

Population dynamics of the carrot cyst nematode *Heterodera carotae* under greenhouse conditions

Dinámica poblacional del nematodo del quiste de la zanahoria *Heterodera carotae* bajo condiciones de invernadero

Ilia Mariana Escobar-Ávila, Alejandro Tovar-Soto*, Departamento de Parasitología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Colonia Santo Tomás, Alcaldía Miguel Hidalgo, CP 11340, CDMX, México. *Corresponding author: alejandrotovars@hotmail.com

Recibido: 10 de Julio, 2020.

Aceptado: 17 de Septiembre, 2020.

Escobar-Ávila IM and Tovar-Soto A. 2021. Population dynamics of the carrot cyst nematode *Heterodera carotae* under greenhouse conditions. Mexican Journal of Phytopathology 39(1).

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2007-1

Primera publicación DOI: 28 de Septiembre, 2020.

First DOI publication: September 28, 2020.

Abstract. The carrot cyst nematode *Heterodera carotae* is an important pest of *Daucus carota* crops. For control measures to be effective, knowledge about nematode population dynamics over time is essential. This study evaluated the population dynamics of *H. carotae* in carrot over a ten-month cultivation period under greenhouse conditions. In June 2017, 90 pots (3 L volume) were placed in the greenhouse: 60 were filled with nematode naturally infested soil (1200 J2/pot) and the remaining 30 were controls (without the nematode). Ten seeds of carrot were sown into each pot. After germination,

Resumen. El nematodo del quiste de la zanahoria *Heterodera carotae* es un patógeno importante en *Daucus carota*. Para que las medidas de control sean efectivas, el conocimiento de la dinámica poblacional del nematodo a través del tiempo es indispensable. El presente trabajo, evaluó la dinámica poblacional de *H. carotae* en cultivo de zanahoria, durante 10 meses bajo condiciones de invernadero. En junio del 2017, se colocaron en invernadero 90 macetas (3 L volumen): 60 fueron llenadas con suelo naturalmente infestado con el nematodo (1200 J2/maceta) y las 30 restantes se utilizaron como controles (sin nematodos). En cada maceta, se sembraron 10 semillas de zanahoria. Después de la germinación, las macetas fueron muestreadas destructivamente cada 15 y 30 días (n=3). Las raíces de cada maceta fueron pesadas y posteriormente teñidas. Los quistes y J2 se extrajeron del suelo. Las poblaciones de J2 tanto en suelo como raíz, se comportaron de manera similar. En suelo, se observaron tres picos de J2 a los 105, 150 y 195 días con 735, 882 y 967 J2/200 cm³ de suelo respectivamente.

pots were destructively sampled every 15 and 30 days (n=3). Roots from each pot were weighed and stained. J2s and cysts were extracted from soil. J2 populations in soil and roots behaved similarly. In soil, three J2 peaks were observed after 105, 150 and 195 days with 735, 882 and 967 J2/200 cm³ of soil, respectively. A multiplication factor of 1.6 was calculated and five generations of the nematode were observed. *H. carotae* caused an average 70.8% yield loss during the experiment. The results can be used in the development of decision-making tools to optimize the implementation of management measures.

Key words: cyst-forming nematode, *Daucus carota*, multiplication factor, life cycle, generations, endo-radicular stages.

Carrot (*Daucus carota*) is a root vegetable that is grown worldwide and used for human consumption in salads, juices, stews and as a garnish. In Mexico, 353,750 t were produced in 2019 with a value of 54,738,948 US dollars. In 2018, Mexico was the 24th largest producer of carrots worldwide (FAO, 2020; SIAP, 2020). As with all crops, carrot is affected by a large number of pathogens e.g., bacteria, fungi, viruses, phytoplasmas and nematodes (Davis and Nuñez, 2007; Seo *et al.*, 2015; Groves *et al.*, 2020). The carrot cyst nematode, *Heterodera carotae* Jones (1950a), is a cyst-forming nematode (CFN) that is distributed throughout the carrot-growing areas of Europe, North America and South Africa (Subbotin *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2017; Escobar-Avila *et al.*, 2018; Handoo and Subbotin, 2018). This CFN has a limited host range: wild and cultivated carrots and a number of wild members of Apiaceae Family, such as *Torilis* spp. (Jones, 1950b; Greco, 1986; Mugniery and Bossis, 1988). This nematode completes its life cycle in 36 days

Se calculó un factor de reproducción de 1.6 y se observaron cinco generaciones del nematodo. *H. carotae* causó una pérdida promedio en rendimiento de 70.8% durante el experimento. Los resultados pueden ser usados para desarrollar herramientas en la toma de decisiones para optimizar el momento de implementación de medidas de manejo.

Palabras clave: Nematodo formador de quistes, *Daucus carota*, factor de reproducción, ciclo de vida, generaciones, estadios endo-radicales.

La zanahoria (*Daucus carota*) es una raíz que se cultiva en todo el mundo y se utiliza para consumo humano en ensaladas, jugos, guisos y como guarnición. En 2019, en México se produjeron 353,750 t valuadas en 54,738,948 dólares. En 2018, México ocupó el lugar 24 entre los más grandes productores de zanahoria a nivel mundial (FAO, 2020; SIAP, 2020). Como ocurre con todos los cultivos, la zanahoria es afectada por un gran número de patógenos, donde destacan, bacterias, hongos, virus, fitoplasmas y nematodos (Davis y Nuñez, 2007; Seo *et al.*, 2015; Groves *et al.*, 2020). El nematodo del quiste de la zanahoria (NQZ), *Heterodera carotae* Jones (1950a), es un patógeno que se encuentra distribuido en las zonas productoras de zanahoria en Europa, Norteamérica y África del Sur (Subbotin *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2017; Escobar-Avila *et al.*, 2018; Handoo y Subbotin, 2018). Este NFQ tiene un rango limitado de hospedantes: zanahorias silvestres y cultivadas, y algunos miembros silvestres de la familia Apiaceae, como *Torilis* spp. (Jones, 1950b; Greco, 1986; Mugniery y Bossis, 1988). Este nematodo completó su ciclo de vida en 36 días a 20 °C y, en un estudio de campo en Italia, tuvo cuatro generaciones por año y causó pérdidas de rendimiento de hasta 20% en cultivos de zanahoria (Greco, 1986; Greco y Brandonisio, 1986).

