

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSTGRADO
MAESTRÍA EN FITOPATOLOGÍA**



**“TÉCNICA MOLECULAR DE PCR PARA IDENTIFICAR LAS
PRINCIPALES ESPECIES DE *Meloidogyne* spp. EN POBLACIONES
PROVENIENTES DE PERÚ”**

Presentado por:

NORA YESSENIA VERA OBANDO

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE EN
FITOPATOLOGÍA**

Lima-Perú

2014

DEDICATORIA

A mi madre Nora, por su amor, cariño y apoyo incondicional a lo largo de mi vida, por motivarme a seguir adelante y no dejarme caer cuando sentía que el camino se terminaba.

A mi padre Wilfredo, por su cariño, palabras de aliento y confianza depositada en mí y por recordarme que siempre lo tendré a mi lado para brindarme su apoyo.

A mis hermanos Hernán, Frank y cuñada Marina por su cariño y apoyo, por preocuparse por su hermana menor y tenerlos siempre conmigo en mi corazón en cualquier lugar donde me encuentre.

A mi sobrina y ahijada Anabelén, por su existencia, por llenar nuestras vidas con su cariño, alegría y esperanza y por motivarnos a ser ejemplo de personas de bien.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por acompañarme y guiarme a lo largo de mi vida, darme fortaleza y fe en cada una de las acciones que realizo y brindarme una vida llena de aprendizaje.

Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC), por el financiamiento de mis estudios de maestría y presente trabajo de tesis, quienes de esta manera permitieron la realización del anhelo de superación académica y profesional de mi persona.

Al Dr. Manuel Canto Sáenz, asesor de la presente tesis, mi más profundo agradecimiento, por su relevante orientación y aporte durante el desarrollo del presente trabajo, así como su indispensable apoyo en la culminación del mismo.

A la Dra. Ida Bartolini Martínez, responsable del laboratorio de Biología Molecular del la Unidad del Centro de Diagnóstico de Sanidad Vegetal de SENASA, y especialista del mismo laboratorio biólogo Arturo Olórtegui Livia, mi sincero agradecimiento por haber brindado su completa disponibilidad, apoyo, orientación y capacitación para la realización del presente trabajo. Sin su ayuda no se hubieran superado las dificultades presentadas para el cumplimiento de los objetivos planteados.

Al Ing. Jorge Tanaka Nakamacho, director de la Unidad del Centro de Diagnostico de Sanidad Vegetal de SENASA e Ing. Cosme Quispe Villalva, responsable del Laboratorio de Nematología de dicha unidad, por su disponibilidad en el uso de laboratorio e invernadero para la realización del presente trabajo.

A la Dra. Mariella Finetti-Sialer, del Istituto di Bioscienze e BioRisorse, Italia, por su completa disponibilidad en la confirmación molecular de las especies *Meloidogyne javanica* y *Meloidogyne arenaria* de las muestras correspondientes al presente trabajo.

A los profesores miembros del jurado evaluador de la presente tesis, Dr. Enrique N. Fernández-Northcote, Dr. Raúl Blas Sevillano y Mg. Sc. Walter Apaza Tapia, por sus valorables comentarios y acertadas sugerencias para el presente trabajo.

A los profesores de la maestría de Fitopatología de la Universidad Nacional Agraria la Molina, por sus consejos y enseñanzas impartidas durante los estudios de postgrado, transmitiendo sus valiosos conocimientos y experiencia profesional.

Al personal de la Unidad del Centro de Diagnóstico de Sanidad Vegetal así como a mis amigos y compañeros de maestría que me brindaron apoyo y palabras de aliento para continuar la realización de la presente tesis.

INDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 <i>Meloidogyne spp.</i>	3
2.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES	3
2.1.2 UBICACIÓN TAXONÓMICA	3
2.1.3 CICLO DE VIDA	4
2.1.4 FORMA DE REPRODUCCIÓN	6
2.1.5 FACTORES QUE AFECTAN EL DESARROLLO DEL NEMATODO	8
2.1.6 SINTOMATOLOGÍA	9
2.1.7 MECANISMOS ASOCIADOS A LOS SÍNTOMAS OBSERVADOS EN PLANTAS	11
2.2 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE <i>Meloidogyne spp.</i>	13
2.2.1 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA	13
2.2.2 PRUEBA DE HOSPEDANTES DIFERENCIALES	14
2.2.3 ANÁLISIS ELECTROFORÉTICOS DE PROTEÍNAS E ISOENZIMAS	15
2.2.4 ANÁLISIS MOLECULAR DE ÁCIDOS NUCLEICOS	16
a. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	16
b. Empleo de biología molecular en la identificación de especies de <i>Meloidogyne spp.</i>	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN	22
3.2 COLECCIÓN DE MUESTRAS	22
3.3 MANTENIMIENTO DE PLANTAS DE TOMATE EN MACETAS CON SUELO INFESTADO	25
3.4 ESTABLECIMIENTO DE POBLACIONES (A PARTIR DE UNA SOLA MASA DE HUEVOS)	25

3.5 EXTRACCIÓN Y MONTAJE DE HEMBRAS DE <i>Meloidogyne</i> spp.	29
3.6 EXTRACCIÓN DE ESPECÍMENES MACHOS Y JUVENILES DE SEGUNDO ESTADO DE <i>Meloidogyne</i> spp.	29
3.7 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE POBLACIONES DE <i>Meloidogyne</i> spp.	31
3.8 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR MEDIANTE PCR DE POBLACIONES DE <i>Meloidogyne</i> spp.	35
3.8.1 EXTRACCIÓN DE ADN DE <i>Meloidogyne</i> spp.	35
a. Extracción de ADN a partir de juveniles de segundo estado (J2): Método de extracción de ADN usando buffer de lisis	35
b. Extracción de ADN a partir de especímenes hembras: Método de extracción de ADN de Minipreparación	37
c. Extracción de ADN a partir de nódulos en raíces: Método de extracción de ácidos nucleicos CTAB según Doyle y Doyle (1987), modificado	39
3.8.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	41
a. Controles positivos utilizados para la identificación de especies de <i>Meloidogyne</i>	41
b. Estandarización de la técnica de PCR para la amplificación de los iniciadores evaluados	41
c. Visualización de ADN amplificado por electroforesis	41
IV. RESULTADOS	46
4.1 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE MELOIDOGYNE SEGÚN EL PATRÓN PERINEAL DE ESPECÍMENES HEMBRAS	46
4.2 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE MELOIDOGYNE MEDIANTE LA FORMA DE LA CABEZA DE ESPECÍMENES MACHOS DE ALGUNAS POBLACIONES EVALUADAS	51
4.3 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE MELOIDOGYNE MEDIANTE PRUEBAS MOLECULARES EMPLEANDO PCR	55
4.3.1 EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	55

4.3.2 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR MEDIANTE PCR DE LAS POBLACIONES DE MELOIDOGYNE UTILIZANDO INICIADORES ESPECÍFICOS	57
4.3.3 UTILIZACIÓN DE INICIADORES DE LA REGIÓN RIBOSOMAL IGS Y REGIÓN MITOCONDRIAL EN EL ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES DE MELOIDOGYNE	63
V. DISCUSIÓN	66
VI. CONCLUSIONES	76
VII. RECOMENDACIONES	77
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
IX. ANEXOS	91

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1: Cultivos y lugares de colecta de muestras para la identificación de especies de <i>Meloidogyne</i> spp. por métodos morfológicos y PCR	23
Cuadro 2: Características usadas para la identificación de <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>M. javanica</i> , <i>M. arenaria</i> y <i>M. hapla</i> basadas en el patrón perineal de la hembra en oviposición (Eisenback <i>et. al</i> , 1983)	33
Cuadro 3: Características usadas para la identificación de <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>M. javanica</i> , <i>M. arenaria</i> y <i>M. hapla</i> basadas en la cabeza de especímenes machos (Eisenback <i>et. al</i> , 1983, Eisenback, 1985)	34
Cuadro 4: Iniciadores evaluados para la identificación de <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>M. javanica</i> , <i>M. arenaria</i> y <i>M. hapla</i> , en poblaciones provenientes de Perú	42
Cuadro 5: Condiciones de amplificación en PCR con iniciadores para la identificación de <i>Meloidogyne incognita</i>	43
Cuadro 6: Condiciones de amplificación en PCR con iniciadores para la identificación de <i>Meloidogyne javanica</i>	43
Cuadro 7: Condiciones de amplificación en PCR con iniciadores para la identificación de <i>Meloidogyne arenaria</i>	44
Cuadro 8: Condiciones de amplificación en PCR con iniciadores para la identificación de <i>Meloidogyne hapla</i>	44
Cuadro 9: Condiciones de amplificación en PCR con iniciadores de la región ribosomal IGS y región mitocondrial de <i>Meloidogyne</i>	45

Cuadro 10:	Consolidado de identificación molecular mediante iniciadores específicos, con su respectivo peso de banda e identificación morfológica de <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>M. javanica</i> , <i>M. arenaria</i> y <i>M. hapla</i> , provenientes de Perú	62
Cuadro 11:	Producto de amplificación con su respectivo peso de banda, utilizando iniciadores 194(5SF)/195 (18SR) de la región IGS	65

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Estructura del genoma mitocondrial de <i>Meloidogyne</i> , mostrando las regiones más utilizadas para su identificación (Okimoto <i>et al.</i> , 1991)	19
Figura 2: Diagrama esquemático de la familia multigénica del ADN ribosomal (ADNr) (Blok <i>et al.</i> , 1997; Wishart <i>et al.</i> , 2002)	20
Figura 3: Lugares de colecta de muestras para la identificación de especies de <i>Meloidogyne</i> spp. por métodos morfológicos y PCR, ubicados referencialmente en mapa que muestra los departamentos del país	24
Figura 4: Extracción e inoculación de una masa de huevos de <i>Meloidogyne</i> a plántulas de tomate para la obtención de poblaciones aisladas	26
Figura 5: Poblaciones a partir de una sola masa de huevos de <i>Meloidogyne</i> spp., mantenidas en invernadero	27
Figura 6: Remoción de plantas de las macetas conteniendo las poblaciones a partir de una sola masa de huevos de <i>Meloidogyne</i> spp.	28
Figura 7: Extracción de espécimen hembra de <i>Meloidogyne</i> sp. y corte del patrón perineal, para su identificación morfológica	30
Figura 8: Morfología general del patrón perineal de un espécimen hembra de <i>Meloidogyne</i> spp. (Eisenback <i>et. al.</i> , 1983)	32
Figura 9: Vista lateral de la morfología básica de la cabeza y estilete de un espécimen macho de <i>Meloidogyne</i> spp. (Eisenback <i>et. al.</i> , 1983)	32
Figura 10: Método de extracción de ADN de <i>Meloidogyne</i> usando buffer de lisis	36
Figura 11: Extracción de ADN de <i>Meloidogyne</i> según método de Minipreparación	38

Figura 12:	Método de extracción de ácidos nucleicos CTAB modificado, a partir de nódulos radiculares	40
Figura 13:	Patrones perineales de especímenes hembras de las 30 poblaciones de <i>Meloidogyne</i> spp. evaluadas (Cuadro 1)	46-51
Figura 14:	Forma de la cabeza de especímenes machos con características de <i>Meloidogyne incognita</i> correspondientes a las población N° 23, proveniente de tomate, La Libertad	52
Figura 15:	Forma de la cabeza de especímenes machos con características de <i>Meloidogyne arenaria</i> correspondientes a la población N° 29, proveniente de vid, Lima	53
Figura 16:	Forma de la cabeza de especímenes machos con características de <i>Meloidogyne hapla</i> correspondientes a la población N° 30, proveniente de aguaymanto, Cajamarca	54
Figura 17:	Productos de amplificación de PCR usando el iniciador MIF/MIR (<i>Meloidogyne incognita</i>), con ADN obtenido de diferentes métodos de extracción, un control positivo (CP), un control agua, sin ADN (CN) y 100 bp ladder (M)	55
Figura 18:	Productos de amplificación de PCR usando el iniciador SEC-1F/SEC-1R (<i>Meloidogyne incognita</i>), con ADN obtenido a partir del método de extracción de lisis (L1), un control positivo (CP), un control agua, sin ADN (CN) y 100 bp ladder (M)	56
Figura 19:	Productos de amplificación de PCR usando el iniciador DHF/DHR (<i>Meloidogyne hapla</i>), con ADN obtenido de diferentes métodos de extracción, un control positivo (CP), un control agua, sin ADN (CN) y 100 bp ladder (M)	56

- Figura 20: Productos de amplificación de PCR usando el iniciador MIF/MIR (*Meloidogyne incognita*), con ADN extraído de 10 juveniles de segundo estado (J2) de 30 poblaciones de *Meloidogyne* (Cuadro 1), un control positivo (CP), un control agua, sin ADN (CN) y 100 bp ladder (M) 57
- Figura 21: Productos de amplificación de PCR usando el iniciador INC-K14F/INC-K14R (*Meloidogyne incognita*), con ADN extraído de 10 juveniles de segundo estado (J2) de 30 poblaciones de *Meloidogyne* (Cuadro 1), un control positivo (CP), un control agua, sin ADN (CN) y 100 bp ladder (M) 58
- Figura 22: Productos de amplificación de PCR usando el iniciador Fjav/Rjav (*Meloidogyne javanica*), con ADN extraído de 10 juveniles de segundo estado (J2) de 30 poblaciones de *Meloidogyne* (Cuadro 1), un control positivo (CP), un control agua, sin ADN (CN) y 100 bp ladder (M) 59
- Figura 23: Productos de amplificación de PCR usando el iniciador Far/Rar (*Meloidogyne arenaria*), con ADN extraído de 10 juveniles de segundo estado (J2) de 30 poblaciones de *Meloidogyne* (Cuadro 1), un control positivo (CP), un control agua, sin ADN (CN) y 100 bp ladder (M) 60
- Figura 24: Productos de amplificación de PCR usando el iniciador DHF/DHR (*Meloidogyne hapla*), con ADN extraído de 10 juveniles de segundo estado (J2) de 30 poblaciones de *Meloidogyne* (Cuadro 1), un control positivo (CP), un control agua, sin ADN (CN) y 100 bp ladder (M) 61

- Figura 25: Productos de amplificación de PCR usando el iniciador 194(5SF)/195(18SR) (rDNA IGS), con ADN extraído de 10 juveniles de segundo estado (J2) de 30 poblaciones de *Meloidogyne* (Cuadro 1), un control positivo (CP), un control agua, sin ADN (CN) y 100 bp ladder (M) 63
- Figura 26: Productos de amplificación de PCR usando el iniciador 194(5SF)/195(18SR) (rDNA IGS), con ADN extraído de un juvenil de segundo estado (J2) de las poblaciones N° 26, N° 27, N° 28, N° 29 y N° 30 de *Meloidogyne* (Cuadro 1), un control agua, sin ADN (CN) y 100 bp ladder (M) 64
- Figura 27: Productos de amplificación de PCR usando el iniciador C2F3 (COIIR) /1108(1RNAF), con ADN obtenido de diferentes métodos de extracción de la población N° 30 proveniente de aguaymanto, Cajamarca 64

INDICE DE ANEXOS

	Página
ANEXO 1: BUFFER DE LISIS	91
ANEXO 2: BUFFER DE EXTRACCIÓN (MÉTODO DE MINIPREPARACIÓN)	92
ANEXO 3: BUFFER DE EXTRACCIÓN CTAB	93

RESUMEN

La correcta y confiable identificación de nematodos fitoparásitos del género *Meloidogyne* es importante para poder llevar a cabo estrategias de manejo integrado, mejoramiento y cuarentena. Por ello, se requiere la aplicación de técnicas complementarias y confirmatorias como la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), para apoyar la identificación de especies realizada por métodos morfológicos y morfométricos. En el presente trabajo se aisló 30 poblaciones a partir de una sola masa de huevos correspondientes al género *Meloidogyne* procedentes de diferentes partes del país, se adoptó métodos de extracción de ácidos nucleicos a partir de uno y 10 juveniles de segundo estado, una y 10 hembras y raíces con nódulos, se aplicó protocolos para la identificación de las especies de *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla* mediante la técnica de PCR utilizando iniciadores específicos y se comparó con la identificación morfológica. De las 30 poblaciones en estudio, 25 mostraron productos de amplificación con los iniciadores MIF/MIR e Inc-14k F/Inc-14k R, diseñados para la identificación de *M. incognita*, concordando con la identificación morfológica según el patrón perineal. Se obtuvo también productos de amplificación con el iniciador Fjav/Rjav para *M. javanica* en una población afectando tabaco proveniente de Lambayeque, con el iniciador Far/Rar para *M. arenaria* en una población afectando vid proveniente de Lima y con el primer DHF/DHR para *M. hapla* en una población afectando aguaymanto proveniente de Cajamarca, concordando estos resultados con la identificación morfológica según el patrón perineal. No se obtuvo productos de amplificación con los iniciadores evaluados en una población de clavel proveniente de Ayacucho y una población que se encontraba afectando vid en Piura, lo cual sugiere que deben realizarse otras pruebas moleculares como secuenciamiento para determinar estas especies. El presente trabajo constituye el primero en utilizar métodos moleculares para la identificación de especies de *Meloidogyne* en el Perú.

Palabras claves: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla*, PCR, iniciadores específicos, patrón perineal.

ABSTRACT

Correct and reliable identification of plant parasitic nematodes of the genus *Meloidogyne* is important to design effective nematode management, breeding and quarantine purposes. Therefore, the use of complementary and confirmatory techniques such as PCR (Polymerase chain reaction) is required to support the morphological and morphometric identification methods. Thirty populations of Root-Knot Nematodes from a single egg mass were isolated from samples collected in different parts of the country, methods of nucleic acid extraction was adopted from one and ten second-stage juveniles (J2), one and ten females and root-knots. Described specific primers were used to identify *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* and *M. hapla* and compared with morphological identification. Twenty-five populations showed amplification products with the MIF/MIR and Inc-14k F/Inc- 14k R primers designed for *M. incognita*, in agreement with the morphological identification (perineal pattern). Amplification products were also obtained with Fjav/Rjav primer designed for *M. javanica* in a population affecting tobacco from Lambayeque, *M. arenaria* (Far/Rar primer) was identified in a population affecting grapes from Lima and *M. hapla* (DHF/DHR) affecting *Physalis* (aguaymanto) in a population from Cajamarca, all these results confirm the morphological identification. No amplification products were obtained with primers evaluated in population affecting carnation from Ayacucho and grapes from Piura, suggesting that other molecular tests such sequencing should be performed to determine these species. The present work is the first carried out on molecular identification of *Meloidogyne* species in Peru.

Key Words: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla*, PCR, specific primers, perineal pattern.

I. INTRODUCCIÓN

Los nematodos fitoparásitos del género *Meloidogyne* son endoparásitos sedentarios obligados de gran importancia económica y constituyen uno de los principales factores limitantes en la producción de campos de cultivos en países tropicales y subtropicales. A esto se suman las estrategias de manejo empleadas para su control que involucran el uso de productos químicos, que conllevan a un mayor gasto económico y problemas de residuos y contaminación.

Meloidogyne spp. es un nematodo polífago, capaz de parasitar 3000 especies de plantas, entre silvestres y cultivadas. Además de ello, debido al exitoso parasitismo y alta especialización desarrollada en su hospedante, así como su permanencia en el suelo, son de difícil erradicación, constituyendo un problema de importancia global.

