

26
2ef



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

**Estudio comparativo de dos poblaciones
del nemátodo fitoparásito *Nacobbus aberrans*
(Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1944.**

T E S I S

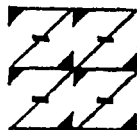
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

SANDRA OLVERA MARTINEZ

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HUMANO
ES
DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.

OCTUBRE DE 1995

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El hombre se cansa,
el espíritu no;
el hombre se rinde,
el espíritu nunca;
el hombre se aflige,
el espíritu vuela;
el espíritu vive cuando el hombre muere.

El hombre parece,
el espíritu es;
el hombre sueña,
el espíritu vive;
el hombre es dominado,
el espíritu es libre;
el espíritu es lo que el hombre puede ser.

The Water Boys

La presente tesis fue distinguida con una beca por parte de:

*** la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), y**

⊗ la Dirección de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPI) del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

RECONOCIMIENTOS

Por las facilidades y el apoyo material otorgado para la realización del presente trabajo, el reconocimiento a las siguientes instituciones:

**A la Universidad Nacional Autónoma de México
(Facultad de Estudios Superiores Zaragoza)**

**Al Instituto Politécnico Nacional
(Escuela Nacional de Ciencias Biológicas,
Laboratorio de Nematología Agrícola)**

**Al Instituto Mexicano del Petróleo
(División de Protección Ambiental,
Departamento de Estudios de Calidad del Aire).**

DEDICATORIAS

- ‡ A **DIOS**, gracias por darme la oportunidad de vivir; gracias por la creación.
- ⊕ A mis padres, **Aurora** Martínez Sandoval y **Juan** Olvera Barajas, por toda la responsabilidad que implica ser guía y ejemplo a seguir. No existe nada en el mundo con lo que se pueda pagar *TODO* lo que ustedes me han dado de forma incondicional. Quiero que sepan que los quiero mucho y que aunque vivo aislada en mi mundo siempre los llevo conmigo.
- ◇ A mi abuelita **Juana** Sandoval, por haber dedicado gran parte de su vida a mí; asimismo, gran parte de lo que soy es por ti.
- ✱ A mis hermanos **Abraham** y **Juan**. El saber que son autónomos e independientes, hace que me sienta orgullosa de ustedes.
- ♥ A **MELESIO**, dedico de forma muy especial esta tesis. Gracias por compartir conmigo tantas cosas buenas, problemas, aventuras y locuras. Agradezco tu apoyo, tu paciencia; admiro tu disposición de crecer, de ser mejor día con día en todos los aspectos para no estancarnos, tu entusiasmo por aprender más cosas y romper la rutina, y tu gran amor a la familia; deseo que nunca cambies, que nunca dejes de apoyarme y nunca dejemos de soñar; *nunca* hay que dejar de ser niños.
- ⊞ Con cariño y respeto a **Don Raúl Balderas M., Doña Teresa Palacios L. y Familia**, gracias por su apoyo y aceptación.
- ★ Con todo el respeto que me merece, muy en especial al M. en C. **Fernando De la Jara A.** por sus valiosos comentarios y su importantísima participación, sin la cual este trabajo no habría culminado.
- ✱ Al Biól. **Alfredo A. Bueno H.** por haber aceptado asesorar este trabajo y al Q.B.P. **Filiberto Zerón B.** por la oportunidad brindada.

* A la Profra. **M^a del Rosario Chapa R.** del Laboratorio de Inmunoparasitología, al M. en C. **Benjamín Noguera T.** y a los Q.B.P. **Judith Estevez R.** e **Iyure Bustos R.** del Laboratorio de Entomología, Dpto. de Parasitología, de la E.N.C.B. (I.P.N.) por su apoyo desinteresado en la orientación técnica y metodológica que gentilmente me proporcionaron.

♠ A los Biólogos **Rolando Torres C., Ricardo Martínez F.,** y al M. en C. **Alejandro Tovar S.,** por sus comentarios.










❖ A la Ing. **Guadalupe Báez C.** por su apoyo y comprensión durante mi estancia en el Departamento de Estudios de Calidad del Aire del I.M.P., a todo el personal que ahí labora; en particular al Biólogo **J. Manuel Morán.**

☆ Mil gracias a los profesores: M. en C. **Dolores A. Escorza C.,** Biól. **Alejandro Tecpa J.** y Biól. **Efrain Angeles C.** por coadyuvar al enriquecimiento y a la calidad de este trabajo.

☞ A mis compañeros del Laboratorio de Nematología Agrícola: **Adriana Arreguín P., M^a Guadalupe Espinoza** de los Monteros R., y **Gerardo López V.,** por los buenos momentos que compartimos en el laboratorio, espero que siempre logren sus metas cualesquiera que éstas sean.

☺ A mis amigos: **Cristina Salgado, Erika I. Gómez, Rubén D. Góngora, Patricia Reyes, Sonia Robledo, Rosenda Navarro, Ana M^a Soriano, E. Fabiola Morales, Artemisa Robles, M^a Martina López, Javier F. Solano, Sara P. Moreno, Teresa Vargas, José Luis Ramírez, Mónica Márquez, J. Cosme Aguilar, R. Elizabeth García** y al resto que no menciono, por todo su apoyo; las vivencias compartidas; y la amistad que hemos venido cultivando desde ya hace algún tiempo.

INDICE

CONTENIDO	PÁGINA
 Resumen	1
 Introducción: Generalidades sobre <i>Nacobbus aberrans</i>	2
● <i>Historia</i>	2
● <i>Distribución Geográfica y Hospederos</i>	2
● <i>Biología</i>	5
● <i>Sintomatología y Patología</i>	6
 Antecedentes	8
 Justificación	11
 Hipótesis de trabajo	12
 Objetivos	
 General	12
 Particulares	12
 Material y Métodos	13
I. Mantenimiento de las poblaciones en invernadero	13
II. Morfometría	14
<i>Ia. Extracción de nematodos</i>	14
<i>Ib. Montaje y medición</i>	14
III. Corrimiento electroforético zonal en geles de poliacrilamida-SDS	15
<i>IIIa. Determinación de la concentración proteínica (mg/ml) por el método de Lowry (Curva patrón)</i>	15
<i>IIIb. Determinación de la concentración proteínica de macerados de nematodos</i>	15
<i>IIIc. Preparación de las muestras para electroforesis</i>	16
<i>III d. Preparación de geles y corrimiento electroforético</i>	16

CONTENIDO**PÁGINA**

📖 Resultados.....	20
I. Morfometría.....	20
<i>Ia. Longitud total (Lt)</i>	<i>20</i>
<i>Ib. Longitud del estilete (Ls)</i>	<i>23</i>
II. Patrones Proteínicos.....	25
<i>Ila. Comparaciones hechas entre muestras de los mismos geles.....</i>	<i>27</i>
<i>Iib. Comparaciones hechas entre muestras de los diferentes geles.....</i>	<i>28</i>
<i>Iic. Comparaciones de los patrones generales</i>	<i>28</i>
📖 Análisis de Resultados.....	31
I. Morfometría.....	31
II. Patrones Proteínicos.....	33
📖 Utilidades prácticas o aplicaciones del estudio realizado, en la Nematología Agrícola..	36
📖 Conclusiones.....	38
📖 Recomendaciones.....	39
📖 Literatura citada.....	40
📖 Anexos.....	49



RESUMEN

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Nematología Agrícola del Departamento de Parasitología (Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional), con el propósito de determinar posibles diferencias intraespecíficas de la especie *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944, utilizando hembras maduras de dos poblaciones provenientes de localidades geográficas diferentes (Actopan, Hidalgo y Chapingo, México) con base en el análisis de los perfiles densitométricos de sus respectivos perfiles proteínicos.

Asimismo, se midieron dos caracteres morfométricos (longitud total y longitud del estilete) en hembras maduras para contrastar diferencias que pudieran existir en esos caracteres para dichas poblaciones.

Se obtuvieron los patrones proteínicos mediante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y se leyeron en un densitómetro CD50 marca Heidelberg; los caracteres morfométricos fueron medidos en un microscopio óptico.

Los perfiles densitométricos presentaron alta semejanza intra e interpoblacional y no dieron indicios de que las poblaciones estudiadas representaran dos razas fisiológicas de este nemátodo.

De acuerdo con los caracteres morfométricos analizados, las poblaciones son similares a un nivel de confianza alto ($P=0.05$). Se obtuvieron nuevos valores máximos de la longitud total: $L_{t_{Actopan}} = 1655\mu\text{m}$, $L_{t_{Chapingo}} = 1878.8\mu\text{m}$; así como de la longitud del estilete $L_{s_{Actopan}} = 25.2\mu\text{m}$ y $L_{s_{Chapingo}} = 26.6\mu\text{m}$ para la especie *Nacobbus aberrans*.



INTRODUCCION: GENERALIDADES SOBRE *Nacobbus aberrans*

Los nemátodos fitoparásitos constituyen un grupo zoológico de gran importancia agrícola debido a que numerosas especies causan daños en diversos cultivares.

En particular, el nemátodo falso nodulador, *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1944, es una especie que destaca dentro de la Nematología Agrícola debido a que es polífaga, afecta diversos cultivares de importancia económica y porque su distribución en nuestro país se ha venido incrementando.

Historia

Thorne y Allen (1961), mencionan que Cobb (1918) fue, aparentemente, el primero en registrar la presencia de *Nacobbus* en Colorado, Estados Unidos. Sin embargo, Cobb lo consideró como *Heterodera schachtii* Schmidt, 1871; pero sus descripciones indican claramente que los ejemplares hallados corresponden al género *Nacobbus*.

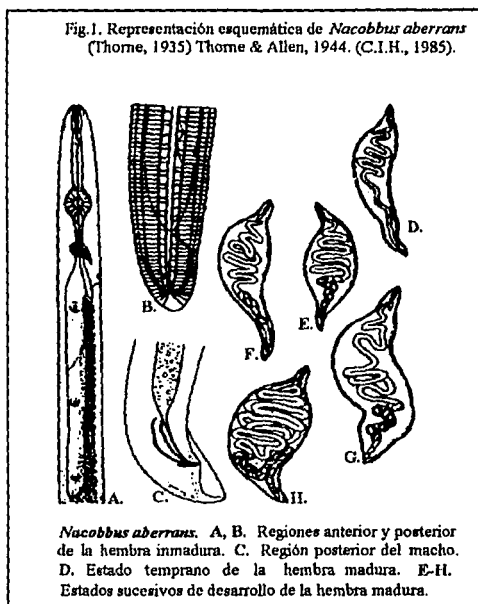
En 1944, Thorne y Allen propusieron el género *Nacobbus*, basados en el dimorfismo sexual pronunciado que presenta este organismo, las glándulas esofágicas sobrepuestas dorsalmente al intestino (Fig. 1) y los agallamientos que producen en las raíces de los hospederos (Sher, 1970).

Distribución Geográfica y Hospederos

N. aberrans presenta distribución neártica y neotropical; por lo tanto, se le encuentra en Norte y Sudamérica asociado con malezas y plantas cultivadas (Inserra et. al., 1983; Lehman, 1980). En Norteamérica, se reporta en la región Oeste de los Estados Unidos (Schuster y Thorne, 1956) y en México (Montes, 1988); en Sudamérica en las tierras altas de Argentina, Bolivia, Ecuador, Perú y Chile (De Ponce de León y Doucet, 1989; Doucet y Di Rienzo, 1991; Alarcón, 1977; Quimi, 1981; Alarcón y Jatala, 1977; Bravo, 1977; OEPP, 1984) aunque también se ha citado su presencia en algunos países de Europa, como en cultivos de invernadero del Reino Unido (Franklin, 1959), en Holanda (De Bruijn y Stemmerding, 1968), en la ex-



Unión Soviética en plantas de papa originarias de Finlandia y Perú y también en la India (OEPP, 1984).



Dada su distribución, se observa su adaptación a diversas condiciones de clima, desde templado a muy frío, y se le ha encontrado desde los 500 hasta los 4500 m.s.n.m. (Zamudio, 1987; Caballero y Muñoz, 1987), aunque se presenta preferentemente en las zonas más altas donde la temperatura es baja y favorable para ciertos hospederos (Alarcón y Jatala, 1977). Los suelos que favorecen su desarrollo son los de tipo arcilloso con textura entre media y pesada (Schuster y Thorne, 1956; Caballero y Muñoz, 1987).

Particularmente, en México, Brunner (1967) lo encuentra por primera vez infectando chile (*Capsicum annuum* L.) en Chapingo, Estado de México. Para 1979 - se reportó su presencia en los estados de México, Hidalgo, Morelos, Guanajuato,



Tlaxcala, Zacatecas y Puebla, infestando cultivos de remolacha, tomate, frijol, espinaca, chile y trigo sarraceno (Montes, 1986; Mian y Rodríguez, 1989; citado por Silva, 1989) y en 1991 se registró la presencia de este nemátodo en el estado de San Luis Potosí, infectando tomate (Torres *et. al.*, 1994) (Fig. 2).



En la zona agrícola de Actopan, Estado de Hidalgo, este nemátodo ha sido estudiado por F. Zerón y F. De la Jara desde 1977 en cultivos de tomate (comunicación personal). Posteriormente, Tinoco (1981), De la Jara *et. al.* (1983), Torres (1984) y Cruz (1987) lo encontraron, además, en otros cultivares de importancia económica así como en malezas presentes en esa zona (De la Jara, Zerón y Tovar, 1990).

En Hidalgo y Guanajuato se ha encontrado parasitando tomate, en Puebla, chile (Rodríguez, 1974), tomate, frijol y espinaca (Zamudio y Marbán, 1983; citado por Zamudio, 1987) y en Oaxaca, tomate (Montes, 1986, 1988); mientras que en Chapingo se le ha localizado en cultivos de chile, tomate, (Montes, 1973; Equihua, 1977; Zamudio, 1987) espinaca y alegría (Castillo y Marbán, 1984).



Estos hospederos pertenecen a familias de gran importancia económica (Cuadro 1). Dentro de las arvenses se citan *Physalis* spp., *Amaranthus hybridus* L., *Portulaca oleracea* L. (Montes, 1986), *Chenopodium murale* L., *Ch. ambrosoides* L., *Solanum rostratum* Dun., *Datura stramonium* L., *Malva parviflora* L. y *Rumex crispus* L., entre otras (Torres, De la Jara, Zerón, 1985; Montes, 1988).

Cuadro 1. Hospederos de importancia económica que son infectados por *Nacobbus aberrans*.

Familia	Nombre común	Nombre científico
Cruciferae	Col	<i>Brassica oleracea</i> L.
	Brócoli	<i>B. oleracea botrytis</i> L.
Cucurbitaceae	Pepino	<i>Cucumis sativum</i> L.
	Calabaza	<i>Cucurbita pepo</i> L.
Solanaceae	Tomate	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.
	Chile	<i>Capsicum annuum</i> L.
	Papa	<i>Solanum tuberosum</i> L.
	Berenjena	<i>S. melongena</i> L.
Leguminosae	Frijol	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
	Chicharo	<i>Pisum sativum</i> L.
Chenopodiaceae	Remolacha azucarera	<i>Beta vulgaris</i> L.

(Información tomada de Cid del Prado, 1985; De la Jara, Zerón y Tovar, 1990; Inserra, Griffin y Anderson, 1985; Inserra *et. al.*, 1983; Johnson y Thames, 1972; OEPP, 1984).

Biología

Sobre este nemátodo fitoparásito se conoce cierta información acerca de su biología. Como es sabido, los factores físicos afectan la distribución de los organismos y presentan valores límite fuera de los cuales no pueden persistir por mucho tiempo ni reproducirse (Prasad y Webster, 1967). Uno de esos factores es la temperatura. Por ejemplo, la maduración de los huevecillos de *Nacobbus* está



grandemente influenciada por este factor: a 20 y 25°C se ve más favorecido su desarrollo que a 5, 10 y 15°C (Inserra *et. al.*, 1983).