at 20 °C and, in an Italian field study, had four generations per year and caused up to 20% yield losses in carrot crops (Greco, 1986; Greco and Brandonisio, 1986). Recently, *H. carotae* was found to be widely distributed in several municipalities of the Tepeaca Valley, Puebla, Mexico, where its life cycle was completed in 73 days at 20-25 °C (Escobar-Avila *et al.*, 2017; Escobar-Avila *et al.*, 2018). The difference in duration of the life cycle between European and Mexican populations of *H. carotae* has led us to believe that the number of generations per year and the population dynamics will also be different. Understanding population dynamics is key to design management strategies. The objectives of the present study were: i) to determine the population dynamics of one population of *H. carotae* in soil and in carrot roots over a ten-month cultivation period under greenhouse conditions; ii) to determine the number of generations of the nematode and its population multiplication capacity; and iii) to determine carrot yield losses at the nematode population densities evaluated.

In June 2017, 90 pots (3 L volume) were placed under greenhouse conditions at 13-20 °C (greenhouse temperature). Sixty of these pots each contained 3 kg of naturally nematode-infested soil and ten carrot seeds (cv. Christian). The naturally nematode-infested soil came from an infested field from Santa Maria Actipan, Acatzingo, Puebla, Mexico (18° 58' 486" N; 97° 50' 295" W; 2246 masl). The soil was thoroughly homogenized and then second-stage juveniles were extracted using the centrifugal flotation technique (Jenkins, 1964) to determine average initial inoculum of *H. carotae* which was 1200 second stage juveniles (J2) per pot. The thirty remaining pots were controls; each contained 3 kg of the same soil, except that it had been tinalized, and 10 carrot seeds (cv. Christian) placed. The experiment was set up in a completely

Recientemente, se encontró que *H. carotae* está ampliamente distribuido en varios municipios del Valle de Tepeaca, Puebla, México, donde completa su ciclo de vida en 73 días a 20-25 °C (Escobar-Avila *et al.*, 2017; Escobar-Avila *et al.*, 2018). La diferencia en la duración del ciclo de vida entre las poblaciones europeas y mexicanas de *H. carotae* nos lleva a creer que el número de generaciones por año y la dinámica poblacional también son diferentes. Entender la dinámica poblacional es determinante para diseñar estrategias de manejo. Los objetivos del presente estudio fueron: i) determinar la dinámica poblacional de una población de *H. carotae* en suelo y en raíces de zanahoria durante un periodo de cultivo de 10 meses bajo condiciones de invernadero; ii) determinar el número de generaciones del nematodo y la capacidad de reproducción de la población; y iii) determinar las pérdidas en el rendimiento del cultivo de zanahoria a las densidades poblacionales del nematodo que fueron evaluadas.

En junio de 2017, se colocaron en invernadero 90 macetas (3 L volumen) a 13-20 °C (temperatura en el invernadero). Sesenta de las macetas contenían suelo naturalmente infestado con el nematodo y 10 semillas de zanahoria (cv. Christian). El suelo naturalmente infestado con el nematodo fue recolectado en un campo infestado en Santa Maria Actipan, Acatzingo, Puebla, México (18° 58' 486" N; 97° 50' 295" O; 2246 msnm). El suelo fue completamente homogeneizado y después se extrajeron los juveniles de segundo estadio utilizando la técnica de tamizado-centrifugado y flotación (Jenkins, 1964), a fin de determinar el promedio por maceta del inóculo inicial de *H. carotae*, que fue de 1200 juveniles de segundo estadio (J2). Las otras 30 macetas se utilizaron como controles; cada maceta con 3 kg del mismo suelo, salvo que éste fue tinalizado, en donde se colocaron 10 semillas de zanahoria (cv. Christian). El experimento fue establecido en

randomized design. All pots were maintained in the greenhouse over a 10-month period (June 2017 - April 2018) and were watered every 3 days with 20 mL of tap water. Immediately after the seeds had germinated, pots were destructively sampled to determine nematode population densities; three treatment pots were evaluated every 15 days and three control pots were evaluated every 30 days. The roots and soil were evaluated separately from each pot. To determine the fresh weight of carrot roots, these were gently shaken, washed and then foliage was removed. From each pot, the roots of each plant were individually weighed and then a mean per pot was determined. As control pots were only evaluated monthly, only data from treatment pots sampled at the same time as control pots were used in statistical analysis of fresh weight. A t-test was performed to identify any significant differences between the weight of the roots when nematodes were present or absent ($p < 0.05$). Analysis was done using the SygmaPlot 12.0 program. Carrot yield loss was calculated as the percentage loss between the root weight of control pots and infested pots. After weighing, all of the roots from each pot were carefully washed with tap water and then stained using acid fuchsin lactoglycerol to observe and count nematode stages inside and on the surface of roots (J2, J3, J4, females and cysts) (Byrd *et al.*, 1983). All nematode stages were recorded and a mean nematode density per stage and date was calculated. The total mean nematode density was taken as the 100 per cent for each date. On the other hand, the soil from each pot was thoroughly homogenized and then J2s and cysts were extracted from 200 cm³ of soil using the centrifugal flotation technique (Jenkins, 1964) and Fenwick's method (Fenwick, 1940), respectively. The mean number of cysts were used to calculate the population multiplication factor by dividing the final population (Pf) density from each date