La correcta identificación de nematodos presentes en un campo de cultivo, tiene implicaciones importantes en muchas áreas, incluyendo la sistemática (taxonomía y filogenia), la genética de poblaciones, ecología y epidemiología y es también fundamental para la implementación de medidas de manejo y control, como el uso de cultivares resistentes, la rotación de cultivos y el establecimiento de medidas cuarentenarias.

Existen diferentes métodos para la identificación de nematodos, con frecuencia son identificados sobre la base de características morfológicas y morfométricas, el hospedante que parasitan, su efecto patológico en el hospedante o su origen geográfico. Sin embargo, estos criterios tienen ciertas limitaciones al llevar a cabo una identificación específica y necesitan de métodos complementarios y confirmatorios.

El método morfológico constituye el método de rutina en los laboratorios de nematología, y se desarrolla generalmente mediante el análisis de patrones perineales de hembras y otras características morfológicas como la forma de la cabeza de machos y estilete de hembras, también es de utilidad la prueba de hospedantes diferenciales, la caracterización fenotípica de isoenzimas de hembras adultas y recientemente el diagnóstico molecular mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

Los métodos moleculares basados en PCR, se caracterizan por su alta sensibilidad y especificidad, permitiendo la amplificación de genes o fragmentos de

genes a partir de cantidades muy pequeñas. Estos métodos vienen revolucionado la taxonomía y la genética de nematodos y constituyen una herramienta importante en la detección de nematodos fitopatógenos. Además de ello, su implementación tiene un efecto en el tiempo que implica un diagnóstico correcto y confiable, ya que este se ve reducido; siendo esto importante, especialmente cuando se trata de nematodos cuarentenados.

En el presente trabajo, se aplicó la técnica de PCR, utilizando iniciadores específicos, para el diagnóstico molecular de especies de *Meloidogyne* presentes en poblaciones provenientes de diferentes departamentos de Perú, y de esta manera contribuir para una identificación más sensible, rápida y confiable de estas especies. Se tuvo los siguientes objetivos:

1. Obtener poblaciones de nematodos correspondientes a *Meloidogyne* spp., procedentes de diferentes partes del país y realizar su identificación morfológica.
2. Aplicar protocolos para la identificación de las principales especies de *Meloidogyne* spp. (*M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla*), mediante PCR, utilizando iniciadores específicos y comparar los resultados moleculares con la identificación morfológica.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 *Meloidogyne* spp.

2.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Los nematodos endoparásitos sedentarios del género *Meloidogyne* constituyen fitopatógenos obligados altamente especializados. Esta característica, junto con su amplia distribución en el mundo, su extenso rango de hospedantes y su interacción con otros fitopatógenos en complejos de enfermedades, hacen que sea el fitonematodo de mayor impacto económico, objeto de diversas investigaciones, que incluyen estudios de taxonomía, biología, interacciones planta-nematodo y enfoques para su control.

La gravedad de los daños causados por *Meloidogyne* spp. varían con la especie de nematodo, la planta hospedante, las labores culturales, la época de siembra y el tipo de suelo. Del mismo modo, los umbrales económicos varían, dependiendo principalmente de estos mismos factores. Son mayormente prevalentes en regiones con temperaturas templadas y tropicales, las cuales favorecen también al cultivo hospedante.

Los estudios sobre *Meloidogyne* spp. se centran con frecuencia en las cuatro principales especies: *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne arenaria* y *Meloidogyne hapla*. El reconocimiento de estas cuatro especies como las principales comienza al ser consideradas dentro de las cinco primeras especies descritas por Chitwood en 1949. Luego, su extenso rango de hospedantes y distribución global contribuyeron en el reconocimiento de su importancia. El Proyecto Internacional de *Meloidogyne* reporta que constituyen el 95% de las especies identificadas de una colección de aislamientos estudiados a nivel mundial, lo que fortaleció aún más su estatus de principales especies (Sasser *et al.*, 1983).

2.1.2 UBICACIÓN TAXONÓMICA

El género *Meloidogyne* se ubica dentro de la siguiente clasificación taxonómica: (Canto-Sáenz, 2010):

Phylum Nemata

Clase Secernentea, Von Linstow 1950, Dougherty 1958.

Orden Tylenchida, Thorne 1949.

Suborden Tylenchina, Chitwood 1950.

Superfamilia Tylenchoidea, Örley 1880.

Familia Heteroderidae, Filipjev, Schuurmans, Sterkhoven 1941

Subfamilia Meloidogyninae, Skarbilovich 1959.

Género *Meloidogyne*, Göldi 1892.

2.1.3 CICLO DE VIDA

Los huevos de *Meloidogyne* spp., se encuentran inmersos en una masa gelatinosa, la cual los mantiene juntos y los protege tanto de las condiciones ambientales extremas como de depredadores. Las masas gelatinosas están compuestas por glicoproteínas y también se les atribuye propiedades antimicrobianas. Generalmente, están depositadas en la superficie de los nódulos, pero algunas veces se encuentran directamente sobre la superficie o dentro del tejido de la raíz de la planta hospedante. La masa de huevos es inicialmente suave, pegajosa y hialina, pero se hace más firme y de color marrón oscuro con el tiempo (Moens *et al.*, 2009). Se pueden encontrar más de 1 000 huevos en una masa, que puede ser más grande que el cuerpo de la hembra (Taylor y Sasser, 1983).

El desarrollo del huevo comienza breves horas después de la ovoposición, resultando en 2, 4, 8, 16 a más células, hasta que se ve el primer estado juvenil completamente formado, enrollado y con un estilete. Se puede mover dentro del huevo pero no es muy activo. La primera muda tiene lugar en el huevo y no es difícil distinguir la cutícula del primer estado juvenil, sobresaliendo más allá de la cabeza del segundo estado juvenil (J2). Poco después, este emerge rompiendo la membrana flexible del huevo, por medio de pinchazos repetidos con el estilete. La eclosión de los huevos es influenciada por la temperatura y ocurre sin requerir ningún estímulo por parte de la raíz de la planta, sin embargo los exudados radiculares algunas veces estimulan la eclosión (Taylor y Sasser, 1983; Karssen y Moens, 2006).

El juvenil de segundo estado que ha emergido, se mueve a través del suelo en busca de una raíz de la que pueda alimentarse. Su capacidad de sobrevivir se ve reforzada por varias adaptaciones fisiológicas y bioquímicas, incluyendo la quiescencia y la diapausa, y las reservas de lípidos que prolongan su viabilidad hasta que llega e

invade la planta hospedante (Moens *et al.*, 2009). La búsqueda de la raíz es al azar hasta que se acerca a unos cuantos centímetros. Luego, son atraídos por los exudados radiculares, acumulándose y penetrando la raíz por la zona de elongación debajo del punto de crecimiento. Se considera que el dióxido de carbono es el factor más importante para atraer a los juveniles de segundo estado (Taylor y Sasser, 1983; Hussey y Janssen, 2001; Karssen y Moens, 2006).

El juvenil de segundo estado penetra la raíz a través de algún punto de la zona subapical donde la endodermis presenta escaso desarrollo y no constituye una barrera física para el ingreso hacia el interior (Wyss *et al.*, 1992). El nematodo avanza hasta el tejido cortical y una vez allí la migración continúa intercelularmente hasta llegar al cilindro vascular en diferenciación. El avance a través del espacio intercelular se realiza recurriendo a la separación de la laminilla media por medios mecánicos a través de golpes de estilete, sin haberse precisado hasta la fecha si también concurren mecanismos enzimáticos en el proceso. Cada juvenil establece su sitio permanente de alimentación una vez que alcanza el cilindro vascular (Hussey y Williamson, 1998). Este sitio consiste en un conjunto de grandes células modificadas llamadas células gigantes, caracterizadas por la presencia de muchos núcleos de gran tamaño, altamente lobulados, con nucléolos prominentes, un alto número de orgánulos, citoplasma denso con altas tasas metabólicas y paredes engrosadas e invaginadas. Los nematodos absorben los nutrientes del citoplasma directamente o a través de tubos de alimentación sintetizados con tal propósito mediante las secreciones procedentes de las glándulas subesofágicas dorsales (Hussey y Mims, 1991).

Varios estudios han documentado los efectos de la infección por nematodos en la expresión génica. Algunos estudios en las células gigantes han revelado que el ARNm de algunos genes puede estar presente en niveles muchas veces mayor que en células de una raíz no infectada (He *et al.*, 2005; Ramsey *et al.*, 2004). También se ha reportado que los niveles de enzimas oxidoreductasas se incrementa, indicando un aumento en la actividad metabólica (Hussey y Janssen, 2001; Karssen y Moens, 2006).

Los nematodos del nódulo de la raíz secretan a través de su cutícula, enzimas antioxidantes que son producidas en la hipodermis y protegen al nematodo de la respuesta oxidativa del hospedante frente a la infección. Así también, las proteínas producidas y secretadas por las células de las glándulas esofágicas dentro de la planta

hospedante por medio del estilete, son señales moleculares que desencadenan la activación de rutas de señalización, que conducen a la supresión de la defensa del hospedante y a la inducción de células gigantes (Abad *et al.*, 2009).

Mientras se están formando las células gigantes y los nódulos, aumenta el ancho del nematodo y hay una dilatación considerable de las glándulas esofágicas. Las células del primordio genital se dividen y éste se agranda haciéndose notorio, dos ramificaciones en la hembra o formando un cuerpo alargado en el macho (Taylor y Sasser, 1983).

Cuando se completan la segunda y tercera muda en la hembra, evidenciadas por las dos cutículas desprendidas, el estilete y el bulbo esofágico medio desaparecen. Poco después de la cuarta muda el estilete y el bulbo medio son regenerados, se forman el útero y la vagina y el patrón perineal se hace visible. La hembra de la cuarta etapa continúa aumentando de grosor y un poco más de longitud, sufriendo la última muda y desarrollándose como hembra adulta, de forma piriforme. Las hembras pueden producir huevos por dos a tres meses y viven algún tiempo más después de que cesa la producción de huevos. El ciclo termina cuando la hembra pone su primer huevo (Taylor y Sasser, 1983).

Después de la segunda y tercera muda en el macho, el estilete no es visible, el bulbo esofágico medio se ha degenerado y sólo la gónada se ha alargado. Luego ocurre una rápida metamorfosis: el cuerpo alargado se desarrolla dentro de la cutícula, completo con estilete, esófago con bulbo medio, espículas, y esperma en los testículos. El macho de la cuarta etapa es vermiforme y sufre una última muda y emerge de la raíz ya como adulto. No hay evidencia de alimentación por parte de machos adultos y pueden ser encontrados en especies partenogénicas cuando las condiciones son desfavorables para el desarrollo de la hembra, por ejemplo, cuando las densidades son muy altas y hay una limitación del suministro de alimentos. Los machos probablemente viven sólo semanas (Taylor y Sasser, 1983; Moens *et al.*, 2009).

2.1.4 FORMA DE REPRODUCCIÓN

Existen tres tipos de reproducción dentro del género *Meloidogyne*: (a) anfimixis, en el cual el esperma de los machos fertiliza los ovocitos en las hembras y posteriormente se produce una meiosis, (b) partenogénesis meiótica facultativa, en el

cual en presencia de machos se produce una anfimixis, pero en su ausencia, se lleva a cabo una meiosis en los ovocitos, con dos de sus núcleos, con una reducción de complemento cromosómico (el pronúcleo y el segundo cuerpo polar), posteriormente se fusionan (automixis), y (c) partenogénesis mitótica obligada, donde los machos no están involucrados y uno de los dos núcleos producidos durante la división mitótica inicial dentro del ovocito se deteriora y el otro se convierte en el precursor del embrión posterior (apomixis) (Chitwood y Perry, 2009).

Sólo siete de las 37 especies de *Meloidogyne* descritas por Taylor y Sasser (1983), fueron anfimícticas. Estas especies se consideran de menor importancia debido a su restringida distribución, baja gama de hospedantes y menor impacto económico. Al igual que muchos nematodos del suelo, la mayoría de especies de *Meloidogyne* spp. son partenogénicas. El modo de reproducción apomíctico se encuentra en las especies más importantes en cuanto a su distribución geográfica e impacto agronómico. Las poblaciones de una misma especie de *Meloidogyne* pueden ser diferentes en el modo de reproducción, por ejemplo, 29 de las 32 poblaciones estudiadas de *M. hapla* se reprodujeron por partenogénesis meiótica facultativa, las otras por partenogénesis mitótica. Una forma un poco diferente de la partenogénesis meiótica ha sido reportada en *M. floridensis*, donde se produce una supresión de la segunda división en la maduración, lo que indica que esta especie tiene un tipo de partenogénesis intermedia entre la partenogénesis meiótica con dos divisiones y la mitótica (Chitwood y Perry, 2009).

La mayoría de especies anfimícticas y automícticas son diploides, con un número haploide de cromosomas (18). Mientras que la mayoría de especies apomícticas son poliploides o aneuploides y por lo general muestran una amplia variación en el número de cromosomas ($2n = 30-55$ cromosomas). Las especies de *Meloidogyne* spp. también se diferencian en su proporción de machos y hembras, las especies con fertilización cruzada por lo general tienen una proporción de 1:1, mientras que las especies que se reproducen por partenogénesis facultativa u obligatoria como *M. hapla* y *M. incognita* tienen valores variables de dicha proporción (Moens *et. al*, 2009).

Tanto en el género *Meloidogyne*, como en *Globodera* y *Heterodera*, los cromosomas sexuales están ausentes y la proporción de machos y hembras puede estar influida por factores ambientales. En las especies que se reproducen por partenogénesis

meiótica y mitóticas, el hacinamiento, la escasez de alimentos, las temperaturas extremas u otras tensiones ambientales adversas, pueden dar lugar a la formación de machos por inversión sexual. Estos machos raramente inseminan hembras, e incluso cuando lo hacen, una división mitótica en el ovocito inicia la embriogénesis sin fusión con el núcleo de espermatozoide (Chitwood y Perry, 2009).

La inversión sexual ocurre cuando en condiciones desfavorables para el nematodo, una vez formado el primordio genital de hembras, este cambia para dar lugar a un nematodo macho. Dependiendo de la etapa de desarrollo en la cual ocurre la inversión sexual, los machos involucrados pueden tener 1 o 2 gónadas de tamaño variable. La inversión sexual en un período inicial de desarrollo da lugar a machos con un testículo, casi indistinguible del de machos normales. La inversión sexual en una etapa media de desarrollo del segundo estado da lugar a la degeneración del núcleo de una de las células que resulta en machos con un testículo atrofiado y otro bien desarrollado. La inversión sexual en un periodo más avanzado resulta en machos con dos testículos de tamaño aproximadamente igual. Para explicar estos patrones de desarrollo, se supone que la diferenciación sexual es controlada por hormonas y que el ambiente influye en el equilibrio hormonal, al afectar la expresión génica. (Papadopoulou y Triantaphyllou, 1982; Karssen y Moens, 2006; Eisenback y Hunt, 2009).

2.1.5 FACTORES QUE AFECTAN EL DESARROLLO DEL NEMATODO

La temperatura, la humedad, la porosidad el suelo, la disponibilidad de oxígeno y la presencia de toxinas, pueden limitar o detener el movimiento, el desarrollo y la eclosión de huevos de los nematodos noduladores de la raíz (Curtis *et al.*, 2009; Evans y Perry, 2009).

La temperatura no sólo afecta la tasa de multiplicación del nematodo sino también su distribución, especialmente en relación con la capacidad de sobrevivir a los efectos de alta o baja temperatura. Dentro del género *Meloidogyne* hay dos grupos, termófilos y criófilos, según su capacidad de sobrevivir las transiciones de fase de lípidos que se producen a 10 °C. *Meloidogyne chitwoodi*, *M. hapla* y *Meloidogyne naasi* son criófilos y pueden sobrevivir en el suelo a temperaturas de hasta por debajo de 10 °C, mientras que *M. javanica*, *M. arenaria* y probablemente *Meloidogyne exigua* son termófilos y no sobreviven en el suelo a temperaturas inferiores a 10 °C (Evans y Perry, 2009).

Bird y Wallace (1966), realizaron un experimento en el que observaron la influencia de la temperatura en la eclosión, movilidad, invasión y el crecimiento de *M. hapla* y *M. javanica*. Generalmente, *M. javanica* requiere de rangos óptimos de temperatura mayores que *M. hapla*. Los requerimientos de temperatura son distintos en las diferentes actividades del nematodo; es así que *M. javanica* requiere para la eclosión temperaturas de 30 °C, a comparación de *M. hapla* que requiere temperaturas de 25 °C.

Se debe tener en cuenta que las condiciones óptimas para las actividades y procesos normales de ciclo de vida del nematodo pueden no ser ideales para su supervivencia a largo plazo. Es así que, Evans y Perry (2009), mencionan que Van Gundy (1985), reportó que la temperatura óptima para el crecimiento y la reproducción de *M. javanica* es de 25-30 °C, mientras que la temperatura óptima para la supervivencia de huevos y juvenil de segundo estado en el suelo es de 10-15 °C.

En una investigación pionera, que sigue siendo relevante hoy en día, Wallace (1964), reconoció el papel esencial desempeñado por la humedad del suelo en la supervivencia y eclosión de los huevos de *Meloidogyne*. La sequía excesiva puede frenar o incluso matar al nematodo, igual ocurre con el encharcamiento prolongado, que por falta de oxígeno en el suelo, el nematodo es también afectado. Todos los juveniles de segundo estado requieren una película de agua de cierto grosor para su circulación en el suelo (Curtis *et al.*, 2009).

En cuanto a las propiedades físicas del suelo destacan la porosidad, oxigenación, hidratación y cantidad de materia orgánica (Magunacelaya y Dagnino, 1999). La textura del suelo es otro factor de importancia pues la distribución y la severidad del ataque del nematodo dependen de ella. El daño y pérdidas de producción por nematodos noduladores de la raíz son generalmente más severos sobre suelos de textura arenosa (Wallace, 1964), ya que en suelos pesados, la eclosión disminuye y el desplazamiento del nematodo se hace más lento.

2.1.6 SINTOMATOLOGÍA

Los nematodos del género *Meloidogyne* se reproducen y alimentan de células vegetales vivas modificadas en la raíz, en la que induce nódulos; de ahí su nombre vernacular. Los síntomas aéreos son similares a los producidos en plantas que tienen un sistema radicular afectado y en mal funcionamiento.

El tamaño y la forma del nódulo dependen de la especie de nematodo, número de nematodos en el tejido de la raíz, grado de susceptibilidad y edad de la planta hospedante. En los nódulos formados puede haber una o más hembras adultas, localizadas en el cilindro central. Con respecto a la especie de nematodo; *M. hapla* es especialmente conocida por la alta incidencia de las raíces adventicias que se desarrollan a partir de nódulos radiculares; *Meloidogyne trifoliophila*, en trébol, produce nódulos alargados dentro de los cuales se encuentran incrustadas masas de huevos; *Meloidogyne partityla*, en pecano, no forma nódulos y tanto la hembra madura como la masa de huevos están expuestos en la superficie de la raíz (Moens *et. al.*, 2009).