Sin embargo, también se ha determinado que puede tolerar temperaturas bajas y sobrevivir bajo condiciones de desecación (Clark, 1967; Alarcón y Jatala, 1977; Jatala y Kaltenebach, 1979). Thorne (1961) afirma que bajo condiciones desérticas se mantienen las poblaciones de *Nacobbus*, ya que permanecen en la fase de huevo durante mucho tiempo (Tinoco, 1981). La aparente existencia de este periodo de quiescencia en el estado de huevo es un factor importante para completar su ciclo biológico y alcanzar la formación de hembras vermiformes, responsables de la formación de agallas en la raíz (Inserra *et. al.*, 1983; González, Franco y Matos, 1991). Al parecer, la película quitinosa y vitelina de la cubierta de los huevecillos juega un papel importante en la capacidad para soportar la desecación, la penetración fungal o la acción de compuestos exopáticos (O'Hara y Jatala, 1985).

Sintomatología y Patología

El diagnóstico, basado en la apreciación de la sintomatología de las partes aéreas de los vegetales parasitados en sus raíces por *Nacobbus*, no es confiable (Caballero y Muñoz, 1987) y sólo se relaciona con su existencia cuando ya ha causado daño, de tal forma que lo primero que se observa son los síntomas producidos por las alteraciones fisiológicas e histológicas de la raíz, que se presentan en forma similar en todos los hospederos que ataca *N. aberrans* (De Ponce de León y Doucet, 1989). Sin embargo, las etapas iniciales de la histopatología, evidenciada en parte por la formación del sincitio de *Nacobbus*, sí difieren considerablemente de las formadas por otros nemátodos, tanto por los estadios que los inducen como por los tejidos que afectan (Jones y Payne, 1977b).

El proceso se describe como sigue: Los sitios preferidos por *N. aberrans* para la invasión son la región de alargamiento, la región de maduración y la región apical (Quimi, 1981; Castillo y Marbán, 1984). Después de la penetración a la raíz, las larvas usualmente se orientan cerca del tejido vascular (Schuster y Thorne, 1956), estableciéndose en forma paralela a éste (Schuster, Sandstedt y Estes, 1965; Castillo y Marbán, 1984; Finetti, 1990). Al mismo tiempo, ésto implica una marcada alteración en la disposición de los elementos de conducción (Castillo y Marbán, 1984; De Ponce



de León y Doucet, 1989; Finetti, 1990) y se observa la inducción de nuevas raíces sólo en un lado de la agalla (Schuster, Sandstedt y Estes, 1965; Castillo y Marbán, 1984).

La presencia del nemátodo causa formación de agallas como consecuencia de una exagerada división celular (hiperplasia) e incremento en el tamaño de las células (hipertrofia) (Schuster y Thorne, 1956; Schuster, Sandstedt y Estes, 1965; De Ponce de León y Doucet, 1989) en la zona cortical y en el cilindro central; el cuerpo del nemátodo deforma la estructura histológica del área radicular que parasita, de tal modo que el sincitio llega a tener forma semilunar creciente, situándose adyacente al nemátodo (Jones y Payne, 1977a); es decir, el proceso comienza en una célula cercana a su región cefálica y continúa hasta que cientos de células forman una unidad interconectada (sincitio) entre 2 mm de ancho y 3 mm de largo o mayor (Schuster, Sandstedt y Estes, 1965). Estos efectos son aparentes cuando la larva asume la forma de "C" o de espiral, forma comúnmente encontrada en los primeros estadios de la infección.

Se observa disolución de las paredes celulares en la vecindad del nemátodo (Schuster y Thorne, 1956; Schuster, Sandstedt y Estes, 1965, Jones y Payne, 1977a, b; Finetti, 1990), citoplasma denso y granulado, núcleos gigantes y deformes, vacuolización, y formación de gránulos de almidón (Schuster, Sandstedt y Estes, 1965; Jones y Payne, 1977a; Inserra *et. al.*, 1983; Castillo y Marbán, 1984; Finetti, 1990).

Las hembras inmaduras abandonan las raíces donde se están desarrollando y penetran nuevamente en otra, donde llegan a ser sedentarias y formar la agalla. La fertilización puede ocurrir después de que las hembras llegan a ser sedentarias, ya que se han encontrado machos en la masa gelatinosa que secreta la hembra a través del ano (Inserra *et. al.*, 1983; Cid del Prado, 1985).



ANTECEDENTES

Se han realizado estudios referentes a varios aspectos sobre la biología de la especie *Nacobbus aberrans* y en varios lugares, se han encontrado diferencias de comportamiento en relación con el hospedero, tales como distintos grados de agresividad en ellos (Canto-Sáenz, 1990; Doucet y Di Rienzo, 1991).

En este aspecto, se pueden mencionar los estudios de Bravo (1977), quien al determinar la patogenicidad de dos poblaciones de *N. aberrans* del Perú (Población 1. Puno y Población 2. Valle del Mántaro) no encontró diferencias en el porcentaje de nodulación en los hospederos manejados (*Solanum tuberosum* subsp. *andigena* X *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* y *Ullucus tuberosum*) pero sí en la patogenicidad de cada población a un cultivo determinado: la población 1 fue más patógena en papas y la población 2 en olluco.

Inserra, Di Vito y Ferris (1984) indican que en Estados Unidos, solamente se encuentra la raza "remolacha azucarera", explicando que se reproduce en kochia (*Kochia scoparia* (L.) Schrad.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.), pero no en Chile (*Capsicum annuum* L.) ni en papa (*Solanum tuberosum* L. y *S. tuberosum* subsp. *andigena* Jus. y Buk.).

En 1993, Toledo, Sosa-Moss y Zavaleta-Mejía, propusieron la existencia de 3 razas de este nemátodo por medio de hospederos diferenciales: **Na-1** que se desarrolla en tomate (*Lycopersicon esculentum*) cv. Rutgers y acelga (*Beta vulgaris*) cv. Ford Hook Giant pero no en frijol (*Phaseolus vulgaris*) cv. Negro Querétaro; **Na-2** que se desarrolla en esas variedades de cultivares y **Na-3** que se desarrolla en frijol y acelga pero no en tomate.

Asimismo, varios autores han reportado diferencias en los caracteres morfométricos de distintas poblaciones de esta especie. Dentro de ellos, cabe mencionar a Jatala y Golden (1977) quienes estudiaron, para su identificación taxonómica, la morfología y morfometría de 26 poblaciones de *N. aberrans* provenientes de Argentina, Bolivia, Ecuador y Perú, en las que encontraron diferencias en el aspecto morfométrico que se consideraron dentro de los límites de las poblaciones descritas por Sher (1970); a pesar de esto, indican que no se trata de



una especie homogénea y simple, sino que involucra dos o más formas, fundamentados en el hecho de que *N. aberrans* no se desarrolló en ninguna de las 6 variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) sometidas a prueba. Por el contrario; Costilla, Basco y De Gómez (1981) indican que existe susceptibilidad a este nemátodo en todas las variedades de papa cultivadas y en experimentación de Bolivia.

Cid del Prado (1986), estudió la morfología de cuatro poblaciones de *N. aberrans* utilizando microscopía electrónica de barrido y determinó que éstas tienen básicamente las mismas características cefálicas: disco cefálico de forma circular u oval con tres fosas sensoriales de cada lado, lóbulos redondeados y puentes cuticulares. Sin embargo, en las poblaciones provenientes de Nebraska, el armazón cefálico está ligeramente esclerosado y poco curvado mientras que en la población de Actopan, Hidalgo, éste es patente con barras gruesas que se proyectan posteriormente.

Este mismo autor en 1992, comparó morfológicamente tres poblaciones provenientes de México: Actopan, Hidalgo; Chapingo, México y Tecamachalco, Puebla, para caracterizar a cada una de ellas, ya que presentan una biología específica en relación al hospedero, lo que le hace suponer que existen razas fisiológicas. Ciertos porcentajes de esas tres poblaciones presentan diferentes morfologías; las hembras maduras provenientes de Actopan, Hidalgo, presentan el "cuello" corto y el extremo posterior no alargado mientras que las hembras de la población Chapingo presentan la tendencia de alargamiento de la región anterior del cuerpo o un "cuello" largo; por otra parte las hembras maduras de la población Tecamachalco presentan "cuello" corto y región posterior alargada.

Doucet (1989), comparó morfológica y morfométricamente diferentes poblaciones de *N. aberrans* de la República Argentina y otros países, ya que se tenían antecedentes de que su comportamiento variaba de acuerdo con su origen geográfico. Encontró que existen diferencias en la longitud del estilete en hembras maduras provenientes de Nebraska, E.U.A. y en la longitud del cuerpo de hembras maduras e inmaduras originarias de la localidad de Balcarce, Argentina.



Los valores medios de los caracteres morfométricos medidos en las poblaciones resultaron equivalentes y las diferencias reportadas no parecieron ser significativas; sin embargo, concluyeron que existe variabilidad de algunas características y que los límites morfométricos de esta especie son más amplios que los aceptados hasta ahora.

Doucet y Di Rienzo (1991), de igual manera, estudiaron la morfología y morfometría de poblaciones de 7 localidades de la República Argentina, asociadas a distintos cultivares para caracterizar aquellas poblaciones más representativas. En el aspecto morfológico no encontraron diferencias pero sí una gran variabilidad: el extremo caudal de las hembras inmaduras variaba de cónico a redondeado e incluso aplastado, pudiendo ser liso o anillado. En este último caso variaba el espesor y la disposición de los anillos. Los campos laterales de las hembras inmaduras y machos, generalmente fueron lisos y estaban delimitados por cuatro líneas rectas; en pocos casos hubieron campos escaleriformes con líneas transversales completas o incompletas. En raras ocasiones se observaron campos laterales delimitados por 5 líneas rectas o rugosas. En los caracteres morfométricos encontraron diferencias altamente significativas ($P=0.05$).

Por lo que respecta a la determinación de perfiles proteínicos de *Nacobbus aberrans*, Mayorga y Jatala (1990) realizaron un estudio electroforético para determinar posibles diferencias en los patrones de proteínas de 20 poblaciones de *N. aberrans* de varios países (aunque no mencionan cuáles). Reportaron diferencias en tales patrones para las poblaciones estudiadas, lo cual es atribuido a la posible existencia de razas.

De acuerdo con los autores antes mencionados, se puede observar que se han abordado distintos aspectos referentes a la biología de este nemátodo fitoparásito que, sin embargo, convergen hacia una misma conclusión: la posible existencia de un complejo de formas que componen la especie *Nacobbus aberrans*.



JUSTIFICACION

En México, *Nacobbus aberrans* afecta varios cultivares de importancia económica y se ha observado que un número considerable de arvenses es buen hospedero de este nemátodo fitoparásito. Aunque no existen datos del daño cuantitativo que causa a la agricultura mexicana, se ha reportado su agresividad en hortalizas como el chile (*Capsicum annuum* L.), el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), que, entre otros, son cultivos importantes ya que constituyen parte de la alimentación básica de la población y son, además, generadores de divisas.

Se ha demostrado también, que su distribución en nuestro país es cada vez mayor y su caracter polifágico constituye un riesgo para cultivares susceptibles en otras áreas agrícolas nacionales. Si se tiene el propósito de establecer modalidades adecuadas de manejo de nemátodos fitoparásitos, en este caso *Nacobbus aberrans*, y seleccionar especies vegetales y cultivares resistentes a este patógeno, es necesario tener un conocimiento preciso de la identidad de la especie y de sus poblaciones presentes en las áreas donde se tiene registrada su presencia.

La posible existencia de numerosas razas fisiológicas de *N. aberrans* representaría una seria complicación en el manejo de este nemátodo, con relación a la rotación de cultivares y uso de variedades resistentes. De aquí el interés de realizar este estudio que persigue contribuir al conocimiento de esta especie fitoparásita, económicamente importante en nuestro país y poder llegar a establecer algún tipo de control pertinente.

Los estudios de este nemátodo con respecto a la diferenciación de razas con base en sus perfiles proteínicos o enzimas no han sido reportados en México y son escasos a nivel mundial, por lo que como trabajo preliminar es importante a pesar de contemplarse sólo dos poblaciones (Actopan y Chapingo), ya que precisamente en ellas se observó un comportamiento diferente de este nemátodo frente al mismo hospedero; estudios anteriores solo presentan listados de cultivares de importancia económica y arvenses que son parasitados por esta especie o sobre la gran variabilidad morfológica y morfométrica que presenta, por lo tanto, este trabajo puede ser considerado como un antecedente o punto de comparación para trabajos subsecuentes.



HIPOTESIS DE TRABAJO

Si se observan diferencias bioquímicas en dos poblaciones del nemátodo fitoparásito *Nacobbus aberrans*, provenientes de distintas localidades geográficas, entonces se supondría la existencia de razas de esta especie de nemátodo.

OBJETIVOS

GENERAL:

Comparar morfométrica y bioquímicamente dos poblaciones de *Nacobbus aberrans* para determinar si son diferentes.

PARTICULARES:

1. Contrastar la longitud total y la longitud del estilete de hembras maduras de *Nacobbus aberrans* provenientes de Actopan, Estado de Hidalgo y Chapingo, Estado de México.

2. Evaluar las posibles diferencias en los perfiles densitométricos de los patrones proteínicos de las poblaciones mencionadas.



MATERIAL Y METODOS

Los métodos que se siguieron para cumplir los objetivos planteados se dividieron en los siguientes puntos:

- I. Mantenimiento de las poblaciones en el invernadero.
- II. Morfometría.
- III. Corrimiento electroforético zonal en geles de poli(acrilamida)-SDS.

I. Mantenimiento de las poblaciones en el invernadero

Se realizó la colecta aleatoria de suelo y raíces agalladas de parcelas donde se tenía conocimiento de la presencia de *Nacobbus aberrans* con base en muestreos anteriores, tanto en Actopan, Hgo., como en Chapingo, México. Las muestras de Chapingo fueron tomadas del lote Xaltepa X-5 del campo experimental de la U.A.C.H., donde se efectuaban trabajos de mejoramiento genético de maíz, frijol, calabaza, sorgo y tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), el cual era semejante al del tipo "cherry" o cereza y presentaba agallamientos. Las de Actopan se tomaron de campos de cultivo del municipio de Boxtha, donde se cultivaba tomate de la variedad ACE 55 VF.

Con el suelo proveniente de cada localidad se llenaron 8 macetas de 5 l de capacidad y otros recipientes de aproximadamente 30 l, a las cuales se añadió agua hasta obtener aproximadamente el equivalente a la capacidad de campo, y se sembraron semillas de tomate de la variedad ACE 55 VF; el riego se aplicó cada 3 días en la superficie del suelo, eliminándose manualmente las malas hierbas, cada vez que se presentaban.

Cuando existía suficiente nodulación se cortaron por el pie las plantas de tomate y se volvieron a sembrar más semillas del mismo en dichos sustratos, lo que se continuó haciendo hasta el final del estudio para mantener, en cada caso, las dos poblaciones del nemátodo (Actopan y Chapingo).



II. Morfometría

Ila. Extracción de los nemátodos.

Se sacaron del suelo las plantas de tomate y se eliminó la parte aérea. Las raíces se enjuagaron con agua de la llave y se cortaron las que presentaban agallas, las cuales se sumergieron en agua a 60°C durante 8-10 minutos. Se sacaron del agua y se colocaron en un frasco de 100 ml de boca ancha con lactofenol (Anexo I) calentado previamente en Baño María a 60°C. El frasco se puso en la estufa a 37-40°C durante dos días.

Se disectaron las agallas cuidadosamente en el microscopio estereoscópico y se extrajeron completas las hembras maduras de *N. aberrans*. El criterio para determinar que el ejemplar extraído fuera una hembra madura, era localizar en la agalla, la masa de huevecillos; si ésta no era patente, entonces se comparaba el ejemplar con las descripciones gráficas hechas por Sher (1970). Se eliminó al máximo posible el material vegetal que se encontraba adherido a la superficie del cuerpo del nemátodo y se colocaron en lactofenol durante 2 días más a 37-40°C; hasta entonces se procedió a su montaje.

IIf. Montaje y medición.