un diseño completamente al azar. Todas las macetas se mantuvieron en el invernadero por un periodo de 10 meses (junio 2017-abril 2018) y se regaron cada 3 días con 20 mL de agua del grifo. Después de que las semillas germinaron, las macetas fueron muestreadas destructivamente para determinar las densidades poblacionales del nematodo; se evaluaron tres macetas (con nematodo) cada 15 días y tres macetas control (sin nematodo) cada 30 días. Las raíces y el suelo de cada maceta fueron evaluados por separado. Para determinar el peso fresco de las raíces de zanahoria, éstas se agitaron ligeramente, se lavaron y después se eliminó el follaje. De cada maceta, las raíces de cada planta fueron pesadas de manera individual y posteriormente se determinó la media por maceta. Dado que las macetas control se evaluaron mensualmente, solo los datos de las macetas con suelo infestado muestreadas al mismo tiempo que las macetas control fueron utilizados para el análisis estadístico del peso fresco. Se realizó una prueba t para identificar diferencias significativas entre el peso de las raíces cuando había nematodos presentes o ausentes ($p < 0.05$). El análisis se realizó con el programa SygmaPlot 12.0. La pérdida de rendimiento de zanahoria se calculó como el porcentaje de pérdida entre el peso de la raíz de las macetas control y las macetas con suelo infestado. Después de pesarlas, todas las raíces de cada maceta fueron cuidadosamente lavadas con agua del grifo y luego teñidas con fucsina ácidolactoglicerol para observar y contar los estadios del nematodo en el interior y en la superficie de las raíces (J2, J3, J4, hembras y quistes) (Byrd *et al.*, 1983). Se registraron todos los estadios del nematodo y se calculó la densidad promedio del nematodo por etapa y fecha. La densidad total promedio del nematodo se tomó como el 100 por ciento de cada fecha. Por otro lado, el suelo de cada maceta se homogeneizó completamente y, a continuación, se extrajeron los J2 y quistes de 200 cm³ de suelo

by the initial population (P_i) density. The value of P_i was taken from the immediate previous date of sampling.

Overall, the fresh weight of carrot roots was significantly smaller in the nematode treatment pots than in the control pots ($p < 0.05$) (Table 1). From the beginning of the experiment and up to 60 days post germination (DPG), the fresh root weight was not significantly different between the treatment and control pots ($p > 0.05$). However, from 90 DPG, there was a significant difference in the root fresh weight between treatment and control pots on every sampling time. At the end of the experiment (300 DPG), an average 70.8% yield loss was observed. Inside carrot roots, J2 were observed at 15 DPG, but as DPG increased the number of J3, then J4 and female stages increased in number (Figure 1). By 75 DPG, all nematode stages were present in various proportions, but cysts were the predominant stage (Figure 1). Five generations of the nematode were

utilizando la técnica de tamizado-centrifugado y flotación (Jenkins, 1964) y el método de Fenwick (Fenwick, 1940), respectivamente. El número promedio de quistes se utilizó para calcular el factor de reproducción de la población dividiendo la densidad de población final (P_f) de cada fecha por la densidad de la población inicial (P_i). El valor de P_i se tomó de la fecha anterior inmediata de muestreo.

En general, el peso fresco de las raíces de zanahoria fue significativamente menor en las macetas con nematodos que en las macetas control ($p < 0.05$) (Cuadro 1). Desde que comenzó el experimento y hasta 60 días post-germinación (DPG), el peso fresco de la raíz no fue significativamente diferente entre las macetas con nematodo y control ($p > 0.05$). Sin embargo, a partir de los 90 DPG, se observó una diferencia significativa en el peso fresco de la raíz entre las macetas con nematodo y las macetas control cada vez que se muestrearon. Al final del experimento (300 DPG), se observó un promedio

Table 1. Fresh root weight of *Heterodera carotae* infested and control carrots over a ten-month culture period under greenhouse conditions.

Cuadro 1. Peso fresco de la raíz de zanahoria control e infestada con *Heterodera carotae* en un periodo de cultivo de 10 meses bajo condiciones de invernadero.

DPG	Fresh carrot root weight (g)		P	Yield loss (%)
	Control	Infested with <i>H. carotae</i>		
30	0.006 ± 0.0008	0.005 ± 0.00008	0.751	16.7
60	0.019 ± 0.0033	0.018 ± 0.0087	0.849	5.3
90	0.066 ± 0.003	0.039 ± 0.0126	0.023*	40.9
120	3.547 ± 1.5	0.242 ± 0.11	0.019**	93.2
150	7.039 ± 0.985	1.519 ± 1.06	0.003**	78.4
180	8.402 ± 2.559	0.528 ± 0.0599	0.006**	93.7
210	9.963 ± 3.619	1.745 ± 0.223	0.017**	82.5
240	10.192 ± 3.467	1.406 ± 0.352	0.012**	86.2
270	13.712 ± 4.255	1.659 ± 0.297	0.008**	87.9
300	16.599 ± 5.379	3.168 ± 0.367	0.012**	80.9

Each value is the mean of three replicates ± standard deviation. Significant differences were determined using a t-test. * = significant ($p \leq 0.05$); ** = highly significant ($p \leq 0.01$). Average yield loss = 70.8%. DPG = days post germination. / Cada uno de los valores es la media de tres repeticiones ± desviación estándar. Las diferencias significativas se determinaron mediante una prueba t. * = significativo ($p \leq 0.05$); ** = altamente significativo ($p \leq 0.01$). Pérdida de rendimiento promedio = 70.8%. DPG = días post-germinación.