Algunos nódulos en la raíz pueden ser muy pequeños y no se pueden reconocer, Por ejemplo: en gramíneas, rara vez se forman nódulos; en cebolla, los nódulos son muy discretos, siendo notoria la producción de masas de huevos; en camote y pimiento, los nódulos son también generalmente pequeños. La mayoría de las plantas con raíces fibrosas o leñosas forman nódulos pequeños o indistintos, especialmente al comienzo de una temporada de cultivo o cuando la densidad de población de nematodos es baja. Otras especies tienen una tendencia a producir nódulos en el extremo de la raíz. El algodón y el maní, son ejemplos de cultivos altamente sensibles en las que los nódulos en la raíz pueden ser difíciles de detectar en forma temprana, en la temporada de crecimiento; pero el gran número de nódulos pueden ser evidentes en la madurez del cultivo. Las plantas con raíces carnosas, especialmente las cucurbitáceas y tomate, desarrollan nódulos fácilmente detectables, a pesar de la baja incidencia de infección (Luc *et al.*, 1990; Moens *et al.*, 2009).

Además de la formación de nódulos, las raíces de plantas muy infectadas, son mucho más cortas, con menos raíces laterales y menos pelos radiculares; lo que conlleva a la reducción del sistema radicular. La deformación en las raíces y su ineficiencia causan un desarrollo limitado; con una menor cantidad de hojas, las cuales son pequeñas y de color verde pálido o amarillento; se observa marchitez y otros síntomas propios de la deficiencia de agua y nutrientes, aun cuando éstos abundan en el suelo (Taylor y Sasser, 1983; Agrios, 1996).

El ritmo rápido de desarrollo y reproducción del nematodo, en plantas muy susceptibles, permite el desarrollo de varias generaciones durante una temporada de cultivo; dando lugar a grandes daños agrícolas. Estos daños pueden consistir en diversos

grados de retraso en el crecimiento, falta de vigor y marchitez bajo estrés hídrico. La infección secundaria por otros patógenos a menudo resulta en una alta descomposición de los tejidos infectados. Al alterar la fisiología de las plantas hospedante, los nematodos no sólo pueden reducir el rendimiento de los cultivos, sino también la calidad del producto (Moens *et al.*, 2009).

2.1.7 MECANISMOS ASOCIADOS A LOS SÍNTOMAS OBSERVADOS EN PLANTAS

Las desviaciones sobre los procesos fisiológicos normales que tienen lugar con el parasitismo del nematodo y que explican la reducción en el rendimiento de las plantas afectadas, no se limitan a las funciones de la raíz, sino que abarcan igualmente a procesos que ocurren en la parte aérea o a nivel de planta entera (Nico, 2002).

El efecto más aparente del parasitismo de nematodos sobre la planta es una reducción general del crecimiento (Dropkin, 1989). Los nematodos reducen el crecimiento de las plantas debido a que destruyen la estructura de las células y consumen su contenido, interfiriendo en los procesos fisiológicos normales y modificando la expresión genética en la planta hospedante. Además de la disminución en el crecimiento, los síntomas asociados al parasitismo, a menudo son marchitez temporal y aparentes deficiencias nutricionales en las hojas; manifestaciones de alteraciones en dos funciones radicales básicas como son la absorción de agua y la nutrición mineral, respectivamente (Nico, 2002).

Los nematodos provocan una reducción en la absorción de agua debido a la destrucción mecánica que provocan en las raíces y a la consiguiente pérdida de biomasa funcional. Sin embargo, se reporta que las relaciones hídricas en la planta se ven afectadas en etapas tempranas de la infección, cuando el parasitismo aún no ha originado destrucción de tejidos ni ha reducido la relación raíz/parte aérea. El parasitismo origina interrupciones en la corriente transpiratoria, particularmente con nematodos que afectan a células ubicadas dentro del cilindro vascular. Como consecuencia, la conductividad hidráulica disminuye en las raíces, tal como lo confirman estudios llevados a cabo en *Meloidogyne* spp. (Meon *et al.*, 1978; Wilcox-Lee y Loria, 1986). Las alteraciones en la relación agua-planta a nivel radical se traducen en desórdenes hídricos que se evidencian en la parte aérea, como la caída del

potencial hídrico de las hojas y alteraciones en los valores normales de conductividad estomática, transpiración y eficiencia hídrica (Manzanilla-López *et. al*, 2004).

Otra función del sistema radical que sufre el efecto perjudicial del parasitismo de los nematodos es la nutrición mineral. La magnitud de la alteración varía ampliamente de acuerdo con la especie de nematodo, el hospedante, las condiciones ambientales y el tiempo transcurrido desde el comienzo de la infección (Hussey, 1985; Melakerberhan y Webster, 1993). La reducción en la absorción de nutrientes minerales obedece fundamentalmente a que la superficie activa para la misma se ve reducida tanto por el daño mecánico directo, como por la disminución de emisión de raíces laterales y la elongación de las ya existentes. El perjuicio causado por los nematodos a la nutrición mineral no se restringe al proceso de absorción, sino que afecta igualmente a la traslocación de los mismos hacia la parte aérea. Este fenómeno es particularmente notable en el caso de aquellas especies que se alojan en el cilindro vascular, como, *Meloidogyne* spp. (Hussey y Williamson, 1998).

En algunos casos, esta circunstancia determina un comportamiento diferencial entre los diversos elementos minerales esenciales y un desajuste entre los mismos. Así, aquellos nutrientes cuya vía de traslocación es preferentemente simplástica, sufren de manera particular este efecto y terminan, de esta manera, concentrándose en la raíz y haciendo sentir su deficiencia en la parte aérea. Esto permitiría explicar por qué N y K son elementos particularmente sensibles al parasitismo por nematodos noduladores, según se demuestra en diversas investigaciones. Sin embargo, otros elementos como Ca^{2+} , no se ven tan afectados o incluso se ven favorecidos en términos proporcionales comparados con otros elementos (Melakerberhan *et. al*, 1985, 1987).

Wallace (1987), adoptando un punto de vista sistémico para el problema, sugiere que las alteraciones provocadas modifican el proceso regulador que deriva en la estabilidad u homeostasis, característica de las plantas sanas. La alteración en determinados procesos normales desata reacciones en las rutas metabólicas y mecanismos fisiológicos que tienen lugar a continuación y dependen de ellos (efecto cascada).

El parasitismo de los nematodos causa efectos perjudiciales igualmente sobre la fotosíntesis (Melakerberhan y Webster, 1993; Hussey y Williamson, 1998). La

reducción en la cantidad total de CO₂ asimilado ha sido demostrada en patosistemas que involucran a nematodos noduladores como *M. javanica* (Loveys y Bird, 1973; Meon *et al.*, 1978), *M. incognita* (Melakerberhan *et al.*, 1985; Melakerberhan y Ferris, 1989; Melakerberhan *et al.*, 1990;). Por otra parte se comprobó que la reducción en la asimilación de CO₂ es proporcional a la duración de la infección y a la densidad de inóculo empleada (Melakerberhan *et al.*, 1986).

Al no existir un contacto directo entre el nematodo y los órganos aéreos involucrados en la fotosíntesis es de suponer que la reducción en la producción neta de fotoasimilados responde a mecanismos indirectos, esto es, que existen procesos intermedios cuya alteración es la que determina, en última instancia, la disfunción de la fotosíntesis normal. La reducción en la función fotosintética obedece, entre otras razones, a la reducción del área foliar (Poskuta *et al.*, 1986), a una menor concentración de clorofila como consecuencia del déficit de N (Melakerberhan *et al.*, 1985) y a la reducción de las tasas de intercambio gaseoso como consecuencia del estrés hídrico y alteraciones en la función estomática normal (Fatemy *et al.*, 1985; Saeed *et al.*, 1997).

2.2 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Meloidogyne* spp.

2.2.1 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

La identificación clásica de especies del género *Meloidogyne* está basada en caracteres morfológicos y morfométricos. El procedimiento más frecuente para su identificación es el estudio del patrón perineal en la región posterior del cuerpo de los especímenes hembras. Esta región comprende el área de la vulva-ano (el perineo), el término de la cola, fasmidios, líneas laterales, y estriaciones cuticulares circundantes (Hunt y Handoo, 2009).

Chitwood en 1949, fue el primero en indicar que los patrones perineales de poblaciones puras de *M. incognita* y *M. javanica* sufrían variaciones morfológicas bajo la influencia de factores como el hospedante. Es por ello que también son utilizadas características morfológicas de la región cefálica y estilete de la hembra, macho y segundo estado juvenil; y forma y tamaño de la cola del segundo estado juvenil. (Hirschmann, 1985; Eisenback, 1985; Eisenback y Hirschmann, 1991). Sin embargo los caracteres del segundo estado juvenil son suplementarios y generalmente no son utilizados en la identificación rutinaria de especies (Magunacelaya y Dagnino, 1999).

El tamaño de los nematodos fitoparásitos hace necesario el empleo de un microscopio óptico compuesto para su observación y medición; así como para la realización de esquemas y fotografías de los especímenes y sus estructuras. También se utiliza el microscopio electrónico de rastreo o barrido, como una herramienta de trabajo para el diagnóstico, ya que permite ver con mucha más claridad algunos detalles morfológicos que son imprecisos utilizando el microscopio óptico compuesto; incluso permiten evidenciar diferencias morfológicas entre poblaciones o razas de diferentes especies. Entre los caracteres morfológicos más importantes revelados por el microscopio electrónico de rastreo se encuentran los de la región cefálica en hembras, machos y juveniles, así como detalles de las estructuras que se presentan en la cutícula y región de la cola en hembras y machos (Rodríguez, 2000).

El estudio de los caracteres morfológicos y su descripción va acompañado de dimensiones y radios (cocientes), establecidos y complementados con parámetros señalados por varios autores a lo largo de los últimos años. Sin embargo, debe considerarse que una población no debe identificarse únicamente con medidas, debido a que éstas pueden ser variables e incluso pueden sobreponerse entre especies (Eisenback *et al.*, 1983).

2.2.2 PRUEBA DE HOSPEDANTES DIFERENCIALES

La prueba de hospedantes diferenciales otorga una indicación preliminar de la especie de *Meloidogyne* spp.; al comparar su capacidad de desarrollo con el cuadro de respuesta típica de las plantas hospedantes. Con esta prueba puede detectarse también variaciones en el comportamiento parasítico y la capacidad patogénica dentro de poblaciones de una especie dada; al observarse respuestas, significativamente diferentes a la típica (Eisenback *et al.*, 1983).

La determinación se basa en la respuesta de la población que se encuentra en estudio a seis hospedantes (*Nicotiana tabacum* L. cv NC-95; *Gossypium hirsutum* L. cv. Deltapine 16; *Capsicum annun* L. cv. California Wonder; *Citrullus vulgaris* Schard cv. Charleston Gray; *Arachis hypogaea* L. cv. Florunner, *L. esculentum* Mill. cv. Rutgers) (Taylor y Sasser, 1983).

Se debe considerar que los resultados no pueden ser interpretados como el establecimiento de un rango de hospedantes para estas especies y razas, ya que la

resistencia del nematodo en diferentes cultivares varia ampliamente y evaluar todos los cultivares de cualquier cultivo sería muy difícil. No se puede afirmar que una especie determinada del nematodo nunca se reproduce en determinada especie de planta (Taylor y Sasser, 1983; Eisenback *et al.*, 1983).

Esta prueba tiene restricciones con respecto a la identificación de nuevas especies, ya que puede tratarse de una especie para la cual no hay información, o la que hay es muy limitada. Sin embargo, su aplicación es útil para identificar las cuatro especies más comunes y sus razas (Eisenback *et al.*, 1983).

2.2.3 ANÁLISIS ELECTROFORÉTICOS DE PROTEÍNAS E ISOENZIMAS

Hussey (1979) y Esbenschade y Triantaphyllou (1985) describieron metodologías para identificar especies de *Meloidogyne* spp. mediante electroforesis de proteínas e isoenzimas. Estos fueron los primeros métodos moleculares aplicados en nematología. En los últimos años Carneiro *et al.* (2000) y Xu *et al.* (2004), evaluaron poblaciones mediante análisis de isoenzimas, reportando 18 y 5 fenotipos de esterasas respectivamente.

Los extractos solubles de proteínas son separados en gel de poliacrilamida bajo un campo eléctrico de acuerdo a su diferente masa molecular (PAGE). La electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2-D- PAGE) puede también ser usada para una mejor separación. En este caso las proteínas son separadas en la primera dimensión de acuerdo a su punto isoeléctrico y en la segunda de acuerdo a su masa molecular. Los perfiles electroforéticos de isoenzimas, particularmente de esterasas EST (EC 3.1.1.1) y malato deshidrogenasa MDH (EC 1.1.1.37) son diferentes para cada especie. También se usan perfiles de super óxido dismutasa SOD (1.15.1.1) glutamato-oxalacetato transaminasa GOT (EC 2.6.1.1) (Karssen y Moens, 2006; Subbotin y Moens, 2006; Blok y Powers, 2009).

Esta metodología es muy sensible, siendo necesaria una sola hembra joven. La comparación de perfiles electroforéticos de esterasas muestra gran consistencia para distinguir especies de *Meloidogyne* spp, sin embargo los perfiles de malato deshidrogenasa ayudan en la identificación cuando los perfiles de esterasas son similares, como por ejemplo, con *M. incognita* y *M. hapla* (Williamson, 1991). Algunas

especies, como *M. arenaria*, muestran varios perfiles diferentes, aunque esto puede indicar de la existencia de especies crípticas (Hunt y Handoo, 2009).

2.2.4 ANÁLISIS MOLECULAR DE ÁCIDOS NUCLEICOS

a. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En los últimos años, los avances en biología molecular y el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por Mullis en el año 1986, han facilitado el análisis del genoma de los organismos, permitiendo una identificación y diagnóstico rápido y preciso de los mismos (Louws *et al.*, 1999). Los análisis basados en PCR son específicos, muy sensitivos y permiten el estudio de un número considerable de muestras en menor tiempo que los métodos morfológicos (Michailides *et al.*, 2005).

La PCR consiste en un método que permite multiplicar exponencialmente un pequeño fragmento de ADN, con el objetivo de incrementarlo hasta niveles detectables, es un procedimiento experimental que reproduce en el laboratorio un proceso esencial en la vida de la célula; la replicación del material genético. Requiere de un molde de ADN (material de partida) que contiene la región a amplificar, iniciadores o cebadores que flanquean la región de ADN patrón que se desea amplificar, la ADN polimerasa termoestable (*Taq* polimerasa o PfuI) y cuatro trifosfatos desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), para la síntesis de las cadenas complementarias, cofactores como el Mg^{2+} y un amortiguador de reacción que optimizan la actividad de la ADN polimerasa (García, 2006).

Un iniciador está formado por una pequeña secuencia de oligonucleótidos (15-30 nucleótidos), que se utiliza en la síntesis de ADN en la PCR. Esta secuencia encuentra y se une a su complemento en una de las bandas molde, lo cual permite que la ADN polimerasa encuentre un lugar en donde iniciar la extensión o elongación de la molécula de ADN. Los iniciadores pueden ser específicos a una secuencia de ADN o pueden ser universales. Los iniciadores universales son complementarios a secuencias de nucleótidos que son muy comunes en un grupo particular de moléculas de ADN, de este modo, son capaces de unirse con una variedad de ADN de diferentes especies. Los iniciadores correspondientes sólo a determinadas especies son llamados iniciadores específicos. Cuando las secuencias de las regiones del fragmento amplificado se desconocen, la técnica puede ser aplicada con iniciadores degenerados, conteniendo una

serie de opciones en varias posiciones en la secuencia que permite la amplificación de una variedad de secuencias relacionadas (Veilleux, 2004; Subbotin y Moens, 2006).

El procedimiento consiste en una sucesión de tres pasos determinado por las condiciones de temperatura: (a) desnaturalización (94-96 °C durante 3-4 min.), (b) alineamiento/unión del iniciador (55-60 °C durante 1-2 min.) y (c) extensión/elongación de la cadena de ADN (70-72 °C durante 1-2 min.). Se lleva a cabo por 30-40 ciclos. Como resultado de la PCR, una molécula única de ADN se amplifica en más de un billón de copias. Los productos amplificados resultantes se separan por electroforesis según su tamaño en geles de poliacrilamida o agarosa y se visualizaran con bromuro de etidio o algún otro colorante, que interactúa con el ADN de doble cadena y hace que se presenten fluorescencia bajo rayos ultravioleta (Subbotin y Moens, 2006).

b. Empleo de biología molecular en la identificación de especies de *Meloidogyne* spp.

El primer método para la identificación de *Meloidogyne* spp. basado en PCR utilizando enzimas de restricción, se informó por Harris *et al.* (1990), donde se logró amplificar con éxito el ADN mitocondrial de especímenes aplastados en una gota de agua estéril y luego añadidos a la reacción de PCR. Posteriormente Powers y Harris (1993), diseñaron iniciadores para amplificar la región ITS del gen mitocondrial que codifica para citocromo oxidasa subunidad II y el gen rRNA 16S y los utilizó para identificar *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla* y *M. chitwoodi*.

Desde 1994, Powers y Harris señalaron que los métodos moleculares tendrían un impacto en la sistemática de los nematodos. En la actualidad la aplicación de la sistemática molecular ha ayudado a resolver inconsistencias en la clasificación morfológica y filogenia de estos organismos (Dorris *et al.*, 1999).

Hasta la fecha, los métodos moleculares basados en PCR, para la identificación de especies de *Meloidogyne*, incluyen en uso de regiones objetivos como: ADNmt (ADN mitocondrial) (Powers y Harris, 1993; Stanton *et al.*, 1997; Tigano *et al.*, 2005; Powers *et al.*, 2005), ADNr (ADN ribosómico o ribosomal,) con perfiles de la región ITS (espaciador transcrito interno) (Zijlstra, 1995, 1997; Zijlstra *et al.*, 1997), región IGS (espaciador intergénico) (Blok *et al.*, 1997; Peterson *et al.*, 1997; Wishart *et al.*, 2002) y secuencias de genes 18S, 5.8 y 28S del ADNr. Lo métodos incluyen el uso de RFLP

(polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción) (Xu *et al.*, 2004), RAPD (amplificación aleatoria de ADN polimórfico) (Tigano *et al.*, 2010), AFLP (polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados) (Semblat *et al.*, 1998), sondas de ADN microsatélite y satélite (De Luca *et al.*, 2002, Castagnone-Sereno *et al.*, 1999), LAMP (Amplificación isotérmica mediada por lazo) (Niu *et al.*, 2011), multiplex PCR (Randing *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2011), iniciadores específicos SCAR (secuencias caracterizadas de la región amplificada) (Zijlstra, 2000; Zijlstra *et al.*, 2000; Randing *et al.*, 2002; Tigano *et al.*, 2010) y PCR en tiempo real (Zijlstra y van Hoof, 2006; Toyota *et al.*, 2008; Berry *et al.*, 2008; De Weerd *et al.*, 2011).

La estrategia mediante RFLP, consiste en la amplificación de una región conservada del genoma (presente en todas las especies) y su posterior digestión con enzimas de restricción que revelan las diferencias entre las especies. Esto trae como resultado una serie de fragmentos de ADN que pueden ser ordenados por su tamaño y visualizados en un gel, a través de electroforesis. Se obtiene un patrón de digestión característico para cada especie. Un trabajo pionero con esta metodología fue el realizado por Curran *et al.* (1985, 1986), donde el ADN fue aislado a partir de un gran número de huevos del nematodo.