Se colocaron en un portaobjetos limpio 5 nemátodos y fragmentos de vidrio muy delgado con el fin de no romper los organismos; se añadieron 5 gotas de lactofenol y se puso cuidadosamente un cubreobjetos limpio. El exceso de lactofenol se limpió con un hisopo humedecido con etanol. La preparación se dejó secar aproximadamente 12 horas a 37°C y se selló con barniz de uñas. Se rotularon adecuadamente las preparaciones (De la Jara y Zerón, 1989).

Los parámetros que se consideraron para la medición de los nemátodos fueron: longitud total (Lt), medida en el objetivo seco débil (10x) y longitud del estilete (Ls), medida en el objetivo seco fuerte (40x) (Anexo I), (Sher, 1970; C.I.H., 1985; Doucet, 1989; Doucet y Dí Rienzo, 1991), que fueron medidos con un micrómetro ocular marca Leitz, calibrado en un microscopio óptico marca Zeiss. A los resultados obtenidos se les aplicó un análisis exploratorio de datos.



III. Corrimiento Electroforético Zonal en Geles de Poliacrilamida-SDS

Antes de la obtención de los patrones proteínicos de las poblaciones de *N. aberrans*, por medio de corrimientos electroforéticos zonales en geles de poliacrilamida-SDS, se determinaron las concentraciones de proteínas que fueron utilizadas en dichos corrimientos. Esto se realizó mediante el método de Lowry (Anexo II).

IIIa. Determinación de la concentración proteínica (mg/ml) por el método de Lowry (Construcción de la Curva Patrón) (Lowry et. al., 1951).

Se numeraron 8 tubos de ensayo de acuerdo con la tabla del Anexo II a los cuales se añadieron los volúmenes correspondientes de solución de albúmina y agua. Se tomaron alícuotas de 0.3 ml, se agregó la solución C, se agitó perfectamente y se dejó reposar 15 minutos a temperatura ambiente; posteriormente se agregaron los volúmenes indicados de solución D, volviendo a agitar (Anexo II), transfiriéndose los contenidos, a las celdas de lectura para ser colocados en el espectrofotómetro marca Coleman Junior II 6-20 y leer las absorbancias a 700 nm. Se registraron las lecturas en la tabla y se construyó la gráfica Absorbancia vs. Concentración (mg/ml).

IIIb. Determinación de la concentración proteínica de macerados de nemátodos.

La determinación de la concentración proteínica de nemátodos se realizó con el extracto conjunto de 40 individuos.

Una vez extraídas de la agalla, se colocaron las hembras en un tubo Eppendorf, se agregaron 40µl de medio de extracción (Anexo III) y se maceraron con una varilla de vidrio. Enseguida se procedió a centrifugar a 7400 rpm durante 15 minutos (Ebenshade y Triantaphyllou, 1985a).

Con una pipeta Hamilton se tomó el volumen total de la fase acuosa y se transfirió a un tubo de ensayo, se añadieron los reactivos en el mismo orden que se siguió para la construcción de la curva patrón.



IIIC. Preparación de las muestras para electroforesis.

Las agallas lavadas se dejaron durante 20 minutos en solución extractora (Anexo III), ésta se eliminó y las agallas fueron puestas en agua corriente. La extracción de nemátodos, sin embargo, se realizó en solución extractora. Una vez extraídos los nemátodos, éstos eran puestos en un microrecipiente colocado, a su vez, en una cama de hielo que contenía solución salina isotónica, más 5µl de cada inhibidor de proteasas (Anexo III), el manejo de estos últimos requiere que no sean expuestos a temperatura ambiente por un tiempo prolongado, por lo que después de su uso deben ser nuevamente puestos en congelación (-20°C).

Una vez obtenido el número de individuos establecido (N=40), los nemátodos se transferían a tubos Eppendorf que contenían 25µl de medio de extracción frío (4°C) y 5µl de cada uno de los tres inhibidores de proteasas, almacenando los tubos a -70°C hasta llevar a cabo la electroforesis. Cada muestra era designada con una letra **A** si pertenecía a la población Actopan y con una **C** si provenía de Chapingo, además, se le asignaba un número progresivo para llevar un orden de las muestras en cada población (C1, A1, C2, A2, etc.).

IIID. Preparación de geles y corrimiento electroforético. (Ebenshade y Triantaphyllou, 1985a; Aguilar et. al., 1993; Quesada, s. a.).

Antes de preparar los geles, se aseguró que todo el material a utilizar (vidriería y equipo de electroforesis) hubiera sido lavado cuidadosamente, enjuagado primero con agua corriente y luego con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente. Las placas de vidrio fueron armadas, colocándolas en una superficie horizontal.

Se permitió que las soluciones (Anexo III) alcanzaran la temperatura ambiente antes de mezclarlas y una vez ocurrido, se preparó primero el gel separador, al 12.0%, en un matraz Erlenmeyer, colocando: 7.11 ml de la solución de monómeros, 5.72 ml de agua bidestilada, 4.35 ml de la solución reguladora del gel separador y 0.76 ml de la solución al 10% de SDS. Los volúmenes de las soluciones fueron calculados de acuerdo con el de cada gel y considerando un exceso (gel separador: 10.00 ml, gel concentrador: 6.16 ml; ambos volúmenes calculados para dos geles).



El matraz se agitó perfectamente después de la adición de cada solución o reactivo, tanto para eliminar los gases disueltos (que pudieran producir burbujas durante la gelificación) y el oxígeno, como para homogeneizar la mezcla. Enseguida se agregaron 0.008 ml de TEMED y por último 0.10 ml de solución al 0.1% de persulfato de amonio, volviendo a agitar. Rápidamente, con una pipeta Pasteur, la mezcla fue introducida cuidadosamente entre las placas para formar el gel. A continuación se le agregó una "capa" de alcohol isopropílico de aproximadamente 0.3 cm de altura, el cual se elimina por escurrimiento, una vez que ocurre la gelificación.

La preparación del gel espaciador (al 5.0%) fue similar a la del gel de corrimiento; sólo cambiaron los volúmenes de las soluciones: 0.99 ml de la solución de monómeros, 3.50 ml de agua bidestilada, 1.50 ml de la solución reguladora del gel concentrador, 0.059 ml de la solución al 10% de SDS; finalmente se añadieron 0.008 ml de TEMED y 0.10 ml de solución al 0.1% de persulfato de amonio. En ese momento la mezcla se vertió sobre el gel de corrimiento, introduciendo el "peine" del equipo entre las placas antes de que ocurra la gelificación (que se lleva a cabo cuando se añade la solución de persulfato de amonio a la mezcla).

Enseguida se preparó el volumen apropiado de amortiguador de corrida 1x (Anexo III). Posteriormente se retiró el peine sin deformar los carriles, se montaron las placas con los geles dentro de la cámara de electroforesis, se vertió el regulador de corrida 1x hacia el tanque interior de la cámara (cuidando que no existieran fugas del regulador hacia el tanque exterior, además de la eliminación de burbujas que se producen), así como al tanque exterior.

Se separaron en un vaso de precipitados, 50 ml. de solución reguladora de corrimiento 1x. Cuando el gel ya estaba preparado, se sacaron las muestras del congelador y se permitió que llegaran a temperatura ambiente para poder macerarlos con una varilla de vidrio, procediendo a centrifugar la muestra a 500 rpm durante 2 minutos y posteriormente a 7,400 rpm durante 15 minutos.

Con una jeringa Hamilton, el volumen total de la fase acuosa (28–48µl) se transfirió a un tubo Eppendorf, se añadió un volumen igual de solución reguladora de muestra 2x, mezclándose perfectamente.



Se utilizaron diferentes volúmenes en cada pozo: 10, 11, 14, 18, 20, 23 y 25 μ l, para observar si existía alguna relación entre el volumen usado y la resolución de las bandas (una muestra de 20 μ l contiene 2.48 μ g de proteína). Cada muestra fue puesta en los pozos del gel con ayuda de una jeringa Hamilton; la cual se enjuagaba de 3 a 5 veces con regulador de corrimiento 1x antes de introducirse en cada muestra y se secaba antes de tomar la siguiente. En uno de los pozos se pusieron 7 μ l de la mezcla que contenía los marcadores de peso molecular (Anexo III).

Una vez colocadas las muestras, se hizo pasar una corriente de 100 V (25 mA); manteniéndose dicha corriente hasta que el colorante alcanzara una distancia de 0.5 cm del borde inferior del gel separador. Terminado el corrimiento electroforético, se sacaron los geles de la cámara para proceder a su fijación y tinción. Las placas se separaron y se cortó ligeramente la esquina inferior derecha del gel separador para poder identificar la posición de los carriles.

Se llevó el gel a un recipiente que contenía la solución del Colorante de Fairbanks. El recipiente se tapó y se mantuvo 30 minutos a temperatura ambiente, después del cual se eliminó el colorante.

Enseguida se enjuagó el gel en el mismo recipiente con agua corriente y posteriormente con agua destilada, la cual se elimina para agregarle solución desteñidora rápida, cambiando dicha solución 3 veces en total. Una vez que la solución desteñidora se cambiaba, se transfería a un frasco con carbón activado, el cual se desechó cuando la solución no se tornaba incolora. Se enjuagó el gel con agua corriente y a continuación con agua destilada. Se sustituyó el agua por una solución al 15% de glicerol y así se mantuvo durante un día.

Se fotografió el gel antes de secarlo. Se anotaron cuidadosamente al reverso de las copias, los datos referentes al gel. Para secarlo, se puso entre dos hojas de papel celofán permeable, se agregó agua bidestilada hasta cubrirlos totalmente. El gel así cubierto se puso entre una placa de vidrio y un marco de acrílico, sosteniéndose con pinzas. Se mantuvo en la estufa a 37°C durante 4-6 horas.



Posteriormente, con un densitómetro óptico CD50 marca Heidelberg se obtuvieron los perfiles densitométricos de los patrones proteínicos de *N. aberrans* (Anexo V) y la absorbancia (a 585nm) de cada banda.

Se determinaron los pesos moleculares de las diferentes proteínas de *Nacobbus aberrans*. Para ésto, se obtuvieron las movilidades electroforéticas (R_f) de los marcadores de peso molecular y de las proteínas problema:

$$R_f = \frac{\text{distancia de la parte superior del gel a la banda (D}_b\text{)}}{\text{distancia de la parte superior al frente del Azul de Bromofenol (D}_B\text{)}}$$

Primero se identificaron las bandas, a las que se les asoció su respectiva movilidad electroforética en cada una de las muestras; enseguida se calculó el R_f promedio para cada banda. Se graficó el R_f de las proteínas conocidas contra el logaritmo de su peso molecular y se interpolaron los R_f promedio de las proteínas problema; al obtener el antilogaritmo del peso molecular se obtuvo su valor real.

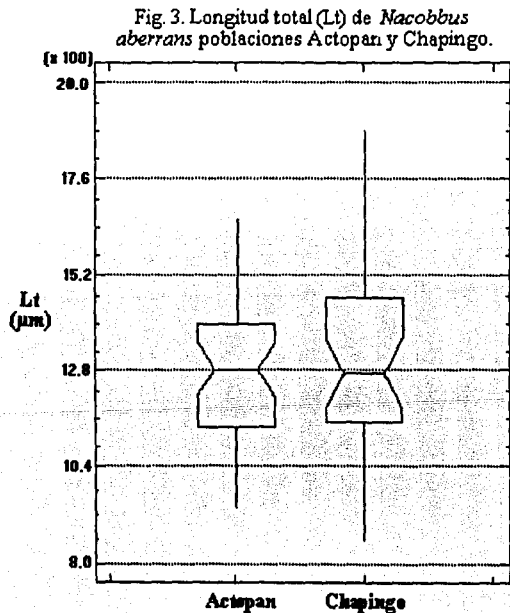


RESULTADOS

I. Morfometría

la. Longitud total (Lt)

El análisis estadístico de la longitud total (Lt) de ambas poblaciones indicó que este parámetro medido en *N. aberrans*, no difiere entre poblaciones, lo que significa, que son estadísticamente similares a un nivel de confianza alto ($P=0.05$) y por lo tanto no forman grupos o "clusters" que pudieran dar indicios de que cada población represente una raza diferente; también se observó que las Lt de ambas poblaciones no presentaron casos extraordinarios bajos o altos (Fig. 3).





La población Actopan tiene una Lt con un intervalo de 931.7-1655.5 μm ; estos valores de Lt no muestran tanta dispersión ya que presentan un rango de 723.8 μm , mientras que para la población Chapingo se observa mayor dispersión en la Lt de sus individuos, debido a que el valor del rango es mayor (1031.8 μm) al de la población Actopan (Cuadro 2).

Cuadro 2. Estadísticos calculados para los parámetros medidos en hembras maduras de *N. aberrans*, poblaciones Actopan y Chapingo.

Estadístico	Longitud total (μm)		Longitud del estilete (μm)	
	Actopan	Chapingo	Actopan	Chapingo
N	35	35	33	35
Mediana	1278.2	1270.5	21.0	21.0
Varianza	34175.2	55650.1	2.9	4.5
Desv. est.	184.8	235.9	1.7	2.1
Error est.	31.3	39.8	0.29	0.4
Mínimo	931.7	847.0	16.8	18.2
Máximo	1655.5	1878.8	25.2	26.6
Rango	723.8	1031.8	8.4	8.4

La Figura 4 muestra que existe un mayor número de individuos de la población Actopan con Lt entre 1190.0 y 1290.0 μm , ya que son 7 individuos (20.0%) los que presentan una Lt dentro de ese intervalo, ésto es similar a la población Chapingo, debido a que son 9 individuos (25.7%) que se encuentran en un intervalo similar, delimitado entre 1150 y 1300 μm (Fig. 5).

Los valores mínimos de Lt de ambas poblaciones (Actopan = 931.7 μm y Chapingo = 847.0 μm) se encuentran dentro de los límites señalados en la descripción de Sher (1970); ya que este autor indica un valor mínimo del topotipo (N = 6) igual a 800 μm y de una población de Inglaterra (N = 7) igual a 910 μm . El valor mínimo de la población Chapingo contrasta con el que obtuvo Brunner (1967) para esa población (1154 μm , N = 7).



Fig. 4. Longitud total (Lt) de *Nacobbuss aberrans*.
Población Actopan.

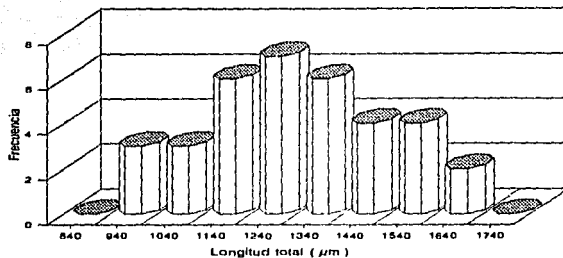
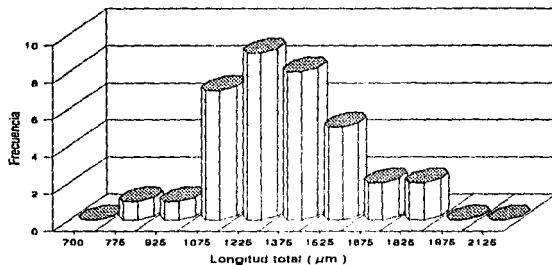


Fig. 5. Longitud total (Lt) de *Nacobbuss aberrans*.
Población Chapingo.