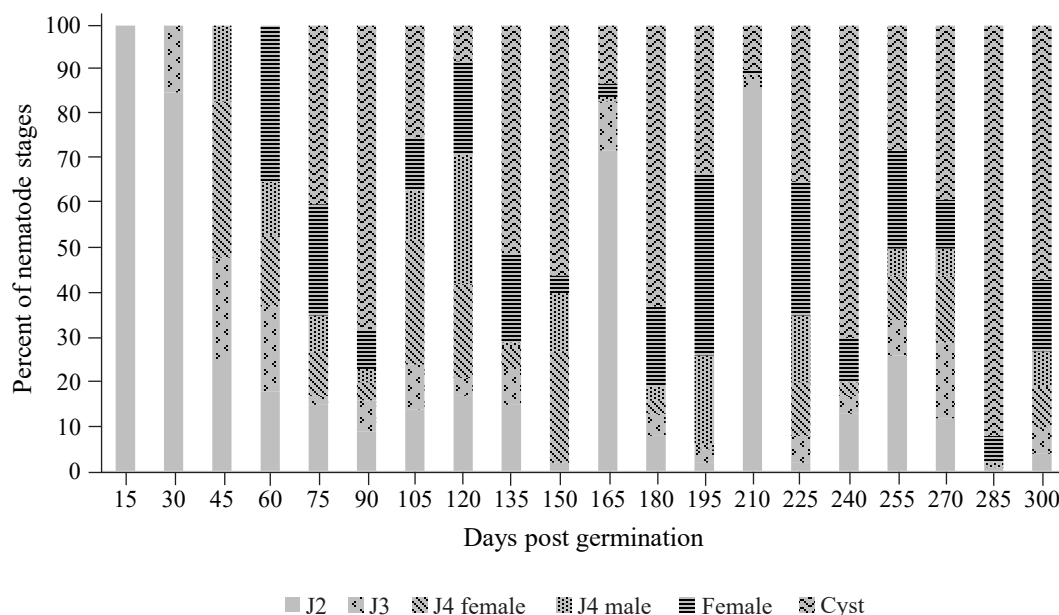


Figure 1. Stages of the cyst nematode *Heterodera carotae* present within roots of carrots over a ten-month culture period under greenhouse conditions. The total mean nematode density from the three replicates was taken as the 100 per cent for each date.

Figura 1. Estadios del nematodo del quiste de la zanahoria *Heterodera carotae* presentes dentro de las raíces de zanahoria durante un periodo de cultivo de 10 meses bajo condiciones de invernadero. La densidad media total del nematodo de las tres repeticiones se consideró como el 100% de cada fecha.

completed during the entire experimental period; peaks of females were observed at 60, 105, 195, 225 and 255 DPG with means of 172, 224, 228, 264 and 235 females, respectively (Figure 2A). As for nematode population in soil, three maximum peaks in J2 populations were observed at 105, 150 and 195 DPG with a mean of 735, 882 and 967 J2/200 cm³ of soil respectively. A similar trend in J2 populations was observed inside carrot roots (Figure 2B). The multiplication factor calculated from cysts was inversely related to the initial population densities and varied between 230 and 558 cysts/200 cm³ of soil (Figure 2C). At low nematode Pi densities, the multiplication factor was the greatest. In contrast, when nematode Pi densities were at their highest, the multiplication factor was at its smallest (Figure 2C). A multiplication factor of 1.6 was calculated at the end of the experiment.

de pérdida de rendimiento de 70.8%. En el interior de las raíces de zanahoria se observaron J2 a los 15 DPG, pero a medida que los DPG aumentaron, el número de J3, J4 y de hembras aumentó también (Figura 1). A los 75 DPG, se presentaron todos los estadios en varias proporciones, pero los quistes fueron el estadio predominante (Figura 1). A lo largo de todo el periodo que duró el experimento, se completaron cinco generaciones del nematodo; los mayores picos (números) de hembras se observaron a los 60, 105, 195, 225 y 255 DPG con medias de 172, 224, 228, 264 y 235 hembras, respectivamente (Figura 2A). En cuanto a la población del nematodo en el suelo, se observaron tres picos máximos en las poblaciones de J2 a los 105, 150 y 195 DPG con una media de 735, 882 y 967 J2/200 cm³ de suelo, respectivamente. Se observó una tendencia similar en las poblaciones J2 en el interior de las raíces de

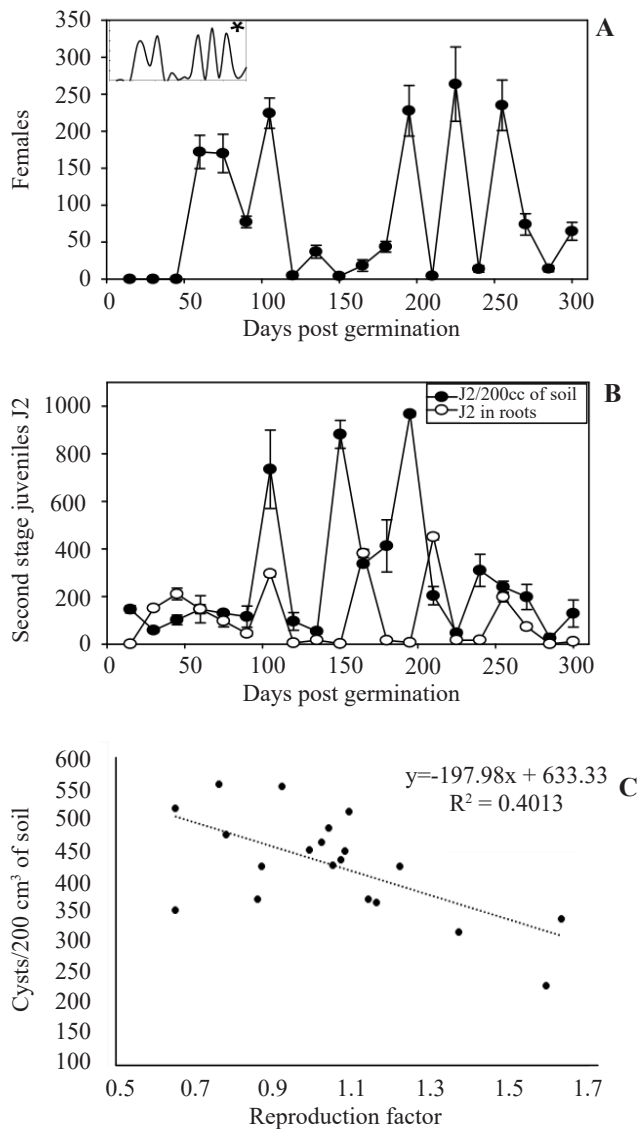


Figure 2. Population dynamics and multiplication factor of *Heterodera carotae* in soil and roots of carrot cv. Christian over a ten-month culture period under greenhouse conditions. A) Population dynamics of *Heterodera carotae* females in carrot roots. Average number of females from three replicates; * = Simple spline curve representation. B) Population dynamics of second stage juveniles (J2) of *H. carotae* in soil and carrot roots. Average number of J2 from the three replicates. C) Relationship between *H. carotae* multiplication factor and initial population densities on carrot.