Métodos más recientes basados en la PCR han utilizado iniciadores que distinguen a especies sin una etapa posterior de digestión. Los marcadores moleculares RAPDs son obtenidos tras la amplificación por PCR de segmentos al azar del ADN, utilizando secuencias arbitrarias de oligonucleótidos iniciadores. Williamson *et al.* (1997) sintetizaron iniciadores de PCR derivados de las secuencias RAPD, posteriormente esta técnica fue usada por Zijlstra (2000) y Zijlstra *et al.* (2000), quienes identificaron y secuenciaron fragmentos RAPD de *M. chitwoodi*, *M. fallax*, *M. hapla*, *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* para, a partir de éstos, diseñar iniciadores específicos SCAR. Algunas especies ya han sido sometidas a procesos de clonación y secuenciación, lo que ha permitido diseñar iniciadores específicos. Un iniciador SCAR es un marcador molecular obtenido por la conversión de un único producto del ADN polimórfico amplificado al azar en un sitio de secuencia marcada. Diversos iniciadores específicos SCAR han sido desarrollados por diferentes investigadores (Randing *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2001; Meng *et al.*, 2004; Tigano *et al.*, 2010).

En un comienzo se usó RFLP de secuencias amplificadas del ADNmt en la identificación de especies de *Meloidogyne* (Powers y Harris, 1993). En la actualidad el empleo de regiones del ADNr se está convirtiendo en la herramienta más utilizada para la identificación de especies (Zijlstra *et al.*, 1997).

Un mapa estructural del genoma mitocondrial del género *Meloidogyne* fue publicado por Okimoto *et al.* (1991) (Figura 1). El mapa mostró la ubicación de 12 genes codificadores de proteínas, genes de ARNr (ARN ribosomal), y ARNt (ARN de transferencia). El ADNmt proporciona una rica fuente de marcadores genéticos para la identificación. El contenido de genes conservados entre los genomas mitocondriales permite comparar enfoques experimentales similares a través de filos muy divergentes. El Consorcio para el código de barras de la vida, ha aprovechado estas características mitocondriales proponiendo una iniciativa mundial en la que todas las especies conocidas tienen un “código de barras” de la secuencia de ADN de la subunidad citocromo oxidasa I (COI). Otra región del genoma mitocondrial de *Meloidogyne* susceptible al desarrollo de técnicas de diagnóstico es la porción del genoma flanqueado por el gen COII y la porción 5' del ARNr 16S (Powers y Harris, 1993). También se reporta a la región de repetición de 63 pb, la cual ha sido utilizada para la caracterización de especies de *Meloidogyne* spp. (Stanton *et al.*, 1997; Lunt *et al.*, 1998; Blok *et al.*, 2002; Brito *et al.*, 2004).

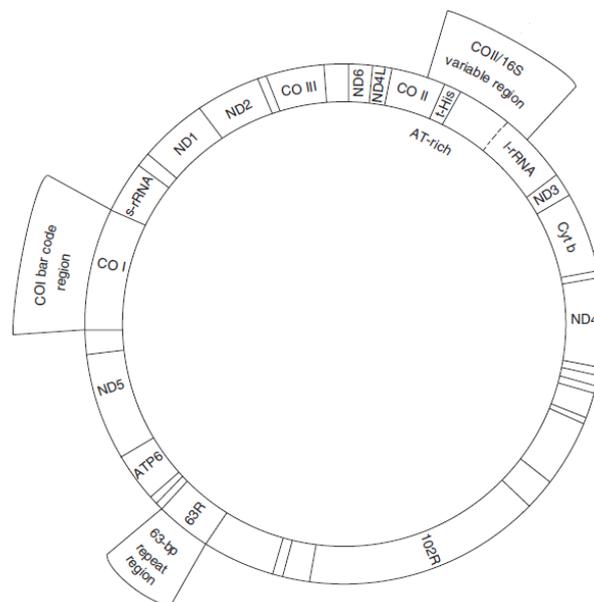


Figura 1: Estructura del genoma mitocondrial de *Meloidogyne*, mostrando las regiones más utilizadas para su identificación (Okimoto *et al.*, 1991).

La familia multigénica del ADNr, está conformada por muchas copias de genes que codifican para los componentes ribosomales: 5.8S, 18S y 28S. En la mayoría de los eucariotas, la organización 5' a 3' de esta familia de genes consiste en un espaciador transcrito externo (ETS), el gen 18S (SSU), un espaciador transcrito interno (ITS1), el gen 5.8S, un ITS2, el gen 28S (LSU) y el espaciador intergénico (IGS). La región IGS es seguida por otra copia de la familia génica (García, 2006; Blok y Powers, 2009), dentro de la región IGS se encuentra el gen 5S (Wishart *et al.*, 2002) (Figura 2).

El gen 18S consiste en la subunidad ribosomal pequeña (SSU), mientras que el gen 28S consiste en la subunidad ribosomal grande (LSU). La SSU nuclear del ADNr es una de las regiones de ADN más conservadas, por lo cual han resultado útiles en la reconstrucción de ramas filogenéticas, incluyendo reinos, filos, clases y órdenes. El grado de conservación nucleotídica del gen 5.8S, el más pequeño de la familia de ADNr, es similar al de la SSU, pero su tamaño es muy pequeño como para contener información filogenética de peso, por esta razón es menos recomendable utilizar este gen para análisis moleculares. La LSU nuclear del ADNr es mucho más larga y muestra más variación, comparándola con el gen 18S, ha demostrado ser útil en el estudio de relaciones filogenéticas en niveles bajos de categoría, como órdenes o familias. Las regiones espaciadoras ITS e IGS, son reportadas para niveles aún más bajos como género, especie y poblaciones (Hwang y Kim, 1999). Recientemente se ha llevado a cabo la diferenciación de especies difíciles de distinguir mediante la comparación de sus secuencias 18S y D2/D3, que es una región variable dentro del gen 28S (Landa *et al.*, 2008).



Figura 2: Diagrama esquemático de la familia multigénica del ADN ribosomal (ADNr) (Blok *et al.*, 1997; Wishart *et al.*, 2002).

Las copias adyacentes de la unidad repetitiva ADNr se encuentran separadas por la región IGS, la cual generalmente es más variable que la ITS y contiene a menudo elementos subrepetitivos, los cuales se piensa que funcionan como aumentadores de la transcripción (Wishart *et al.*, 2002).

Las regiones espaciadoras del ADNr nuclear evolucionan mucho más rápido que las regiones codificantes. Por otro lado, las variaciones en las regiones codificantes del ARNr son mucho más conservadas, ya que una mutación en alguna de estas regiones podría evitar la construcción efectiva de los ribosomas, lo cual afectaría de forma negativa la maquinaria de la síntesis proteica (Hwang y Kim, 1999; Subbotin *et al.*, 2005).

Este arreglo de genes muy conservados y regiones espaciadoras menos conservadas es lo que ha hecho de estos genes un objetivo muy utilizado, ya que permite el diseño de iniciadores universales en secciones de secuencias conservadas, y estos iniciadores pueden utilizarse para amplificar fragmentos homólogos, tanto de especies distantes como de especies estrechamente relacionadas (García, 2006; Blok y Powers, 2009).

También se ha utilizado la secuencia que traduce a la proteína de choque térmico 90 (Hsp90) para la diferenciación de algunas especies de *Meloidogyne* spp., esta proteína es muy conservada y se produce frente a un medio ambiente desfavorable o de estrés (Skantar *et al.*, 2004; Handoo *et al.*, 2005).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del laboratorio de Nematología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) y laboratorio e invernadero de Nematología de la Unidad del Centro de Diagnóstico de Sanidad Vegetal del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), donde se mantuvo las poblaciones aisladas de *Meloidogyne* y se llevó a cabo la identificación morfológica y laboratorio de Biología Molecular del Centro de Diagnóstico de Sanidad Vegetal del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), donde se llevó a cabo la identificación por técnicas moleculares.

3.2 COLECCIÓN DE MUESTRAS

La colecta de muestras se realizó en diferentes departamentos del Perú con ayuda de una lampa de mano y cuando el suelo se encontraba en capacidad de campo. Estas muestras consistieron en raíces y suelo infestado con *Meloidogyne* spp. En el Cuadro 1 y Figura 3, se muestra los cultivos y lugares donde se realizó la colecta de las muestras.

Cuadro 1: Cultivos y lugares de colecta de muestras para la identificación de especies de *Meloidogyne* spp. por métodos morfológicos y PCR.

Po	Co	Cultivo	Departamento	Provincia	Localidad
1	2	<i>Hypericum sp.</i>	Ancash	Yungay	Yungay
2	3	<i>Solanum tuberosum</i>	Apurímac	Chincheros	Uranmarca
3	5	<i>Capsicum annuum</i> (Piquillo)	Arequipa	Caylloma	Majes
4	10	<i>Capsicum annuum</i> (Pimiento)	Ica	Ica	Villacurí
5	11	<i>Capsicum annuum</i> (Pimiento)	Ica	Ica	Arrabales
6	13	<i>Pisum sativum</i> (Holantao)	Ica	Ica	Arrabales
7	14	<i>Capsicum annuum</i> (Pimiento)	Ica	Ica	Los Aquijez
8	15	<i>Capsicum annuum</i> (Pimiento)	Ica	Ica	Pachacutec
9	17	<i>Musa acuminata</i>	Junín	Chanchamayo	San Luis de Shuaro
10	19	<i>Pisum sativum</i>	La Libertad	Santiago de Chuco	Santiago de Chuco
11	20	<i>Passiflora edulis</i>	La Libertad	Virú	Virú
12	21	<i>Capsicum annuum</i> (Piquillo)	Lambayeque	Lambayeque	Olmos
13	25	<i>Capsicum baccatum</i>	Lima	Huaura	Huacho
14	26	<i>Cucurbita maxima</i>	Lima	Lima	La Molina
15	27a	<i>Capsicum baccatum</i>	Lima	Barranca	Barranca
16	28	<i>Solanum tuberosum</i>	Lima	Cañete	San Benito
17	29	<i>Solanum tuberosum</i>	Lima	Barranca	Barranca
18	30	<i>Capsicum baccatum</i>	Lima	Cañete	Imperial
19	31	<i>Lycopersicon sculentum</i>	Lima	Lima	Ate Vitarte
20	33	<i>Olea europea</i>	Tacna	Tacna	Inclán
21	34	<i>Musa acuminata</i>	Tumbes	Tumbes	Pampas de Hospital
22	35	<i>Musa acuminata</i>	Tumbes	Tumbes	Corrales
23	37	<i>Lycopersicon sculentum</i>	La Libertad	Trujillo	Laredo
24	38	<i>Theobroma cacao</i>	Huánuco	Leoncio Prado	Rupa-Rupa
25	39	<i>Capsicum annuum</i> (Pimiento)	Ancash	Casma	Casma
26	6	<i>Dathus caryophyllus</i>	Ayacucho	Huamanga	Tambillo
27	32a	<i>Vitis sp.</i>	Piura	Piura	Piura
28	22	<i>Nicotiana tabacum</i>	Lambayeque	Lambayeque	Lambayeque
29	23	<i>Vitis vinifera</i>	Lima	Cañete	Nuevo imperial
30	7	<i>Physalis peruviana</i> (Aguaymanto)	Cajamarca	Celendín	José Gálvez

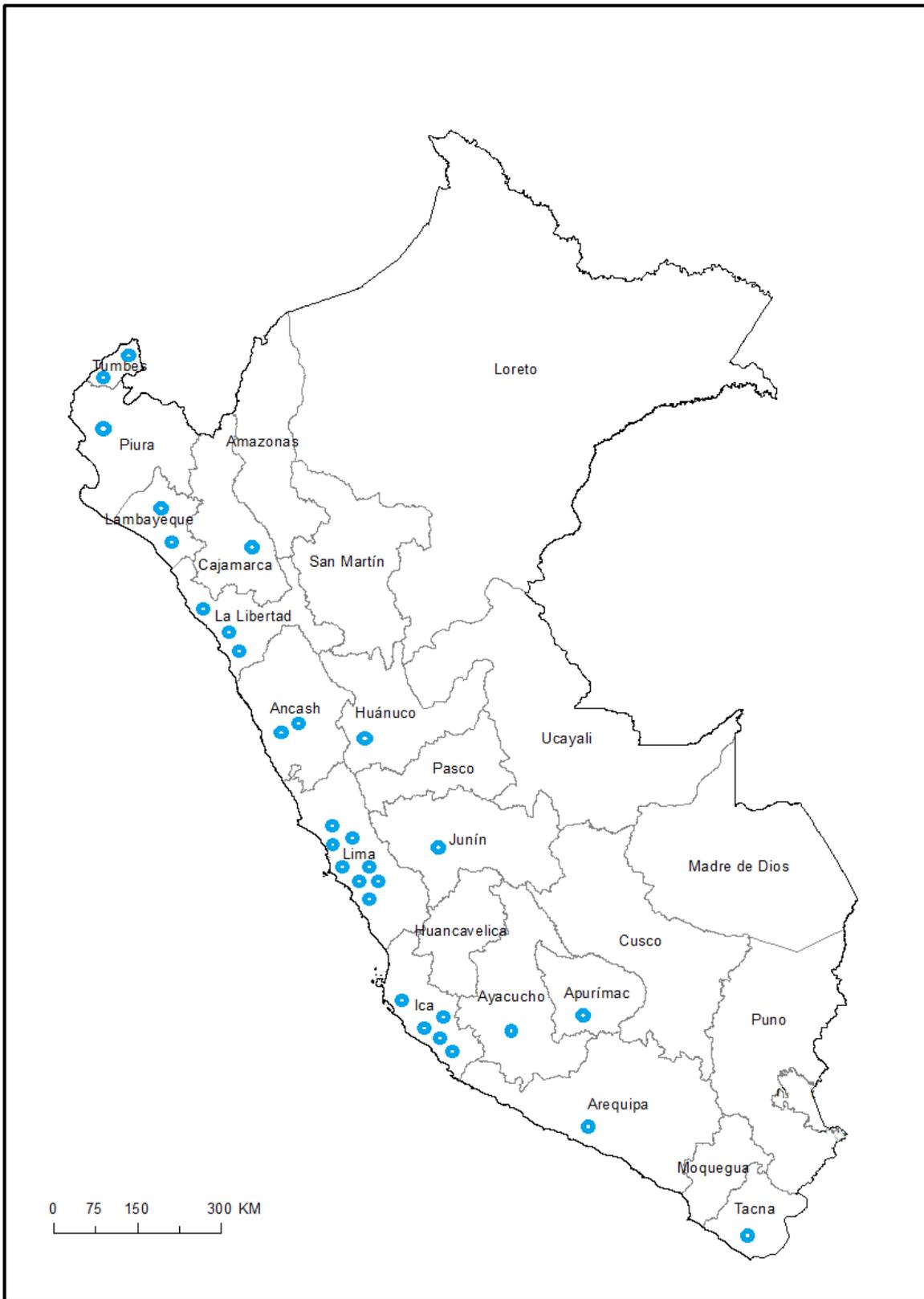


Figura 3: Lugares de colecta de muestras para la identificación de especies de *Meloidogyne* spp. por métodos morfológicos y PCR, ubicados referencialmente en mapa que muestra los departamentos del país.

3.3 MANTENIMIENTO DE PLANTAS DE TOMATE EN MACETAS CON SUELO INFESTADO

Se sembraron semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. Río Grande), en una mezcla de sustrato (turba inerte y arena, en proporción 1:1), previamente esterilizado en autoclave (121 °C; 1.1 atm. de presión durante 30 min.).

Después de aproximadamente dos semanas del establecimiento del semillero, las plántulas de tomate se seleccionaron conforme su vigor, tamaño y número de hojas y fueron trasplantadas a 30 macetas conteniendo las muestras de suelo colectado e infestado con el nematodo. Las macetas utilizadas (500 cc. de capacidad), fueron previamente lavadas y desinfectadas con hipoclorito de sodio (2.5 por ciento).

De esta manera se otorgó las condiciones necesarias para el desarrollo del ciclo completo del nematodo, con la producción final de masa de huevos.

3.4 ESTABLECIMIENTO DE POBLACIONES (A PARTIR DE UNA SOLA MASA DE HUEVOS)

Transcurridos aproximadamente 60 días del primer trasplante y al evidenciarse nodulación radicular, las raíces de tomate fueron removidas de las macetas y lavadas suavemente con agua de caño.

Cada población fue obtenida a partir de una sola masa de huevos. Para ello se inoculó una masa de huevos (por cada población) a plántulas de tomate, que fueron previamente sembradas en un sustrato esterilizado (turba inerte y arena, en proporción 1:1), contenido en vasos de plástico pequeños (50 cc. de capacidad) (Figura 4).

Transcurridos aproximadamente 60 días de la inoculación y al evidenciarse nodulación radicular, las raíces de tomate fueron removidas de los vasos de plástico y lavadas suavemente con agua de caño. Posteriormente, se repitió el procedimiento anterior inoculando nuevamente una masa de huevos a plántulas de tomate (2 veces).

Luego de dos semanas, las plántulas a las cuales se les realizó la segunda inoculación de una masa de huevos, fueron trasplantadas a macetas (500 cc. de capacidad) conteniendo sustrato esterilizado (tierra agrícola y arena, en proporción 1:1). Las macetas fueron rotuladas y mantenidas en invernadero, a una temperatura ambiental de (25 ± 4 °C) y una humedad relativa de 80-90 por ciento (Figura 5).

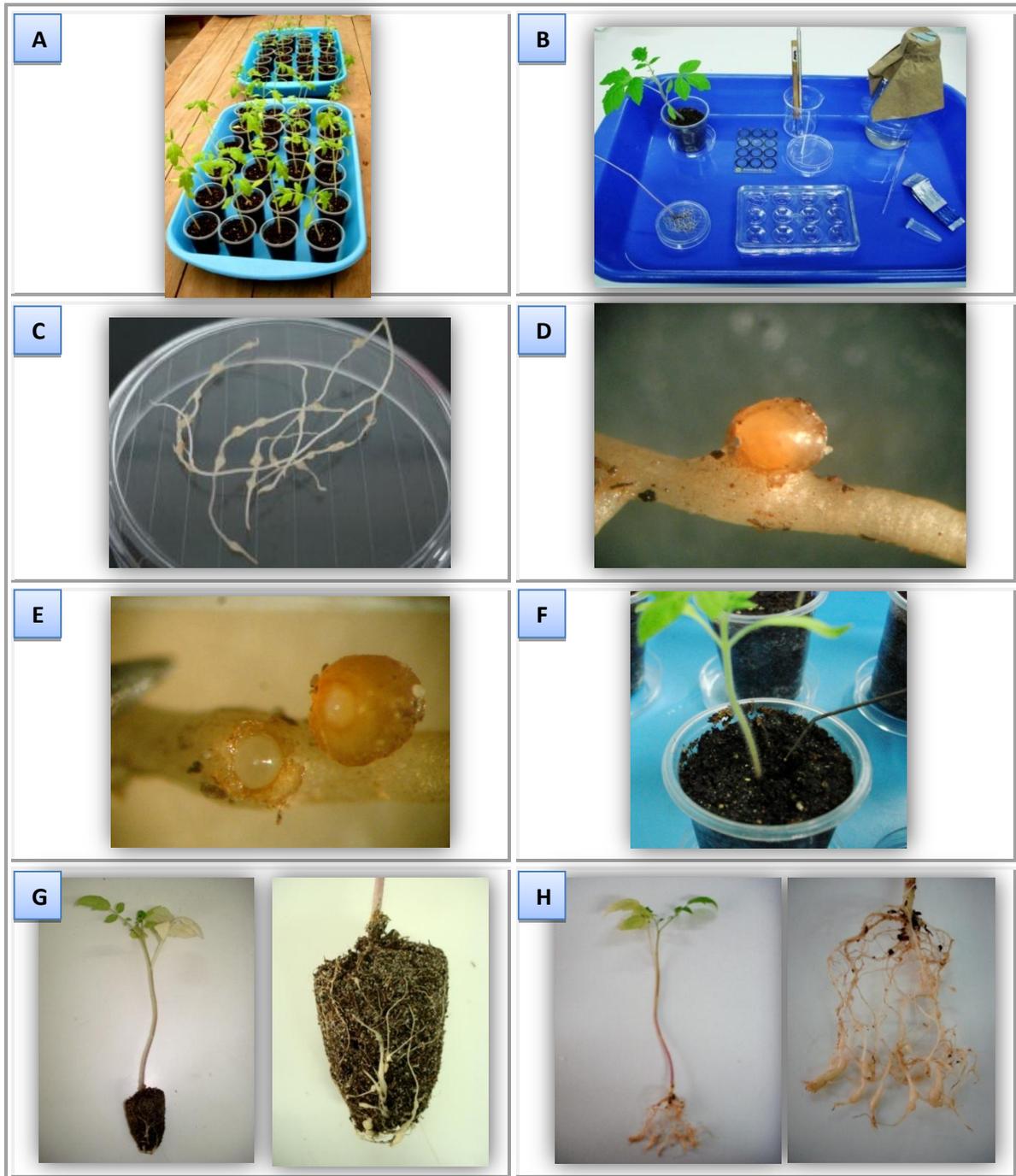


Figura 4: Extracción e inoculación de una masa de huevos de *Meloidogyne* a plántulas de tomate para la obtención de poblaciones aislada. A: Vasos de plástico conteniendo plántulas de tomates en sustrato estéril, B: Materiales utilizados en la extracción, C: Nodulación radicular ocasionada por el nematodo, D: Masa de huevos en raíz, E: Hembra y masa de huevos en raíz, F: Inoculación de masa de huevos extraída a plántula de tomate, G y H: Nodulación radicular observada en tomate inoculado, luego de 60 días.