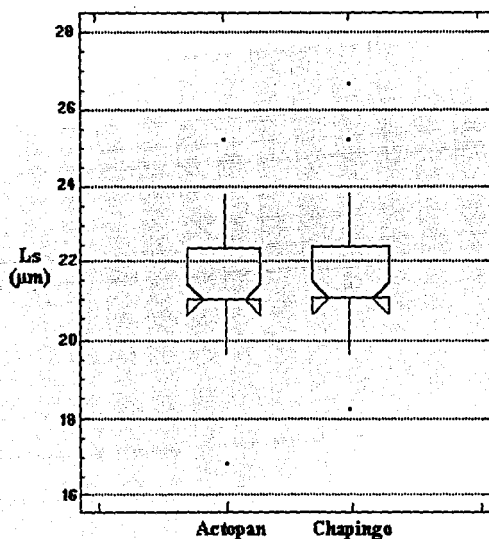
Por otra parte, las Lt máximas que se obtuvieron en este estudio (Actopan = 1655.5 μm y Chapingo = 1878.8 μm) no concuerdan con los límites máximos obtenidos por Sher (1970), ya que para el topotipo reporta un valor máximo igual a 1200 μm y para la población citada de Inglaterra se registró 1450 μm . Sin embargo, Doucet y Di Rienzo (1991) registraron un valor similar de longitud total al reportado en este estudio: la población de Tafi de Valle, Argentina (N = 11) presentó una Lt máxima de 1650 μm comparado con 1655.5 μm de Lt para la población Actopan. Brunner (1967), por su parte, encontró que el valor máximo de Lt para la población Chapingo fue 1300 μm . Los nuevos valores máximos de longitud total para *N. aberrans* fueron 1655.5 y 1878.8 μm registrados en este estudio obtenido de las poblaciones Actopan y Chapingo, respectivamente.



1b. Longitud de estilete (Ls).

Para la longitud del estilete (Ls), se observa que ambas poblaciones son estadísticamente idénticas ($P=0.05$) y tampoco forman "clusters" o grupos de acuerdo a este caracter (Fig. 6).

Fig. 6. Longitud del estilete (Ls) de *Nacobbus aberrans* poblaciones Actopan y Chapingo.



A pesar de ser idénticas casi en el 100% del total de los datos, las poblaciones presentan algunos casos extraordinarios bajos y altos. La población Actopan presenta una Ls con un intervalo de 16.8-25.2µm, dichos valores son los casos extraordinarios bajo y alto, respectivamente. De la misma forma, la Ls de la población Chapingo tiene un intervalo de 18.2-26.6µm, cuyos valores representan los casos extraordinarios bajo y alto, respectivamente. Aunque tienen diferentes intervalos, las dos poblaciones presentan el mismo rango (8.4µm; Cuadro 2).



Los valores máximo y mínimo de Ls obtenidos en este estudio no concuerdan absolutamente con los obtenidos por Sher (1970) para las poblaciones citadas, sin embargo, coinciden con los valores mínimos de varias poblaciones de Argentina estudiadas por Doucet y Di Rienzo (1991), aunque no con los máximos. Solamente el valor máximo de la población Chapingo de este estudio es muy similar al obtenido por Brunner (1967) para la misma población (Cuadro 3).

Cuadro 3. Valores máximo y mínimo de longitud del estilete (μm) obtenidos para la especie *Nacobbus aberrans* de diferentes procedencias.

Procedencia	Intervalo de Ls (μm)	N
Actopan, México (1994)	16.8-25.2	35
Chapingo, México (1994)	18.2-26.6	35
Chapingo, México (Brunner, 1967)	20.7-26.9	7
Topotipo, Inglaterra (Sher, 1970)	20.0-24.0	6
Inglaterra (Sher, 1970)	20.0-23.0	7
Las Mesadas, Argentina (Doucet y Di Rienzo, 1991)	17.0-17.0	7
La Plata, Argentina (Doucet y Di Rienzo, 1991)	17.0-20.0	22
Río Cuarto, Argentina (Doucet y Di Rienzo, 1991)	17.0-20.0	24
Rosario, Argentina (Doucet y Di Rienzo, 1991)	17.0-20.0	19

De cualquier forma, el valor de la mediana se encuentra dentro de los límites establecidos por Sher (1970). Se obtuvieron dos valores máximos de longitud del estilete nuevos para la especie *N. aberrans*: 25.2 y 26.6 μm de las poblaciones Actopan y Chapingo, respectivamente.

En la población Actopan, el 63.6% (21 ejemplares) del total de individuos medidos presentó una Ls dentro del intervalo 20 a 21 μm (Fig. 7), lo que es muy similar al compararse con la población Chapingo, ya que son 18 individuos (51.4%) con un intervalo entre 20.6 a 21.8 μm (Fig. 8).



Fig. 7. Longitud del estilite (L_s) de *Nacobbus aberrans*.
Población Actopan.

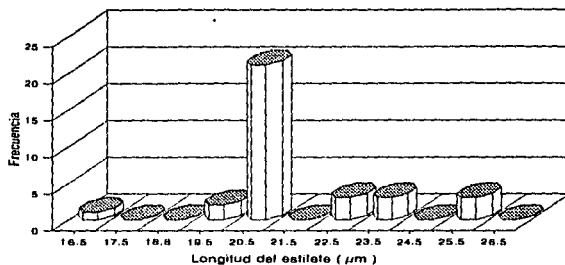
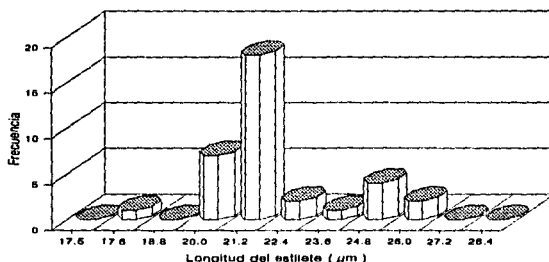


Fig. 8. Longitud del estilite (L_s) de *Nacobbus aberrans*.
Población Chapingo.

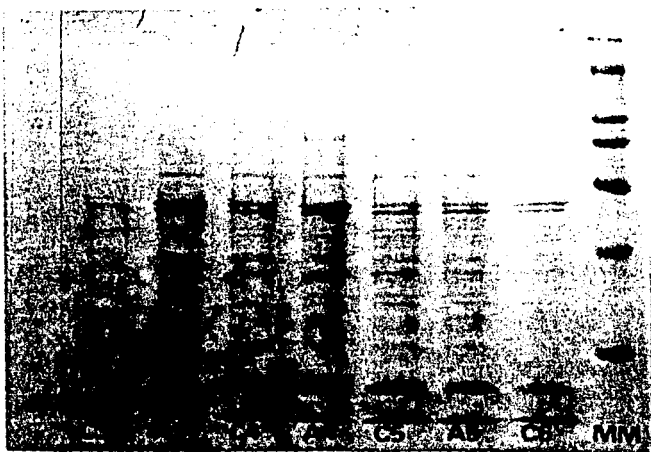
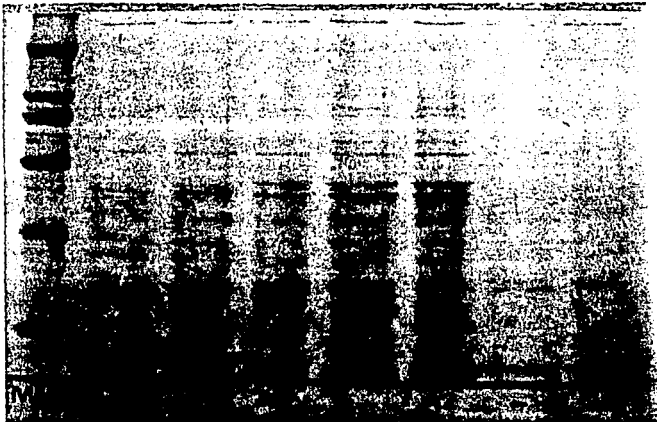


II. Patrones proteínicos

Los patrones de proteínas de los aislados revelaron un patrón general prácticamente idéntico (Fotos 1 y 2). Así como la presencia o ausencia de una nueva estructura morfológica nos capacita para determinar rápidamente entre taxa, la presencia o ausencia de una proteína particularmente grande y distintiva nos capacita para discriminar rápidamente entre patrones proteínicos (Ferris, Ferris y Murdock, 1985).



Fotos 1 y 2. Patrones de proteínas obtenidos de hembras maduras de *Nacobbus aberrans* por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. Poblaciones Actopan (A) y Chapingo (C).



MM = Marcadores de peso molecular
- = Carril no leído en el densitometro.



Para su análisis, los perfiles densitométricos obtenidos (en los que cada pico representa una proteína) se dividieron en dos regiones: La región inicial que va desde 90 o menos, hasta aproximadamente 112.4 de posición % del perfil; y la región final que continúa a partir de 113 hasta aproximadamente 150 (ver Fig. 9).

Todos los perfiles (Anexo V) se compararon por superposición para registrar el mayor número de bandas que aparecen en los geles, y obtener un perfil general para cada población (Fig. 9); con la finalidad de encontrar mínimas diferencias entre las poblaciones. Cabe hacer la aclaración de que la última banda no se consideró en ningún caso debido a que se trata con seguridad del azul de bromofenol que se adiciona a la solución reguladora de muestra 2x, que es la que indica el fin del corrimiento electroforético.

Aunque los perfiles fueron característicos y repetibles, la movilidad de una banda dada en diferentes geles varió en cantidades muy pequeñas, por lo que las comparaciones fueron relativamente difíciles.

En general, en la región inicial de los perfiles densitométricos (entre 90 y 112.4 de posición %) así como la de los geles de Actopan y Chapingo se encontraron las bandas menores (Anexo V; Fotos 1 y 2); y dada su forma de mostrarse en los perfiles -algunas veces como picos demasiado pequeños o como picos grandes y muy juntos- no se consideraron representativos. Por otro lado, se consideró que la región final podría haber dado indicios de posibles diferencias entre las poblaciones y el establecimiento de razas, debido a que se observaron picos y bandas definidos.

Ila. Comparaciones hechas entre muestras de los mismos geles.

Para la población Actopan se tiene que las proteínas separadas por electroforesis son constantes. Con el manejo de diferentes volúmenes (10 a 25µl) el número de bandas presentes fue muy similar. En determinados geles, el densitómetro registró algunos picos como uno solo sin importar el volumen de muestra manejado. En general, se puede decir que no se notó relación entre el tamaño de los picos y el volumen usado, ya que aún utilizando los mismos volúmenes, se registraron tamaños de picos ligeramente diferentes, o con distintos volúmenes se obtuvieron tamaños de picos muy similares. Las diferencias en las movilidades electroforéticas (R_f) fueron



prácticamente nulas. El mismo comportamiento se presentó en la población Chapingo.

Al comparar los perfiles densitométricos de las poblaciones Actopan y Chapingo, se observa que las proteínas son las mismas. Nuevamente, no se observó una buena correlación entre volumen de muestra utilizado y tamaño de los picos. En general, se aprecia que los picos de *C* presentaron un tamaño ligeramente menor a los de *A*, lo que tal vez indicaría una mínima diferencia entre las poblaciones, situación que no es determinante para el establecimiento de razas. Los R_f presentaron minúsculas diferencias.

Iib. Comparaciones hechas entre muestras de los diferentes geles.

Las comparaciones hechas de los perfiles densitométricos de los diferentes geles pertenecientes a la población Actopan, indicaron que las bandas presentes son constantes, aunque existe esa ligera variación de R_f , ya mencionada, en las bandas. En ciertos casos se observa que a mayor volumen de muestra se obtiene mayor tamaño de picos, aunque esta relación no siempre se cumple; en algunos perfiles se muestra que un pico está constituido por 2 proteínas (o podrían ser más) ya que se obtuvo mejor delineación de picos en otros perfiles analizados. La región inicial no es muy clara en algunos perfiles y tampoco se notó relación del tamaño de los picos con el volumen de muestra utilizado. El comportamiento de las proteínas en los diferentes geles de la población Chapingo fue el mismo que presentó la población Actopan.

Al comparar los perfiles de ambas poblaciones, no se observaron diferencias sustanciales en la presencia ni en tamaño de los picos. Por otra parte, se pueden ver diferencias relativamente mayores en la movilidad electroforética de las proteínas (R_f) entre las muestras de los diferentes geles; en contraste con las muestras de un mismo gel, en donde prácticamente no existen disimilitudes.

Iic. Comparación de los patrones generales.

Al comparar los patrones generales de ambas poblaciones (Fig. 9), se observa que éstos son iguales, ya que presentan el mismo número de bandas (11), las cuales fueron designadas numéricamente del 1 al 11, cuyo análisis mostró una



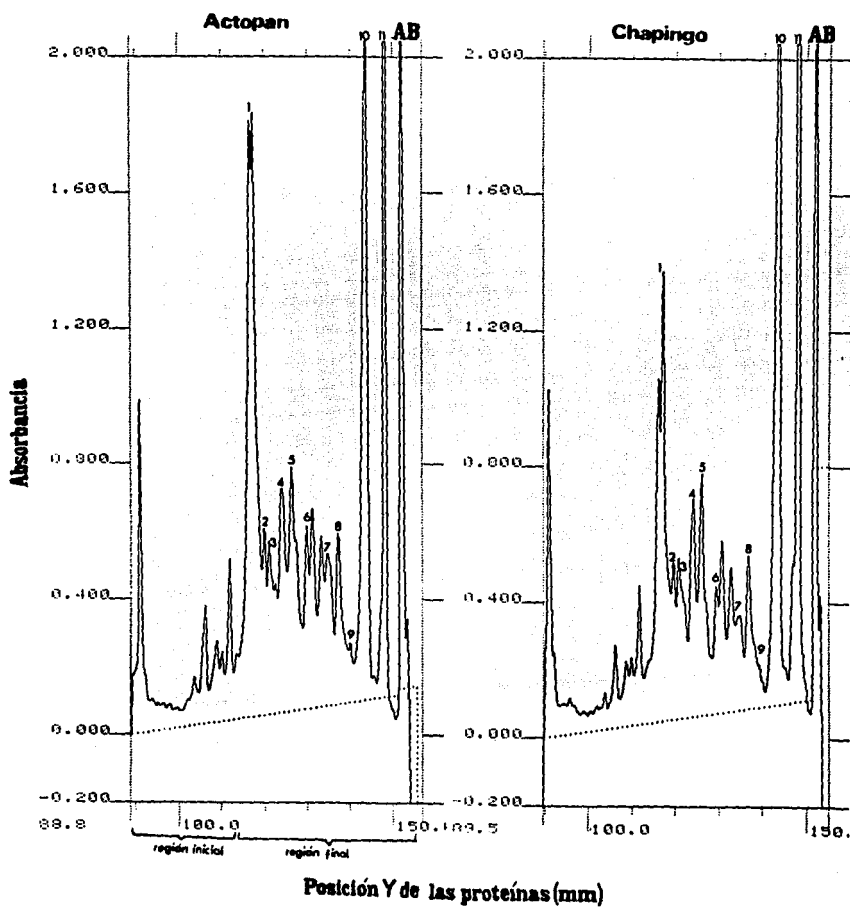
correspondencia entre ellas; a pesar de observarse diferencias en el tamaño de los picos y en sus R_f . Las poblaciones estudiadas presentaron sus proteínas como bandas dobles en $R_f = 0.763$ (Banda 1), $R_f = 0.790$ (Banda 3), $R_f = 0.848$ (Banda 6), $R_f = 0.871$ (Banda 7) y $R_f = 0.955$ (Banda 11).

Se registraron dos bandas más teñidas en la región final; una banda doble con $R_f = 0.763$ (Banda 1) y una sencilla con $R_f = 0.945$ (Fotos 1 y 2) que corresponden, en la mayoría de los casos, a los picos más altos en los perfiles (Fig. 9).

Los pesos moleculares calculados para las diferentes proteínas de *Nacobbus aberrans*, se presentaron dentro del intervalo 24.26 a 59.56 Kd. Tres proteínas se salieron de ese intervalo, pero por extrapolación, sus pesos moleculares fueron aproximadamente de 19.49, 21.38 y 23.44 Kd.



Fig. 9. Perfiles densitométricos generales de *Nacobbus aberrans*. Poblaciones Actopan y Chapingo.



AB = Azul de Bromofenol.



ANALISIS DE RESULTADOS

I. Morfometría

Los valores de longitud total (Lt) y longitud del estilete (Ls) registrados en el presente estudio, difirieron de los datos de Brunner (1967), Sher (1970) y Doucet y Di Rienzo (1991), lo que puede deberse a las diferentes procedencias de las poblaciones bajo estudio, los hospederos manejados, las técnicas de colecta, fijación y montaje (Greet, 1972) así como al método de preservación (Wayne y Webster, 1969). En muchos casos, el análisis morfológico es altamente dependiente de la experiencia y habilidad de interpretación del investigador (Powers, 1992).