Figura 2. Dinámica poblacional y factor de reproducción de *Heterodera carotae* en suelo y raíces de zanahoria cv. Christian durante un periodo de cultivo de 10 meses bajo condiciones de invernadero. A) Dinámica poblacional de hembras de *Heterodera carotae* en raíces de zanahoria. Número promedio de hembras de tres repeticiones; * = Representación simple de una curva spline. B) Dinámica poblacional de juveniles de segundo estadio (J2) de *H. carotae* en suelo y raíces de zanahoria. Número promedio de J2 de las tres repeticiones. C) Relación entre el factor de reproducción de *H. carotae* y las densidades poblacionales iniciales en zanahoria.

In this study, the carrot cyst nematode *Heterodera carotae* caused an average 70.8% yield loss in carrot over a ten-month culture period from June 2017 to April 2018 under greenhouse conditions. This is much higher than those previously reported by Greco *et al.* (1993), which was a maximum of 20% under Italian conditions. Ambrogioni and Marinari-Palmisano (1976) determined a tolerance limit, i.e. the maximum nematode density at which no yield

zanahoria (Figura 2B). El factor de reproducción calculado de los quistes, se relacionó de manera inversa con las densidades poblacionales iniciales y variaron entre 230 y 558 quistes/200 cm³ de suelo (Figura 2C). Cuando las densidades de la Pi del nematodo estaban a su nivel mínimo, el factor de reproducción estaba a su nivel máximo. En cambio, cuando las densidades de Pi del nematodo estaban a su máximo, el factor de reproducción estaba a su

losses occur (Seinhorst, 1986; Schomaker and Been, 2006), of 0.19 eggs/cm³ of soil in a field trial, while Greco and Brandonisio (1980) determined a tolerance limit of 0.8 eggs/cm³ of soil in a microplot experiment. In the latter study, yield losses of 40 and 70% occurred at densities of 16 and 32 eggs/cm³ of soil, respectively (Greco and Brandonisio, 1980). In our study, the initial nematode density was 1200 J2/three kg of soil, which is equivalent to 0.4 J2 per g of soil. It is difficult to compare our results with previous work because the initial nematode inoculum concentrations were not the same. However, the initial nematode density in our study was lower than the one reported by Greco and Brandonisio (1980) and yet still caused a yield loss of 70%. In addition, the inoculum concentration used in our study was, theoretically, within the tolerance limit, and so no yield losses should have been observed (Greco and Brandonisio, 1980). The difference in our results and previous reports may be due to a number of factors. Firstly, the plant varieties used in the experiments were different and it is known that some varieties of carrots are more susceptible to nematodes than others (Barrot, 2018). It is possible that carrot cv. Christian is more susceptible than cv. Vilmorin 66, which Greco and Brandonisio (1980) used. Secondly, temperature and type of soil play an important role in emergence and development of *H. carotae* (Greco and Brandonisio, 1986). The optimum temperature for emergence of *H. carotae* J2 is between 15 and 20 °C, although they can invade plants and develop at 10 °C (Greco and Brandonisio, 1986; Greco, 1987). Our study was conducted at 13-20 °C, therefore there were no temperature restrictions on emergence and development. Thirdly, the specific Mexican population (Santa Maria Actipan) of *H. carotae* used in this experiment could be more virulent than the European population. Further studies on virulence of the Mexican population

nivel mínimo (Figura 2C). Al final del experimento se calculó un factor de reproducción de 1.6.

En este estudio, el nematodo del quiste de la zanahoria *Heterodera carotae* causó pérdidas de rendimiento promedio de 70.8% en la zanahoria durante un periodo de cultivo de 10 meses, de junio de 2017 a abril de 2018, bajo condiciones de invernadero. Este porcentaje es mucho más alto que los porcentajes anteriormente reportados por Greco *et al.* (1993), que llegaron a un máximo de 20% en condiciones de campo en Italia. Ambrogioni y Marinari-Palmisano (1976) determinaron un límite de tolerancia, es decir, la densidad máxima del nematodo a la cual no se producen pérdidas de rendimiento (Seinhorst, 1986; Schomaker y Been, 2006), de 0.19 huevos/cm³ de suelo en un ensayo en campo, mientras que Greco y Brandonisio (1980) determinaron un límite de tolerancia de 0.8 huevos/cm³ de suelo en un experimento a nivel de microparcela. En este último estudio, se produjeron pérdidas de rendimiento de 40 y 70% a densidades de 16 y 32 huevos/cm³ de suelo, respectivamente (Greco y Brandonisio, 1980). En nuestro estudio, la densidad inicial del nematodo fue de 1200 J2/tres kg de suelo, que equivale a 0.4 J2 por g de suelo. Es difícil comparar estos resultados con trabajos anteriores porque las concentraciones iniciales de inóculo del nematodo no fueron iguales. Sin embargo, la densidad inicial del nematodo en este estudio fue menor que la que reportaron Greco y Brandonisio (1980), y aun así causó una pérdida de rendimiento de 70%. Además, la concentración de inóculo utilizada en nuestro estudio estuvo, teóricamente, dentro del límite de tolerancia, y, por tanto, no debió haber producido pérdidas de rendimiento (Greco y Brandonisio, 1980). La diferencia entre estos resultados y los reportes anteriores puede deberse a diversos factores. En primer lugar, las variedades vegetales que se usaron en el experimento fueron diferentes, y se sabe que algunas variedades de