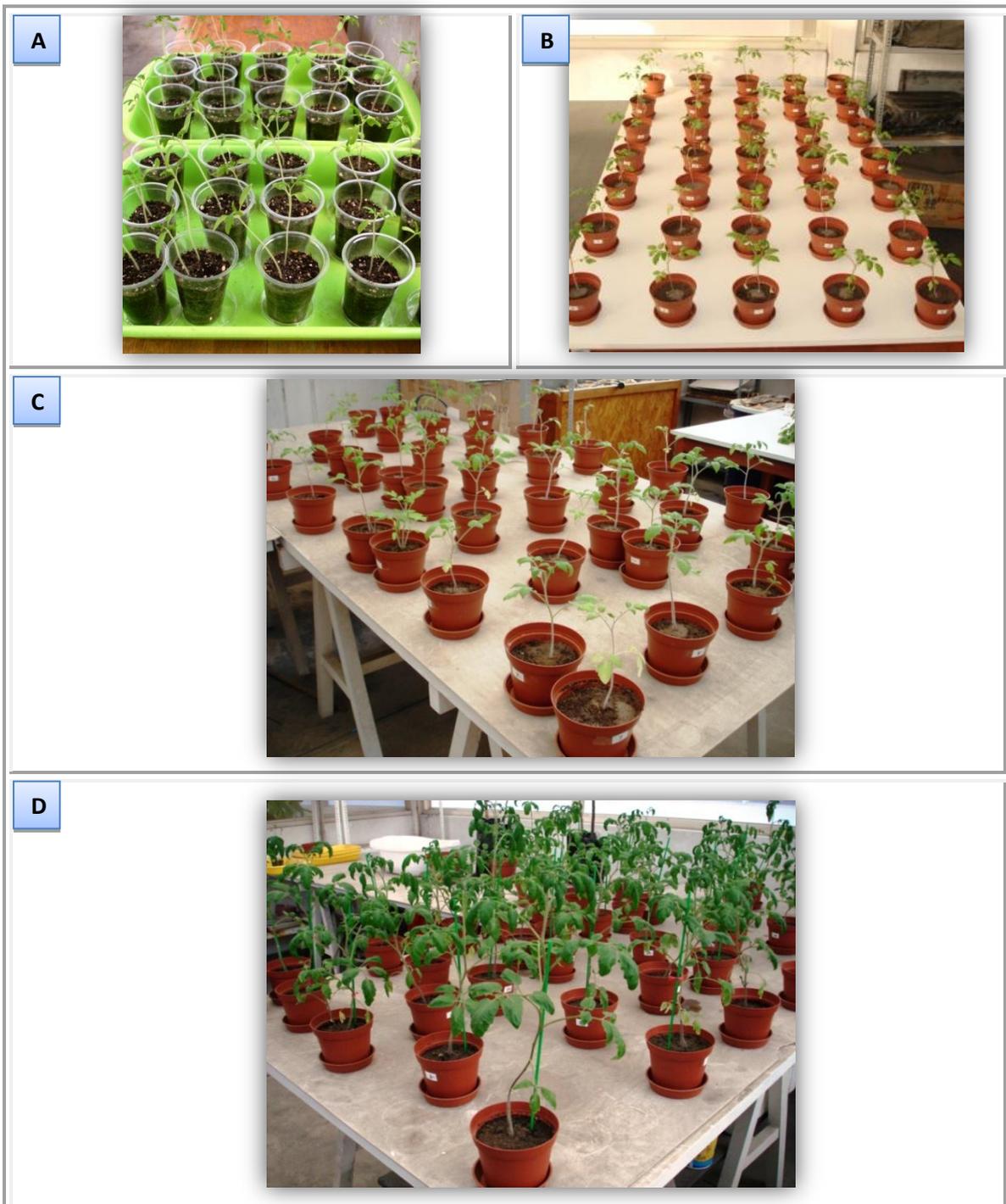


Figura 5: Poblaciones a partir de una sola masa de huevos de *Meloidogyne* spp., mantenidas en invernadero. A: Plántulas de tomate inoculadas con una masa de huevos (segunda repetición). B y C: Poblaciones a partir de una sola masa de huevos de *Meloidogyne* spp., luego de 28 días de trasplante de tomate, D: Poblaciones a partir de una sola masa de huevos de *Meloidogyne* spp., luego de 60 días de trasplante de tomate.

Al cabo de 60 días, las plantas fueron removidas de las macetas (Figura 6) y se procedió a la extracción de especímenes para la identificación morfológica y extracción de ácidos nucleicos para las pruebas moleculares.



Figura 6: Remoción de plantas de las macetas conteniendo las poblaciones a partir de una sola masa de huevos de *Meloidogyne* spp. A: Planta de tomate luego de 60 días de transplante, B: Remoción de raíces de planta de tomate, C y D: Nodulación radicular ocasionada por el nematodo.

3.5 EXTRACCIÓN Y MONTAJE DE HEMBRAS DE *Meloidogyne* spp.

Las raíces fueron lavadas cuidadosamente sumergiéndolas en un depósito conteniendo agua, evitando el desprendimiento de las masas de huevos.

Con la ayuda de un microscopio estereoscópico y agujas de disección se abrió el tejido afectado tratando de no dañar las hembras maduras, las cuales fueron transferidas a ácido láctico al 45 %, donde permanecieron por al menos 24 horas.

Se extrajo 10 hembras maduras con sus respectivas masas de huevos y se realizaron montajes de sus patrones perineales, los cuales fueron observados en microscopio óptico con 600 y 1200 aumentos.

Para la realización de los montajes del patrón perineal (Figura 7); con la ayuda del microscopio estereoscópico se ubicó el diseño perineal en la hembra madura y se procedió a cortarlo en forma rectangular. Los cortes perineales fueron colocados en un portaobjeto conteniendo una pequeña gota de glicerina; orientando la vulva del diseño hacia la parte superior del portaobjeto, así como la parte interior de la cubierta del cuerpo hacia abajo. Se colocó un cubreobjeto y se selló con esmalte de uñas, colocando las etiquetas con su código respectivo.

3.6 EXTRACCIÓN DE ESPECÍMENES MACHOS Y JUVENILES DE SEGUNDO ESTADO DE *Meloidogyne* spp.

La extracción de machos se realizó incubando 10 gramos de raíces infectadas con *Meloidogyne* spp., procedentes de las poblaciones aisladas; en agua de caño y propiciándoles aireación con una bomba de pecera pequeña. Luego, los especímenes fueron recogidos en tamiz de 500 mesh, y fueron observados en microscopio óptico con 100, 400, 600 y 1200 aumentos.

Para la extracción de juveniles de segundo estado, con ayuda de agujas de disección se separaron masas de huevos y se las colocó en agua de caño para propiciar la eclosión de huevos en juveniles, luego fueron observados en microscopio óptico con 100, 400, 600 y 1200 aumentos.



Figura 7: Extracción de espécimen hembra de *Meloidogyne* sp. y corte del patrón perineal, para su identificación morfológica. A y B: Separación de masa de huevos de la hembra madura del nematodo, C y D: Corte a nivel de cabeza del espécimen hembra y eliminación del material contenido dentro del cuerpo, E y F: Ubicación del patrón perineal en la parte posterior del espécimen hembra y corte en forma rectangular con el patrón perineal en el centro.

3.7 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE POBLACIONES DE *Meloidogyne* spp.

Las características usadas para la identificación de especies de *Meloidogyne* spp. se basaron principalmente en la morfología del patrón perineal de las hembras y la morfología de la cabeza de los especímenes machos que pudieron extraerse. La interpretación de estas observaciones se realizó según las características e ilustraciones descritas por varios autores (Eisenback *et. al*, 1983; Taylor y Sasser, 1983; Eisenback, 1985; Hunt y Handoo, 2009).

Los caracteres morfológicos del patrón perineal (Figura 8) usados en la identificación fueron: forma del diseño perineal (rectangular, circular, oval, piriforme, de reloj de arena, etc.), arco dorsal (alto, bajo redondeado, aplanado), líneas laterales (presentes o ausentes), forma de las estrías (finas, gruesas, cortas, quebradas, lisas, onduladas, en zigzag), hombreras (presentes o ausentes), puntuaciones al término de la cola (presentes o ausentes), alas en uno o a ambos lados del diseño (presentes o ausentes). Los caracteres particulares que permitieron llegar a una identificación de especies se mencionan en el Cuadro 2.

Para el caso de especímenes machos, los caracteres morfológicos y morfométricos (Figura 9) usados en la identificación fueron: forma del contorno del disco labial, forma de la cápsula y región cefálica y distancia desde el orificio de la glándula esofágica dorsal a la base del estilete (DGED). Los caracteres particulares de especímenes machos, que complementaron la identificación morfológica de especies, fueron los mencionados en el Cuadro 3.

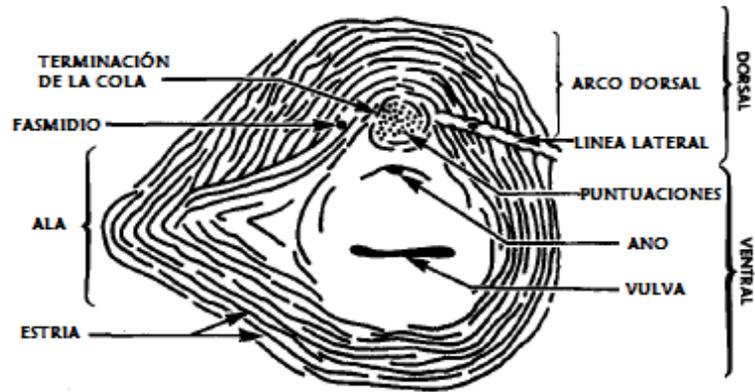


Figura 8: Morfología general del patrón perineal de un espécimen hembra de *Meloidogyne* spp. (Eisenback *et. al*, 1983).

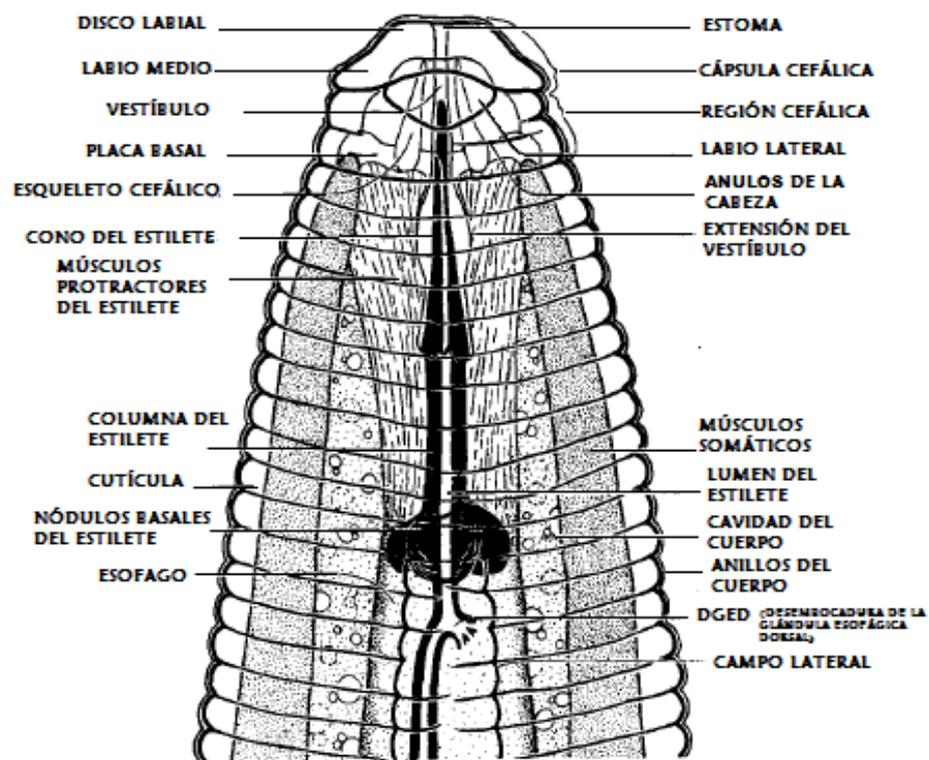


Figura 9: Vista lateral de la morfología básica de la cabeza y estilete de un espécimen macho de *Meloidogyne* spp. (Eisenback *et. al*, 1983).

Cuadro 2: Características usadas para la identificación de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla* basadas en el patrón perineal de la hembra en oviposición (Eisenback *et. al*, 1983).

Especie	<i>Meloidogyne incognita</i>	<i>Meloidogyne javanica</i>
Patrón perineal	Arco dorsal alto y cuadrado	Redondeado con arco dorsal bajo a moderadamente alto
Campo lateral	Sin líneas laterales claramente visibles	Líneas laterales claramente visibles formando doble incisuras
Estrías	Lisas a onduladas, moderadamente finas	Lisas a onduladas, moderadamente finas
Región perivulvar	Frecuentemente se observan estrías que se dirigen hacia la vulva	Frecuentemente se observan estrías que se dirigen hacia la vulva

Especie	<i>Meloidogyne arenaria</i>	<i>Meloidogyne hapla</i>
Patrón perineal	Arco dorsal de redondeado a aplanado	Varía de hexagonal casi redondeado a ovalo aplanado; arco dorsal generalmente es aplanado. Frecuentemente con puntuaciones en el área donde termina la cola.
Campo lateral	Sin líneas laterales claramente visibles	Las líneas laterales no son visibles, aunque pueden estar indicadas por ligeras irregularidades en las estrías o porque las estrías dorsales y ventrales se unen formando un ángulo
Estrías	Estrías dorsales y ventrales bifurcadas, uniéndose en ángulo en los campos laterales, estrías dorsales con ondulaciones pronunciadas, formando una “hombreira” en el arco. Se puede presentar estrías que se prolongan lateralmente para formar una o dos alas.	Lisas a onduladas. Algunas estrías pueden prolongarse lateralmente y formar una o dos alas
Región perivulvar	Algunas estrías se dirigen hacia la vulva	Algunas estrías se dirigen hacia la vulva

Cuadro 3: Características usadas para la identificación de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla* basadas en la cabeza de especímenes machos (Eisenback *et. al*, 1983, Eisenback, 1985).

	<i>Meloidogyne incognita</i>	<i>Meloidogyne javanica</i>
Cápsula cefálica	Plana a cóncava, el disco labial sobresale (más alto) sobre labios medios.	Alta, ancha y redondeada, separada de región de la cabeza, pero casi tan ancha que esta.
Región Cefálica	No separada, generalmente dos o tres anulaciones incompletas	No separada, lisa o generalmente dos o tres anulaciones incompletas
Longitud del estilete (µm)	23-25 (24)	18-22 (20)
Cono del Estilete	Punta roma	Punta aguda, cono recto
Columna (Eje) del Estilete	Cilíndrico, frecuentemente angosto cerca a los nódulos	Cilíndrico, frecuentemente angosto cerca a los nódulos
Nódulos basales del estilete	Separados, redondeados o transversalmente elongados	Separados, muy ensanchados
DGED (µm)	Corto 2-4 (3)	Corto 2-4 (3)

	<i>Meloidogyne arenaria</i>	<i>Meloidogyne hapla</i>
Cápsula cefálica	Baja, con declive hacia la parte posterior, ensanchada posteriormente	Alta y angosta en comparación con la región cefálica
Región Cefálica	No separada, lisa o generalmente 2 o 3 anulaciones incompletas	Separada del cuerpo, lisa
Longitud del estilete (µm)	20-25 (22)	Raza 1: 17-23 (20) Raza 2: 19-23 (21)
Cono del Estilete	Punta aguda, cono amplio y robusto.	Punta aguda, cono angosto y delicado
Columna (Eje) del Estilete	Cilíndrico, frecuentemente ensanchado cerca a los nódulos	Raza 1: Cilíndrico, ensanchado cerca a los nódulos Raza 2: Cilíndrico, angosto cerca a los nódulos
Nódulos basales del estilete	No separados, inclinado hacia atrás, fusionado con el eje	Pequeños y redondeados
DGED (µm)	Largo 4-7 (5.5)	Largo 4-6 (5)

3.8 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR MEDIANTE PCR DE POBLACIONES DE *Meloidogyne* spp.

3.8.1 EXTRACCIÓN DE ADN DE *Meloidogyne* spp.

Luego de realizar la identificación morfológica, se extrajeron especímenes hembras del nematodo, masas de huevos, de las cuales se obtuvieron juveniles de segundo estado y se tomó parte de raíces de las plantas a partir de las cuales se obtuvo el ADN para las pruebas moleculares.

a. Extracción de ADN a partir de juveniles de segundo estado (J2): Método de extracción de ADN usando buffer de lisis (Figura 10)

Se llevó a cabo la metodología reportada por McClure *et al.* (2012) y Williams *et al.* (1992), modificando los tiempos de incubación en el termociclador, ya que con un mayor tiempo a 60 °C y 95°C se obtuvieron productos de amplificación más nítidos en el gel, además de ello la cantidad de buffer empleado fue mayor (40 µl), lo cual permitió llevar a cabo mayor número de reacciones por muestra trabajada. Esta metodología se detalla a continuación:

- Se tomaron 40 µl de buffer de lisis (ANEXO 1) y se colocaron en un tubo pequeño.
- Se colocaron 10 µl de buffer de lisis sobre una lámina cubre objeto.
- Sobre la gota de buffer de lisis se colocaron 1 y 10 juveniles de segundo estado, los cuales fueron cortados por la mitad.
- Los nematodos cortados y el buffer de lisis fueron devueltos al tubo.
- Los tubos fueron congelados a - 20 °C por 15 minutos o más.
- Los tubos se colocaron en el termociclador a 60 °C por 60 minutos y luego para inactivar la proteinasa K a 95°C x 15 minutos.
- Se mantuvo en congelación a - 20 °C, hasta su uso.

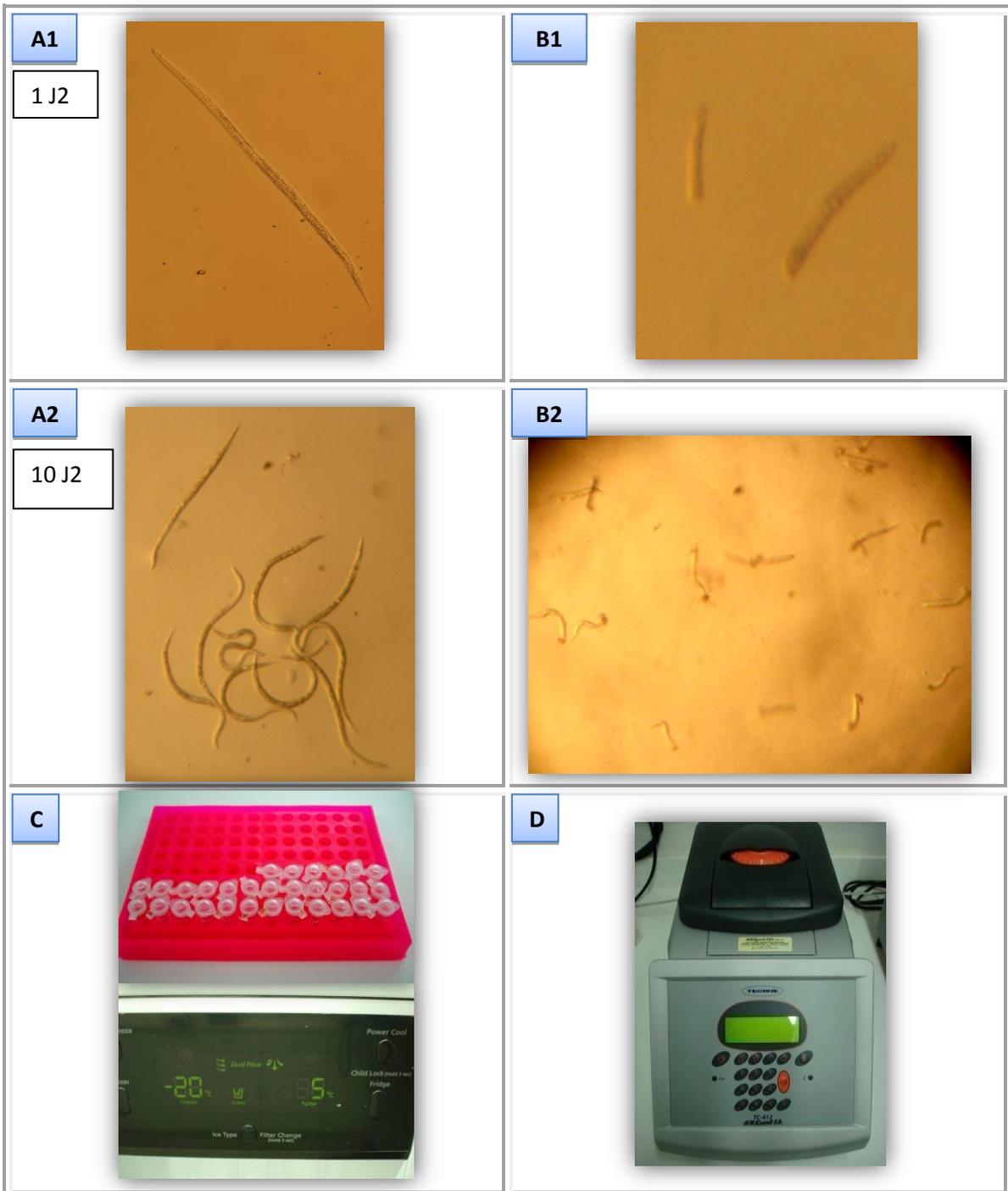


Figura 10: Método de extracción de ADN de Meloidogyne usando buffer de lisis. A1 y A2: Juveniles de segundo estado seleccionados para la extracción de ADN, B1 y B2: Juveniles de segundo estado cortados por la mitad, C: Tubos conteniendo buffer de lisis y especímenes cortados por la mitad, D: Termociclador utilizado para el proceso de incubación.

b. Extracción de ADN a partir de especímenes hembras: Método de extracción de ADN de Minipreparación (Figura 11)

Se llevó a cabo la metodología utilizada por Cenis (1992) y Karajeh *et al.* (2010), reemplazando el uso del triturador cónico por un tip sellado en su punta y obviándose el proceso de centrifugación y lavado de pellet previo a la incorporación del buffer. La metodología utilizada se detalla a continuación:

- Se colocó uno y 10 especímenes hembras en hipoclorito de sodio al 0.5 por ciento por pocos minutos y luego se lavaron con agua destilada estéril.
- Se colocaron 10 μ l de buffer de extracción (ANEXO 2) dentro de un tubo de 1.5 ml, donde los especímenes fueron aplastados.
- Se completó un volumen de 400 μ l del buffer de extracción y 10 μ l de β – mercaptoetanol (2.5 por ciento).
- Se agregó 0.5 volumen de acetato de sodio 3 M, pH 5.2 y se llevó a -20 °C.
- Se centrifugó a 13000 rpm por dos minutos, luego se tomó el sobrenadante y se lo colocó en otro tubo.
- Se agregó dos volúmenes de etanol absoluto frío (mantenido a -20°C) y se llevó a -20 °C por una hora.
- Se centrifugó a 14000 rpm por tres minutos, formándose un precipitado.
- Se lavó el pellet agregando etanol al 70 por ciento y posteriormente etanol absoluto.

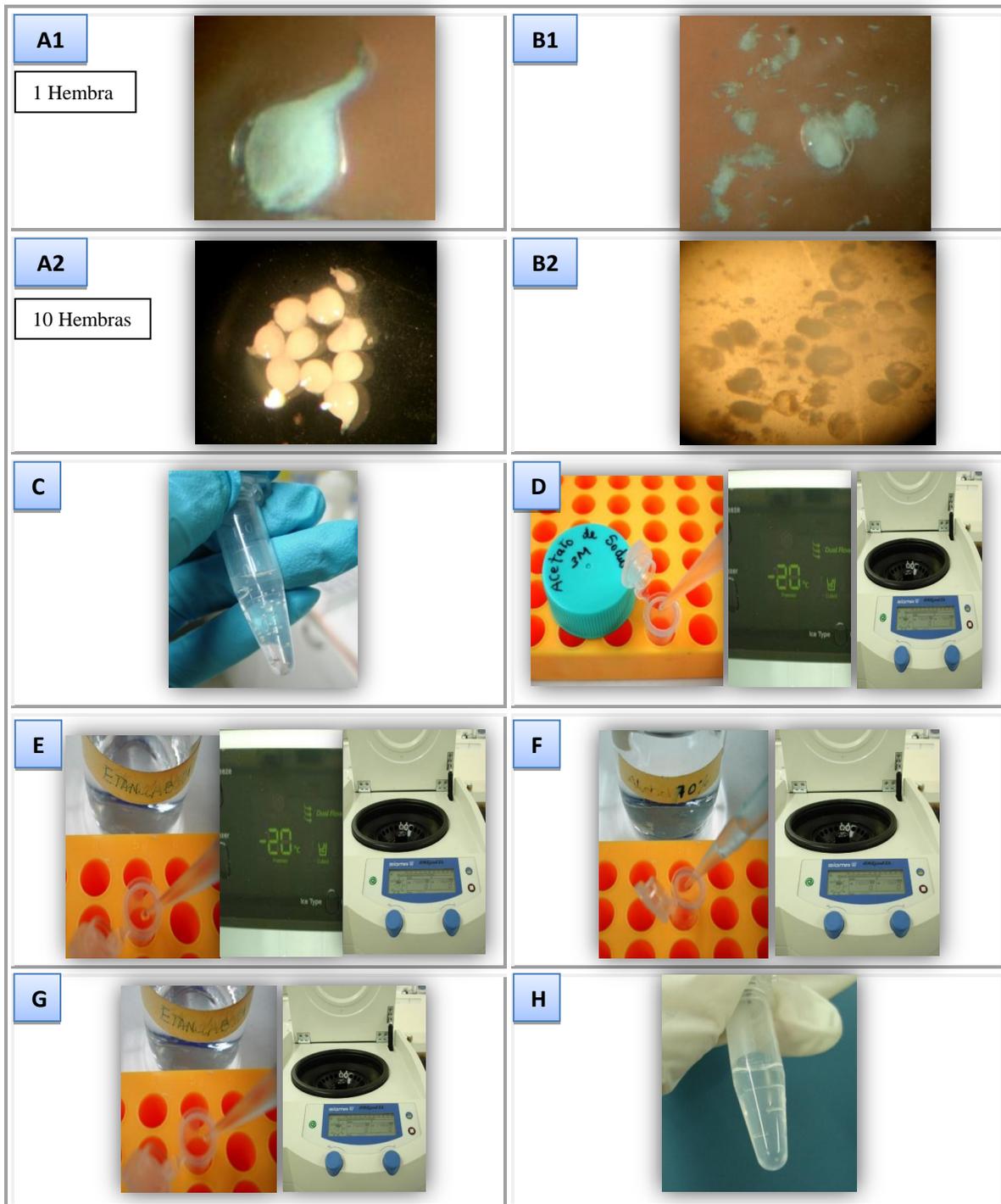


Figura 11: Extracción de ADN de Meloidogyne según método de Minipreparación. A1 y A2: Hembras maduras seleccionadas para la extracción de ADN, B1 y B2: Hembras maduras aplastadas con ayuda de un tip sellado en su punta, C: Tubo conteniendo buffer de minipreparación y especímenes aplastados, D: Incorporación de Acetato de Sodio 3M, incubación y centrifugación, E: Incorporación de etanol absoluto frío, incubación y centrifugación, F: Lavado de pellet conteniendo ADN con etanol 70 por ciento, G: Lavado de pellet conteniendo ADN con etanol absoluto, H: Pellet conteniendo ADN.

c. Extracción de ADN a partir de nódulos en raíces: Método de extracción de ácidos nucleicos CTAB según Doyle y Doyle (1987), modificado (Figura 12)

Se llevó a cabo la metodología utilizada por Doyle y Doyle (1987), modificando las cantidades de buffers, las cuales han sido validadas previamente e incorporando acetato de potasio 5M para ayudar a separar las proteínas denaturadas y polisacáridos de los ácidos nucleicos. La metodología utilizada se detalla a continuación:

- Se trituró las raíces en mortero con nitrógeno líquido y fueron colocadas en un tubo de 1.5 ml.
- Se agregó buffer 10X CTAB, buffer 2X CTAB (ANEXO 3), β – mercaptoetanol y proteinasa K, se agitó suavemente y se incubó por 45 minutos a 65 °C.
- Se agregó acetato de potasio 5 M y se llevó a -20 °C por 20 minutos, para luego centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos y tomar el sobrenadante.
- Se agregó cloroformo alcohol isoamílico y se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos, tomando el sobrenadante (se repitió dos veces).
- Se agregó isopropanol y se llevó a -20 °C por 20 minutos, para luego centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos.
- Se lavó el pellet con alcohol al 70 por ciento y alcohol absoluto.



Figura 12: Método de extracción de ácidos nucleicos CTAB modificado, a partir de nódulos radiculares. A: Trituración de nódulos radiculares con nitrógeno líquido, B: Incorporación de buffer CTAB, β -mercaptoetanol y proteinasa K e incubación, C: Incorporación de acetato de potasio 5M, incubación y centrifugación, D: Incorporación de cloroformo-alcohol isoamílico y centrifugación, E: Incorporación de isopropanol, incubación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y centrifugación, F: Lavado de pellet conteniendo ADN con alcohol 70 por ciento, G: Lavado de pellet conteniendo ADN con etanol absoluto, H: Secado de pellet a temperatura ambiente.

3.8.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

a. Controles positivos utilizados para la identificación de especies de *Meloidogyne*

Los controles positivos de *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* fueron proporcionados por la Dra. Vivian Blok del Instituto James Hutton, Escocia-Reino Unido en forma de ADN y el control positivo de *M. hapla* fue proporcionado por el Dr. Michael McClure de la Universidad de Arizona, Tucson-Arizona-USA como juveniles de segundo estado (10 individuos), a partir del cual se extrajo ADN por el método de extracción de lisis.

b. Estandarización de la técnica de PCR para la amplificación de los iniciadores evaluados

Se realizó una búsqueda de trabajos de investigación relacionados al diseño y validación de iniciadores específicos para la detección de especies de *Meloidogyne*. Los iniciadores evaluados se indican en el Cuadro 4.

A fin de determinar las condiciones óptimas para la obtención de una amplificación adecuada, fue necesario realizar varias experiencias. Se inició con la concentración de reactivos propuestos por los autores que reportaron los iniciadores escogidos; sin embargo, debido a que la amplificación no siempre puede darse bajo estas condiciones, fue necesario modificar las concentraciones de Cl_2Mg y Taq polimerasa (Promega), tiempo de cada ciclo en el termociclador y las temperaturas de alineamiento de los iniciadores con el fin de obtener el acoplamiento adecuado a la secuencia blanco, así como la polimerización óptima del DNA. Las condiciones finales de amplificación se muestran en los Cuadros 5, 6, 7, 8 y 9.

Se utilizaron termocicladores TECHNE TC-512 y TC-412 con capacidad de 96 pocillos.

c. Visualización de ADN amplificado por electroforesis

Se tomó 7 μ l de producto amplificado por reacción y se analizaron en un gel de agarosa al 1.5 por ciento, en amortiguador TBE 1X. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb.

La electroforesis fue llevada a cabo en cámara horizontal a 90 V por una hora y media aproximadamente, para luego revelar el gel con bromuro de etidio 0.5 μ g/ml.

Posteriormente, el gel fue observado en un transiluminador UV Bio-Rad y se utilizó el programa de software Quantity One para la lectura respectiva.

Cuadro 4: Iniciadores evaluados para la identificación de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla*, en poblaciones provenientes de Perú.

	Nombre	Secuencia de iniciadores (5'-3')	Fuente	Fragmento amplificado
Especie	Iniciadores Específicos			
<i>M. incognita</i>	MIF/MIR	GTGAGGATTCAGCTCCCCAG ACGAGGAACATACTTCTCCGTC	Meng <i>et al.</i> (2004)	999 pb
<i>M. incognita</i>	INC-K14F/ INC-K14R	GGGATGTGTAAATGCTCCTG CCCGCTACACCCTCAACTTC	Randig <i>et al.</i> (2002)	399 pb
<i>M. incognita</i>	SEC-1F/ SEC-1R	GGGCAAGTAAGGATGCTCTG GCACCTCTTCATAGCCACG	Tesařová <i>et al.</i> (2003)	502 pb
<i>M. javanica</i>	Fjav/Rjav	GGTGC GCGATTGAACTGAGC CAGGCCCTTCAGTGGA ACTATAC	Zijlstra <i>et al.</i> (2000)	670 pb
<i>M. arenaria</i>	Far/Rar	TCGGCGATAGAGGTAAATGAC TCGGCGATAGACACTACAAACT	Zijlstra <i>et al.</i> (2000)	420 pb
<i>M. arenaria</i>	DAF/DAR	TCGAGGGCATCTAATAAAGG GGGCTGAATATTCAAAGGAA	Dong <i>et al.</i> (2001)	999 pb
<i>M. hapla</i>	DHF/DHR	GGCTGAGCATAGTAGATGATGTT ACCCATTAAGAGGAGTTTTGC	Dong <i>et al.</i> (2001)	~1500 pb
Región	Iniciadores universales			
rDNA IGS	194(5SF)/195 (18SR)	TTAACTTGCCAGATCGGACG TCTAATGAGCCGTACGC	Blok <i>et al.</i> (1997)	Variable
Mitocondrial COII-16S rRNA	C2F3 (COIIR) /1108(1RNAF)	TACCTTTGACCAATCACGCT GGTCAATGTTTCAGAAATTTGTGG	Powers y Harris (1993)	Variable

Cuadro 5: Condiciones de amplificación en PCR con iniciadores para la identificación de *Meloidogyne incognita*.

Iniciador	MIF/MIR	INC-K14F/ INC-K14R	SEC1/SEC2
Buffer PCR	1 X	1 X	1 X
Cl2Mg	1.5 mM	2 mM	1.5 mM
Dntps	0.2 mM c/u	0.2 mM c/u	0.2 mM c/u
Iniciador F	0.2 µM	0.2 µM	0.2 µM
Iniciador R	0.2 µM	0.2 µM	0.2 µM
Taq	1 U	1 U	1 U
Volumen	25 µl	25 µl	25 µl
Programa de PCR	94 °C 2 min 94 °C 30 s 60 °C 30 s 72 °C 1 min 72 °C 7 min } 40 ciclos	94 °C 5 min 94 °C 30 s 58 °C 45 s 70 °C 1 min 70 °C 8 min } 30 ciclos	94 °C 4 min 94 °C 1 min 58 °C 1 min 72 °C 90 s 72 °C 5 min } 40 ciclos

Cuadro 6: Condiciones de amplificación en PCR con iniciadores para la identificación de *Meloidogyne javanica*.

Iniciador	Fjav/Rjav
Buffer PCR	1 X
Cl2Mg	1.5 mM
Dntps	0.2 mM c/u
Iniciador F	0.2 µM
Iniciador R	0.2 µM
Taq	1 U
Volumen	25 µl
Programa de PCR	94 °C 2 min 94 °C 30 s 62 °C 30 s 72 °C 1 min 72 °C 7 min } 35 ciclos

Cuadro 7: Condiciones de amplificación en PCR con iniciadores para la identificación de *Meloidogyne arenaria*.

Iniciador	Far/Rar	DAF/DAR
Buffer PCR	1 X	1 X
Cl2Mg	1.5 mM	1.5, 2, 3 mM
Dntps	0.2 mM c/u	0.2 mM c/u
Iniciador F	0.2 µM	0.2 µM
Iniciador R	0.2 µM	0.2 µM
Taq	1 U	1 U
Volumen	25 µl	15 µl
Programa de PCR	95 °C 2 min 95 °C 1 min 62 °C 1 min 72 °C 40 s 72 °C 5 min } 35 ciclos	94 °C 2 min 96 °C 1 min 50,54,58,62 °C 1 min 72 °C 90 s 72 °C 7 min No amplificó } 30 ciclos

Cuadro 8: Condiciones de amplificación en PCR con iniciadores para la identificación de *Meloidogyne hapla*.