La Lt de las dos poblaciones bajo estudio, presentó rangos diferentes, lo que es reflejo de la alta variabilidad de este carácter. Esto indica que es un parámetro poco estable y que no debería ser usado como criterio taxonómico para establecer la jerarquía de especie, a pesar de sus varianzas relativamente bajas (Cuadro 2); sino únicamente para propósitos meramente descriptivos.

Lo anterior coincide con Chitwood, quien ya desde 1957 hacía referencia a la variabilidad interpoblacional e indicaba que el tamaño del nemátodo, como criterio de especie, no es útil ya que depende de la edad, tamaño, condición física, tasa metabólica y disponibilidad de alimento del hospedero en el momento en el que el nemátodo entra y crece; situación que juega un papel importante en el tamaño definitivo del parásito adulto.

Asimismo, Bird y Mai (1967), mencionan que un carácter de un taxon específico con gran cantidad de varianza es menos útil que otro con una menor cantidad de variación. Esto queda ejemplificado con el caso observado en la longitud del estilete (Ls) de ambas poblaciones, las cuales presentan el mismo rango y varianzas bajas (Cuadro 2), y por lo tanto sería de mayor utilidad considerar la Ls en la determinación de esta especie.

La variación en los caracteres morfométricos se observa en las diferentes especies de nemátodos fitoparásitos, de vida libre y aún dentro de líneas —una línea está definida como la progenie de una hembra única— (De Coninck, 1962; Bird y Mai,



1967); incluso se han reportado excedencias del rango de las mediciones tanto para los valores conocidos de especies como para géneros de otros nemátodos (Bird y Mai, 1967).

Tales variaciones son el resultado de la influencia de factores externos como el tipo de hospedero, el origen geográfico, la fisiología del hospedero, las condiciones nutricionales del hospedero que se reflejan en la calidad del alimento, las condiciones ambientales y la densidad de población (De Coninck, 1962; Fisher, 1965; Bird y Mai, 1967; Wayne y Webster, 1969; Evans y Fisher, 1970). De aquí que los caracteres morfométricos de un taxon de nemátodos pueden estar cambiando constantemente debido a los efectos de dichos factores (Bird y Mai, 1967).

Todos esos factores externos que influyen la morfometría de los nemátodos de vida libre y fitoparásitos, han hecho que la taxonomía convencional, basada en la examinación microscópica de ejemplares, haya fracasado en revelar caracteres estables útiles para separar especies (De Coninck, 1962).

La mera observación de diferencias estadísticamente significativas, no es suficiente cuando se tienen dos poblaciones, a las que se tendrán que ubicar como una o dos especies o razas (De Coninck, 1962); de ahí que Clark (1962) concluyera que la discriminación entre especies altamente relacionadas no es posible con base en las medidas; actualmente Dobzhanski *et. al.* (1988) siguen apoyando esa conclusión al indicar que ni las subespecies ni las semiespecies pueden distinguirse morfológicamente; de igual manera que las razas o patotipos.

Por todo lo anterior, Chitwood (1957) así como Wayne y Webster (1969), sugirieron que el concepto de especie morfológica debería considerarse una necesidad práctica en el reconocimiento de las clasificación de nemátodos, debido a que el concepto de especie biológica tiene poca aplicabilidad en el campo de la Nematología Agrícola; un área en la que las especies deben ser reconocidas casi completamente con base en su anatomía.

Pero dada la gran variabilidad existente entre poblaciones del grupo de los nemátodos fitoparásitos, ni siquiera es válido (para cuestiones prácticas o de aplicación a la agricultura) el concepto de especie morfológica; por lo que en la



actualidad se habla de patotipos o razas fisiológicas que presentan una alta similitud morfológica, siendo reconocidos por su habilidad de reproducirse en plantas hospederas muy específicas; de acuerdo con Stone (1985), una *raza fisiológica* de una especie de nemátodo es un grupo de organismos de dicha especie que se distinguen por su capacidad heredada de parasitar exitosamente ciertas especies de plantas; un *patotipo*, es un grupo de organismos pertenecientes a una especie que se distingue por su habilidad heredada de reproducirse en líneas específicas de plantas que presentan genes de resistencia al nemátodo; los patotipos pueden existir dentro de una raza-

La distribución normal que presentan los dos parámetros medidos a las poblaciones estudiadas, es observado en la naturaleza en general, y dado que los datos presentan este tipo de distribución, son susceptibles de tratarse con diversos métodos estadísticos para confirmar que no representan razas de esta especie.

II. Patrones proteínicos

Los patrones de proteínas y sus respectivos perfiles densitométricos fueron reproducibles. Si bien es cierto que en algunos geles se nota alguna correspondencia del tamaño de los picos con el volumen de muestra usado, en otros no se nota esa diferencia a pesar de usar volúmenes semejantes o iguales. Esto puede ser debido a la variación que pudo ocurrir durante el proceso de tinción-destinción del gel, manejo del densitómetro, volumen de muestra utilizado \pm variación, volumen de solución extractora \pm variación, volumen de la solución reguladora de muestra $2x \pm$ variación; pero no se atribuyen a diferencias intraespecíficas; lo que tampoco parece ser la causa de que en el mismo gel se observe que el tamaño de los picos de las muestras de la población A sean ligeramente más grandes que los de la población C, ya que ésto no se observa en los demás geles.

Los perfiles fueron característicos y repetibles pero la movilidad de una banda dada en diferentes geles varió en cantidades muy pequeñas, comportamiento que se ha observado en los distintos trabajos hechos con separación de proteínas, como el realizado por Evans (1971), y por Ebenshade y Triantaphyllou (1985b), ya que la tasa de migración R_f de las proteínas en un gel depende altamente de las condiciones de extracción de las proteínas, almacenamiento de la muestra, condiciones de



electroforesis, composición de aminoácidos, tamaño de la molécula, asimetría de la conformación de la proteína, la cual también afecta el grado de interacción fibra del gel-proteína (Johnson, 1977; Hussey, 1979; Pozdol y Noel, 1984; Rollinson, 1980; citado por Ebenshade y Triantaphyllou, 1985b); tales condiciones o factores pueden variar entre los laboratorios, e incluso de una corrida electroforética a otra en el mismo laboratorio.

Hussey (1979), indica que cuando las muestras son utilizadas inmediatamente después de la extracción o antes de 18 horas de almacenamiento, se obtiene menor variación en la movilidad electroforética de las proteínas. Mayor tiempo de refrigeración, congelamiento o muestras liofilizadas, altera el R_f de algunas proteínas. En este estudio, se mantuvieron las muestras en congelación (-70°C) hasta por 22 días, sin que esto afectara el corrimiento, donde no se observó una gran diferencia en la movilidad electroforética de las bandas (Fotos 1 y 2). Solamente se registró una disminución en la intensidad de las bandas de una muestra o carril del gel (Foto 1), debido a que esa muestra fue almacenada a -20°C y no a -70°C , situación que no alteró el R_f (dicho carril no fue leído en el densitómetro).

Los casos donde se obtienen picos tan anchos en sus bases (Anexo V), se deben a los parámetros establecidos en el densitómetro, y no a la interacción proteína-proteína, que se da cuando se utilizan altas concentraciones de estas moléculas, como lo indican Pozdol y Noel (1984), lo cual se puede corroborar con los patrones en los que se observa definitivamente la separación de las bandas (Fotos 1 y 2).

Por otra parte, tal vez se necesitan mayores concentraciones de proteína para hacer más visibles las bandas de la región inicial, o en su caso, realizar corrimientos en cámaras de mayor superficie.

Finalmente, de acuerdo con el análisis de los diferentes perfiles densitométricos, se puede asentar que posiblemente las poblaciones manejadas pertenecen a una sola raza fisiológica de esta especie de nemátodo fitoparásito. Esto es apoyado por el trabajo realizado por Toledo, Sosa-Moss y Zavaleta-Mejía (1993), quienes propusieron la existencia de 3 razas fisiológicas de *Nacobbus aberrans*, con base en lo que ellos denominaron: "Pruebas de hospederos diferenciales de Chapingo, para razas de *Nacobbus aberrans*"; en la cual, la raza propuesta como *Na-1* de *N.*



aberrans está representada por individuos de las localidades de Actopan (Hidalgo), Chapingo (México) y Cuautla (Morelos), que se desarrollan en cultivos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Rutgers y acelga, (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*) cv. Ford Hook Giant, pero no en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Negro Querétaro.

Esto también es indicio del peligro que representa la movilización de instrumentos, maquinaria de trabajo y suelo contaminados, de una región a otra, lo que podría afectar los cultivos que se producen en las diferentes regiones del país, y de esta forma provocar que el brote de alguna enfermedad producida, ya sea por *Nacobbus aberrans*, o por cualquier otra especie de nemátodo fitopárasito, afectaría seriamente la producción.



UTILIDADES PRACTICAS O APLICACIONES DEL ESTUDIO REALIZADO, EN LA NEMATOLOGÍA AGRÍCOLA

El polimorfismo dentro de una especie es un fenómeno universal y su relación con la filogenia y la especiación puede ser investigado a varios niveles (Dalmasso y Bergé, 1978); de esta forma, la comparación y evaluación de las diferencias y similitudes morfológicas del fenotipo en cualquier taxa, constituyen las fuentes de los datos tradicionales más utilizadas en la práctica taxonómica, ya que proveen de una aproximación legítima, relativamente económica y fácil de estudiar (Nieto y Llorente, 1989).

En el área de la Nematología Agrícola, la determinación de especies está basada principalmente en las características morfológicas y morfométricas de los individuos adultos, o de algún estadio larvario; frecuentemente el J2 que es la fase infectante en muchas especies de nemátodos fitoparásitos. La identificación precisa y confiable de las especies con base en estos criterios, es un trabajo arduo que requiere personal experto en algún género y especie en particular.

A pesar de la importancia de los estudios de la taxonomía convencional, en algunos géneros de nemátodos fitoparásitos, esta metodología no es suficiente para revelar caracteres estables, con los cuales se puedan separar especies, subespecies, razas fisiológicas o patotipos. La variación intraespecífica y la ocurrencia de razas fisiológicas ha hecho necesario el desarrollo de técnicas que coadyuven a la clasificación y diferenciación de razas.

Los nemátodos fitoparásitos son una fuente de considerable pérdida económica para los agricultores. La rotación de cultivos y el uso de líneas resistentes de plantas hospederas, necesitan acompañarse por métodos sensitivos para la identificación de parásitos.

En la Nematología Agrícola, los nematicidas químicos participan de forma restringida en los programas de manejo integrado de medidas de control, ya que algunos productos químicos causan daños al ecosistema, por lo que muchos de ellos se han retirado del mercado mundial, situación que ha sido difícil de llevar a cabo en



México por su eficacia en la disminución de las poblaciones presentes en el suelo y por el desconocimiento de los daños que producen.

Debido a lo anterior se plantea una metodología económica y eficaz en armonía con el ambiente, las cuales son: líneas resistentes y rotación de cultivares, presentándose como alternativas en el control biológico para un gran número de especies de nemátodos fitoparásitos. Estos tipos de control y otras formas de manejo, tal como la aplicación de compuestos inhibidores naturales, podrían ser utilizados en lugar de los nematicidas. Pero el cambio hacia el control de esas prácticas, debe ser acompañado por un conocimiento más preciso de las especies y razas de los nemátodos causantes de las enfermedades vegetales, así como de su relación con el ambiente y el hospedero.

Por ejemplo, la explotación de la resistencia del hospedero generalmente es efectiva, sólo contra un subgrupo de variantes de nemátodos encontrados en una sola especie, de aquí que para que sea usada como una estrategia de manejo efectiva, los patotipos deban ser identificados.



CONCLUSIONES

* De acuerdo con los caracteres morfométricos medidos en hembras maduras de *Nacobbus aberrans*, no se obtuvieron agrupaciones que indicaran la subdivisión de esta especie en razas.

* La longitud del estilete es un carácter más estable para la determinación de esta especie, no así la longitud total.

* Se obtuvieron dos valores máximos nuevos para la longitud total de la especie *Nacobbus aberrans*: 1655.5 y 1878.0 μm , para las poblaciones Actopan y Chapingo, respectivamente.

* Se obtuvieron dos valores máximos nuevos para la longitud del estilete de la especie *N. aberrans*: 25.2 y 26.6 μm , para las poblaciones Actopan y Chapingo, respectivamente.

* La densitometría indicó que las proteínas que forman parte de las hembras maduras de *N.aberrans* son las mismas en las poblaciones Actopan y Chapingo, por lo que presumiblemente se trate de la misma raza fisiológica.



RECOMENDACIONES

- ✓ Si se lleva a cabo nuevamente la separación de proteínas por éste método, se recomienda utilizar una mayor concentración de proteínas, para obtener mejor resolución de los patrones y de los perfiles; además se obtendría mayor número de bandas y la zona inicial podría ser vista con más claridad.
- ✓ Se sugiere hacer corrimientos en una cámara de mayor superficie, con la finalidad de observar mejor la separación entre bandas, principalmente en la región inicial del gel.
- ✓ Ampliar los estudios a nivel enzimático.
- ✓ Realizar estudios con electroforesis en dos dimensiones, ya sea con proteínas o enzimas.



LITERATURA CITADA

- ◊ Aguilar, T. F. et. al. 1993. MANUAL DE PRACTICAS DE INMUNOLOGIA. Departamento de Inmunología. E.N.C.B. I.P.N. México. Pags. 52-60.
- ◊ Alarcón, C. 1977. EVALUACION DE PAPAS NATIVAS DE BOLIVIA PARA RESISTENCIA AL NEMATODO *Nacobbus* spp. CAUSANTE DEL ROSARIO O FALSO NUDO DE LA RAIZ. *Nematrópica*. 7(2):2.
- ◊ Alarcón, C. y Jatala, P. 1977. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA RESISTENCIA DE *Solanum andigena* A *Nacobbus aberrans*. *Nematrópica*. 7(2):2-3.
- ◊ Bird, G. W. y Mai, W. F. 1967. MORPHOMETRIC AND ALLOMETRIC VARIATIONS OF *Trichodorus christei*. *Nematologica*. 13:617-632.
- ◊ Bravo, B. J. 1977. DIFERENCIACION PATOGENICA DE *Nacobbus* spp. DE DOS PROCEDENCIAS (PUNO Y VALLE DEL MANTARO) EN DOS HOSPEDEROS. *Nematrópica*. 7(2):3.
- ◊ Brunner de Magar, P. 1967. "JICAMILLA" DEL CHILE CAUSADA POR UN NUEVO NEMATODO Y OBTENCION DE FUENTES DE RESISTENCIA. Tesis de Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillos, México.
- ◊ Caballero, E. L. y Muñoz, M. A. 1987. CUATRO FECHAS DE SIEMBRA E HISTOPATOLOGIA DE TRES VARIEDADES DE ESPINACA (*Spinaca oleracea* L.) AL ATAQUE DEL NEMATODO FALSO AGALLADOR *Nacobbus* spp. THORNE Y ALLEN, 1944. Tesis de Licenciatura. U.A.CH. Chapingo, México.
- ◊ Canto-Sáenz, M. 1990. LIFE CYCLE AND PATOGENICITY OF *Nacobbus aberrans* THORNE AND ALLEN, 1944. Abstracts of the papers at the 2nd International Nematology Congress. August 11-17, 1990. Veldholven, Netherlands. In: *Nematologica*. 36(4):338.