are needed. Inside carrot roots, J2, J3, J4, females and cysts were observed after 15, 30, 45, 60 and 75 DPG, respectively at 13-20 °C. These results agree with those obtained by Escobar-Avila *et al.* (2017) who evaluated the same population in carrot cv. Mexicana and observed J2, J3, J4, females and cysts after 10, 24, 38, 59 and 73 DPG, respectively, under greenhouse conditions at 20-25 °C. In contrast, in Italy the life cycle of this nematode species was completed within 36 days at 20 °C in carrot cv. Selection 92 (Greco and Brandonisio, 1986). According to Greco and Brandonisio (1986) the temperature range for development of *H. carotae* is 10-20 °C and that above 25 °C nematode development stops. Therefore, in the months when the average temperatures are high, the life cycle may be longer (Greco, 1987; Mugniery and Bossis, 1988). However, this was not a factor in our study in which the temperature was maintained between 13 and 20 °C. Factors that might influence the duration of the life cycle (twice as long for the Mexican population compared with the Italian population) is the carrot variety used and the particular characteristics of the Mexican nematode population evaluated. *Heterodera carotae* has an interesting biology. Approximately half of the eggs are retained within the cyst, while the other half are laid in a gelatinous matrix secreted by the anal glands of the female (termed egg masses). Under suitable conditions, eggs in the egg masses hatch as soon as embryogenic development is completed. In contrast, hatching of eggs within the cysts is delayed; these eggs usually require a two-month period and the presence of host plant root exudates before they hatch. Therefore, *H. carotae* is capable of hatching all year round (Winslow, 1955; Aubert, 1986; Greco and Brandonisio, 1986; Greco, 1987; Baldwin and Mundo-Ocampo, 1991). This is unlike other species of cyst nematode that only complete one generation per year and require a dormancy

zanahoria son más susceptibles que otras a los nematodos (Barrot, 2018). Es posible que la cv. Christian sea más susceptible que la cv. Vilmorin 66 que utilizaron Greco y Brandonisio (1980). En segundo lugar, la temperatura y el tipo de suelo tienen un papel muy importante en la emergencia y el desarrollo de *H. carotae* (Greco y Brandonisio, 1986). La temperatura óptima para la emergencia de J2 de *H. carotae* es de entre 15 y 20 °C, aunque pueden invadir plantas y desarrollarse a 10 °C (Greco y Brandonisio, 1986; Greco, 1987). Nuestro estudio fue realizado a 13-20 °C, y, por tanto, no hubo restricciones de temperatura durante la emergencia y el desarrollo. En tercer lugar, es posible que la población mexicana (Santa María Actopan) de *H. carotae* utilizada en este experimento, pueda ser más virulenta que la población europea. Es necesario realizar más estudios sobre la virulencia de la población mexicana. En el interior de las raíces de zanahoria, se observaron J2, J3, J4, hembras y quistes a los 15, 30, 45, 60 y 75 DPG, respectivamente, a 13-20 °C. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Escobar-Avila *et al.* (2017), quienes evaluaron la misma población en la cv. Mexicana y observaron J2, J3, J4, hembras y quistes a los 10, 24, 38, 59 y 73 DPG, respectivamente, bajo condiciones de invernadero a 20-25 °C. Por el contrario, en Italia, el ciclo de vida de esta especie de nematodo se completó en 36 días a 20 °C en la cv. Selection 92 (Greco y Brandonisio, 1986). Según Greco y Brandonisio (1986), el rango de temperatura para el desarrollo de *H. carotae* es de 10-20 °C, y a más de 25 °C, el desarrollo del nematodo se detiene. Por tanto, en los meses en que las temperaturas promedio son elevadas, es posible que el ciclo de vida se prolongue (Greco, 1987; Mugniery y Bossis, 1988). Sin embargo, en este estudio este no fue un factor, ya que la temperatura se mantuvo entre 13 y 20 °C. Los factores que pudieron haber influido en la duración del ciclo de vida (dos veces mayor en la

period before hatching (e.g. the cereal cyst nematodes *H. avenae*, *H. filipjevi*, *H. latipons* and the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*). The peculiar biology of *H. carotae* explains why all nematode stages were found at the same time inside carrot roots during the experiment; after the first appearance of females, eggs within egg masses were continuously hatching and infesting carrot roots. Five generations of the nematode were completed during the ten-month culture period. In the first four months of the experiment, two nematode generations were completed (60 and 105 DPG), which corresponds to one typical carrot growing season. After six months, another three nematode generations were observed with a 30-day period between each one (195, 225 and 255 DPG). It seems that, at first, the nematode required some time to establish its population leading to long life cycles (75 days), but then the life cycle shortened and generations were completed every 30 days. During the experiment, the highest numbers of J2 in the soil were observed at 105, 150 and 195 DPG; a similar trend was observed inside carrot roots. In the first generation of females the number of J2 in soil was constant. From the second generation of females the J2 numbers peaked at 105 DPG and the timing suggests they were most probably derived from egg masses. At 150 days, a second peak of J2 was observed but there was no increase in the numbers of females or cysts in the roots; this second peak of J2 (150 days) was observed 60 days after the largest number of cysts was observed in roots (90 days). As the eggs inside cysts require a two-month period before they can hatch it is likely that this second peak of J2 was derived from the cysts (Greco and Brandonisio, 1986). The timing of the third peak of J2 suggests they were derived from egg masses of the third generation of females (195 days). These results demonstrate the high multiplication capacity of this species, especially

población de la cv. mexicana que la de la población italiana) fueron la variedad de zanahoria que se utilizó y las características particulares de la población mexicana del nematodo que se evaluó. *Heterodera carotae* tiene una biología interesante. Aproximadamente la mitad de los huevos son retenidos dentro del quiste, mientras que la otra mitad son depositados en una matriz gelatinosa que las hembras secretan por las glándulas anales (llamadas masas de huevos). En condiciones adecuadas, los huevos de las masas eclosionan tan pronto como concluye el desarrollo embriogénico. En cambio, la eclosión de los huevos dentro del quiste se demora; en general, estos huevos requieren un periodo de dos meses y la presencia de exudados de la raíz de la planta hospedante antes de eclosionar. Por tanto, *H. carotae* tiene la capacidad de eclosionar todo el año (Winslow, 1955; Aubert, 1986; Greco y Brandonisio, 1986; Greco, 1987; Baldwin y Mundo-Ocampo, 1991). Esto es diferente a otras especies de nematodos formadores de quistes, ya que completan únicamente una generación por año y requieren un periodo de latencia antes de eclosionar (por ejemplo, los nematodos del quiste de los cereales *H. avenae*, *H. filipjevi*, *H. latipons*, y el nematodo del quiste de la papa *Globodera rostochiensis*). La biología peculiar de *H. carotae* explica por qué todos los estadios del nematodo ocurrieron al mismo tiempo dentro de las raíces de zanahoria durante el experimento; después de la primera aparición de las hembras, los huevos dentro de las masas eclosionaron de manera continua e infestaron las raíces de zanahoria. Durante el periodo de cultivo de 10 meses se completaron cinco generaciones del nematodo. En los primeros cuatro meses del experimento se completaron dos generaciones de nematodos (60 y 105 DPG), lo cual corresponde a un típico ciclo de cultivo de zanahoria. Después de seis meses, se observaron otras tres generaciones de nematodos con un periodo de 30 días entre una y

in continuous carrot crops, as is done for carrot seed production. The multiplication factor was inversely related to initial population densities. This means that when the initial population is high, the multiplication factor is low. This is due to competition for space and food in large nematode populations (Seinhorst, 1966; Hajihasani *et al.*, 2010). Studies on population dynamics of the carrot cyst nematode in soil and roots are scarce. Moreover, they have generally been conducted over a shorter period (4-5 months only). Therefore, our findings provide novel and important information that can be used in the development of integrated management strategies and decision-making tools to optimize the timing of control applications.

CONCLUSIONS

To be able to develop control strategies that are effective against the Carrot Cyst Nematode (CCN), *Heterodera carotae*, the knowledge of population dynamics is indispensable. The results obtained in this study showed three second-stage juveniles (J2's) peaks at 105, 150 and 195 post-germination days, at which time, control strategies that are effective against this stage of the CCN can be applied. Additionally, a multiplication factor of 1.6 was calculated and five generations of the nematode were observed. The CCN caused an average 70.8% yield loss during the experiment.

ACKNOWLEDGEMENTS

The first author acknowledges CONACyT for the financial support provided for her PhD studies.

otra (195, 225 y 255 DPG). Al parecer, al principio, el nematodo necesitó algún tiempo para establecer su población, lo cual produjo ciclos de vida prolongados (75 días), pero después el ciclo se acortó y las generaciones se completaron cada 30 días. Durante el experimento, el mayor número de J2 en el suelo se observaron a los 105, 150 y 195 DPG; se observó una tendencia similar en el interior de las raíces de zanahoria. En la primera generación de hembras, el número de J2 en el suelo fue constante. A partir de la segunda generación de hembras, los números de J2 alcanzaron su punto máximo a los 105 DPG y el tiempo sugiere que lo más probable es que hayan surgido de las masas de huevos. A los 150 días, se observó un segundo pico de J2, pero no aumentó el número de hembras o de quistes en las raíces; este segundo pico de J2 (150 días) se observó 60 días después de que se produjo el número más grande de quistes en las raíces (90 días). Como los huevos en el interior de los quistes requieren un periodo de dos meses antes de eclosionar, es probable que este segundo pico de J2 se haya derivado de los quistes (Greco y Brandonisio, 1986). El momento en que se dio el tercer pico de J2 sugiere que fueron derivados de masas de huevos de la tercera generación de hembras (195 días). Estos resultados demuestran la gran capacidad de reproducción de esta especie, sobre todo en cultivos continuos de zanahoria, como se hace para la producción de semilla. El factor de reproducción se relacionó inversamente con las densidades poblacionales iniciales. Esto significa que cuando la población inicial es alta, el factor de reproducción es bajo. Esto se debe a la competencia por espacio y alimento en grandes poblaciones de nematodos (Seinhorst, 1966; Hajihasani *et al.*, 2010). Son escasos los estudios sobre la dinámica poblacional del nematodo del quiste de

CITED LITERATURE

- Ambrogioni L and Marinari-Palmisano A. 1976. Effetto di avvicendamenti culturali su *Heterodera carotae* (Nematoda: Heteroderidae) e sulla produzione di carota in terreno infestato. *Redia* 59: 355.
- Aubert V. 1986. Hatching of the carrot cyst nematode. Pp: 347-348. In: Lamberti F and Taylor CE (eds.). *Cyst nematodes*. Plenum Press, London, UK. 467 p. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2251-1_26
- Baldwin JG and Mundo-Ocampo M. 1991. Heteroderinae, cyst- and non-cyst forming nematodes. Pp: 275-362. In: Nickle WR (ed.). *Manual of Agricultural Nematology*. Marcel Dekker, Inc, New York, USA. 1064 p.
- Barrot L. 2018. Resistance to *Heterodera carotae* and methods for use. US Patent 20,180,103,647. April 19.
- Byrd DW Jr, Kirkpatrick T and Barker KR, 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology* 15(1): 142-143. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2618249/>
- Davis RM and Nuñez J. 2007. Integrated Approach for Carrot Pest and Disease Management. Pp: 149-188. In: Ciancio A and Mukerji KG (eds.). *General Concepts in Integrated Pest and Disease Management*. Springer, The Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6061-8_6
- Escobar-Avila IM, Medina-Canales MG and Tovar-Soto A. 2017. Distribution, life cycle and histological changes by *Heterodera* sp. in carrot in Puebla. *Mexican Journal of Phytopathology* 35(2): 304-313. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1606-7>
- Escobar-Avila IM, López-Villegas EO, Subbotin SA and Tovar-Soto A. 2018. First Report of Carrot Cyst Nematode *Heterodera carotae* in Mexico: Morphological, Molecular Characterization and Host Range Study. *Journal of Nematology* 50(2): 229-242. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2018-021>
- FAO, 2020. Food and Agriculture organization. <http://www.fao.org/faostat/>. (Review september, 2020).
- Fenwick DW. 1940. Methods for the recovery and counting of cysts of *Heterodera schachtii* from soil. *Journal of Helminthology* 18: 155-172. <https://doi.org/10.1017/S0022149X00031485>
- Greco N. 1986. "The carrot cyst nematode". Pp: 333-346. In: Lamberti F and Taylor CE (eds.). *Cyst nematodes*. Plenum Press, London, UK. 467 p. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2251-1_25
- Greco N. 1987. *Heterodera carotae*: A destructive nematode of carrot. *Nematology Circular No. 140*. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry. Gainesville, Florida, USA. 4 p.
- Greco N and Brandonisio A. 1980. Relationship between *Heterodera carotae* and carrot yield. *Nematologica* 26(4): 497-500. <https://doi.org/10.1163/187529280x00440>

la zanahoria en el suelo y las raíces. Además, por lo general, se han realizado durante periodos más cortos (en solo 4-5 meses). Por lo tanto, estos resultados aportan información nueva e importante que se puede utilizar en el desarrollo de estrategias de manejo integrado y en las herramientas de toma de decisiones, a fin de optimizar el momento en que se realizan las aplicaciones de medidas de control.

CONCLUSIONES

Para poder crear estrategias de control que sean eficaces contra el nematodo del quiste de la zanahoria (NQZ), *Heterodera carotae*, es indispensable conocer la dinámica poblacional. Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron tres picos de juveniles de segundo estadio (J2) a los 105, 150 y 195 días después de la germinación, momento en que se pueden aplicar las estrategias de control más eficaces para combatir dicho estadio del NQZ. Adicionalmente, se calculó un factor de reproducción de 1.6 y se observaron cinco generaciones del nematodo. El nematodo del quiste de la zanahoria causó una pérdida de rendimiento promedio de 70.8% durante el experimento.

AGRADECIMIENTOS

La primera autora agradece al CONACyT el apoyo económico que le proporcionó para la realización de sus estudios de doctorado.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

- Greco N and Brandonisio A. 1986. The Biology of *Heterodera carotae*. *Nematologica* 32(4): 447-460. <https://doi.org/10.1163/187529286x00327>
- Greco N, D'Addabbo T, Brandonisio A and Elia F. 1993. Damage to Italian crops caused by cyst-forming nematodes. *Journal of Nematology* 25 (4S): 836-842. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2619465/>
- Groves RL, Clements JR and Bradford BZ. 2020. Carrot diseases resulting from phytoplasmas and viruses. Pp: 148-155. In: Geoffriau E and Simon P (eds). *Carrots and Related Apiaceae Crops*. CAB International, London, UK. 368 p. <https://doi.org/10.1079/9781789240955.0148>
- Hajihassani A, Tanha Maafi Z, Nicol JM and Rezaee S. 2010. Effect of the cereal cyst nematode, *Heterodera filipjevi* on wheat in microplot trials. *Nematology* 12(3): 357-363. <https://doi.org/10.1163/138855409x12548945788321>
- Handoo ZA and Subbotin SA. 2018. Taxonomy, Identification and Principal Species. Pp: 365-398. In: Perry RN, Moens M and Jones JT (eds.). *Cyst nematodes*. CAB International, London, UK. 464 p. <https://doi.org/10.1079/9781786390837.0365>
- Jenkins DW. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter* 48(9): 692.
- Jones FGW. 1950a. A new species of root eelworm attacking carrots. *Nature* 165: 81. <https://doi.org/10.1038/165081a0>
- Jones FGW. 1950b. Observations on the beet eelworm and other cyst-forming species of *Heterodera*. *Annals of Applied Biology* 37(3): 407-440. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1950.tb00966.x>
- Mugnieri D and Bossis M. 1988. *Heterodera carotae* Jones, 1950. 1. Gamme d'hôtes, vitesse de développement, cycle. *Revue de Nématologie* 11(3): 307-313. <https://core.ac.uk/reader/39867740>
- Schomaker CH and Been TH. 2006. Plant Growth and Population Dynamics. Pp: 275-301. In: Perry RN and Moens M (eds.). *Plant Nematology*. CAB International, London, UK. 463 p. <https://doi.org/10.1079/9781845930561.0275>
- Seinhorst JW. 1966. *Longidorus elongatus* on *Fragaria vesca*. *Nematologica* 12(2): 275-279. <https://doi.org/10.1163/187529266x00680>
- Seinhorst JW. 1986. Effects of nematode attack on the growth and yield of crop plants. Pp: 191-209. In: Lamberti F and Taylor CE (eds.). *Cyst nematodes*; Plenum Press, London, UK. 467 p. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2251-1\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2251-1_11)
- Seo Y, Kim YS, Park Y and Kim YH. 2015. Comparisons of Pathological Responses in Carrot to Root-knot Nematodes. *The Plant Pathology Journal* 31(4): 441-445. <http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.NT.06.2015.0115>
- SIAP, 2020. Secretaria de Información Agroalimentaria y Pesquera. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>. (Review september, 2020).
- Subbotin SA, Mundo-Ocampo M and Baldwin JG. 2010. Systematics of cyst nematodes (Nematoda: Heteroderinae). *Nematology monographs and perspectives*. Vol. B. Brill, The Netherlands. 512 p. <https://doi.org/10.1163/ej.9789004164345.i-512>
- Winslow RD. 1955. The hatching responses of some root eelworms of the genus *Heterodera*. *Annals of Applied Biology* 43: 19-36. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1955.tb02450.x>
- Yu Q, Ponomareva E, Van Dyk D, McDonald MR, Sun F, Madani M, Tenuta M, 2017. First report of the carrot cyst nematode (*Heterodera carotae* Jones) from carrot fields in Ontario, Canada. *Plant Disease* 101(6): 1056. <https://doi.org/10.1094/pdis-01-17-0070-pdn>