Iniciador	DHF/DHR
Buffer PCR	1 X
Cl2Mg	1.5 mM
Dntps	0.2 mM c/u
Iniciador F	0.2 µM
Iniciador R	0.2 µM
Taq	1 U
Volumen	15 µl
Programa de PCR	94 °C 2 min 96 °C 1 min 56 °C 1 min 72 °C 90 s 72 °C 7 min } 30 ciclos

Cuadro 9: Condiciones de amplificación en PCR con iniciadores de la región ribosomal IGS y región mitocondrial de Meloidogyne

Iniciador	194(5SF)/195 (18SR)	1108(1RNAF)/C2F3 (COIR)
Buffer PCR	1 X	1 X
Cl2Mg	3 mM	3 mM
Dntps	0.2 mM c/u	0.2 mM c/u
Iniciador F	0.2 µM	0.36 µM
Iniciador R	0.2 µM	0.36 µM
Taq	1.5 U	1.5 U
Volumen	25 µl	30 µl
Programa de PCR	94 °C 2 min 94 °C 30 s 50 °C 30 s 72 °C 90 s 72 °C 5 min } 45 ciclos	94 °C 2 min 96 °C 30 s 50 °C 30 s 72 °C 90 s 72 °C 5 min } 45 ciclos

IV. RESULTADOS

4.1 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE MELOIDOGYNE SEGÚN EL PATRÓN PERINEAL DE ESPECÍMENES HEMBRAS

Mediante las descripciones y claves (Eisenback *et. al*, 1983; Taylor y Sasser, 1983; Eisenback, 1985; Hunt y Handoo, 2009), se determinó las especies: *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla*, en las poblaciones en estudio (Figura 13)

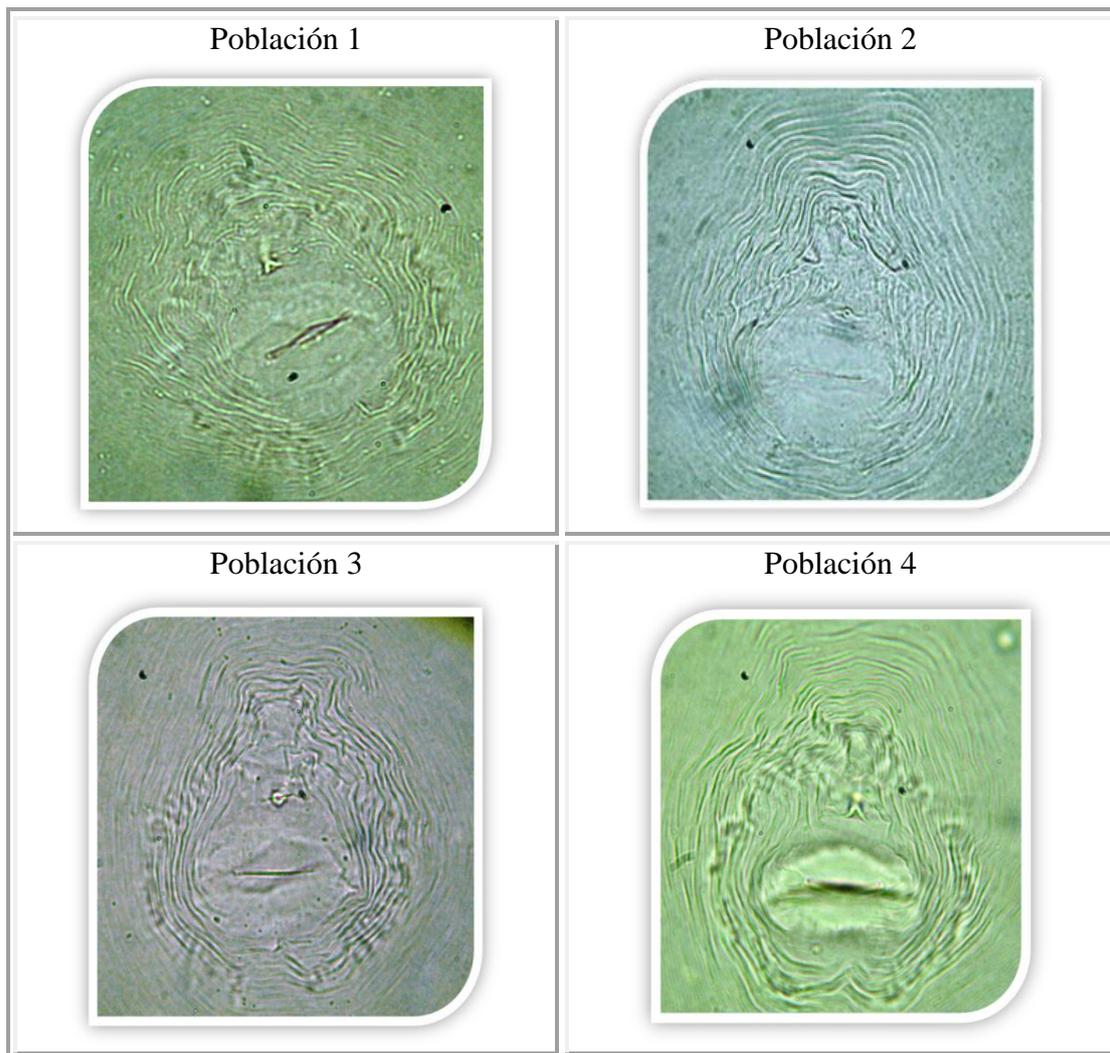


Figura 13: Patrones perineales de especímenes hembras de las 30 poblaciones de *Meloidogyne* spp. evaluadas (Cuadro 1).

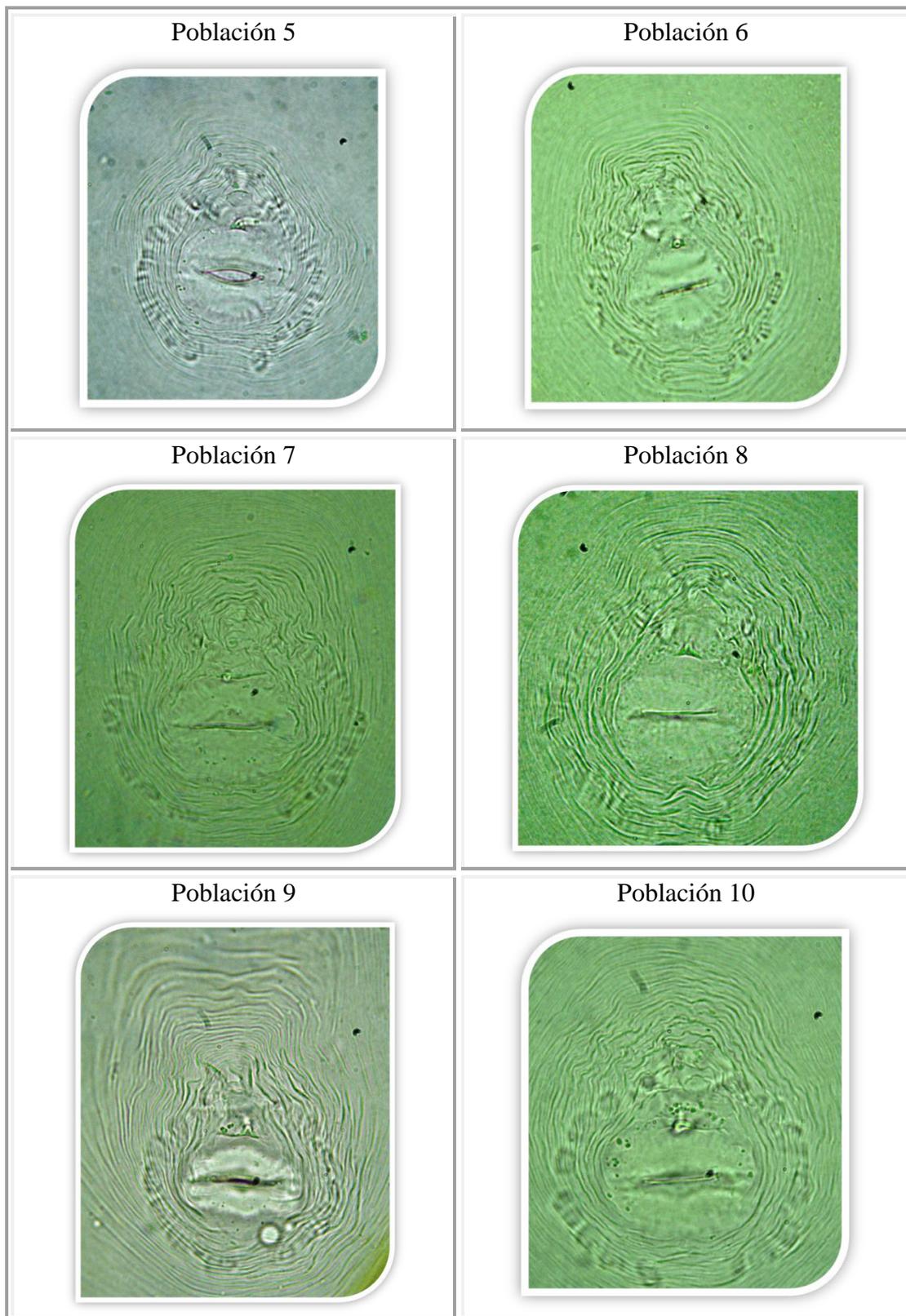


Figura 13: Patrones perineales de especímenes hembras de las 30 poblaciones de *Meloidogyne* spp. evaluadas (Cuadro 1) (continuación).

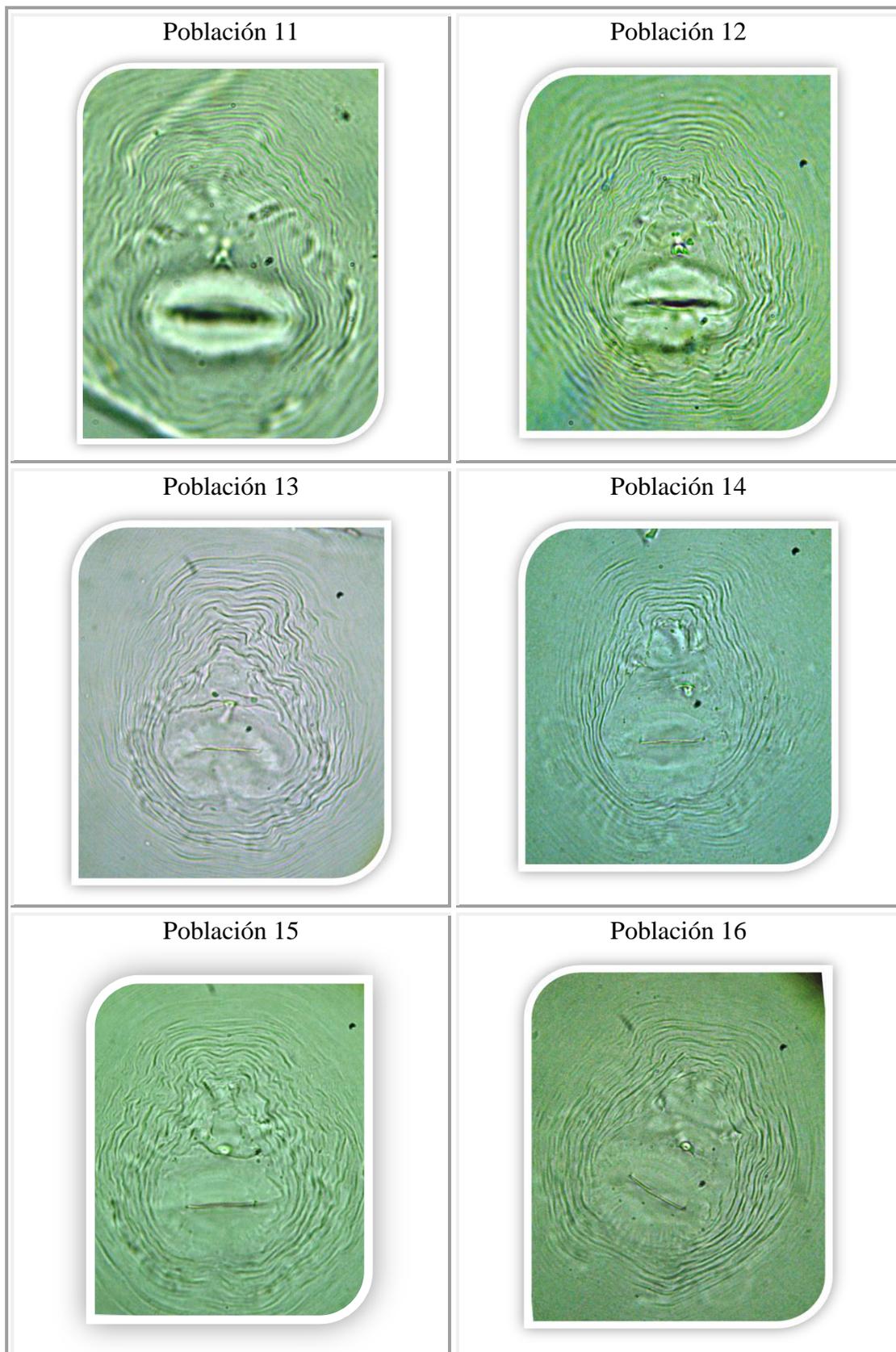


Figura 13: Patrones perineales de especímenes hembras de las 30 poblaciones de *Meloidogyne* spp. evaluadas (Cuadro 1) (continuación).

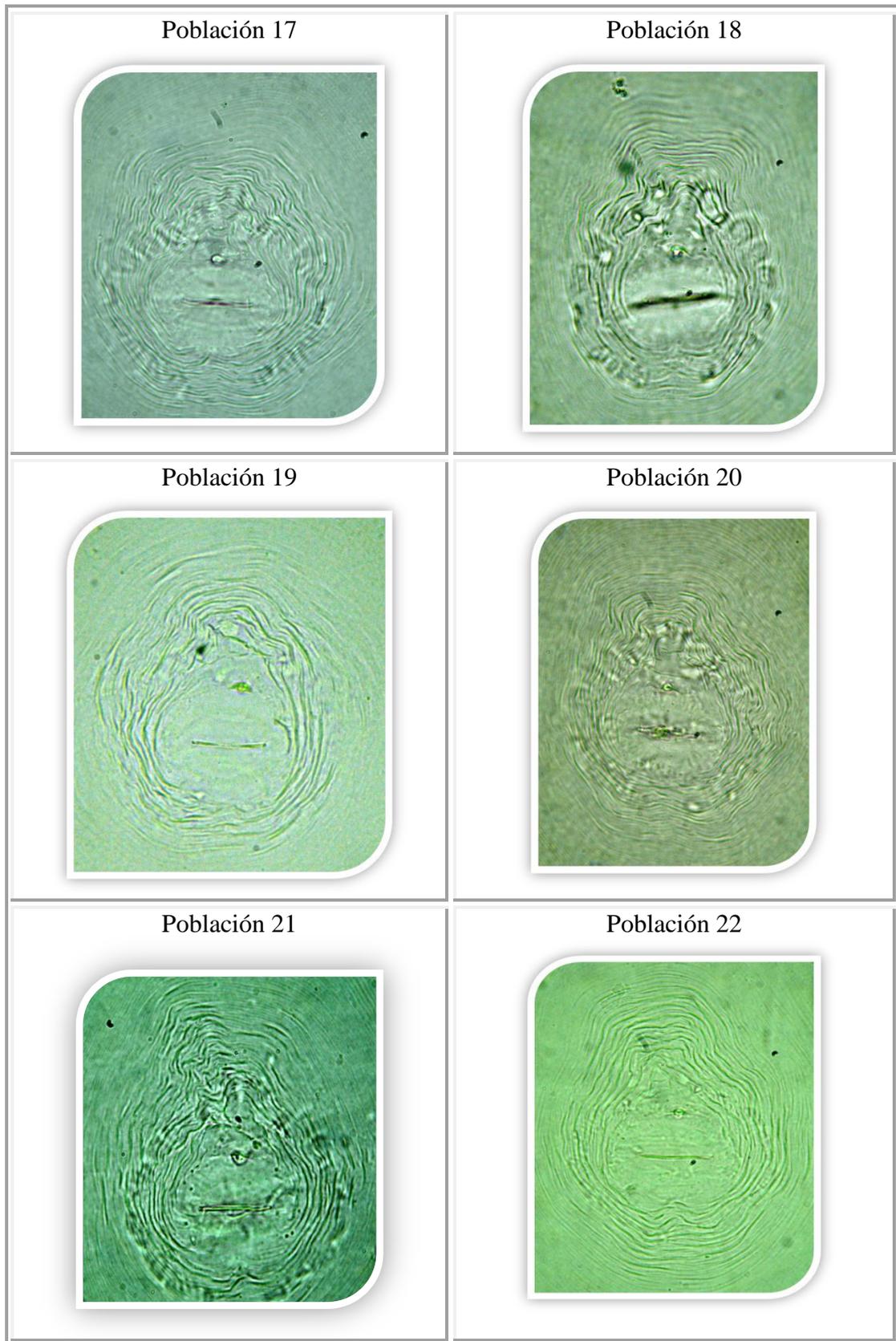


Figura 13: Patrones perineales de especímenes hembras de las 30 poblaciones de *Meloidogyne* spp. evaluadas (Cuadro 1) (continuación).



Figura 13: Patrones perineales de especímenes hembras de las 30 poblaciones de *Meloidogyne* spp. evaluadas (Cuadro 1) (continuación).

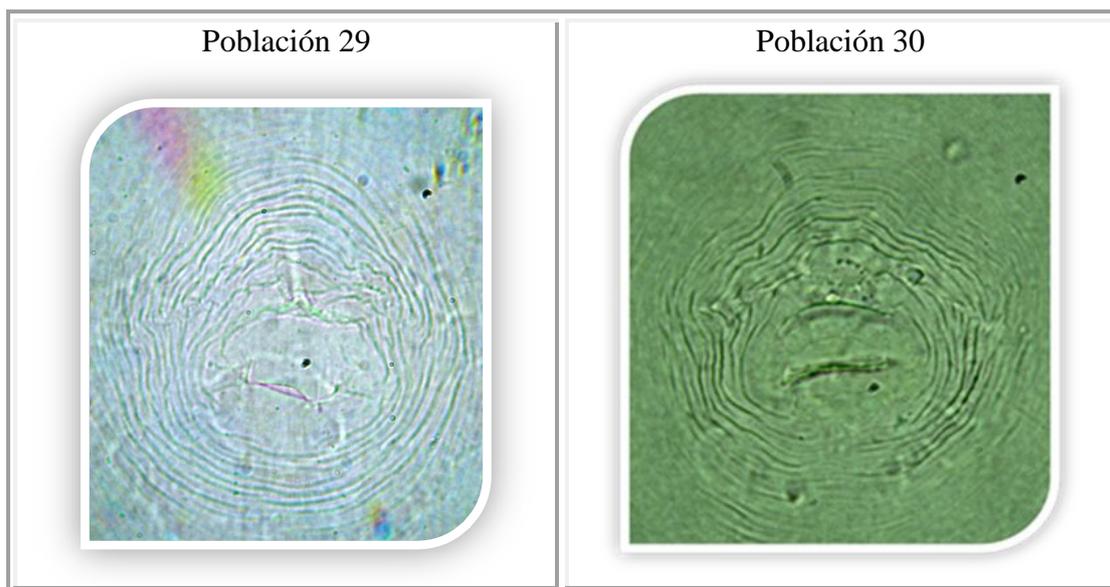


Figura 13: Patrones perineales de especímenes hembras de las 30 poblaciones de *Meloidogyne* spp. evaluadas (Cuadro 1) (continuación).

4.2 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE MELOIDOGYNE MEDIANTE LA FORMA DE LA CABEZA DE ESPECÍMENES MACHOS DE ALGUNAS POBLACIONES EVALUADAS

Las observaciones microscópicas de la cabeza de especímenes machos según las características indicadas en el Cuadro 3, permitió distinguir a *M. incognita* (Figura 14), *M. arenaria* (Figura 15) y *M. hapla* (Figura 16). No se pudo obtener especímenes machos de todas las poblaciones.