- ◇ **Castillo, P. G. y Marbán, M. N. 1984. HISTOPATOLOGIA Y DESARROLLO DE *Nacobbus aberrans* THORNE Y ALLEN, 1944 EN RAICES DE *Capsicum annuum* L. Y *Capsicum baccatum*. *Agrociencia*. (56):85-93.**
- ◇ **Chitwood, M. B. 1957. INTRASPECIFIC VARIATION IN PARASITIC NEMATODES. *Syst. Zool.* 6:19-23.**
- ◇ **Cid del Prado, V. I. 1985. CICLO BIOLOGICO DE *Nacobbus aberrans*. In: *Fitonematología Avanzada*. I. N. Marbán e I. Thomason (eds.). Colegio de Postgraduados. Montecillos, México. Pags. 57-65.**
- ◇ **Cid del Prado, V. I. 1986. MORPHOLOGICAL STUDY OF *Nacobbus* spp. INCLUDING FOUR POPULATIONS FROM MEXICO USING SCANNING ELECTRONIC MICROSCOPY. Abstracts of the 25th Annual Meeting of the Society of Nematologists. In: *J. of Nematology*. 18(4):603.**
- ◇ **Cid del Prado, V. I. 1992. VARIACION MORFOLOGICA DE TRES POBLACIONES MEXICANAS DE *Nacobbus aberrans* (THORNE, 1935) THORNE Y ALLEN 1944. *Memorias del XIX Congreso Nacional de Fitopatología*. Buenavista, Saltillo, Coahuila. Sociedad Mexicana de Fitopatología. Pag. 86.**
- ◇ **Clark, S. A. 1967. THE DEVELOPMENT AND LIFE HISTORY OF THE FALSE ROOT-KNOT NEMATODE, *Nacobbus serendipiticus*. *Nematologica*. 13:91-101.**
- ◇ **Clark, W. C. 1962. MEASUREMENTS AS TAXONOMIC CRITERIA IN NEMATOLOGY. Reports of the VIth Symposium. Abstract in: *Nematologica*. 7:10.**
- ◇ **Commonwealth Institute of Helminthology. 1985. DESCRIPTION OF PLANT PARASITIC NEMATODES. *Nacobbus aberrans*. Set. 8. N° 119. 2 pp.**
- ◇ **Costilla, M.; Basco, H. y De Gómez, T. 1981. ENSAYO DE CONTROL QUIMICO DEL NEMATODE *Nacobbus aberrans* EN TUBERCULOS DE PAPA. *Nematrópica*. 11(2):78-79.**



- ◊ **Dalmasso, A. y Bergé, J. B. 1978. MOLECULAR POLIMORPHISM AND PHYLOGENETIC RELATIONSHIP IN SOME *Meloidogyne* spp.: APPLICATION TO THE TAXONOMY OF *Meloidogyne*. *J. of Nematology*. 10(4):323-332.**
- ◊ **De Bruijn, N. y Stermerding, S. 1968. *Nacobbus serendipiticus*. A PLANT PARASITIC NEMATODE NEW TO THE NETHERLANDS. *Neth. J. Pl. Path.* 74:227-228.**
- ◊ **De Coninck, L. 1962. PROBLEMS OF SYSTEMATICS AND TAXONOMY IN NEMATODOLOGY TODAY. *Nematologica*. 7:1-7.**
- ◊ **De la Jara, A. F. y Zerón, B. F. 1989. MANUAL DE PRACTICAS DE NEMATOLOGIA AGRICOLA. Departamento de Parasitología. E.N.C.B. I.P.N. México. 113 pp.**
- ◊ **De la Jara, A. F.; Zerón, B. F. y Tovar, S. A. 1990. MALEZAS COMO POSIBLES RESERVORIOS DE *Nacobbus aberrans* (THORNE, 1935) THORNE Y ALLEN, 1944 EN DIVERSOS CULTIVOS DE ACTOPAN, HIDALGO. *Agrociencia. Serie Protección Vegetal*. 1(1):153-157.**
- ◊ **De Ponce de León, E. y Doucet, M. E. 1989. THE GENUS *Nacobbus* THORNE & ALLEN, 1944 IN ARGENTINA. 2. ASSOCIATION BETWEEN *Nacobbus aberrans* (THORNE, 1935) THORNE & ALLEN, 1944 AND THE WEED *Sisymbrium irio* L. *Revue Nématol.* 12(3):269-271.**
- ◊ **Dickson, D. W.; Huisinigh, D. y Sasser, J. N. 1971. DEHYDROGENASES, ACID AND ALKALINE PHOSPHATASES, AND ESTERASES FOR CHEMOTAXONOMY OF SELECTED *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Heterodera* AND *Aphelenchus* spp. *J. of Nematology*. 3(1):1-16.**
- ◊ **Dobzhanski, T.; Ayala, F. J.; Stebbins, G. y Valentine, J. W. 1988. EVOLUCION. Ed. Omega. Barcelona, España. 558 pp.**
- ◊ **Doucet, M. E. 1989. THE GENUS *Nacobbus* THORNE & ALLEN, 1944 IN ARGENTINA. 1. STUDY OF A POPULATION OF *Nacobbus aberrans* (THORNE, 1935) THORNE & ALLEN, 1944 ON *Chenopodium album* L. FROM RIO CUARTO, PROVINCE OF CORDOBA. *Revue Nématol.* 12(1):17-26.**



- ◇ Doucet, M. E. y Di Rienzo, A. J. 1991. EL GENERO *Nacobbus* THORNE & ALLEN, 1944 EN ARGENTINA. CARACTERIZACION MORFOLOGICA Y MORFOMETRICA DE *Nacobbus aberrans* (THORNE, 1935) THORNE & ALLEN, 1944. *Nematrópica*. 21(1):19-35.
- ◇ Ebensshade, P. R. y Triantaphyllou, A. C. 1985a. ELECTROPHORETIC METHODS FOR THE STUDY OF ROOT-KNOT NEMATODE ENZYMES. In: *Advanced Treatise on Meloidogyne*. Vol. 2. Methodology. J. N. Sasser, K. R. Barker y C. C. Carter (eds.). Raleigh: North Carolina State University. U.S.A. Pags. 115-123.
- ◇ Ebensshade, P. R. y Triantaphyllou, A. C. 1985b. USE OF ENZYME PHENOTYPES FOR IDENTIFICATION OF *Meloidogyne* SPECIES. *J. of Nematology*. 17(1):6-20.
- ◇ Ebensshade, P. R. y Triantaphyllou, A. C. 1990. ISOZYME PHENOTYPES FOR THE IDENTIFICATION OF *Meloidogyne* SPECIES. *J. of Nematology*. 22(1):10-15.
- ◇ Equihua, P. E. A. 1977. CONTROL QUIMICO DEL NEMATODO *Nacobbus* sp. THORNE Y ALLEN EN CULTIVO DE CHILE. Tesis de Licenciatura. U.A.CH. Chapingo, México.
- ◇ Evans, A. A. F. 1971. TAXONOMIC VALUE OF GEL ELECTROPHORESIS OF PROTEINS FROM MYCOPHAGOUS AND PLANT-PARASITIC NEMATODES. *Int. J. Biochem* 2:72-79.
- ◇ Evans, A. A. F. y Fisher, J. M. 1970. SOME FACTORS AFFECTING THE NUMBER AND SIZE OF NEMATODES IN POPULATIONS OF *Aphelenchus avenae*. *Nematologica*. 16:295-304.
- ◇ Ferris, V. R.; Ferris, J. M. y Murdock, L. L. 1985. TWO-DIMENSIONAL PROTEIN PATTERNS IN *Heterodera glycines*. *J. of Nematology*. 17(4):422-427.
- ◇ Finetti, M. S. 1990. HISTOPATHOLOGICAL CHANGES INDUCED BY *Nacobbus aberrans* IN RESISTANT AND SUSCEPTIBLE POTATO ROOTS. *Revue Nématol.* 13(2):155-160.



- ◊ Fisher, J. M. 1965. STUDIES ON *Pratylenchus nanus* I. EFFECTS OF VARIATION IN ENVIRONMENT ON SEVERAL MORPHOMETRIC CHARACTERS OF ADULTS. *Nematologica*. 11:269-279.
- ◊ Franklin, M. T. 1959. *Nacobbus serendipiticus*, *Nacobbus* sp. A ROOT GALLING NEMATODE FROM TOMATOES IN ENGLAND. *Nematologica*. 4:286-293.
- ◊ González, A.; Franco, J. y Matos, A. 1991. DESARROLLO DE *Nacobbus aberrans* (THORNE, 1935) THORNE Y ALLEN, 1944 EN CAJAS PETRI: METODO ALTERNATIVO PARA LA EVALUACION DE RESISTENCIA EN *Solanum tuberosum* L. *Nematológica*. 21(2):155-160.
- ◊ Greet, D. N. 1972. ELECTROPHORESIS AND MORPHOMETRICS OF THE ROUND-CYST NEMATODES. Proceedings of the Association of Applied Biologists. Pags. 283-286.
- ◊ Hussey, R. S. 1979. BIOCHEMICAL SYSTEMATICS ON NEMATODES-A REVIEW. Commonwealth Institute of Helminthology. Helminthological Abstracts. Series B, Plant Nematology. 48(4):141-148.
- ◊ Inserra, R. N.; Di Vito, M. y Ferris, H. 1984. INFLUENCE OF *Nacobbus aberrans* DENSITIES ON GROWTH OF SUGARBEET AND KOCHIA IN POTS. *J. of Nematology*. 16(4):393-395.
- ◊ Inserra, R. N.; Griffin, G. D. y Anderson, J. L. 1985. THE FALSE ROOT-KNOT NEMATODE *Nacobbus aberrans*. Research Bulletin 510. Utah State University. Logan, Utah.
- ◊ Inserra, R. N.; Vovlas, N.; Griffin, G. D. y Anderson, J. L. 1983. DEVELOPMENT OF THE FALSE ROOT-KNOT NEMATODE, *Nacobbus aberrans* ON SUGAR BEET. *J. of Nematology*. 15(2):288-296.
- ◊ Jatala, P. y Golden, A. M. 1977. TAXONOMIC STATUS OF *Nacobbus* SPECIES ATTACKING POTATOES IN SOUTHAMERICA. *Nematológica*. 7(2):9-10.



- ◇ Jatala, P. y Kaltenbach, R. 1979. SURVIVAL OF *Nacobbus aberrans* IN ADVERSE CONDITIONS. Annual Abstracts of The Society of Nematologists. In: J. of Nematology. 11(4):303.
- ◇ Johnson, G. B. 1977. ASSESSING ELECTROPHORETIC SIMILARITY: THE PROBLEM OF HIDDEN HETEROGENEITY. Ann. Rev. Ecol. Syst. 8:309-328.
- ◇ Johnson, J. D. y Thames, W. H. 1972. THE BIOLOGY OF A POPULATION OF *Nacobbus* (Hoplolaimidae: Nematoda) FOUND PARASITING SPINACH IN TEXAS. Annual Abstracts of The Society of Nematologists. In: J. of Nematology. 4(4):228.
- ◇ Jones, M. G. K. y Payne, H. L. 1977a. THE STRUCTURE OF SYNCYTIA INDUCED BY *Nacobbus aberrans* IN TOMATO ROOTS, AND THE POSSIBLE ROLE OF PLASMODESMATA IN THEIR NUTRITION. J. of Cell Science. 23:299-313.
- ◇ Jones, M. G. K. y Payne, H. L. 1977b. SCANNING ELECTRON MICROSCOPY OF SYNCYTIA INDUCED BY *Nacobbus aberrans* IN TOMATO ROOTS. Nematologica. 23:172-176.
- ◇ Lehman, P. S. 1980. WEEDS AS RESERVOIRS FOR NEMATODES THAT THREATEN FIELD CROPS AND NURSERY PLANTS. Nematol. Circ. N° 66 Div. Pl. Ind. Florida Dept. Agric. Consumer Serv. 2 pp.
- ◇ Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. y Randall, R. J. 1951. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. J. of Biol. Chem. 193:265-275.
- ◇ Mayorga, A. y Jatala, P. 1990. UTILIZATION OF POLYACRILAMIDE GEL ELECTROPHORESIS FOR DETECTING DIFFERENCES IN PROTEIN PATTERNS OF TWENTY *Nacobbus aberrans* POPULATIONS. Nematológica. 20(1):11-12.
- ◇ Montes, B. R. 1973. INFLUENCIA DE ABONOS ORGANICOS EN LA ECOLOGIA E INFECTIVIDAD DE *Nacobbus serendipiticus*. Tesis de Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillos, México.



- ◇ Montes, B. R. 1986. ESPECIES DE *Meloidogyne* Y *Nacobbus* PRESENTES EN OAXACA, SUS NIVELES DE DAÑO Y SU RANGO DE HOSPEDEROS. Memorias del XIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología.
- ◇ Montes, B. R. 1988. NEMATOLOGIA VEGETAL EN MEXICO. INVESTIGACION DOCUMENTAL. Sociedad Mexicana de Fitopatología. México. 158 pp.
- ◇ Nieto, A. y Llorente, J. 1989. CARACTERES BIOQUIMICOS Y NUCLEARES EN LOS METODOS DE LA SISTEMATICA MODERNA. Ciencias. Número especial 3:56-77.
- ◇ OEPP. 1984. *Nacobbus aberrans* (THORNE) THORNE AND ALLEN (*sensu lato*). Data Sheets on Quarantine Organisms. Eur. Mediterr. Plant Prot. Organ. Bulletin N° 144. 14(1):51-65.
- ◇ O'Hara, C. M. y Jatala, P. 1985. ULTRASTRUCTURE OF *Meloidogyne*, *Globodera* AND *Nacobbus* EGGS SHELLS AS RELATED TO THE ACTIVITIES OF BIOCONTROL FUNGI. Annual Abstracts of The Society of Nematologists. In: J. of Nematology. 17(4):508.
- ◇ Powers, T. O. 1992. MOLECULAR DISGNOSTICS FOR PLANT NEMATODES. Parasitology Today. 8(5):177-179.
- ◇ Pozdol, R. F. y Noel, G. R. 1984. COMPARATIVE ELECTROPHORETIC ANALYSES OF SOLUBLE PROTEINS FROM *Heterodera glycines* RACES 1-4 AND THREE OTHER *Heterodera* SPECIES. J. of Nematology. 16(3):332-340.
- ◇ Prasad, S. K. y Webster, J. M. 1967. EFFECT OF TEMPERATURE ON THE RATE DEVELOPMENT OF *Nacobbus serendipiticus* IN EXCISED TOMATO ROOTS. Nematologica. 13:85-90.
- ◇ Quesada, P. F. (sin año). ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA. Departamento de Inmunología. E.N.C.B. I.P.N. México. 18 pp.
- ◇ Quimi, V. H. 1981. CICLO BIOLOGICO Y COMPORTAMIENTO DE *Nacobbus aberrans*. Nematológica. 11(2):86.



- ◊ **Rodríguez, C. E.** 1974. SITUACION ACTUAL DE LA NEMATOLOGIA EN LAS PLANTAS HORTICOLAS DE MEXICO. Memorias del II Simposio Nacional de Parasitología Agrícola. Pags. 103-111.
- ◊ **Schuster, M. L.; Sandstedt, R. y Estes, L. W.** 1965. HOST PARASITE RELATIONS OF *Nacobbus batatiformis*, THORNE AND SCHUSTER 1956. J. of the A.S.S.B.T. 9(3):193-197.
- ◊ **Schuster, M. L. y Thorne, G.** 1956. DISTRIBUTION, RELATION TO WEEDS, AND HISTOLOGY OF SUGAR BEET ROOT GALLS CAUSED BY *Nacobbus batatiformis* THORNE AND SCHUSTER. J. of the A.S.S.B.T. 9(3):193-197.
- ◊ **Sher, S. A.** 1970. REVISION OF THE GENUS *Nacobbus* THORNE AND ALLEN, 1944. (Nematoda:Tylenchoidea). J. of Nematology. 2(3):228-235.
- ◊ **Sigma Chemical Company.** 1991. BIOCHEMICAL ORGANIC COMPOUNDS FOR RESEARCH AND DIAGNOSTIC REAGENTS. Sigma Chemical Company. U.S.A. 2144 pp.
- ◊ **Silva, J. J.** 1989. MANEJO DE *Nacobbus aberrans* (THORNE, 1935) THORNE Y ALLEN, 1944 ASOCIADO AL CULTIVO DE FRIJOL EN EL VALLE DE VALSEQUILLO, PUEBLA. Tesis de Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillos, México.
- ◊ **Stone, A. R.** 1985. CO-EVOLUTION OF POTATO CYST NEMATODES AND THEIR HOSTS: IMPLICATIONS FOR PATHOTYPES AND RESISTANCE. Bulletin OEPP/EPO Bulletin 15:131-137.
- ◊ **Tínoco, S. R.** 1981. DINAMICA DE POBLACION DE NEMATODOS ASOCIADOS CON EL CULTIVO DE JITOMATE, CICLO PRIMAVERA-VERANO 1980 EN ACTOPAN, HIDALGO. Tesis de Licenciatura. E.N.C.B. I.P.N. México.
- ◊ **Toledo, R. J. C.; Sosa-Moss, C. y Zavaleta-Mejía, E.** 1993. GAMA DE HOSPEDEROS DE CINCO POBLACIONES MEXICANAS DE *Nacobbus aberrans*. Nematrópica. 23(1):105-108.



- ◇ Torres, C. R.; De la Jara, A. F. y Zerón, B. F. 1985. FLUCTUACIONES POBLACIONALES DE NEMATODOS FITOPARASITOS ASOCIADOS A LOS CULTIVOS DE *Capsicum annum* L., *Medicago sativa* L. y *Avena sativa* L. Annual Meeting of The American Phytopathology Society. Caribbean Division. Sept. 11-14, 1985. Abstract In: *Phytopathology*. 76(3):372.
- ◇ Torres, C. R.; Tovar, S. A.; De la Jara, A. F. y Zerón, B. F. 1994. NUEVO REGISTRO DE *Nacobbus aberrans* PARA LA REPUBLICA MEXICANA. Memorias del XXI Congreso Nacional de Fitopatología. Cuernavaca, Morelos. 20-22 de Julio, 1994. Sociedad Mexicana de Fitopatología. Pag. 71.
- ◇ Trudgill, D. L. y Carpenter, J. M. 1971. DISK ELECTROPHORESIS OF PROTEINS OF *Heterodera* SPECIES AND PATHOTYPES OF *Heterodera rostochiensis*. *Ann. Appl. Biol.* 69:35-41.
- ◇ Wayne, M. W. y Webster, W. A. 1969. A NUMERICAL TAXONOMIC STUDY OF A GROUP OF SELECTED STRONGYLATES (NEMATODA). *Syst. Zool.* 18:423-443.
- ◇ Zamudio, G. V. 1987. EVALUACION DE LA RESISTENCIA DE COLECCIONES Y VARIETADES DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.) A *Nacobbus aberrans* THORNE Y ALLEN, 1944. Tesis de Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillos, México.
- ◇ Zerón, B. F. y De la Jara, A. F. Comunicación Personal. Departamento de Parasitología. Laboratorio de Nematología Agrícola. E.N.C.B. I.P.N. México.



A N E X O S

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**



Anexo I

Fijación y montaje de nemátodos

Lactofenol:

Acido Láctico (200 ml).

Glicerol (400 ml).

Fenol (200 ml).

Agua destilada (200 ml).



Anexo II

Determinación de la concentración proteínica (mg/ml) por el método de Lowry

Solución A. Solución al 2% de Na_2CO_3 anhidro en solución 0.1N de NaOH.

Solución B. Solución al 0.5% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en solución al 1% de Tartrato de Sodio y Potasio fresca (preparada a partir de una solución al 1% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y otra al 2% de Tartrato de Na y K: Tomar 50 ml de la primera solución y mezclar con 50 ml de la segunda).

Solución C. Mezclar 50 partes de la solución A con una parte de la solución B.

Solución D. Reactivo de Fenol (dilución 1:1 de Reactivo de Fenol y agua bidestilada).

Solución de Albúmina de Huevo de concentración igual a 1mg/ml = 1 ppm. Leer las muestras a 730nm.

TABLA DE REGISTRO DE DATOS PARA LA CONSTRUCCION DE LA CURVA PATRON.

Tubo N°	Albúmina (ml)	Agua (ml)	Conc.obtenida (mg/ml)	Alicuota (ml)	Sol. C (ml)	Sol. D (ml)	Absorb.
Blanco	0.00	1.00	0.00	0.3	2.5	0.75	
1	0.05	0.95	0.05	0.3	2.5	0.75	
2	0.10	0.90	0.10	0.3	2.5	0.75	
3	0.15	0.85	0.15	0.3	2.5	0.75	
4	0.20	0.80	0.20	0.3	2.5	0.75	
5	0.25	0.75	0.25	0.3	2.5	0.75	
6	0.30	0.70	0.30	0.3	2.5	0.75	
7	0.40	0.60	0.40	0.3	2.5	0.75	
8	0.50	0.50	0.50	0.3	2.5	0.75	



Anexo III

Corrimiento electroforético zonal en geles de poliacrilamida-SDS

Solución al 0.85% de NaCl. Desechar después de una semana.

Inhibidores de proteasas (Sigma Chemical Company, 1991): Estos reactivos se sacan del congelador, se permite que lleguen a temperatura ambiente e inmediatamente después de su uso se guardan nuevamente a -20°C :

Fenilmetilsulfonil fluoruro ó α -toluenosulfonil fluoruro ó fenilmetanosulfonil fluoruro (PMSF). Inhibe serinproteasas como quimiotripsina, tripsina, trombina y acetilcolinesterasa de mamíferos. No inhibe metaloproteasas ni la mayoría de las cistein proteasas y aspártico proteasas. Usar una concentración de $174\mu\text{g/ml}$ de isopropanol. Distribuir en 4 viales y mantener en congelación (-20°C).

1-cloro-3-tosilamido-7-amino-L-2-heptanona ó Na-p-tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK). Inhibe irreversible y específicamente tripsina. También inhibe otras serin y cistein proteasas como bromelaina, ficina y papaina. No inhibe quimiotripsina. Usar en concentración de $25\mu\text{g/ml}$ de agua bidestilada. Distribuir en 4 viales y mantener en congelación (-20°C).

L-1-cloro-3-[4-tosilamido]-4-fenil-2-butanona ó N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK). Inhibe irreversiblemente quimiotripsina y otras serin y cistein proteasas como bromelaina, ficina y papaina. No inhibe tripsina. Usar en concentración de $50\mu\text{g/ml}$ de metanol. Distribuir en 4 viales y mantener en congelación (-20°C).

Marcadores de Peso molecular: Estos reactivos se sacan del congelador, se permite que lleguen a temperatura ambiente e inmediatamente después de su uso se guardan nuevamente a -20°C :

Miosina de músculo de conejo (205 Kd), β -galactosidasa (116 Kd), Fosforilasa b de músculo de conejo (97,4 Kd), Albúmina bovina (66 Kd), Albúmina de huevo (45 Kd), Anhidrasa carbónica de eritrocitos de bovino (29 Kd).

Solución al 15, 20 y 50% (p/v) de Glicerol. Preparar sólo los volúmenes necesarios ya que con el tiempo la solución llega a contaminarse con hongos.

Solución de HCl 1N y 5N.



Solución al 10% de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS). Disolver lentamente en 50 ml de agua bidestilada evitando la formación de espuma y aforar a 100 ml. No es necesario filtrar. Guardar a temperatura ambiente. Es estable indefinidamente.

2-Mercaptoetanol.

Solución al 0.2% de Azul de Bromofenol. Guardar a -20°C .

Glicina.

Trizma Base.

Acido Ascórbico.

Cisteína/HCl.

EDTA (sal disódica).

Regulador del Gel Separador pH=8.9

40.0 ml HCl 1N.

36.3 g TRIZMA-BASE.

5.3 ml EDTA 0.2M pH=8.0

10.0 ml Solución al 50% de Glicerol.

46.8 ml Agua bidestilada.

Disolver el TRIZMA-BASE en 30 ml de agua bidestilada (tarda en disolverse, se produce una reacción endotérmica), añadir las soluciones de EDTA 0.2M y de glicerol, homogeneizar y ajustar a pH=8.8-8.9 con HCl 1N. Aforar a 100 ml y después filtrar con papel Whatman N° 1. Guardar en botella de polipropileno a 4°C . La solución es estable indefinidamente.

Regulador del Gel Concentrador pH=6.8

6.0 ml HCl 5N.

5.9 g TRIZMA-BASE.

40.0 ml EDTA 0.2M pH=8.0

54.0 ml Agua bidestilada.

Preparar la solución de forma idéntica a la solución anterior y guardar en botella de polipropileno a 4°C . La solución es estable indefinidamente.

Regulador de Corrimiento 10x pH=8.3

7.5 g TRIZMA-BASE.

36.0 g Glicina.

25.0 ml Solución al 10% de Dodecil sulfato de sodio (SDS).

10.0 ml EDTA 0.2M pH=8.0

215.0 ml Agua bidestilada.

Mezclar el TRIZMA-BASE y la glicina con la solución al 10% de SDS y agitar con una varilla de vidrio hasta lograr disolver la máxima cantidad posible de los solutos;



añadir 150 ml de agua y después la solución de EDTA 0.2M y terminar de disolver lo que restaba del soluto (tardan en disolverse, se produce una reacción endotérmica); aforar a 250 ml.; ajustar a pH=8.3 con la solución 5N de HCl. Guardar en botella de polipropileno a temperatura ambiente.

Regulador de Muestra 2x pH=6.8

0.8 ml solución reguladora del gel concentrador.

2.5 ml solución al 10% de SDS.

1.0 ml de Glicerol.

1.3 ml de 2-Mercaptoetanol.

1.0 ml solución al 0.2% de Azul de Bromofenol.

Distribuir en tubos Eppendorf de 1.5 ml y guardar a -20°C. Utilizar en relación 1:1 con la muestra.

Gel Separador y Gel Concentrador (Solución de monómeros) (Aguilar *et. al.*, 1993).

30.0 g Acrilamida.

0.8 g Bis-acrilamida.

100 ml Agua bidestilada.

Pesar las sustancias con cuidados extremos (guantes y cubrebocas, ya que son reactivos neurotóxicos y se absorben fácilmente por la piel). La bisacrilamida tarda en disolverse. Filtrar con papel Whatman N° 1 y guardar en botella de polipropileno cubierta con papel aluminio a 4°C. Preparar el volumen necesario ya que la solución se elimina después de 2 meses como máximo (Quesada, s.a.).

Medio de Extracción TRIS/HCl pH=8.0 (Trudgill y Carpenter, 1971).

100 ml solución al 20% (p/v) de Glicerol.

0.1g de TRIZMA-BASE.

0.1g de Acido ascórbico.

0.1g de Cisteína/HCl.

0.037g de EDTA.

Ajustar a pH=8.0 con HCl 1N y filtrar después de prepararla; guardarla en refrigeración (-4°C). Desechar después de 3 semanas.

Alcohol Etilico al 95%.

Alcohol Isopropílico.

N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED). Distribuir en tubos Eppendorf de 0.5 ml y almacenar a 4°C.

Solución al 10% de Persulfato de Amonio. Colocar muestras de 0.01g en tubos Eppendorf de 1.5 ml, almacenarlos en un desecador. Inmediatamente antes de su uso, disolverlo en 100 µl de agua bidestilada.



Regulador de Corrimiento 1x. Esta solución se prepara en el momento en el que los geles han sido dispuestos para llevar a cabo la electroforesis. Tomar 50 ml de amortiguador de corrimiento 10x y añadir 450 ml de agua bidestilada.

Colorante de Fairbanks.

57.0 ml Alcohol metílico absoluto.

12.0 ml Acido acético glacial.

0.31 g Azul de Coomasie.

57.0 ml Agua bidestilada.

Filtrar con papel Whatman N° 1 y guardar a temperatura ambiente.

Solución Desteñidora Rápida.

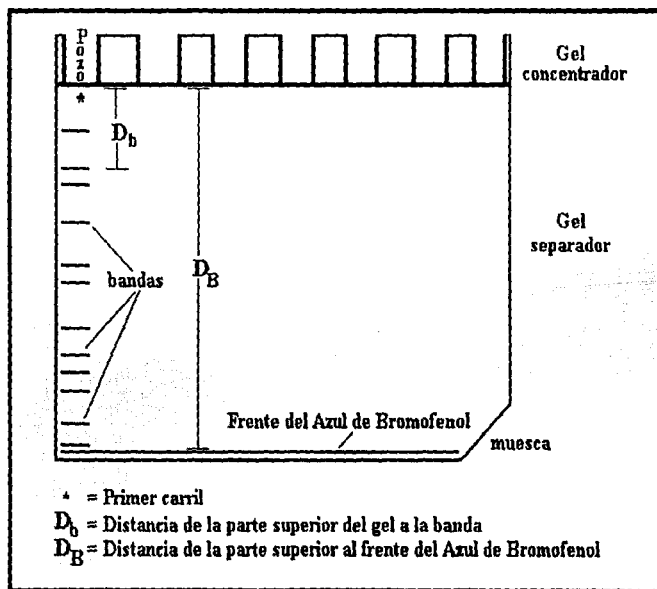
114.0 ml Alcohol metílico absoluto.

22.0 ml Acido acético glacial.

114.0 ml Agua bidestilada.

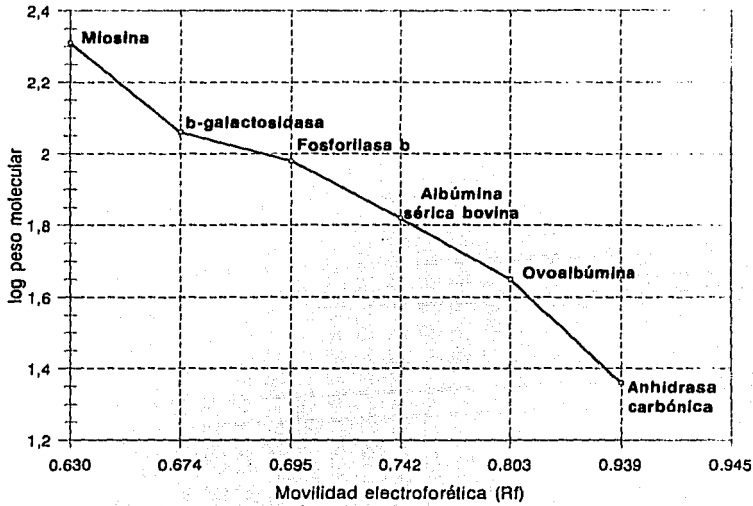
Guardar a temperatura ambiente.

Esquema que representa un gel de poliacrilamida.





Curva estándar del logaritmo del peso molecular y la movilidad electroforética (Rf), para la determinación de los pesos moleculares de las diferentes proteínas de *Nacobbus aberrans*.



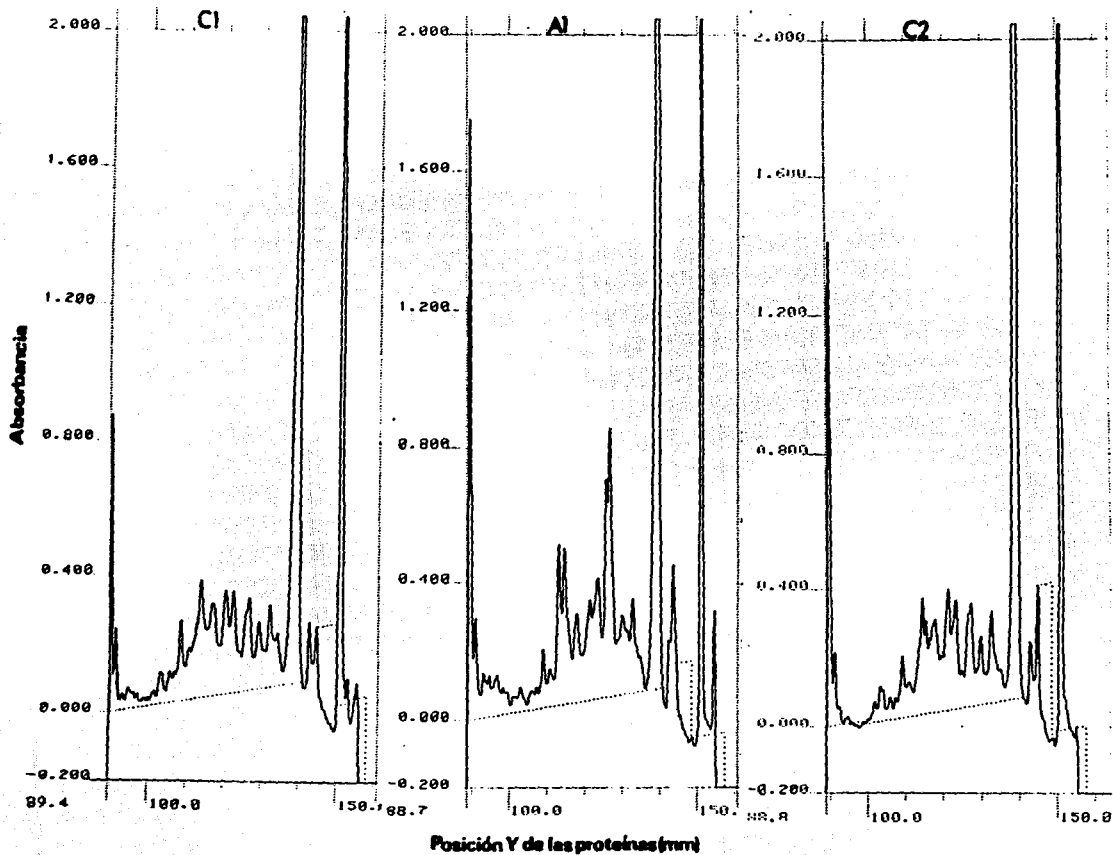


Anexo IV
Parámetros medidos (μm) a *Nacobbus aberrans*.

Población Elemento N°	Actopan		Chapingo	
	Lt	Ls	Lt	Ls
1	1139.0	22.4	1124.2	22.4
2	1501.5	23.8	1224.3	19.6
3	1170.4	21.0	1324.4	21.0
4	1139.6	22.4	1147.3	19.6
5	1293.6	21.0	1416.8	26.6
6	1393.7	21.0	1332.1	19.6
7	1362.9	21.0	1532.3	25.5
8	1078.0	*	1647.8	21.0
9	1332.1	21.0	847.0	19.6
10	1278.2	21.0	1232.0	19.6
11	1247.4	21.0	1878.8	25.2
12	1285.9	*	1601.6	21.0
13	1355.2	23.8	1016.4	21.0
14	1624.6	21.0	1155.0	26.6
15	1416.8	21.0	1124.2	21.0
16	931.7	21.0	1848.0	21.0
17	1216.6	21.0	1124.2	19.6
18	1532.3	21.0	1047.2	21.0
19	1216.6	22.4	1208.9	21.0
20	1078.0	21.0	939.4	21.0
21	954.0	16.8	1155.0	21.0
22	1155.0	19.6	1563.1	21.0
23	1332.1	19.6	1309.0	21.0
24	1070.3	21.0	1232.0	18.2
25	1655.5	21.0	1447.6	21.0
26	1224.3	21.0	1178.1	25.2
27	1239.0	21.0	1455.3	21.0
28	1147.3	21.0	1139.6	21.0
29	1493.8	21.0	1393.7	25.2
30	962.5	21.0	1216.6	21.0
31	1609.3	25.2	1586.2	21.0
32	1093.4	21.0	1393.7	22.4
33	1370.6	23.8	1270.5	21.0
34	1393.7	25.2	1309.0	19.6
35	1470.7	25.2	1540.0	23.8
Mediana	1278.2	21.0	1270.5	21.0

Anexo V

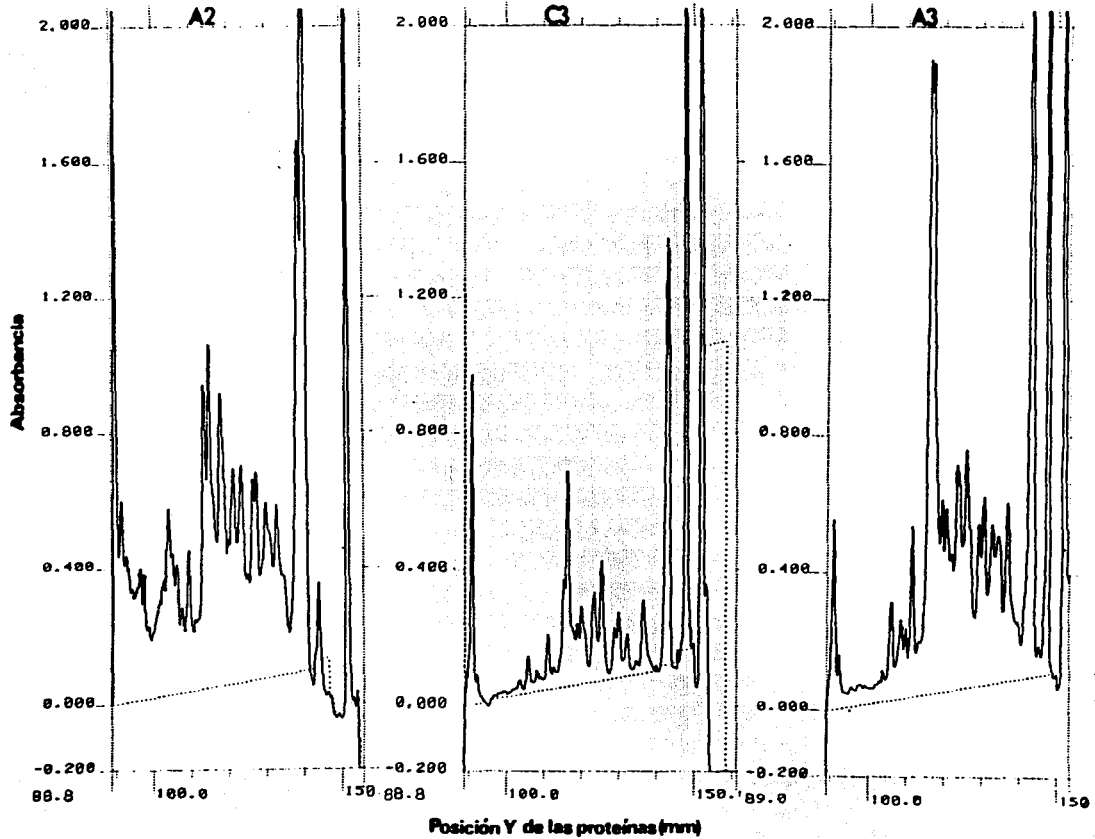
Perfiles densitométricos obtenidos por lectura en el densitómetro óptico CD50 Heidelberg,
de los patrones de proteínas de hembras maduras de *Nacobbus aberrans*.
Poblaciones Actopan (A) y Chapingo (C).



FALLA DE ORIGEN

Anexo V

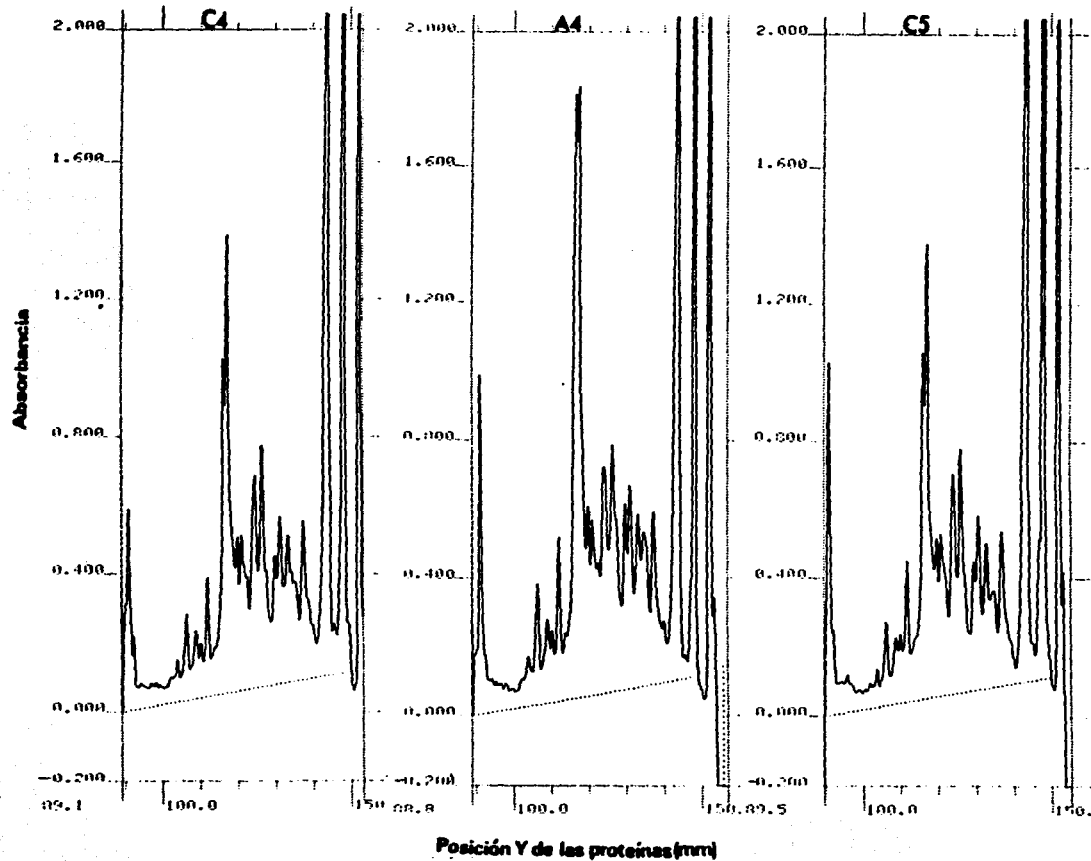
...Perfiles densitométricos obtenidos por lectura en el densitómetro óptico CD50 Heidelberg,
de los patrones de proteínas de hembras maduras de *Nacobbus aberrans*.
Poblaciones Actopan (A) y Chapingo (C).



Actopan 00-01-1980

Anexo V

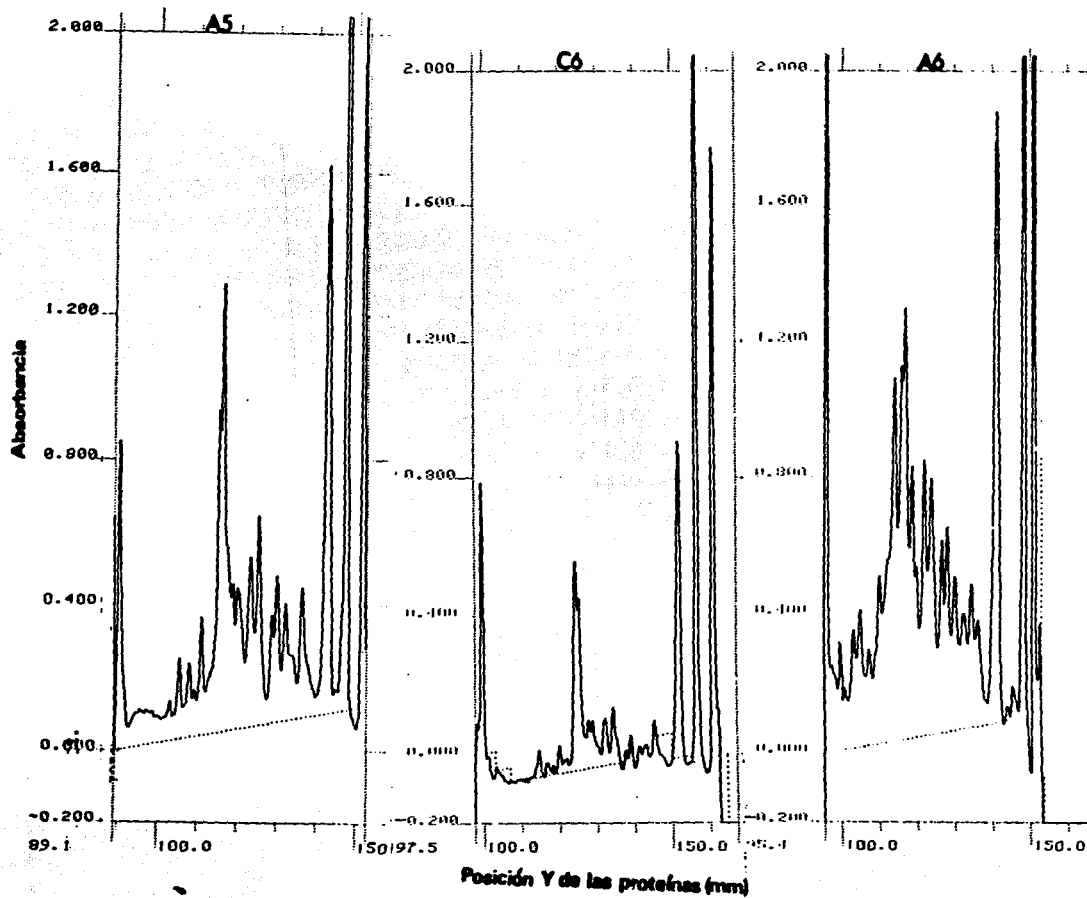
...Perfiles densitométricos obtenidos por lectura en el densitómetro óptico CD50 Heidelberg,
de los patrones de proteínas de hembras maduras de *Nacobbus aberrans*.
Poblaciones Actopan (A) y Chapingo (C).



REPLICA DE ORIGIN

Anexo V

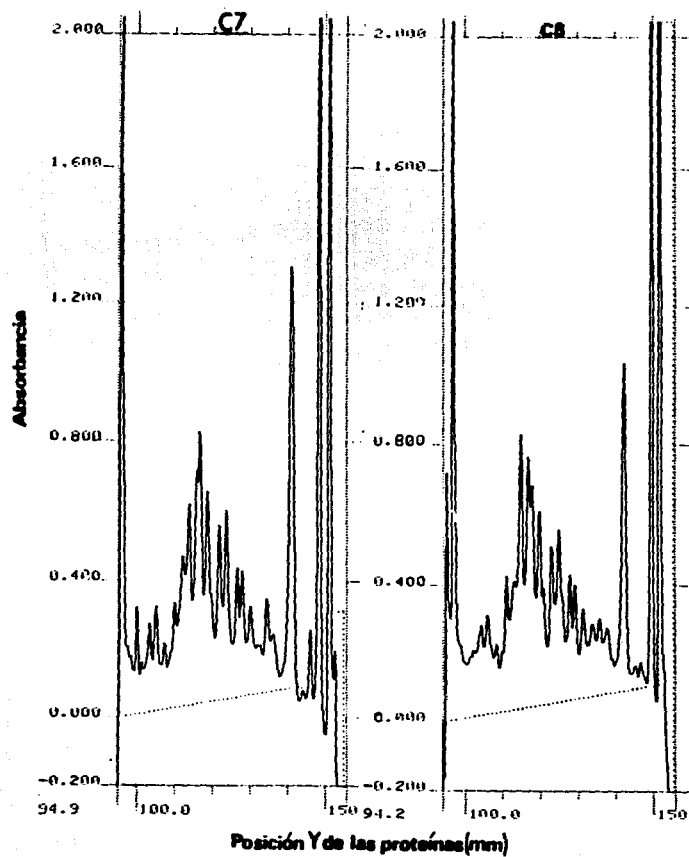
...Perfiles densitométricos obtenidos por lectura en el densitómetro óptico CD50 Heidelberg,
de los patrones de proteínas de hembras maduras de *Nacobbus aberrans*.
Poblaciones Actopan (A) y Chapingo (C).



FALLA DE ORIGEN

Anexo V

...Perfiles densitométricos obtenidos por lectura en el densitómetro óptico CD50 Heidelberg,
de los patrones de proteínas de hembras maduras de *Nacobbus aberrans*.
Poblaciones Actopan (A) y Chapingo (C).



Nunca debemos olvidarnos de nuestros sueños aunque el mundo abogue por lo contrario.

Wilson Aguilár Filho