:95-103.
- Vovlas, N., H. F. Rapoport, R. M. Jiménez-Díaz, and P. Castillo. 2005. Differences in feeding sites induced by root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. in chickpea. *Phytopathology* 95:368-375.

---

Received:

14/III/2011

Accepted for publication:

13/VII/2011

Recibido:

Aceptado para publicación: