

1 - INTRODUCCIÓN

El cultivo del cafeto (*Coffea arábica*) es de gran importancia económica en términos de producción y generación de empleo en la zona cafetalera de Izalco. Este municipio está ubicado en el Departamento de Sonsonate en la zona occidental del país. Según PROCAFE, en Izalco existen 9329 mz. de cafetal las cuales están distribuidas en los tres estratos altitudinales (400-1200 m. s. n. m.). La producción promedio por manzana en esta zona es de 10 - 12 qq/mz según técnicos de POCAFE, lo cual es muy bajo si lo comparamos con la potencialidad de producción que tienen las variedades, "pacas" y "bourbon" sembradas en condiciones optimas, 20 - 35 qq/mz y 25 - 40 qq/mz respectivamente. Esta baja producción se debe a que las plantaciones son afectadas por problemas fitosanitarios. Los cafetos son atacados por plagas principalmente por: hongos, insectos y nematodos que afectan su producción. Siendo estos últimos los responsables de la mayoría de los daños que se observan en las diferentes fincas, donde se encuentran diversas poblaciones de nematodos agalladores pertenecientes al género *Meloidogyne*.

Los daños o pérdidas que estos ocasionan se pueden resumir de la siguiente manera:

- a) Reducción de la producción de plantas infestadas
- b) Destrucción de plantas en vivero
- c) Incremento en los costos de producción debido a la utilización de nematicidas.

Para el combate de estos nematodos, los caficultores utilizan productos agroquímicos (nematicidas), sin embargo estos productos presentan ciertas desventajas: son de alto costo, de manera que no están al alcance de todos los productores ; son más eficaces en viveros y menos eficaces en plantaciones establecidas; son peligrosos para las personas que los manipulan y contaminan el medio ambiente y cuando se utilizan hay que depender

de ellos. Por estas razones, existe la necesidad de implementar programas de investigación para buscar métodos alternativos de control. Uno de estos métodos es: la utilización y la selección de variedades resistentes de *Coffea canephora* (Robustas) que puedan ser utilizadas como portainjertos. Sin embargo, para llevar a cabo este tipo de trabajo, es imperativo identificar y/o caracterizar la diversidad de especies de nematodos presentes en la zona. El presente trabajo trata de la caracterización de poblaciones de nematodos del género *Meloidogyne* que se encuentran parasitando el cultivo de cafetos en la zona cafetalera de Izalco.

2- MARCO TEÓRICO

2.1 Importancia Económica de los Nematodos en el Cultivo de Cafetos

Todos los suelos agrícolas son hospederos potenciales de nematodos fitoparásitos, lo que ha ocasionado que diferentes géneros y especies alcancen poblaciones críticas que reducen los rendimientos de los cultivos establecidos (Araya, 1994). Los daños se acentúan cuando buenos hospederos son cultivados en forma frecuente y especialmente cuando se trata de un monocultivo como el cafeto. Los nematodos parásitos de las raíces de cafetos pertenecen a dos géneros: *Meloidogyne* y *Pratylenchus* spp. Son de importancia económica ya que los primeros desarrollan agallas en las raíces reduciendo la capacidad de absorción de agua y nutrientes en la planta, los segundos lesionan los tejidos provocando el desprendimiento de la corteza en las raíces (Anzueto *et al.*,1995; Villaín *et al.*,1999). Las plantas atacadas no desarrollan sintomatología aérea característica por lo cual los agricultores y agrónomos confunden los síntomas con problemas edáficos (Einsenback *et al.*, 1983; Araya, 1994; Villaín *et al.*,1999). Los daños causados por nematodos han sido evaluados en las diferentes etapas del cultivo del café en viveros en varios países productores (tabla 1). Aún cuando resulta difícil establecer con certeza las pérdidas en producción; existen datos y observaciones que revelan el impacto de los fitonematodos en plantaciones establecidas(tabla 2)(Anzueto, 1993; Araya,

Cuadro 1. Efecto de fitonematodos en viveros de café (Araya, 1994).

EDAD (meses)	NEMATODO	PARAMETRO AFECTADO	%	REFERENCIA
4	<i>Meloidogyne exigua</i>	Crecimiento	34	Román, J. 1978
6	<i>M. exigua</i>	Altura	30	Arruda 1960
10	<i>M. exigua</i>	Crecimiento	45	Román, J. 1978
12	<i>M. exigua</i>	Altura	68	Arruda 1960
12	<i>M. exigua</i>	Altura	31.4	Macedo 1974
8	<i>M. incognita</i>	Altura	20	Negrón <i>et al.</i> , 1987
6	<i>M. incognita</i>	Peso raíz	50	Vovlas <i>et al.</i> , 1991
6	<i>M. javanica</i>	Peso raíz	45	Vovlas <i>et al.</i> , 1991
4	<i>Pratylenchus coffeae</i>	Crecimiento	32	Monterroso 1973
10	<i>P. coffeae</i>	Crecimiento	56	Monterroso 1973
6	<i>Radopholus similis</i>	Altura	52	Milne <i>et.,al</i> 1976
10	<i>Meloidogyne spp</i>	Reduce 10 veces el peso del follaje.		Figueroa, A. 1978

Cuadro 2. Impacto de fitonematodos en la fase productiva del café (Araya, 1994).

PAIS	NEMATODO	DAÑO	REFERENCIA
India	<i>Meloidogyne Pratylenchus</i>	Provocan marchitez y muerte de la planta.	Mayne y Subranhayan, 1933
Brasil	<i>M. exigua</i>	Principal causa de la decadencia del café en Rio de Janeiro.	Duque, 1949
Brasil	<i>Meloidogyne</i>	Abandonar las plantaciones y reemplazarlas por caña de azúcar.	Delacroix citado por Duque, 1949
Java	<i>P. coffeae</i>	Causo en menos de 6 meses la muerte de mas del 95% del café.	Vaysssiere, 1955
Indonesia	<i>Meloidogyne</i>	Peste más destructiva del café.	Cramer, 1957
El Salvador	<i>Meloidogyne</i>	Segunda peste más importante después de <i>Mycena citricolor</i> .	ISIC, 1958
Brasil	<i>M. coffeicola</i>	Grandes áreas de café fueron reemplazadas por caña de azúcar en Rio de Janeiro.	Lordello L.G.E. et al., 1960
Brasil	<i>M. exigua</i>	52% de pérdidas en rendimiento.	Arruda et al., 1962
India	<i>Rothylencus reniformis</i>	Con 10 juveniles (J2) / 50 c/c de suelo, imposible cultivar café.	D'suoza, 1965
Indonesia	<i>Radopholus similis</i>	Peste muy importante del café.	Whitehead, 1968
India	<i>P. coffeae</i>	Cafetos mueren en suelos infestados.	Whitehead, 1969
México	<i>M. exigua</i>	Causa la muerte de 85% de resiembras.	Vásquez, 1971
Brasil	<i>M. exigua</i>	Grandes áreas de café fueron reemplazadas por caña de azúcar en Rio de Janeiro.	Lordello E.I.L., 1972 y 1976
Perú	<i>M. exigua</i> <i>M. incognita</i>	Principal problema en la producción	Gómez, 1972
Brasil	<i>M. exigua</i>	Reduce la absorción de zinc y boro.	Macedo et al., 1974
Colombia	<i>M. exigua</i> <i>M. javanica</i>	Causa pérdidas de \$ 800 millones anuales.	Barriga, 1976
Brasil México América Central Caribe América del Sur	<i>M. exigua</i> <i>M. exigua</i> <i>M. exigua</i> <i>M. exigua</i> <i>M. exigua</i>	24 % pérdidas en rendimiento. 10 % pérdidas en rendimiento. 10 % pérdidas en rendimiento. 10 % pérdidas en rendimiento. 13 % pérdidas en rendimiento.	Sasser, 1979
Sao Paulo	<i>M. incognita</i>	Peor peste del café	Lordello, 1984
Brasil	<i>M. exigua</i>	Redujo 14.5% en altura, 19.4% en el diámetro y 68.2% en la producción.	Guerra, 1985
Rio de Janeiro	<i>M. exigua</i>	Causo la destrucción total de plantaciones que fueron reemplazadas por caña de azúcar.	Campos et al., 1990

2.2 Importancia económica de los nematodos del género *Meloidogyne* como parásitos del cultivo de cafetos

El primer reporte de la existencia de nematodos fitoparásitos perjudiciales a un cultivo económico fue hecho por Jobert en (1878), quien observó los graves daños que el parásito causaba en plantaciones de cafetos en Brasil (Taylor & Sasser, 1983); diez años después la especie en mención fué identificada por Goeldi (1887) como *Meloidogyne exigua*. En Centro América los nematodos agalladores atacan viveros y cafetales establecidos generando pérdidas económicas. Hasta el momento no se han realizado estudios para cuantificar las pérdidas asociadas con la presencia del nematodo en Centro América (Villain *et al.*,1999). Según Sasser citado por Morera (1986) en América Central, México y el Caribe las pérdidas ocasionadas por *Meloidogyne spp* son del 10%, sin embargo en la década de los noventa se pudo observar varias fincas en Costa Rica y Nicaragua con pérdidas superiores al 70%(Morera, 1986). Carneiro *et al.*,(1996a) menciona que *Meloidogyne spp* esta entre las plagas más destructivas de plantas de cafetos en Brasil. Campos *et al.*, (1990) reportan que en 1976 se destruyeron 3 millones de plantas de vivero en el estado de Sao Paulo, Brasil y en Colombia se estima que los daños anuales ascienden a US \$800 millones.

2.3 Nematodos del género *Meloidogyne* como parásitos del cafeto

2.3.1 Distribución Mundial

No se conocen los hábitats originales de las especies de *Meloidogyne*. La amplia distribución del material vegetal infectado por este nematodo dificulta distinguir entre las especies nativas de una región y las ya adaptadas (Taylor & Sasser, 1983).

Estos nematodos se encuentran diseminados en todas las zonas productoras de café en el mundo(Christie,1959;Taylor & Sasser,1983) La distribución de las especies de *Meloidogyne* se explica por la variedad de huéspedes y por las condiciones climáticas tales como la temperatura, pluviosidad y textura del suelo de una determinada región (Christie,1959;Taylor & Sasser, 1983; Sasser & Cáster, 1985).

2.3.2 Sintomatología de plantas afectadas

La sintomatología de la parte aérea de las plantas infestadas con nematodos agalladores, es similar a aquellos causados por otros patógenos de la raíz y/o por condiciones ambientales que restringen el flujo de agua o de nutrientes. (Einsenback *et al*, 1983; Taylor & Sasser, 1983). La mayoría de especies de *Meloidogyne* inducen a la raíz infectada a engrosarse alrededor del punto donde el nematodo se está alimentando formándose así la típica agalla radicular las que pueden presentarse simple o formando un conjunto masivo de agallas de tamaño y forma variable sobre las raíces de las plantas que parasitan. En el vivero las plantas atacadas presentan una clorosis general y enanismo; en plantaciones establecidas los cafetos presentan un amarillamiento en las hojas y posteriormente sufren una defoliación. (Christie, 1959; Taylor, 1968; Eisenback *et al*, 1983; Taylor & Sasser, 1983;Lordello,1986).

2.3.3. Métodos de Combate

Los caficultores combaten estos nematodos del nódulo de la raíz con diferentes métodos:

a) Control químico

Este método consiste en la utilización de Nematicidas (organofosforados, carbonatos y fumigantes) para reducir poblaciones de nematodos en el campo y en el suelo para viveros.

b) Control genético

Este método consiste en utilizar plantas resistentes para combatir nematodos, sin embargo, en lo que se refiere a *Coffea arabica*, no existe por el momento una variedad comercial resistente a las diversas especies ó patotipos de nematodos.

c) Control Cultural

Este método consiste en implementar medidas de evitación o exclusión. Las prácticas consisten en evitar el transporte de plantas y suelo infestados con nematodos a sitios que se encuentran libres de esta plaga. También se debe de evitar hacer viveros con suelos infestados.

d) Injertación

Este método consiste en la utilización de variedades portainjertos de *Coffea canephora* (Robusta) resistentes a nematodos. En este caso, la variedad patrón no es afectada por los nematodos y la variedad comercial produce con todo su potencial. Este método de combate es bastante eficaz en zonas altamente infestadas y se utilizan desde hace mucho tiempo en Guatemala y Brasil.

El programa de mejoramiento varietal de *C. canephora* conducido en Brasil llevó a la creación de la variedad Apoata la cual es resistente a diversos patotipos de *M. incognita* (Villain *et al.* ,1999).

En Guatemala se utiliza desde hace muchos años el patrón de Robusta para controlar al nematodo *Pratylenchus*, sin embargo estos Robusta no seleccionados presentan un bajo

nivel de resistencia (30 - 40%) a cepas de *Meloidogyne* agresivos (Anzueto, 1993; Villain *et al.*, 1996; Bertrand *et al.*, 1999). Debido a este bajo nivel de resistencia, se inicio un proyecto de evaluación y selección de germoplasma para obtener Robustas con mayor grado de resistencia a los principales nematodos de Centro América, patógenos para el cafeto (Campos *et al.*, 1990; Anzueto, 1993). Este proyecto permitió la creación de la variedad Nemaya (Anzueto *et al.* 1991) la cual se originó del cruzamiento de dos árboles de la colección del CATIE: el T 3561 (2-1) y el T 3751 (1-2) ambos presentaron altos niveles de resistencia en comparación con otros (56 y 54% respectivamente). La descendencia híbrida de este cruce es altamente resistente (80%) para *M. arenaria* de El Salvador y *Meloidogyne* spp de Guatemala y el 100% para *M. arabicida* y *M. exigua* de Costa Rica y Nicaragua respectivamente. (Anzueto *et al.*, 1991; Bertrand *et al.*, 1999)

e) Enmiendas orgánicas

Los abonos orgánicos como: la gallinaza y la pulpa de café, juegan un papel muy importante para mejorar la estructura, fertilidad y el regular el balance hídrico del suelo, favorecen igualmente el desarrollo de microorganismos antagónicos de los nematodos (Villain *et al.*, 1999)

f) Otros métodos.

- Plantas antagonistas

Existe una gran diversidad de plantas cuya acción nematicida es bien conocida dentro de las cuales se encuentran las leguminosas de cobertura las que se consideran poseen una mayor variedad de fitotoxinas que cualquier otra familia (Villain *et al.*, 1999) Estas fitotoxinas se concentran en hojas, vainas, semillas y raíces (Domínguez *et al.*, 1990). En Costa Rica y Nicaragua las leguminosas mas utilizadas para el control de nematodos son: *Pueraria phaseoloides*, *Arachis pintoi*, *Centrosema pubescens*, *Desmodium ovalifolium*,

Centrosema acutifolium, *C. macrocarpum* y *Stylobium* spp, Domínguez *et al.*,1990 ; Herrera, 1997; Herrera & Marban, 1999); estas han reducido significativamente el índice de agallamiento en los trabajos realizados con nematodos agalladores. Es importante considerar que las plantas antagónicas presentan cierto nivel de especificidad de su antagonismo frente a los nematodos que se quieren combatir (Domínguez, *et al.*,1990; Herrera & Marban, 1999).

- Micorrizas

Las micorrizas después de haber colonizado bien las raíces de las plantas jóvenes de café pueden ejercer una acción antagonista sobre la infestación de las raíces por nematodos. Además permiten mejorar la nutrición de los cafetos por su acción simbiótica contribuye así a inducir una mayor tolerancia de las plantas al ataque de los nematodos (Villain *et al.*,1999).

2.3.4 Clasificación taxonómica de las especies de *Meloidogyne*

De acuerdo a Taylor & Sasser, (1983) la posición taxonómica de las especies del género *Meloidogyne* es la siguiente:

PHYLUM	: Nemata o nematoda
CLASE	: Secernentea
ORDEN	: Tylenchida
SUPERFAMILIA	: Tylenchoidea
FAMILIA	: Meloidogynidae
GENERO	: <i>Meloidogyne</i>

2.3.5 Ciclo biológico

El ciclo de desarrollo de los *Meloidogyne* comprende cuatro estadios larvarios y un estado adulto. El ciclo comprende dos fases: La primera que va desde la salida de las larvas de los huevos, hasta que penetran en las raíces de los cafetos y la segunda comprende el desarrollo completo del nematodo al interior de los tejidos .(Christie,1959; Taylor & Sasser,1983; Villain et al., 1999).

Taylor,1968; De Guiran & Netscher, 1970,1979, detallan el ciclo de desarrollo como sigue: Estos nematodos pertenecen al grupo de los endoparásitos sedentarios, presentan dimorfismo sexual, la hembra es de forma piriforme o esférica, y el macho es un gusano de forma vermiforme y aguzado. La hembra ubicada en el interior de las raíces, oviposita sus huevos en una masa protectora gelatinosa. Las larvas mudan por primera vez en el interior del huevo, luego eclosionan pasando al segundo estadio juvenil (J2) y se diseminan en el suelo, donde pueden, ya sea penetrar directamente en la raíz, y comenzar a alimentarse o esperar varios meses en el suelo en ausencia de un hospedero ó en caso de condiciones desfavorables. Una vez que las larvas encuentran las raíces se fijan en forma definitiva y continúan su crecimiento. Después de la segunda muda, las larvas están en el tercer estadio y se comienza a desarrollar células gigantes alrededor del punto de fijación del nematodo y una agalla comienza a aparecer sobre la raíz y se inicia también la diferenciación de las larvas en hembra y macho. Después de la tercera muda, y al acercarse al final del cuarto estadio, comienzan a desarrollarse los órganos sexuales de la hembra. El macho, se convierte en un gusano largo y delgado enrollado en la cutícula larvaria; la hembra adulta empieza nuevamente a depositar los huevos en una masa gelatinosa que se encuentra al exterior de la raíz.

El macho deja la cutícula larvaria y se desplaza en la misma raíz para copular a la hembra (fig. 1).

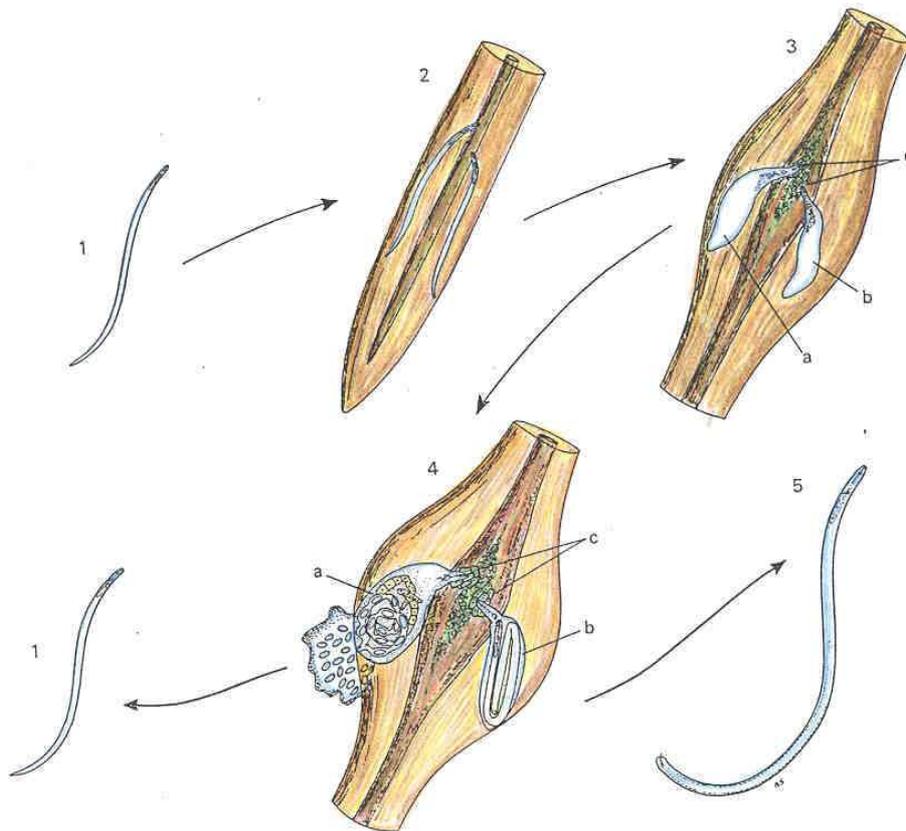


Figura 1. Esquemmatización del ciclo biológico de *Meloidogyne* spp. 1) Larva en segundo estadio (J2), 2) Larva de segundo estadio que acaba de penetrar una raíz, 3) Inicio de formación de agalla; a - b: larvas de segundo estadio en crecimiento; c: células gigantes; 4) Agalla conteniendo: a: hembra adulta con su masa de huevos en una sustancia gelatinosa; b: macho adulto en su cubierta larvaria; c: células gigantes; 5) Macho adulto libre.

2.3.6 Factores que influyen en el desarrollo de *Meloidogyne*

La velocidad de desarrollo de estos nematodos se ve influida por factores como:

Temperatura.

Lordello (1977) menciona que a temperaturas entre 27.5 °C a 30°C, el estado adulto es alcanzado en 17 días. A temperaturas inferiores a 15.4°C , ó superiores a 33.5°C, las hembras no llegan a alcanzar su madurez.

Humedad.

Las especies de *Meloidogyne* dependen del agua en el suelo para continuar su vida y todas sus actividades. Las larvas y los huevos mueren en suelo seco; pero pueden sobrevivir si hay suficiente humedad para mantener el aire del suelo con casi 100% de humedad, en suelos muy húmedos la emergencia puede inhibirse y el movimiento larval disminuir por falta de oxígeno (Taylor, 1968; Taylor & Sasser, 1983).

Textura del suelo.

Las larvas de los nematodos se mueven a través de los poros del suelo, muchos nematologos han concluido que el nematodo del nódulo de la raíz es más severo en suelos arenosos que en suelos arcillosos(Christie, 1959; Taylor & Sasser, 1983). Es decir en suelos que contienen menos del 10% de arcilla, menos del 30% de limo y más del 60% de arena (Sasser & Cáster, 1985).

2. 4 Especies de *Meloidogyne* asociadas al cultivo del cafeto

Whitehead (1969) menciona la existencia de doce especies atacando el cultivo del cafeto, Lordello (1972) menciona solamente diez.

Campos *et al.*,(1990) indica la existencia de trece especies. Sin embargo, recientemente cuatro nuevas especies han sido descritas: *M. arabicida* en Costa Rica (López & Salazar,

1989), *Meloidogyne* spp. en Guatemala (Anzueto *et al.*,1991), *M. konaensis* en Hawai (Einsenback *et al.*, 1994), y *M. paranaensis* en Brasil (Carneiro *et al.*,1996a). Por lo que actualmente son 17 especies reportadas como parásitos del cultivo del cafeto en las diversas zonas de producción de café en el mundo. (Tabla 3)

Desde el punto de vista económico las especies más importantes son: *M. exigua*, *M. incognita* y *M. coffeicola* (Taylor & Sasser, 1983; Campos *et al.*,1990)

Las dos primeras se encuentran en Centro y Sur América donde causan graves daños (Campos *et al.*,1990; Marban, 1994). La ultima ha sido únicamente señalada en Brasil (Curi *et al.*,1969; Jaehn, Rebel & Lordello, 1980).

En Centro América la especie *M. exigua* ha sido reportada en Guatemala (Schieber & Sosa, 1960) en Costa Rica (Salas & Echandi, 1961) y en Nicaragua (Vega, 1982).

La especie *M. incognita* ha sido reportada en Guatemala (Chitwood & Bergé, 1960). En El Salvador (Pinochet & Guzmán, 1987) y en Costa Rica (Figuroa, 1989). Otra especie, *M. javanica* fue reportada por Abrego & Holdeman (1961) en El Salvador.

Cuadro 3. Distribución geográfica de las especies de *Meloidogyne* reportadas como parásitos sobre raíces de cafetos.

NEMATODOS	HUÉSPED	PAÍS	REFERENCIA
<i>Meloidogyne exigua</i>	<i>Coffea arabica</i>	Guatemala, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, República Dominicana, Puerto Rico, Colombia, Brasil, Bolivia, Perú y Venezuela.	Whitehead, 1969 Lordello, 1972 Campos et al, 1990
<i>M. incognita</i>	<i>C. arabica</i> <i>C. canephora</i>	Guatemala, Jamaica, Brasil, Venezuela, Costa de Marfil, Tanzania, India.	Lordello, 1972 Campos et al, 1990
<i>M. coffeicola</i>	<i>C. arabica</i>	Brasil	Lordello, 1972
<i>M. javanica</i>	<i>C. canephora</i> (Robusta) <i>C. arabica</i>	El Salvador, Brasil, Tanzania, Zaire, India	Lordello, 1972 Campos et al, 1990
<i>M. hapla</i>	<i>C. canephora</i> var. Robusta	Brasil, Tanzania, Zaire, India	Campos et al, 1990
<i>M. africana</i>	<i>C. arabica</i> <i>C. canephora</i>	Kenia, Zaire	Whitehead, 1959
<i>M. decalineata</i>	<i>C. arabica</i>	Tanzania, Sao Tomé	Campos et al, 1990
<i>M. kikuyensis</i>	<i>C. arabica</i>	Tanzania	Whitehead, 1969
<i>M. arenaria</i>	<i>C. canephora</i> (Robusta)	Jamaica	Whitehead, 1969
<i>M. megadora</i>	<i>C. arabica</i> <i>C. canephora</i> <i>C. congensis</i> <i>C. eugenoides</i>	Angola, Uganda	Whitehead, 1968
<i>M. inornata</i>	<i>C. arabica</i>	Guatemala	Campos et al, 1990
<i>M. oteifae</i>	<i>C. canephora</i>	Zaire	Lordello, 1972
<i>M. thamesi</i>	<i>Coffea spp.</i>	India	Campos et al, 1990
<i>M. arabicida</i>	<i>C. arabica</i>	Costa Rica	López & Salazar, 1989
<i>M. konaensis</i>	<i>C. arabica</i>	Hawai	Einsenback et al, 1994
<i>M. paranaensis</i>	<i>C. arabica</i>	Brasil	Carneiro et al, 1996
<i>Meloidogyne spp.</i> (esterasa F1)	<i>C. arabica</i>	Brasil, Perú, Surinam, Guatemala	Esbenshade & Triantaphyllou, 1985 Anzueto et al, 1991

2.5 Importancia de la identificación de las especies para implementar programas de manejo integrado.

La identificación de las especies de *Meloidogyne* es de gran importancia, pues constituye la base para el combate de los mismos (Carneiro, 1996b; Jepson, 1987; Robinson, 1989)

En Sur América, por ejemplo se siembran las dos especies de cafetos más importantes, *C. arabica* y *C. canephora* (Jepson, 1987). La primera es sensible a *M. exigua* mientras que la segunda es resistente a esta misma especie. Sin embargo es necesario detallar que las dos especies de cafeto son sensibles a otras especies de nematodos, específicamente a *M. coffeicola* y *M. incognita* (Jepson, 1987)

2.5.1 Problemas asociados a la identificación de las especies de *Meloidogyne*

La identificación de las especies de los nematodos del nódulo de la raíz se dificulta por varias razones: A nivel de campo, los síntomas aéreos que estos desarrollan sobre las plantas que parasitan no son específicos; de la misma forma, los síntomas sobre las raíces a veces no son observados, las agallas ofrecen muy pocos criterios (forma y tamaño variables) y algunas especies no las desarrollan (Christie, 1959; Taylor & Sasser, 1983). Por otra parte, diversas poblaciones de una misma especie producen diferentes reacciones sobre un mismo huésped (presencia de razas biológicas) (Taylor, 1968; Taylor & Sasser, 1983; Ibrahim, 1993).

La taxonomía en el género *Meloidogyne* es generalmente basado en características morfológicas, biométricas y parasitológicas (patrones perineales, largo del estilete, largo de la cola de los machos, y rango de hospederos diferenciales) (Dalmaso & Bergé, 1978; Netscher, 1978; Taylor & Sasser, 1978; Jepson, 1983; Hartman, 1985b Fargette, 1987; Pais, 1989;). Sin embargo los criterios morfológicos mayormente utilizados para su

identificación presentan muy poca variación entre las diferentes especies, lo que hace difícil observar las diferencias existentes (Triantaphyllou,1963; Jepson, 1987; Fargette; 1987; Pais, 1989). Experimentos y estudios citogenéticos han demostrado que muchos miembros del género *Meloidogyne*, se reproducen por partenogénesis mitótica obligada (Triantaphyllou, 1962,1963,1970; Dalmaso & Bergé,1978; Eisenback, *et al.*,1983; Esbenshade & Triantaphyllou, 1987;) por lo que el concepto de especie biológica no puede ser aplicado a *Meloidogyne*.

El criterio morfológico mayormente utilizado para identificar las especies es el estudio de la placa perineal de las hembras. Esta estructura es observada mediante una técnica de preparación y esta formada por estrías cuticulares (arrugas) que rodean la vulva y el ano (fig. 4) (Hartman & Sasser, 1985a; Jepson, 1987). La ornamentación que forman estas estrías se parece a una huella digital humana (Fig.4). Aunque este criterio sea bastante útil, presenta la dificultad de que la persona que realiza los estudios debe tener conocimientos especializados en taxonomía (Jepson, 1987).

Otro criterio utilizado para identificar especies es el análisis de proteínas enzimáticas y no enzimáticas por medio de la utilización de la técnica de electroforesis (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985a,b;1987; Fargette & Braaskma, 1990).

Las enzimas mas utilizadas para discriminar especies son las esterasas (Dickson, 1970 - 1971; Dalmaso & Berge;1978; Janati *et al.*,1982; Eisenback, 1983; Fargette,1987a ; Ibrahim, 1993). Después de realizada la electroforesis las esterasas se presentan como bandas de color oscuro en una placa de gelatina previamente elaborada (Dickson, *et al.*,1970,1971; Trudjill & Carpenter, 1971; Esbenshade & Triantaphyllou 1985b; Hernández *et al.*,1995; 1997)

2.6 Caracterización bioquímica de poblaciones de *Meloidogyne*

2.6.1 Historia

El uso de técnicas electroforéticas en el estudio de proteínas solubles y enzimas específicas ha sido popular desde principios de 1960 (Esbenshade y Triantaphyllou, 1985a).

Ornstein y Davis, (1964) describen la teoría y aplicación de discos electroforéticos con geles de poliacrilamida. La primera investigación de taxonomía bioquímica en nematodos del nódulo de la raíz fue conducida por Dickson *et al.*, (1971); Hussey & Krusberg,(1971) y Hussey *et al.*, (1972).

En estudios iniciales de enzimas de nematodos fueron empleados discos electroforéticos. Los extractos de muchos nematodos fueron combinados en un solo gel para la identificación de un fenotipo o de una población de nematodos en particular (Dickson *et al.*, 1970, 1971; Hussey *et al.*, 1972). En estudios posteriores fueron desarrolladas microtécnicas de electroforesis y adaptadas para la extracción de pequeñas cantidades de proteína solubles solo de hembras adultas de *Meloidogyne* para el análisis enzimático y comparación de enzimas fenotipos.(Dalmaso & Bergé 1978; Esbenshade & Triantaphyllou, 1985b). Recientemente la utilización de la técnica de láminas delgadas de gel de poliacrilamida en el análisis electroforético de fenotipos enzimáticos de hembras individuales provenientes de diferentes muestras de poblaciones de nematodos han mostrado mucha satisfacción ya que este método es muy confiable y preciso en la identificación de nematodos del nódulo de la raíz (Esbenshade & Triantaphyllou, 1985b).

2.6.2 Sistemas enzimáticos mayormente utilizados.

Los análisis de proteína vía electroforesis con gel de polyacrilamida, proporcionan información adicional para distinguir especies de los nematodos agalladores (Hussey *et al.*,1972; Einsenback,*et al.*,1983; Esbenshade & Triantaphyllou, 1984, 1985 ,1987; Pais, 1989; Payan & Dickson, 1990; Fargette, 1990,Karsen *et al.*,1995). Esta técnica se basa en el siguiente principio: las proteínas solubles tienen la propiedad de cargarse eléctricamente cuando están en solución. Si se colocan en un campo eléctrico se desplazan hacia el ánodo o hacia el cátodo según si su carga es negativa o positiva. La velocidad de desplazamiento o velocidad de migración electroforetica depende de la carga de la proteína en medio de electroforesis, así como también de su tamaño, de su forma y de su asociación eventual con otros compuestos químicos capaces de ionizarse (Pasteur *et al.*,1987)

Los perfiles electroforeticos de varias enzimas, particularmente de las esterases (EST), malato deshidrogenasa (MDH) y alfa glycerofosfato deshidrogenasa(GPDH); son diferentes para cada especie (Eisenback, 1983). Los perfiles de esterases son los más útiles para la identificación de las cuatro especies más comunes de *Meloidogyne*: *M. hapla*, *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* (Esbenshade,1983; Taylor & Sasser, 1985; Esbenshade y Triantaphyllou, 1985b)

3- MATERIALES Y MÉTODOS.

El objetivo general de este trabajo fue identificar la diversidad de nematodos del género *Meloidogyne* que se encuentran parasitando las plantaciones de cafetos en la zona cafetalera de Izalco, Departamento de Sonsonate. Se caracterizaron 25 cepas de *Meloidogyne* originarias de diferentes fincas de dicha zona ubicadas en los tres estratos altitudinales (cf. Tabla 4. Fig. 2).

Las actividades se llevaron a cabo en el invernadero y laboratorio de Nematología de la Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (PROCAFE), de julio del 2000 a abril del 2001, el cual comprendió las siguientes fases:

3. 1 Fase de campo

3.1.1 Recolección de muestras.

Se visitaron 25 fincas de la zona cafetalera de Izalco, localizadas entre los 400-1200 m.s.n.m. En cada finca se recolectaron raíces de cafetos adultos que presentaban síntomas de ataques por nematodos del género *Meloidogyne* (presencia de agallas) las cuales se tomaron de la banda de fertilización previo a la limpia de la hojarasca a 30 cm de distancia de la base del tallo y a 20 cm de profundidad; posteriormente se colocaron en bolsas plásticas limpias identificándolas con el nombre de la finca también se colectaron en viveros. Estas muestras fueron transportadas al laboratorio.

3. 1. 2 Establecimiento y mantenimiento de crías.

Se estableció una colección de 25 cepas en el invernadero; donde una cepa o población consistió en una muestra de nematodos colectados en un lugar específico y de una planta específica (café). De las raíces se aislaron 5 masas de huevos y posteriormente se

inocularon en plantas de café (*Coffea arabica*) y sultana (*Impatiens spp.*) tal como ,se ha realizado en otros países (Suárez,1996).

Para cada cepa se estableció una ficha donde se llevo un registro; así como de las diferentes actividades que se realizaron sobre ellas (Anexo 1, 2 y 3).

Cuadro 4. Lista de fincas donde se colectaron las cepas de *Meloidogyne* estudiadas en diferentes estratos altitudinales.

No de muestra	Nombre de la finca	Ubicación Cantón	Altura m.s.n.m	Variedad de cafeto
1	San Miguelito	Teshcal	450	Pacas
2	El Ángel	Huiscoyolate	550	Pacas
3	La Estrella	Cruz Grande	600	Pacas
4	Santa Rita	Cruz Grande	620	Pacas
5	Las Palmeras	Cruz Grande	550	Pacas
6	Samaria	Cruz Grande	600	Pacas
7	Las Lajas	Las Lajas	1000	Bourbon-Pacas
8	El Carrizal	Tunalmiles	940	Bourbon-Pacas
9	Laurelar	Tunalmiles	820	Bourbon-Pacas
10	El Carmen	Talcomunca	840	Bourbon-Pacas
11	Grano de Oro	Talcomunca	850	Bourbon-Pacas
12	El Gran Chaparral	Tunalmiles	1000	Bourbon-Pacas
13	Santa Elisa	Talcomunca	540	Pacas
14	San Luis	Cruz Grande	770	Pacas
15	San José	Teshcal	640	Pacas
16	La Esperanza	Teshcal	700	Pacas
17	El Carmen	Cruz Grande	750	Pacas
18	Santa Rosa	Cruz Grande	800	Pacas
19	Las Mercedes	Huiscoyolate	430	Pacas
20	Las Merceditas	Huiscoyolate	430	Pacas
21	Las Mercedes	Tunalmiles	520	Pacas
22	Nuevos Horizontes	Cruz Grande	1100	Bourbon
23	San Roberto	Cruz Grande	640	Pacas
24	La Gloria	Cruz Grande	550	Pacas
25	San Nicolás	San Isidro	1030	Bourbon

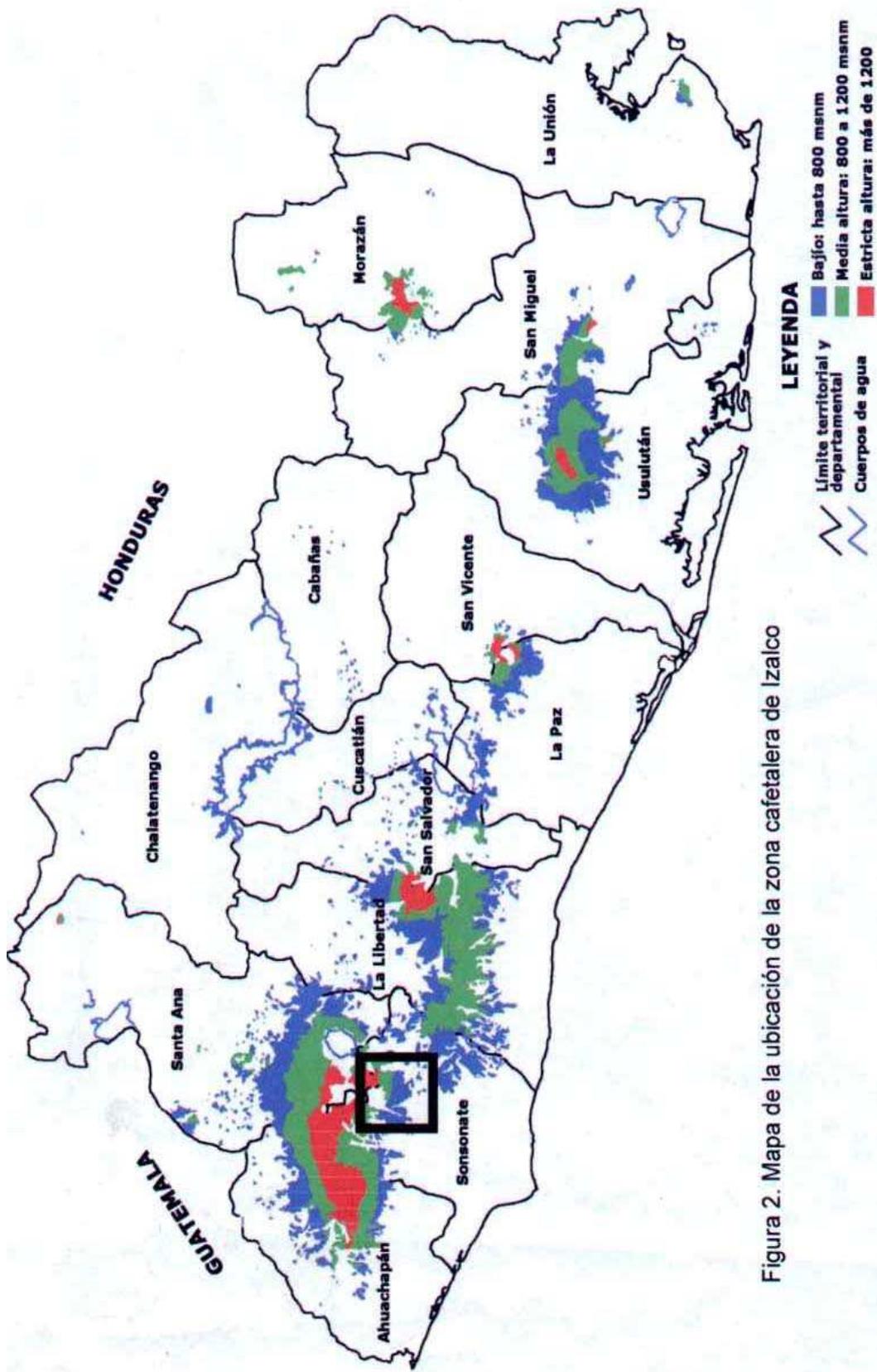


Figura 2. Mapa de la ubicación de la zona cafetalera de Izalco

3. 2 Fase de laboratorio.

3. 2. 1 Caracterización Bioquímica de cepas y Reactivos utilizados.

(La lista de Reactivos y equipo utilizado se presentan en anexos)

3. 2. 2 Análisis enzimático.

Para el análisis enzimático se trabajó con las metodologías propuestas por Esbenshade & Triantaphyllou, (1985b); y Fargette, (1987) que consiste en la identificación de especies de *Meloidogyne* estudiando fenotipos enzimáticos a través de la técnica de electroforesis. En este caso se utilizó el estudio de fenotipos de las enzimas esterasas (isoesterasas).

3. 2. 3 Preparación de extractos proteicos.

Para la preparación de extractos proteicos se extrajeron de cada una de las cepas ya establecidas, 20 hembras jóvenes, que estaban comenzando a poner huevos. Cada hembra se colocó en un tubo hematocrito de 1 mm de diámetro que contenía 10 µl de solución de extracción con ph 8 (Anexo 4) posteriormente fue macerada e inmediatamente el extracto se guardó en el congelador 8°C en vial es identificados con el nombre de la finca correspondiente hasta el momento de ser utilizados.

3. 2. 4 Preparación de geles.

Sé preparon geles de 0.75 mm de espesor de bis-acrylamida en placas de vidrio de 10 x 8 cm. Primeramente se depositó una solución al 7% de concentración de acrylamida con ph 8.4 (gel de concentración) (Anexo 4) y se dejó reposar por una hora para que se polemizara. Una hora después se agregó una solución al 4% de acrylamida y ph de 6.7(stoking gel) (Anexo 4) posteriormente se colocó un peine que delimita los pocillos

donde se colocan las muestras. Una vez preparados los geles se guardaron en el refrigerador hasta el momento de ser utilizados (\pm tres horas).

3. 2. 5 Desarrollo de electroforesis.

Las muestras se sacaron del congelador y fueron centrifugadas en una microcentrifuga a 9000 r.p.m. por 10 minutos, y luego con la ayuda de una microjeringa se depositaron en las placas que contenían los geles, a razón de una muestra por pocito. Como testigo se utilizaron muestras provenientes de la finca Santa Marta, ubicada en el cantón los Naranjos en el municipio de Juayúa, a 1450 m.s.n.m. las cuales han sido estudiadas por patrones perineales, e identificadas como *Meloidogyne hapla* la cual presenta una banda esterasica.

Posteriormente las placas se colocaron en una cubeta conteniendo solución tampón (Anexo 4) a la cual se le agrego unas gotas de solución de bromofenol blue al 0.05% como marcador. Inmediatamente la cubeta se cubrió con la tapadera que contiene los electrodos y fue colocada dentro del refrigerador a 8°C conectándose luego al generador de corriente. En un primer tiempo se le aplico una intensidad de corriente eléctrica de 60 voltios durante 25 minutos, transcurrido ese tiempo se le aplicó otra intensidad de 160 voltios durante una hora.

3. 2. 6 Revelado

Una vez transcurrido el tiempo de electroforesis, los geles fueron separados de las placas y se sumergieron en una solución reveladora de enzimas esterasas (Anexo 4) posteriormente se colocaron en cuarto oscuro a \pm 35°C por 20 minutos para que se completara la reacción de revelado. Transcurridos los 20 minutos los geles se sacaron del

cuarto oscuro y se lavaron con agua corriente. Después de lavados se sumergieron en una solución de ácido acético al 10% (Anexo 4) para su conservación e interpretación.

3. 2. 7 Interpretación.

Sobre los geles se observó la presencia ó ausencia de bandas de esterases presentes de cada muestra. A cada banda se le midió el porcentaje de migración con respecto al marcador (azul de bromofenol al 5%). El número de bandas asociadas a una cepa específica se le llamó fenotipo. Para la denominación de las velocidades de migración de las bandas se utilizó la terminología propuesta por Esbenschade & Triantaphyllou (1985b).

3. 2. 8 Clonación

Las cepas que presentaron diferentes fenotipos fueron clonadas, con la finalidad de obtener poblaciones puras, para lo cual, se aislaron hembras con su respectiva masa de huevos.

Las hembras fueron analizadas individualmente por electroforesis y su masa de huevos se dejó en incubación en agua para obtener los estadíos juveniles infectivos (J2); posteriormente estas fueron inoculadas en plantas de sultana y café sembradas en suelo estéril.

3. 3 Caracterización Morfológica.

3. 3. 1 Estudio de placas perineales

Las hembras de los clones o fenotipos más frecuentes fueron estudiadas por placas perineales para complementar la investigación. Las placas perineales se prepararon

utilizando la metodología propuesta por Taylor & Netscher; (1974), para identificar especies de *Meloidogyne* (fig.3).

Las hembras adultas fueron extraídas de raíces infestadas bajo un microscopio estereoscópico. Estas hembras fueron transferidas a una placa de fibra de vidrio, conteniendo unas gotas de ácido láctico al 45%. Con un bisturí se les cortó la parte posterior y se les extirpó los contenidos internos del cuerpo. Posteriormente con una pestaña flexible se removieron suavemente los tejidos y el patrón perineal fue recortado con la ayuda de un bisturí y se transfirió a un porta - objeto conteniendo glicerina. Se sellaron y fueron guardados. Se estudiaron de 5-10 patrones perineales por cada cepa.

Las características morfológicas que se estudiaron fueron: La forma del arco dorsal, la presencia ó ausencia de campos laterales, las estrías de la cutícula y la forma de la extremidad de la cola (Fig. 4), ((Eisenback, 1985; Jepson, 1987).

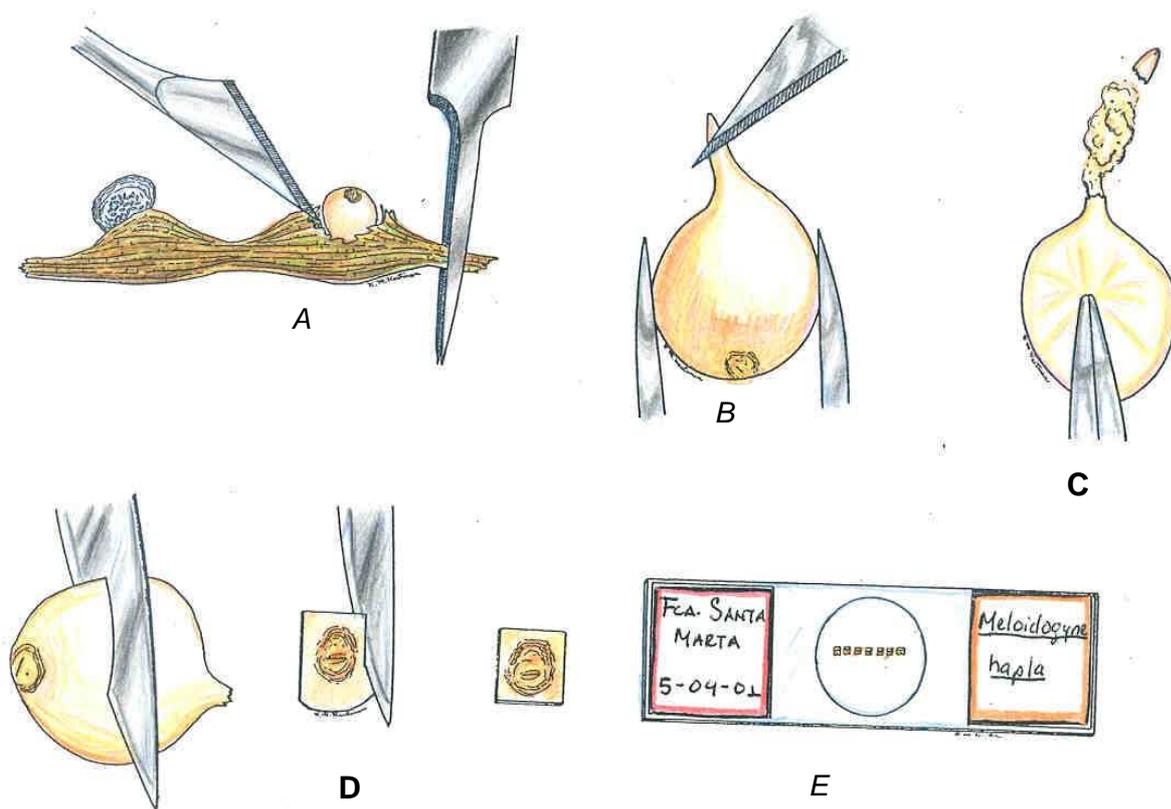


Figura 3. Esquema demostrativo de la preparación de placas perineales de hembras de *Meloidogyne* spp. para su identificación. A) Disección de raíces de café con la ayuda de pinzas y escarpelo para extraer hembras de *Meloidogyne*. B) Cortadura de la cabeza de una hembra. C) Eliminación de contenido interno de la hembra. D) Cortadura de la región perineal de las hembras. E) Montaje de las placas perineales entre lámina y laminilla.

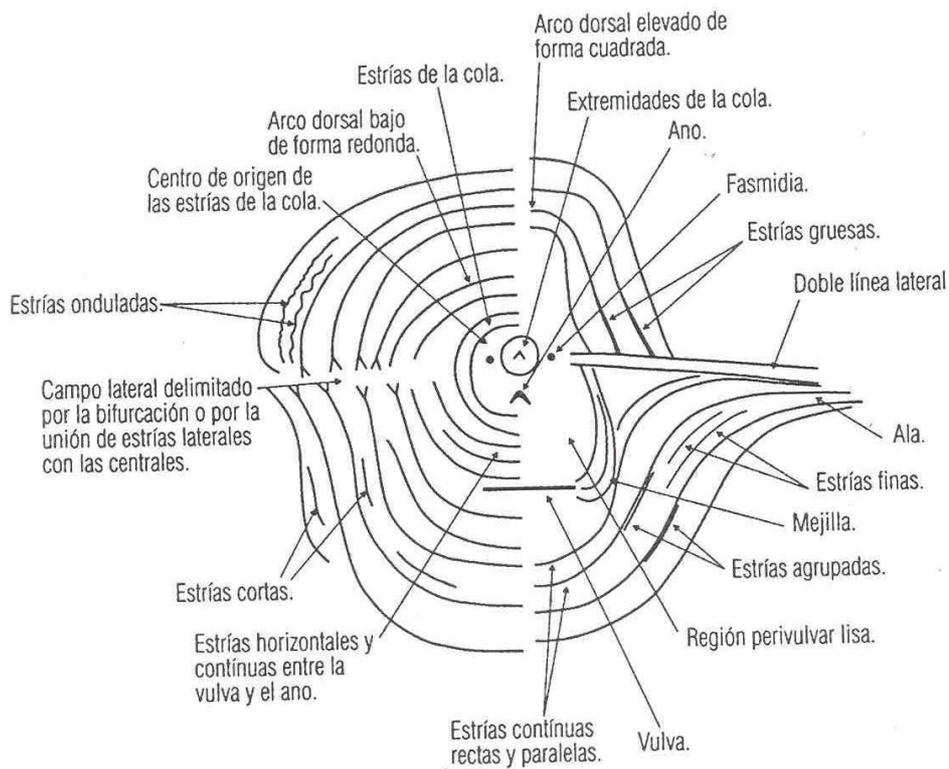


Figura 4. Estructuras morfológicas de la placa perineal de una hembra de *Meloidogyne* spp.

4 - RESULTADOS

4. 1 Caracterización Bioquímica.

Se determinaron 7 fenotipos diferentes con 8 bandas esterasicas en el estudio de 25 cepas provenientes de la zona cafetalera de Izalco departamento de Sonsonate (fig. 5). De estos, dos ya han sido reportados en la literatura y cinco han sido encontrados por primera vez.

El fenotipo M2 se encontró en la finca San Nicolás y presenta dos bandas esterasicas, la primera a 64% y la segunda a 67% de migración (fig.5).

El fenotipo S1M2 se encontró en las fincas Grano de Oro y Gran Chaparral y le corresponden 3 bandas esterasicas con porcentajes de migración de 56%; 60%; y 63% respectivamente (figs. 5, 6 y 7).

El fenotipo F2 se determinó en la finca San Luis, este presenta dos bandas esterasicas, la primera a 71%, y la segunda a 75% de migración (figs. 5, 6 y 7). Este fenotipo fue reportado por Hernández (1997).

El fenotipo H1 presenta una banda esterasica con 67% de migración (figs. 5, 6 y 7). Este mismo fenotipo se encontró en las fincas, Grano de Oro y San Nicolás.

El fenotipo M1 fue encontrado en la finca Las Lajas y presenta una banda esterasica con el 60% de migración (fig. 5).

El fenotipo S1F2, se encontró en las muestras colectadas en la finca las Lajas y presenta tres bandas esterasicas, la primera con 58%; la segunda a 71%; y la tercera a 75% de migración (fig. 5).

El fenotipo S1M1F2, presenta cuatro bandas esterasicas con porcentajes de migración de 56%; 60%; 71%; y 75% respectivamente (figs.5, 6 y 7). Este fenotipo fue el más frecuente y se encontró en 23 fincas, lo cual representa una frecuencia del 98% de las fincas en

estudio. Este ha sido reportado por Hernández(1997), en una cepa colectada en el municipio de Izalco.

4. 2 Caracterización morfológica.

Las observaciones realizadas sobre las placas perineales confirmaron que existe una gran variabilidad de un individuo a otro y por lo tanto es difícil en muchos casos hacer un buen diagnóstico utilizando este único criterio. Según este estudio se determinaron los siguientes tipos de placas perineales:

Tipo *M. hapla*; este tipo se observó en las cepas de las fincas, Grano de Oro y San Nicolás, que presentan el fenotipo esterasico H1. Esta placa es de forma redonda con estrías finas, lisas y cerradas. Posee un arco dorsal plano y los campos laterales bien definidos, la característica principal que identifica a esta especie es la presencia de puntos sub - cuticulares en la región de la extremidad de la cola (fig. 8).

Tipo *M. arenaria*; este tipo de placa fue observada en cepas originarias de las fincas San Luis, Gran Chaparral y Grano de Oro que presentaban los fenotipos esterasicos F2 y S1M2, respectivamente. Se caracteriza porque presenta un arco dorsal bajo, inflado cerca de los campos laterales. Presenta también una línea lateral que se define por la bifurcación de las estrías dorsales y ventrales que se unen formando un ángulo. La región perivulvar de esta placa es lisa. (fig. 8)

Tipo *M. incognita*; Este tipo de placa fue él más frecuente. y todas las cepas que presentaban los fenotipos M1, S1F2 y S1M1F2. Tenían un arco dorsal elevado y de forma cuadrada muy característico, las estrías eran lisas u onduladas. (fig. 8)

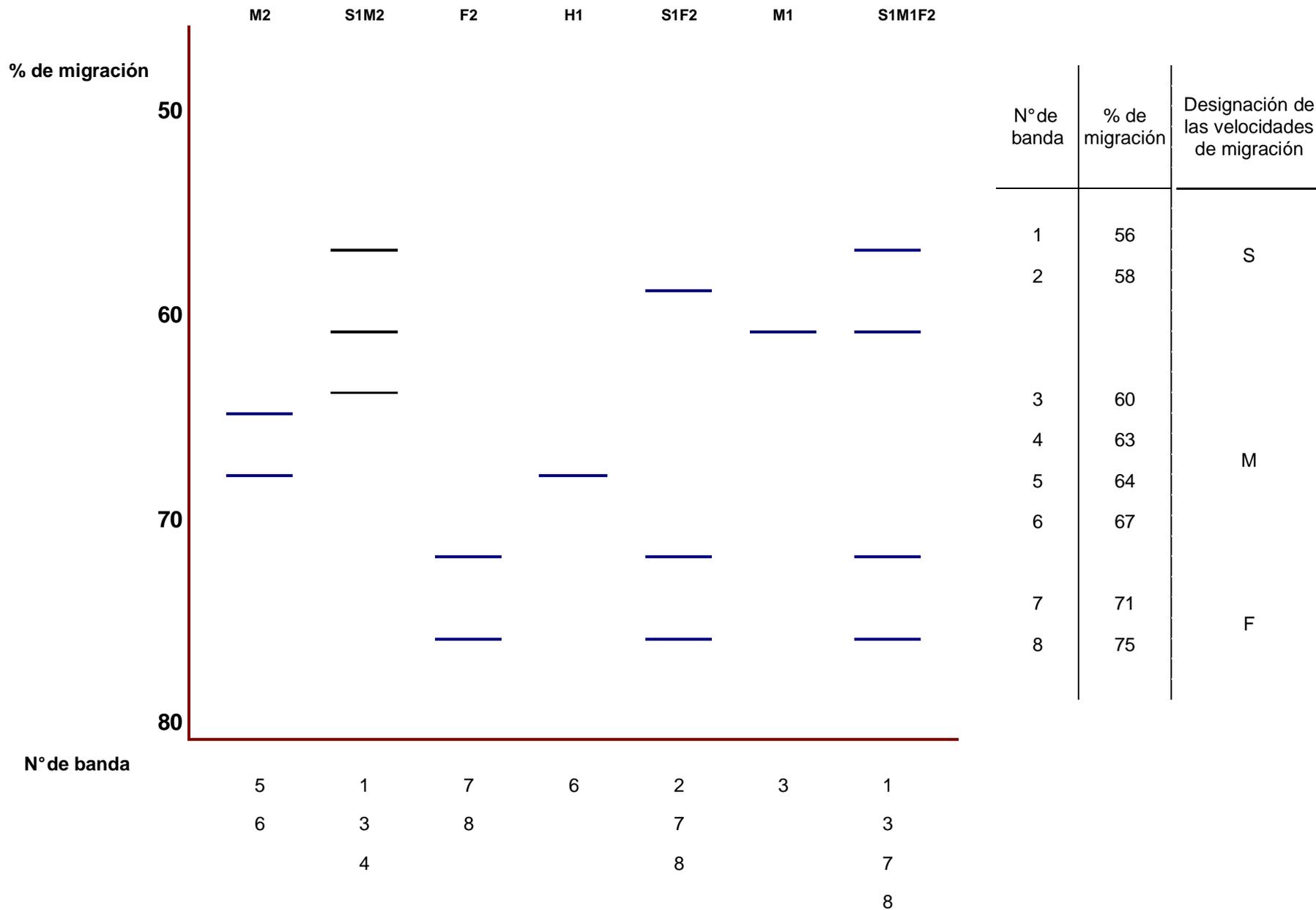


Fig. 5: Fenotipos esterásicos encontrados en 25 fincas de la zona cafetalera de Izalco. Las designaciones de las velocidades de migración fueron tomadas de acuerdo a Esbenschade & Triantaphyllou, 1985. (S: lento; M: medio; F: rápido). M2 = *Meloidogyne Sp2*, S1M2 = *M. arenaria*, F2 = *M. arenaria*, H1 = *M. hapla*, S1F2 = *Meloidogyne Sp3*, M1 = *Meloidogyne Sp1*, S1M1F2 = *Meloidogyne Sp4*,

FENOTIPOS S2F2 S2M1 M2 S2F2 F2 S2F2 H1 S2F2 H1

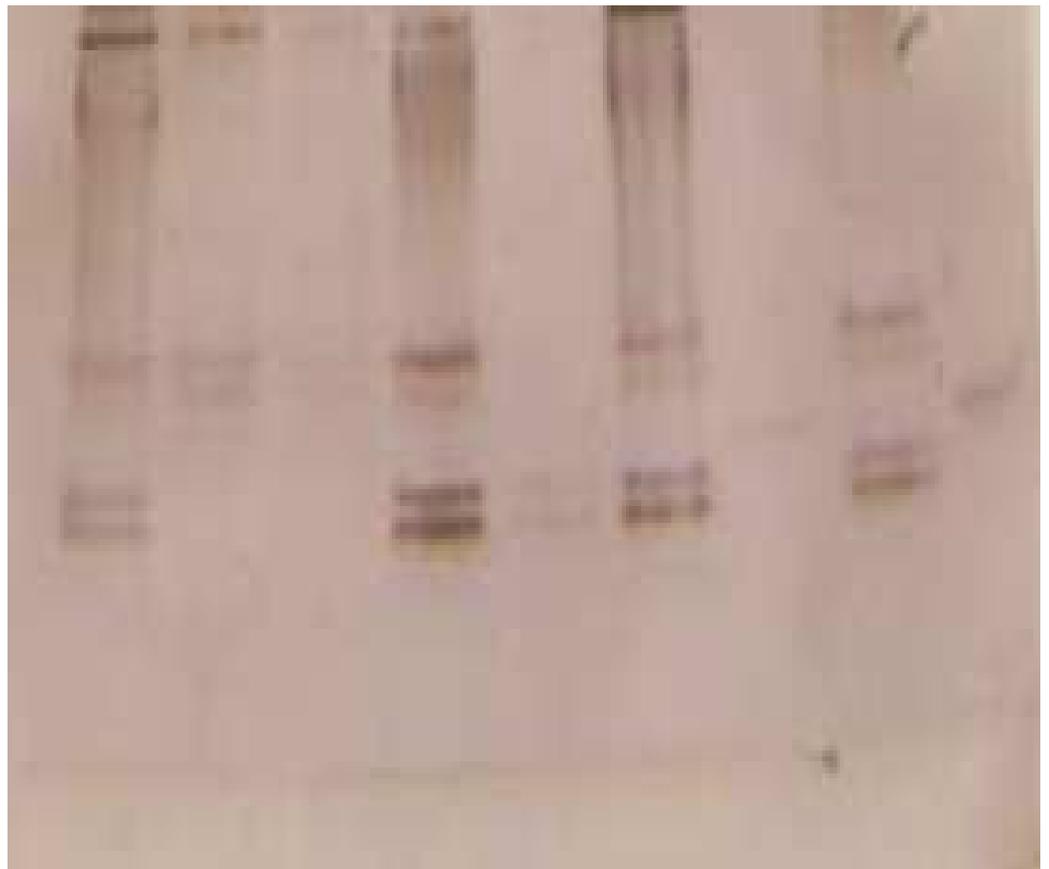


Figura 6. Gel de acrylamida mostrando 4 fenotipo encontrados.
S1M1F2 = *Meloidogyne* sp4, S1M2 = *M. arenaria*, F2 = *M. arenaria*,
H1 = *M. hapla*.

Fenotipos: H1 S1M1F2 H1 S1M1F2 F2 S1M1F2 S1M2 S1M2 S1M1F2



Figura 7. Gel de acrylamida mostrando 4 de los fenotipos esterasicos encontrados. H1= *M. hapla*. S1M1F2 = *Meloidoavne sp4*. F2 = *M. arenaria*.

4. 3 Diagnóstico.

El cuadro 5, presenta los resultados del diagnostico, utilizando los dos criterios estudiados la caracterización morfológica y bioquímica.

La especie *M. hapla*, fue identificada correctamente por medio de los dos criterios.

La especie *M. arenaria*, fue identificada por medio de los dos criterios, pero mayoritariamente por el tipo de placa perineal que presentaban las cepas. Ya que los fenotipos esterasicos que se observaron no han sido reportados anteriormente en la literatura.

Las especies *Meloidogyne Sp1*, *Meloidogyne Sp2*, *Meloidogyne Sp3* y *Meloidogyne Sp4*, fueron identificadas de esta manera por el número de bandas esterasicas que presentaban; ya que todos excepto *Meloidogyne Sp2*, mostraron una placa perineal del tipo *M. incógnita*.

4. 4 Frecuencia de especies y distribución geográfica.

La especie que más se presentó en este estudio fue *Meloidogyne Sp4*, con el 98% de frecuencia en las muestras colectadas. En la mayoría de las cepas, esta especie se encontró sola, y únicamente en dos fincas fue encontrada mezclada con *M. arenaria*, y también una vez con *Meloidogyne Sp1* y *Meloidogyne Sp3* . Esta frecuencia comprende fincas ubicadas en los estratos altitudinales de bajío y media altura, que oscilan entre 450 hasta 1100 m. s. n. m (Cuadro 5)

Las especies *Meloidogyne Sp1* y *Meloidogyne Sp3* se encontraron en las cepas colectadas en la finca Las Lajas, ubicadas a una altura de 1000 m. s. n. m. (media altura), (Cuadro 5).

La especie *Meloidogyne Sp2* fue colectada en la finca San Nicolás y por el momento no puede ser asociada a ninguna especie, presenta una placa perineal amorfa(Cuadro 5)

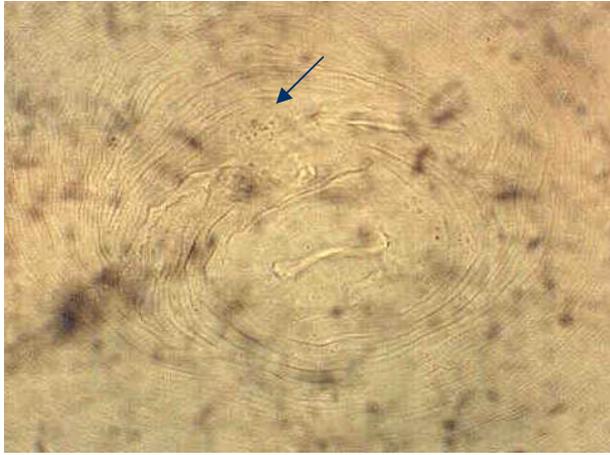
La especie *M. arenaria* fue encontrada en tres fincas grano de Oro, El Gran Chaparral y San Luis, ubicadas entre los 770 a 1000 m. s. n. m, (Cuadro 5) mezcladas con *Meloidogyne sp4* y *M. hapla*.

La especie *M. hapla* fue encontrada en dos fincas Grano de Oro y San Nicolás, ubicadas en media altura (850 a 1030 m. s. n. m.), (Cuadro 5).

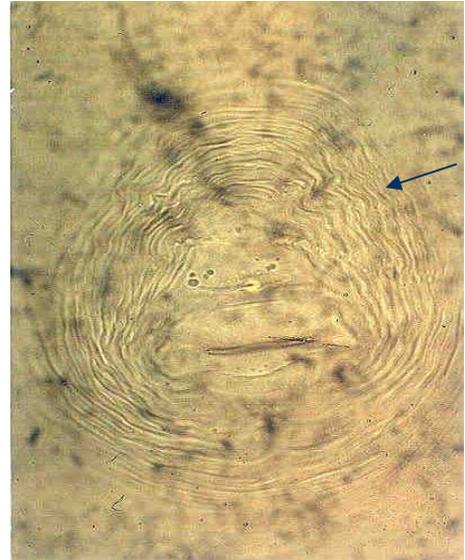
Cuadro 5. Cuadro resumen de fenotipos encontrados en 25 fincas cafetaleras de la zona de Izalco.

Nombre de la finca	Ubicación (cantón)	m.s.n.m	Fenotipos	Placa perineal	Especie asociada
San Miguelito	Teshcal	450	S1M1F2	<i>M. incógnita</i>	<i>Meloidogyne sp.4</i>
El Angel	Huiscoyolate	550	S1M1F2	<i>M. incógnita</i>	<i>Meloidogyne sp.4</i>
La Estrella	Cruz Grande	600	S1M1F2	<i>M. incógnita</i>	<i>Meloidogyne sp.4</i>
Santa Rita	Cruz Grande	620	S1M1F2	<i>M. incógnita</i>	<i>Meloidogyne sp.4</i>
Las Palmeras	Cruz Grande	550	S1M1F2	<i>M. incógnita</i>	<i>Meloidogyne sp.4</i>
Samaria	Cruz Grande	600	S1M1F2	<i>M. incógnita</i>	<i>Meloidogyne sp.4</i>
Las Lajas	Las Lajas	1000	S1M1F2, M1, S1F2	<i>M. incógnita</i>	<i>Meloidogyne sp4</i> , <i>Meloidogyne sp3</i> , <i>Meloidogyne sp1</i>
El Carrizal	Tunalmiles	940	S1M1F2	<i>M. incógnita</i>	<i>Meloidogyne sp.4</i>
Laurelar	Tunalmiles	820	S1M1F2	<i>M. incógnita</i>	<i>Meloidogyne sp.4</i>
El Carmen	Talcomunca	840	S1M1F2	<i>M. incógnita</i>	<i>Meloidogyne sp.4</i>
Grano de Oro	Talcomunca	850	H1 S1M2	<i>M. hapla</i> , <i>M. arenaria</i>	<i>M. hapla</i> <i>M. arenaria</i>
El Gran Chaparral	Tunalmiles	1000	S1M2 S1M1F2	<i>M. arenaria</i> , <i>M. incógnita</i>	<i>M. arenaria</i> , <i>Meloidogyne sp.4</i>
Santa Elisa	Talcomunca	540	S1M1F2	<i>M. incógnita</i>	<i>M. incógnita</i>
San Luis	Cruz Grande	770	F2 S1M1F2	<i>M. arenaria</i> , <i>M. Incógnita</i>	<i>M. arenaria</i> , <i>Meloidogyne sp.4</i>
San José	Teshcal	640	S1M1F2	<i>M. incógnita</i>	<i>Meloidogyne sp.4</i>
La Esperanza	Teshcal	700	S1M1F2	<i>M. incógnita</i>	<i>Meloidogyne sp.4</i>
El Carmen	Cruz Grande	750	S1M1F2	<i>M. incógnita</i>	<i>Meloidogyne sp.4</i>
Santa Rosa	Cruz Grande	800	S1M1F2	<i>M. incógnita</i>	<i>Meloidogyne sp.4</i>
Las Mercedes	Huiscoyolate	430	S1M1F2	<i>M. incógnita</i>	<i>Meloidogyne sp.4</i>
Las Merceditas	Huiscoyolate	430	S1M1F2	<i>M. incógnita</i>	<i>Meloidogyne sp.4</i>
Las Mercedes	Tunalmiles	520	S1M1F2	<i>M. incógnita</i>	<i>Meloidogyne sp.4</i>
Nuevos Horizontes	Cruz Grande	1100	S1M1F2	<i>M. incógnita</i>	<i>Meloidogyne sp.4</i>
San Roberto	Cruz Grande	640	S1M1F2	<i>M. incógnita</i>	<i>Meloidogyne sp.4</i>
La Gloria	Cruz Grande	550	S1M1F2	<i>M. incógnita</i>	<i>Meloidogyne sp.4</i>
San Nicolás	San Isidro	1030	H ₁ , M2	<i>M. hapla</i> , <i>Meloidogynesp2</i>	<i>M. hapla</i> , <i>Meloidogyne sp2*</i>

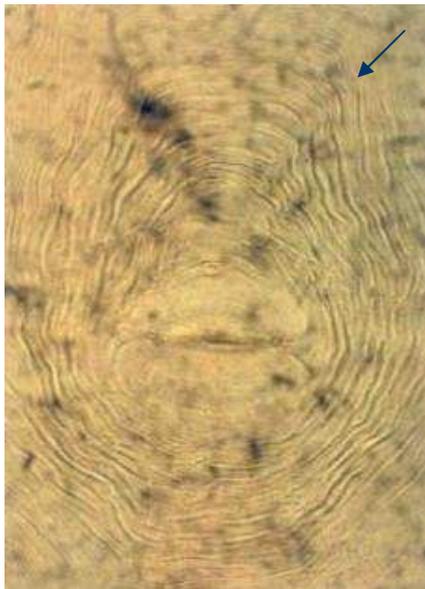
*No se puede aproximar a ninguna especie por el momento.



Placa perineal tipo *M. hapla*



Placa perineal tipo *M. arenaria*



Placa perineal tipo *M. incognita*



Placa perineal tipo *M. incognita*

Figura 8. Patrones perineales de hembras de *Meloidogyne* correspondientes a los fenotipos encontrados en la zona de Izalco.

5 - DISCUSIÓN

El presente trabajo confirma que el estudio de fenotipos de las enzimas estererasas es de gran utilidad para identificar especies y determinar nuevos tipos de *Meloidogyne*.

Esta misma afirmación fue establecida por trabajos que realizaron anteriormente varios autores como: Esbenshade & Triantaphyllou (1985b); Fargette (1987), y Hernández (1997).

Estos estudios también son de gran utilidad para determinar la presencia de una o más especies en una zona determinada y dentro de una cepa en particular. El fenotipo "S1M1F2" es el que se encontró con mayor frecuencia, lo cual indica que la especie asociada a este fenotipo es la que prevalece en la zona cafetalera de Izalco atacando cafetos. Los otros fenotipos fueron encontrados en pocos sitios y en mezclas.

Por otra parte, la variabilidad observada de las placas perineales confirma lo que mencionan algunos autores con respecto a que este solo criterio no es de gran utilidad para realizar diagnósticos precisos. Las únicas especies que se pueden identificar con este único criterio son: *M. camilliae*, *M. brevicauda*, *M. artillia*, *M. hapla* y *M. exigua*. Estas especies poseen una placa perineal bien definida, sin variaciones y es fácilmente reconocida (Jepson, 1987). En este trabajo, la única especie que se pudo identificar con este único criterio, fue *M. hapla*, las otras especies no es posible identificarlas.

Lo anterior demuestra que para realizar diagnósticos más precisos es mejor combinar dos ó más criterios, pero en todo caso lo mejor es el estudio de las enzimas estererasas.

La determinación de 6 especies tipo de *Meloidogyne*, indica que existe una gran diversidad de especies atacando las plantaciones de café de la zona de Izalco, sin embargo el hecho de que tres diferentes fenotipos presenten el mismo tipo de placas

perineales, indica que se podría tratar de una misma especie, es decir podría existir una variación intraespecífica que podría estar asociada a la patogenicidad de la misma.

Si este fuera el caso tendríamos únicamente tres especies donde la predominante sería la que tiene un tipo de placa perineal de *M. incognita*. En todo caso sería muy importante realizar estudios más detallados para determinar si estos tres fenotipos son una variación de la misma especie. El mismo caso se observó en las cepas identificadas como *M. Arenaria*. Los fenotipos observados no han sido reportados en la literatura. Un estudio importante es el estudio de varios sistemas enzimáticos en conjunto. Esbenschade & Triantaphyllou(1985b), caracterizaron 291 cepas originarias de 65 países por medio de cuatro sistemas enzimáticos(Esterasas, MDH, GOT, y SOD). También Hernández(1997), caracterizó 39 cepas originarias de todos los países de Centro América con los mismos sistemas enzimáticos.

La patogenicidad de las cepas no fue estudiada, sin embargo todas se multiplicaron bien sobre plantas de café, eso indica que todas son capaces de ocasionar daños económicos sobre plantaciones de cafetos. La estimación exacta de las pérdidas que causan los nematodos en Izalco no ha sido calculada por lo tanto sería importante cuantificarla para poder demostrar a los caficultores la importancia de llevar a cabo las medidas pertinentes para que los combatan en forma adecuada.

En cuanto a la distribución geográfica de las especies los resultados difieren con respecto a los que presentaban Abrego & Holdeman (1961), quienes afirmaban que el nematodo agallador más frecuente en cafetales de El Salvador era la especie *M. javanica*. Esta especie no fue determinada en este estudio. Por otra parte los resultados concuerdan con los resultados de Hernández (1997) quien determinó la presencia de *Meloidogyne* spp de cuatro bandas esterasicas en la zona cafetalera de Izalco.

Este mismo autor demostró la patogenicidad de esta especie que fue muy agresiva cuando se inoculó sobre plantas de *C. arabica* var. Catuai y ET-15 (var. Silvestre originaria de Etiopía).

La especie *M. hapla* fue la primera en ser reportada parasitando cafetos en El Salvador y posiblemente también sea el primer reporte que se tiene sobre la presencia de esta especie en Centro América. Campos *et al.*(1990), mencionan que *M. hapla* ataca cafetos en Brasil, algunos países de África y la India. Está reconocido que esta especie se encuentra con más frecuencia en zonas frías, y para el caso en este estudio fue encontrada en fincas ubicadas entre los 850 a 1030 m.s.n.m. lo cual indica, que posiblemente se encuentra en zonas más altas y que ahí sea la predominante. Para corroborarlo habría que realizar muestreos y a la vez estudiar su patogenicidad sobre cafetos.

La especie *M. arenaria*, ya había sido reportada por Hernández(1997), atacando cafetos en la zona oriental, de El Salvador pero con otro fenotipo esterasico. El haberla encontrado en Izalco, indica que esta especie podría estar presente en todo el país ya que se conoce que es muy polífaga.

El hecho que la especie *Meloidogyne* Sp4 sea la que predomina más, indica que posiblemente se deba a que es una especie bastante agresiva y que es capaz de desplazar a las otras especies, ya sea por la capacidad de reproducción sobre los cafetos ó porque tiene una gama de hospederos bastante amplia. La presencia de una sola especie en una zona, es una ventaja para implementar programas de manejo integrado, especialmente el uso de variedades resistentes(control genético). En este caso la selección varietal va orientada hacia esa especie. Caso contrario cuando hay más de una especie, la solución debe hacerse para encontrar variedades resistentes a varias especies

a la vez. Los resultados de este estudio demuestran que el mejoramiento varietal tendría que orientarse hacia dos especies: *Meloidogyne Sp4* y *M. hapla*, esto por el hecho que se encuentran diseminadas en diferentes zonas altitudinales. Sin embargo, antes de realizar esos estudios deberían realizarse caracterizaciones biológicas para estudiar su verdadera patogenicidad (capacidad de hacer daño).

6 - CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir:

- El estudio de fenotipos enzimáticos de esterasas es de gran utilidad para identificar especies ya existentes y determinar nuevos tipos de *Meloidogyne*
- Se determinaron 7 fenotipos diferentes con 8 bandas esterasicas .
- El Fenotipo más frecuente fue S1M1F2, que presentó 4 bandas esterasicas y sé encontró en el 98% de las fincas en estudio.
- Con la combinación de estudios bioquímicos y morfológicos se pudieron determinar 6 especies tipos:
 - *Meloidogyne* Sp1
 - *Meloidogyne* Sp2
 - *Meloidogyne* Sp3
 - *Meloidogyne* Sp4
 - *M. hapla*
 - *M. arenaria*
- *Meloidogyne* Sp1, *Meloidogyne* Sp3 y *Meloidogyne* Sp4 presentaron una placa perineal de tipo *M. incognita*. Lo cual indica que esta especie es la predominante en Izalco.
- *Meloidogyne* Sp2, no se puede asociar por el momento a ninguna especie.
- Sé confirmó la presencia de *M. arenaria* como parasito del cultivo de cafetos en El Salvador.
- Se reporta por primera vez la presencia de *M. hapla* parasitando cafetos en El Salvador.

7 – RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos y a las conclusiones de este trabajo se puede recomendar:

- Se deben de realizar otros estudios para identificar de forma precisa las cepas que presentaron los fenotipos: M1, S1F2 y S2M1F2. Estas cepas se asociaron a placas perineales de tipo *M. incognita*.

Los estudios que se podrían realizar son:

- 1- Caracterización bioquímica con otros sistemas enzimáticos como: MDH, SOD, GOT.
 - 2- Caracterización molecular por medio del ADN.
- Se deben realizar estudios de caracterización biológica de las cepas que presentaron cuatro bandas (fenotipo S1M1F2), con el objetivo de determinar la magnitud de las pérdidas económicas que causan en Izalco en estudios secuenciales.
 - De la misma forma se recomienda realizar un estudio de revisión de literatura y caracterización biológica de la especie *M. hapla* con el fin de establecer su estatus como parásito del cultivo de cafetos.
 - Estudios de investigación a nivel de vivero para determinar tipo de daño, etc.

BIBLIOGRAFÍA

Abrego, L. 1975. Contribuciones a la investigación nematológica en el cultivo del cafeto Boletín informativo N° 125 Instituto Salvadoreño de Investigaciones del Café Nueva San Salvador, El Salvador pp. 1 - 15.

_____, Holdeman, Q. L. 1961. Informe de progresos en el estudio del problema de los nematodos del café en El Salvador. Instituto Salvadoreño de Investigaciones del Café. N° 8. 16p.

Anzueto, F; Eskes, A B; Sarah, J L; Decazy, B. 1991. Recherche de la resistance a *Meloidogyne* spp. dans une collection de *Coffea arabica* in Colloque scientifique international sur le café (14. 1991, San Francisco, California. Estados Unidos) [Informe] San Francisco, California Estados Unidos, ASIC. pp. 534 - 543.

_____. 1993 etude de resistance du cafeiero (*Coffea* spp.) a *Meloidogyne* spp. et *Pratylenchus* spp. Doctórate Thesis, Ecole Nationale Supérieure Agronomique Rennes, 17th March 1993 123 pp.

_____. Villain, L; Marban, N; Bertrand, B; Dufour, M. 1995. "NEMAYA" nueva variedad portainjerto resistente a los principales nematodos de Centro América. Proyecto regional de resistencia a los nematodos del café de Centro América. PROMECAFE-IICA/CIRAD (FRANCIA). Documento de trabajo. 6p.

Araya, M. 1994. Importancia económica de los nematodos. Noticiero del café, Instituto del café de Costa Rica. 9 (84) : 2 - 6.

Bertrand, B; Peña, M X; Anzueto, F; Cilas, C; Etienne, H; Anthony, F; Eskes, A B. 1999. Genetic study of *Coffea canephora* coffee tree resistance to *Meloidogyne incognita* nematodes in Guatemala and *Meloidogyne* spp. nematodes in El Salvador for selection of root stock varieties in Central América. Euphytia. 00:1-8

Campos, V P; Sivapalan, P; Gnanapragasam, N C. 1990. nématodes parasites of coffee, cocoa and tea. In: M. Luc, R A Sikora, J. Bridge, eds. Plant parasitic nématodes in subtropical and tropical agriculture Wallingfor, United Kingdom, C. A. B. International p. 387 - 430.

Carneiro, R M D G; Carneiro, R G; Abrantes, I M O; Santos, M S N A; Aimeida, M R A.1996a *Meloidogyne paranaensis* spp.n.(Nematoda:Meloidoginydae) a root- knot nematode parasitizing coffee in Brasil. Journal of Nematology 28 (2):177 - 189.

_____. Almeida, A.R.A; Carneiro, R G.1996b.Enzyme phenotypes of Brazilian populations of *Meloidogyne* spp. Fundamental and Applied Nematology.19 (6) 555 - 560.

Chitwood, B G; Berger, C A. 1960. Preliminary report on nemic parasites of coffee in Guatemala, with suggest and interim control measures. Plant disease reporter 44 : 841 - 847.

Christie, J R. 1959. Plant nematodes their bionomics and control. University of Florida Gainesville Florida. pp 56-77.

Curi, S M; Lordello, L G E; De Bona,A; Cintra, A F.1969.Levantamento de nematoide do cafeeiro, *Meloidogyne coffeicola*, no estado de Sao Paulo. O. Biológico (2) 35 : 41 - 43.

Dalmasso, A; Berge, J.B.1978. Molecular polymorphism and phylogenetic relationships in some *Meloidogyne* spp. Journal of nematology vol. 10 (4): 323 - 331.

Davis, B. J. 1964.Disc electrophoresis.II.Method and applicati3n to human serum proteins.Ann. N.Y. Acad. Sci. 121:404-427.

De Guiran,G ; Netscher, C.1970.Les nematodes du genere *Meloidogyne* parasites de cultures tropicales. CAH Orstom, Sér, Biol, (11): 151 - 185.

_____, G; Netscher, C; Ritter, M. 1979. Life cycle of *Meloidogyne* species and factors influencing their development in. Lambert, F.; Taylor, C. E. (EDS) root - knot nematodes (*Meloidogyne* species) Sistematics, boilogy and control. Acad. Press. London p. 173 - 191.

Dickson, D W; Sasser, J N; Huisingh, D. 1970. Comparative dis - electrophoretiic proteín analyses of selected *Meloidogyne*, *Dytilenchus*, *Heterodera* and *Aphelenchus* spp. Journal of Nematology vol. 2 (4):286 - 292

_____.1971. Dehidrogenases, acid and alkaline phosphatases, and esterases for chemotaxonomy of selected *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Heterodera* and *Aphelenchus* spp. Journal of nematology vol. (3): 1 - 15.

Domínguez, J. A. ; Marban, N. ; De La Cruz, R. 1990 Leguminosas de cobertura asociadas con tomate var. "dina guayabo" y su efecto sobre *Meloidogyne arabicida* López y Salazar. Turrialba 40 (2) : 217 - 221.

Eisenback, J. D. ; Hirschmann, H; Sasser, J N; Triantaphyllou, A C.1983. Guía para la identificación de las cuatro especies más comunes del nematodoagallador (*Meloidogyne* especies) con una clave pictórica trad. por Carlos Sosa Moss Raleigh, North Carolina p. 1 - 48

_____.Bernard, E. C.; Schmitt, D P. 1994. Description of the kona coffee root - knot nematode *Meloidogyne konaensis* spp. n. Journal of Nematology 26 (4):363 -374.

Esbenshade, P. R.; Triantaphyllou, A C. 1985a. Electrophoretic methods for the study of root - knot nematode enzymes North Carolina state University Graphics Raleigh, North Carolina USA p. 115 - 123.

_____.1985b. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. Journal of Nematology vol. 17: 6 - 20.

_____,A. C. 1987. Enzymatic relationships and evolution in the genus *Meloidogyne* (Nematoda: *Tylenchida*) Journal of Nematology vol. 19: 8 - 18.

Fargette, M. 1987. Use of the esterase phenotypes in the taxonomy of the genus *Meloidogyne*. Instability of the esterase phenotype. Revue Nematologie. 10 (1): 39 - 43.

_____.Braaskma, R. 1990. Use of the esterase phenotype in the taxonomy of the genus *Meloidogyne* 3 A Study of some "B" race lines and their taxonomic position Revue nematol. 13 (4):375 -386.

Figueroa, A. M. 1989. Reconocimiento y análisis del problema de los nematodos en viveros de café (*Coffea arabica*) en Costa Rica. Nematotropica Estados Unidos 19(1):5

Goeldi, E. A. 1887. Relatorio sobre a molestia do cafeeiro na provincia do Rio de Janeiro; apparently advance separate of: archos. Mus. Nac. Rio de Janeiro, Brasil. 8:7-21.

Hartman, K. M.; Sasser, J N. 1985a. Identificación of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology An advanced treatise on *Meloidogyne* vol. II North Carolina State University Graphics. p. 69-76.

_____.1985b. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal - pattern morphology North Carolina State University Graphics Raleigh North Carolina, Estados Unidos. p. 69 -77.

Herrera, S. IC. 1997. Efecto de coberturas vivas de leguminosas en el control de nematodos fitoparásitos del café. In. Memoria XVIII Simposio Latinoamericano de Caficultura, ICAFE, IICA, Costa Rica 1997. p. 387 -391.

_____.Marban, N. 1999. Efecto de coberturas vivas de leguminosas en el control de algunos fitonematodos del café en Nicaragua. *Nematropica* 29 (2): 223 -232.

Hernandez, A; Fargette, M; Sarah, J L.; Decazy, B; Eskes, A; Molinier, V; Boisseau, M. 1995 Caracterisation biochimique, biologique et morphologique de diferentes populations de *Meloidogyne* spp parasites du café en amerique centrale. In.Resumes du 10e colloque de L'ASIC, Kyoto, Japon 9 - 14 abril, 1995.

_____.1997. Etude de la variabilité intra et interespecificque des nematodes du genre *Meloidogyne* spp parasites du Café en Amerique Centrale. These Ph.D.Université de Montpellier II. Sciences et Techniques du Languedoc. Francia.103 p.

Hussey, R. S; Krusberg, L R. 1971 Disc - electrophoretic patterns of enzymes and soluble proteins of *Dytilenchus dipsaci* and *D. triformis*. *Journal of Nematology* 3: 79 - 84.

_____. Sasser, J N; Huisingh, D. 1972. Disc - electrophoretic studies of soluble proteins and enzymes of *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. *Journal of Nematology* 4 (3) : 183 - 189.

Ibrahim, S. K.; Perry, R. N. 1993 Use of esterase patterns of females and galled roots for the identification of species of *Meloidogyne* *Fundam. Appl. Nematol.* 16 (2):187 -191.

Jaehn, A; Rebelk.E.; Lordello, LGE.1980. A origen do nematoide, *Meloidogyne coffeicola*. In Reuniao de nematologia (4.1980,Piracicaba spp., Brasil). Trabalhos apresentados. Piracicaba spp., Brasil, Sociedade Brasileira de Nematologia. p. 159-161

Janati, A.; Bergé, J B; Triantaphyllou, A C; Dalmaso, A. 1982. Nouvelles données sur l' utilisation des isoesterases pour l' identification des *Meloidogyne*. Revue Nematol. 5 :147 - 154.

Jepson,S. B. 1983. Identication of *Meloidogyne* : a general assessment and comparison of male morphology using light microscopy. Revue Nematol., 6:291-309.

_____, 1987. Identification of root - knot nematodes (*Meloidogyne* especies) CAB International United Kingdom p. 2-15,45-53.

Jobert, C. 1878. Sur une maledie du caféiero observeré au Brasil. Compestrendus de la societe de biologe, Francia 87 :941 - 943.

Karsen, G. Van-hoenselaar, T. Bakker-Verkerk, B. Janssen, R. 1995 Species identification of cyst and root-knot nématodes from potato by electrophoresis of individual females. Electrophoresis.16:105-109

Lordello, L. G. 1972 Nematodes pest of coffee. In J. M. Webster (Ed), Economic nematology, London Academic Press. p. 268 - 284.

_____. 1977. Nematoides das plantas cultivados. 4^a ed. Brasil Nobel. 197 p.

_____. 1986. Plant - parasitic nématodes that attack coffee. In. Plant parasitic nematodes of bananas, citrus, coffee, grapes and tobacco, Union Carbide Agricultural Products Company , North Carolina, U S A. p . 33 - 41.

López,R.; Salazar, L.1989. *Meloidogine.arabica*,sp.n.(Nematodada:Heteroderidae)Nativo de Costa Rica: Un nuevo y severo patógeno del cafeto.Turrialba (Costa Rica).39(3):313-323.

Marban, M N. 1994. Nematodos fitoparásitos de café en Centro América. Boletín Promecafe, IICA. Guatemala 62: 5 - 7.

Morera, G N. 1986. Evaluación de la interacción entre genotipos de *Meloidogyne exigua* goeldi, 1987 y *Coffea* spp. Tesis Mag. Sc. UCR CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Netscher, C. 1978. Morphological and physiological variability of species of *Meloidogyne* in West. Africa and implications for their control. Meded. Landb. Hogesch. Wageningen, 78:1-46

Ornstein, L. 1964. Disc electrophoresis. I. Background and theory. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121:321-349.

Pais, C S; Abrantes, I M O. 1989. Esterase and malate deshidrogenase phenotypes in portuguese populations of *Meloidogyne* species. Journal of Nematology 21 (3) : 342 - 346.

Pasteur, N; Pasteur, G; Bonhomme, F; Catalán, J; Britton - Davidian, J. 1987. Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines. Technique et Documentation, Lavoisier, París. 217 p.

Payan, L A; Dickson, D W. 1990. Comparision of populations *Pratylenchus brachyurus* based on isoenzyme phenotypes. Journal of Nematology 22 (4) : 538 - 545.

Pinochet, J; Guzmán, R. 1987. Nematodos asociados a cultivos agrícolas en El Salvador: su importancia y manejo. Turrialba (Costa Rica) 37 (2) : 137 - 146.

Robinson, M P. 1989. Isoelectric focusing techniques for the identification of plant parasitic nématodes. Electrophoretic Studies on Agricultural Pests Vol. No 39 p. 431 - 442.

Salas, L A; Echandi, E. 1961. Parasitic nématodes in coffee plantations of Costa Rica Coffee, IICA Costa Rica 3 (8) : 6 - 9.

Sasser, J N; Cáster, C C. 1985. Overview of the international *Meloidogyne* project 1975 - 1984. In. K. R. Bakker, C.C. Cáster, J. N. Sasser (eds), An advanced treatise on *Meloidogyne*, biology and control, Raleigh, North Carolina State University vol. 1. p. 19 - 24.

Schieber, E.; Sosa, O. N. 1960. nématodes on coffee in Guatemala Plant disease reporter Estados Unidos 44 : 841 - 847.

Suárez, L. M. 1996 Conservación e incremento de inóculo de *Meloidogyne* en *Impatiens* spp. CENICAFE (Colombia) 47 : 53 - 56.

Taylor, A. L. 1968. Introducción a la nematología vegetal aplicada Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación Roma. p. 131

_____. Netscher, C. 1974. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. Nematologica, 20:268-269.

_____, J. N. Sasser. 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes. (*Meloidogyne* species). North Carolina State University, Department of plant pathology, and United States, Agency for International Development. Raleigh: North Carolina State Graphics. 111p.

_____, 1983. Biología, Identificación y Control de los nematodos del nódulo de la raíz *Meloidogyne* spp. Carolina del Norte, Estados Unidos, Universidad del Estado de Carolina del Norte. 106 p.

Triantaphyllou, A. C. 1962. Oögenesis in the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. Nematologica. 7:105-113.

_____, 1963. Polyploidy and parthenogenesis in the root-knot nematode *Meloidogyne arenaria*, Journal of Morphology. 113:489-499.

_____, 1970. Cytogenetic aspects of evolution of the family Heteroderidae. Journal of Nematology, 2:26-32

_____, 1984. Polyploidy in Twenty-two points, plus triple-word-score, plus fifty points for using all my letters. Game's over. I'm outta here. meiotic parthenogenetic populations and mechanisms of conversion to diploidy. Revue Nematologie, 7(1):65-72.

Trudgill, D. L.; Carpenter, J. M. 1971 Disk electrophoresis of proteins of *Heterodera* species and pathotypes of *Heterodera rostochiensis* Annals of applied biol. 69 : 35 - 41.

Vega, M. I. 1982. Informe sobre situación nematológica en Nicaragua. In Proceedings of the third research and planning Conference on root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. Jan 11-15, Cali, Colombia, p.66-68.

Villain,L;Sarah,J.L;Decazy,A;Sierra,S.1996. Evaluation of grafting on *Coffea canephora* var. Robusta, and chemical treatment for control of *Pratylenchus* spp. In *C. arabica* cropping systems. Proceedings of Thirid International Nematology Congress.Gosier,Guadeloupe, 7-12 , 1996 julio,1996.

____.Anzueto, F.; Hernández, A.; Sarah, J. L. 1999 Los nematodos parásitos del cafeto. In. Desafíos de la caficultura en Centro América ed. por Benoit Bertrand y Bruno Rapidel San José, Costa Rica IICA. PROMECAFE: CIRAD: IRD: CCCR. FRANCIA. p. 327 - 360.

Whitehead, A. G. 1969 Nematodes attacking coffee, tea and cacao and their control in Nematodes of tropical crops ed. by J.E. Peachey England, Commonwealth Bureau of Helminthology Tech. Commun. No 40 p. 238.

ANEXOS

Anexo 1. Ubicación de fincas muestreadas en Izalco en el año 2000.

NOMBRE DE LA FINCA	CANTON	AREA (Mz)	ALTURA (msnm)	ESTADO DE LA PLANTACION	VARIEDAD DE CAFÉTO	FECHA DE MUESTREO	FECHA DE INOCULACION
San Miguelito	Teshcal	3.00	450	Adulto	Pacas	17/08/00	18/08/00
El Angel	Huiscoyolate	23.00	550	Vivero	Pacas	17/08/00	18/08/00
La Estrella	Cruz Grande	11.50	600	Adulto	Pacas	17/08/00	18/08/00
Santa Rita	Cruz Grande	125.00	620	Vivero	Pacas	17/08/00	18/08/00
Las Palmeras	Cruz Grande	13.00	550	Adulto	Pacas	17/08/00	18/08/00
Samaria	Cruz Grande	74.30	600	Adulto	Pacas	23/08/00	24/08/00
Las Lajas	Las Lajas	273.00	1000	Vivero - Adulto	Bourbón	29/08/00	29/08/00
El Carrizal	Tunalmiles	60.00	940	Vivero - Adulto	Bourbón	29/08/00	29/08/00
Laurelar	Tunalmiles	4.75	820	Adulto	Pacas	30/08/00	31/08/00
El Carmen	Talcomunca	19.00	840	Adulto	Pacas	30/08/00	31/08/00
Grano de Oro	Talcomunca	36.00	850	Adulto	Pacas	30/08/00	31/08/00
Gran Chaparral	Tunalmiles	100.00	1000	Adulto	Bourbón	30/08/00	31/08/00
Santa Elissa	Talcomunca	7.00	540	Adulto	Pacas	06/09/00	07/09/00
San Luis	Cruz Grande	3.00	770	Adulto	Pacas	06/09/00	07/09/00
San José	Teshcal	12.00	640	Adulto	Pacas	06/09/00	07/09/00
La Esperanza	Cruz Grande	9.00	700	Adulto	Pacas	29/09/00	29/09/00
El Carmen	Cruz Grande	12.00	750	Adulto	Pacas	29/09/00	29/09/00
Santa Rosa	Huiscoyolate	10.00	800	Adulto	Pacas	29/09/00	29/09/00
Las Mercedes	Huiscoyolate	6.00	430	Adulto	Pacas	04/10/00	11/10/00
Las Merceditas	Huiscoyolate	3.25	430	Adulto	Pacas	04/10/00	11/10/00
Las Mercedes	Tunalmiles	3.25	520	Adulto	Pacas	04/10/00	11/10/00
Nuevos Horizontes	Cruz Grande	92.00	1100	Vivero	Bourbón	12/10/00	13/10/00
San Roberto	Cruz Grande	9.50	640	Vivero - Adulto	Pacas	09/11/00	10/11/00
La Gloria	Cruz Grande	12.50	550	Adulto	Pacas	09/11/00	10/11/00
San Nicolás	San Isidro		1030	Adulto	Bourbón	09/11/00	10/11/00

ANEXO 4

PRODUCTOS Y SOLUCIONES UTILIZADAS PARA LA COLORACIÓN DE ENZIMAS

SOLUCIÓN DE EXTRACCIÓN

Tris	1.314 g.
Acido Ascorbico	0.01897 g.
Cisteina / Hcl	0.014 g.
Sacarosa	20 g.
Ajustar Ph	8 con Hcl
Agua destilada	100 ml

SOLUCIONES PARA LA PREPARACIÓN DE GELES

I - GEL DE SEPARACIÓN

SOLUCIÓN A

Hcl 1N	20 ml
Tris	12 g.
Temed	0.23 ml
Ajustar Ph	8.4
Agua destilada	100 ml

SOLUCIÓN B

Sigma acryl / bis 37:1.40%

SOLUCIÓN C

Persulfato de amonio

0.014 g. / 10 ml de agua destilada

SOLUCIÓN D

Agua destilada

Mezclar las soluciones A, B, C y D en las siguientes proporciones:

Solución A	1.2 ml
Solución B	1.68 ml
Solución C	4.8 ml
Solución D	1.92 ml

II - GEL DE CONCENTRACIÓN

SOLUCIÓN SpA

Hcl 1N	40 ml + 20 ml de agua destilada
Tris	5.98 g.
Temed	0.46 ml
Ajustar Ph	6.7 (Hcl 1N)
Agua destilada	100 ml

SOLUCIÓN SpB

Acrylamida	10 g.
Bis - acrylamida	2.5 g.
Agua destilada	100 ml

SOLUCIÓN SpC

Persulfato de amonio

0.028 g. / 5 ml de agua destilada

SOLUCIÓN SpD

Sacarosa 4 g. / 10 ml de agua destilada

Mezclar las soluciones SpA, SpB, SpC y SpD en las siguientes proporciones:

Solución SpA	0.5 ml
Solución SpB	0.35 ml
Solución SpC	0.5 ml
Solución SpD	2.65 ml

SOLUCIÓN TAMPON PARA CUBETA

SOLUCIÓN MADRE

Tris	6 g.
Glicina	28.8 g.
Agua destilada	1000 ml

Solución a utilizar:

Solución madre	100 ml
Agua destilada	900 ml

SOLUCIONES MADRE PARA REVELADO

SOLUCIÓN A : 0.2 Molar

NaH ₂ PO ₄	27.8 g.
Agua destilada	1000 ml

SOLUCIÓN B

NaH ₂ PO ₄ · 7H ₂ O	53.65 g.
Agua destilada	1000 ml

Mezclar las soluciones A y B en las siguientes proporciones:

Solución madre A	28 ml
Solución madre B	72 ml
Agua destilada	100 ml

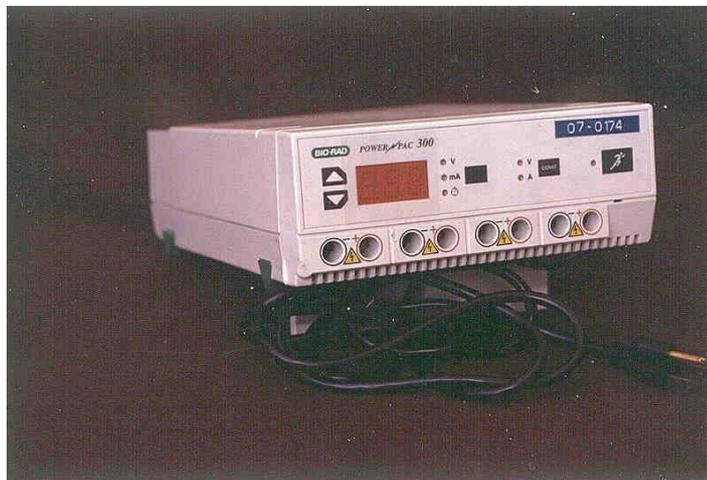
SOLUCIÓN DE REVELADO PARA LAS ISOENZIMAS DE ESTERASAS

Fast Blue RR	60 mg
α - Naphthyl Acetato	80 mg. Disueltos en 2 ml de acetona
Tampón fosfato Ph 7.2	100 ml

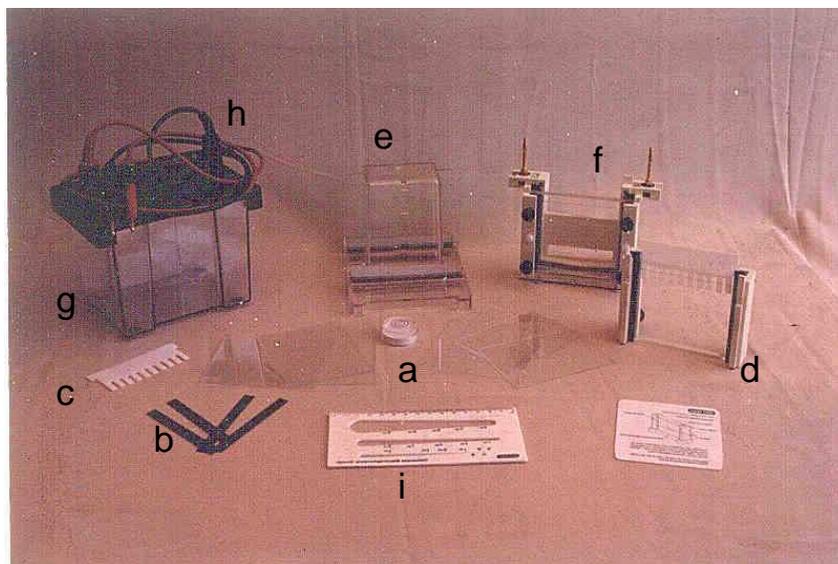
SOLUCIÓN DE ACIDO ACETICO AL 10%

Hcl al 37%	8.81 ml
Agua destilada	100 ml

Anexo 5. Equipo utilizado en el desarrollo de electroforesis.



Generador de corriente



- a) Placas de vidrio; b) Espaciadores para grosor de geles; c) Peines plásticos; d) Marco para armado de placas de vidrio; e) Stand para armado de geles; f) Marco para sujetar geles y ensamblador de electrodos; g) Cubeta; h) Electrodo; i) Regla