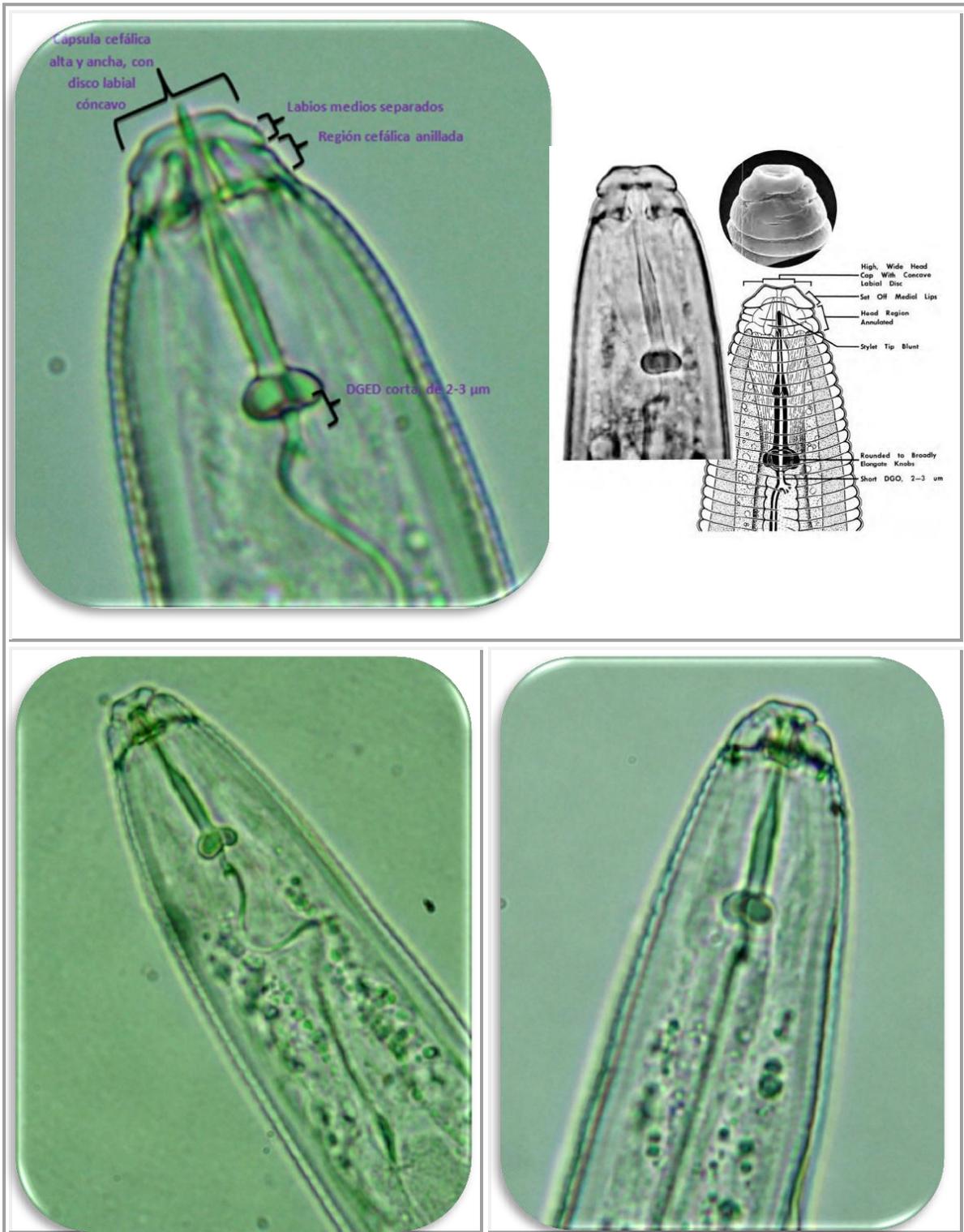


Figura 14: Forma de la cabeza de especímenes machos con características de *Meloidogyne incognita* correspondientes a las población N° 23, proveniente de tomate, La Libertad.

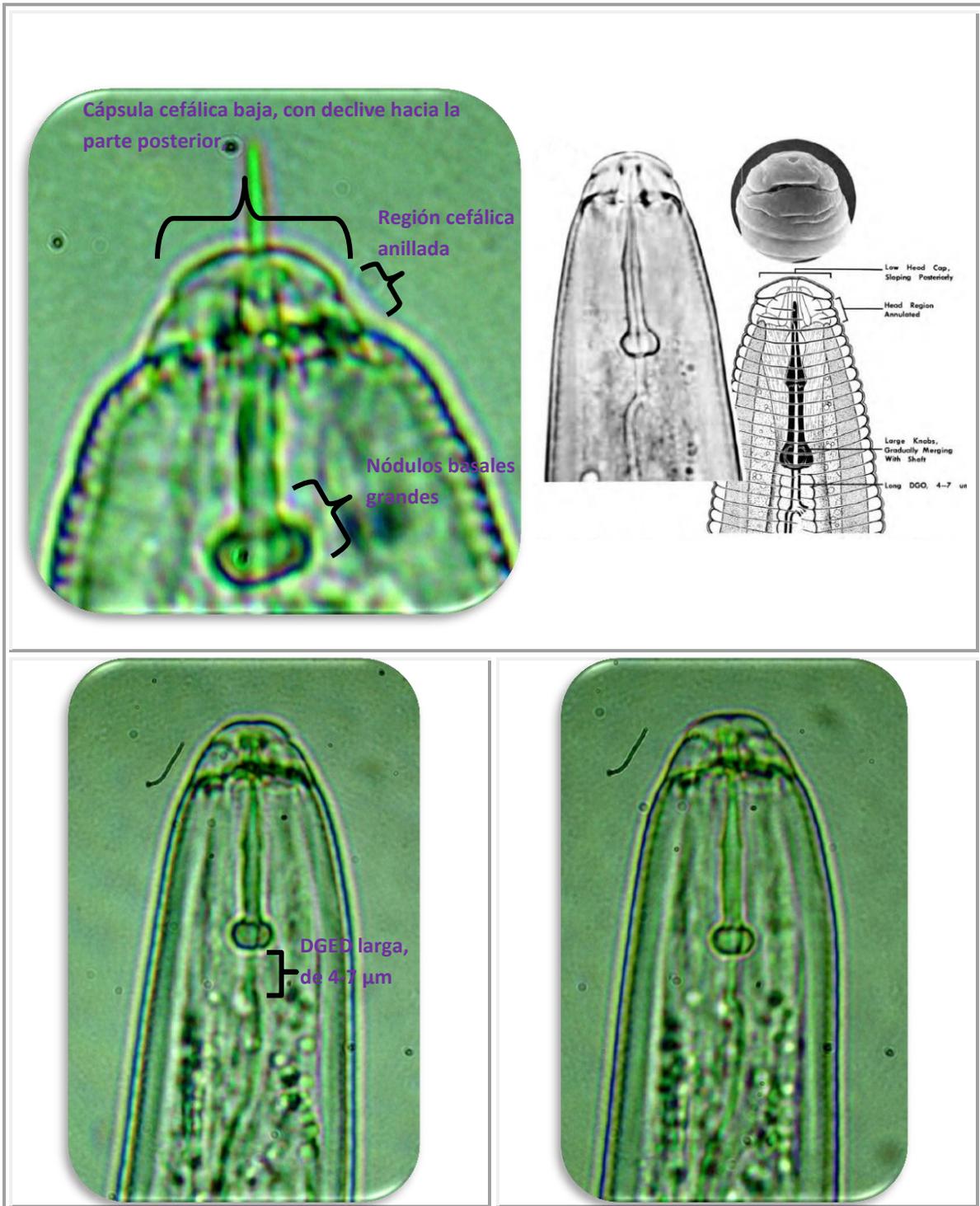


Figura 15: Forma de la cabeza de especímenes machos con características de *Meloidogyne arenaria* correspondientes a la población N° 29, proveniente de vid, Lima.

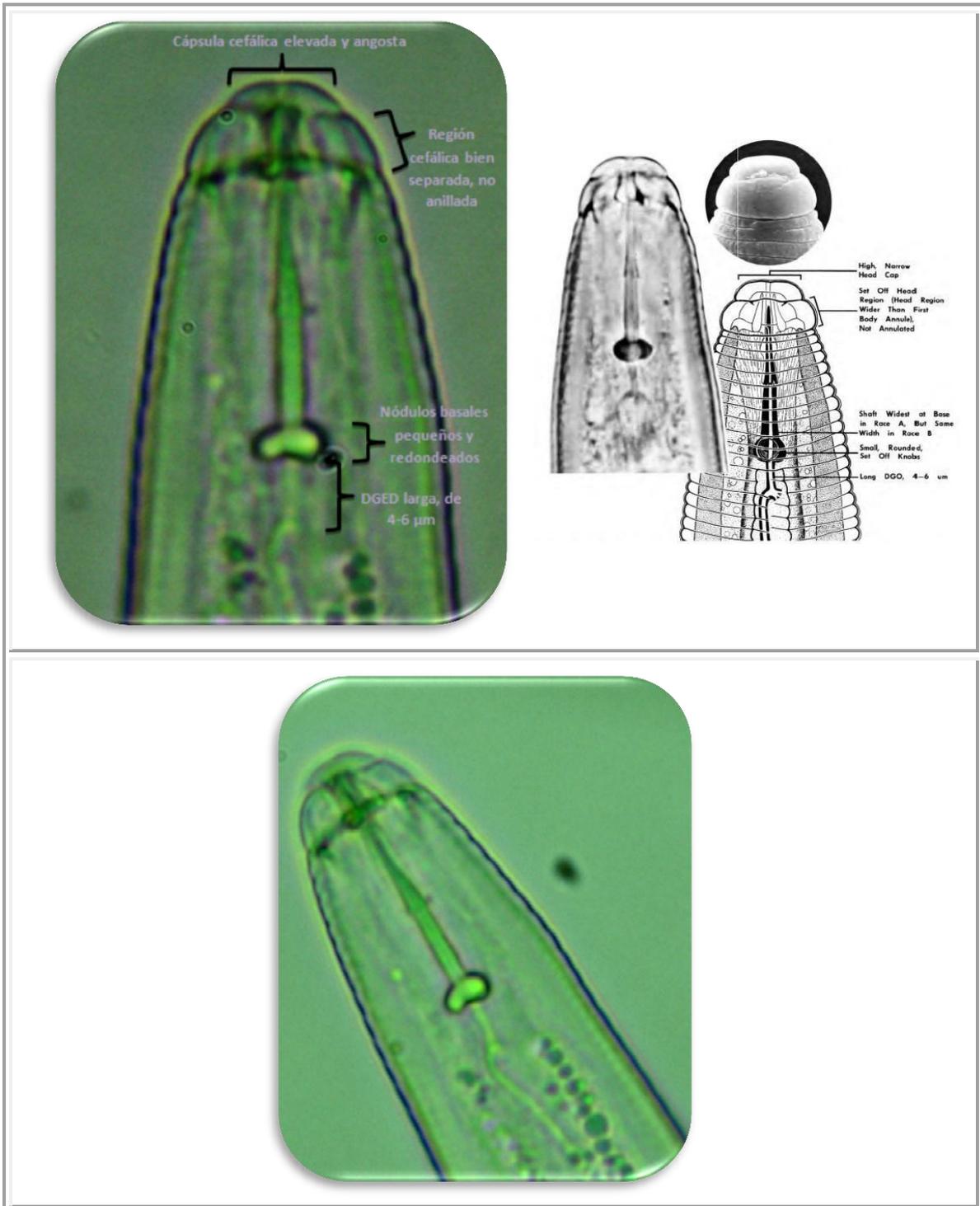


Figura 16: Forma de la cabeza de especímenes machos con características de *Meloidogyne hapla* correspondientes a la población N° 30, proveniente de aguaymanto, Cajamarca.

4.3 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE MELOIDOGYNE MEDIANTE PRUEBAS MOLECULARES EMPLEANDO PCR

4.3.1 EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

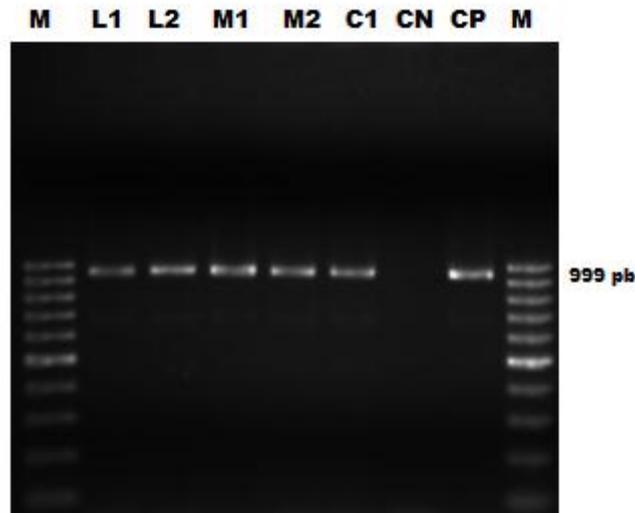


Figura 17: Productos de amplificación de PCR usando el iniciador MIF/MIR (*Meloidogyne incognita*), con ADN obtenido de diferentes métodos de extracción. L1: Método de extracción de Lisis a partir de un juvenil de segundo estado, L2: Método de extracción de Lisis a partir de 10 juveniles de segundo estado, M1: Método de extracción de Minipreparación a partir de un espécimen hembra, M2: Método de extracción de Minipreparación a partir de 10 especímenes hembras, C1: Método de extracción de CTAB modificado a partir de nódulos radiculares, CP: Control positivo de *M. incognita*, CN: Control agua, sin ADN, M: 100 bp ladder.

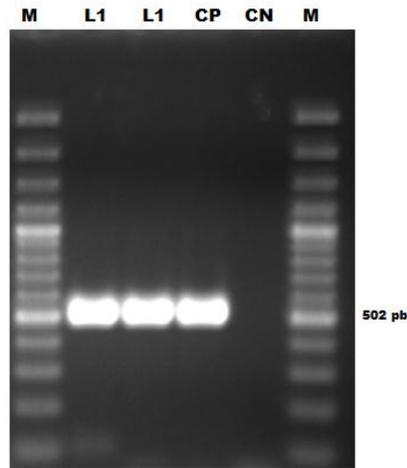


Figura 18: Productos de amplificación de PCR usando el iniciador SEC-1F/SEC-1R (*Meloidogyne incognita*), con ADN obtenido a partir del método de extracción de lisis. L1: Método de extracción de Lisis a partir de un juvenil de segundo estado, CP: Control positivo de *M. incognita*, CN: Control agua, sin ADN, M: 100 bp ladder.

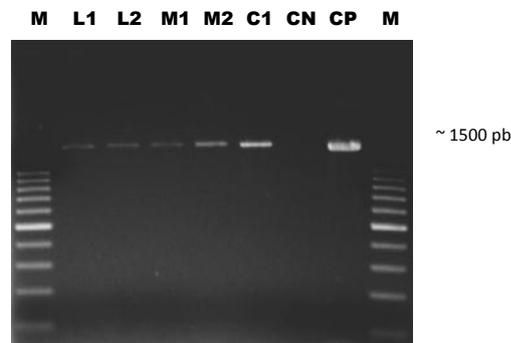


Figura 19: Productos de amplificación de PCR usando el iniciador DHF/DHR (*Meloidogyne hapla*), con ADN obtenido de diferentes métodos de extracción. L1: Método de extracción de Lisis a partir de un juvenil de segundo estado, L2: Método de extracción de Lisis a partir de 10 juveniles de segundo estado, M1: Método de extracción de Minipreparación a partir de un espécimen hembra, M2: Método de extracción de Minipreparación a partir de 10 especímenes hembras, C1: Método de extracción de CTAB modificado a partir de nódulos radiculares, CP: Control positivo de *M. hapla*, CN: Control agua, sin ADN, M: 100 bp ladder.

4.3.2 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR MEDIANTE PCR DE LAS POBLACIONES DE MELOIDOGYNE UTILIZANDO INICIADORES ESPECÍFICOS

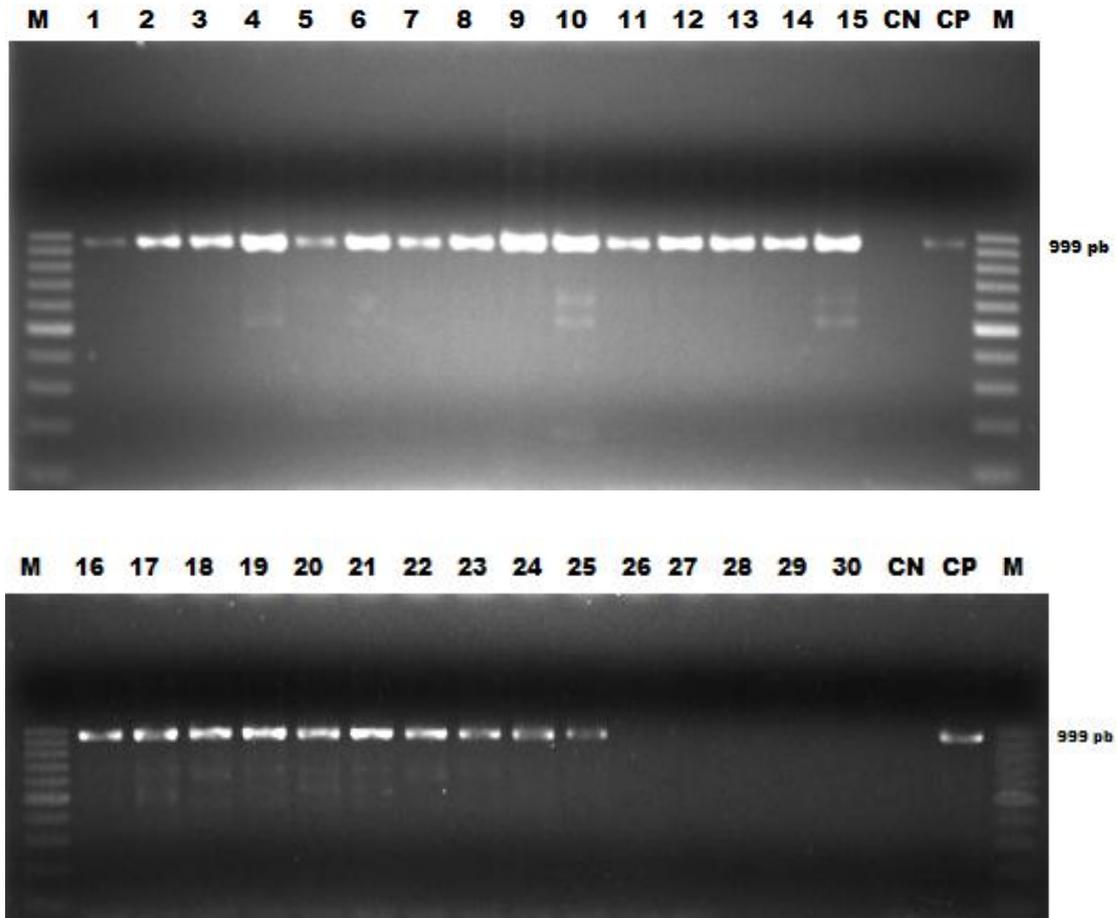


Figura 20: Productos de amplificación de PCR usando el iniciador MIF/MIR (*Meloidogyne incognita*), con ADN extraído de 10 juveniles de segundo estado (J2) de 30 poblaciones de *Meloidogyne* (Cuadro 1), un control positivo (CP), un control agua, sin ADN (CN) y 100 bp ladder (M).

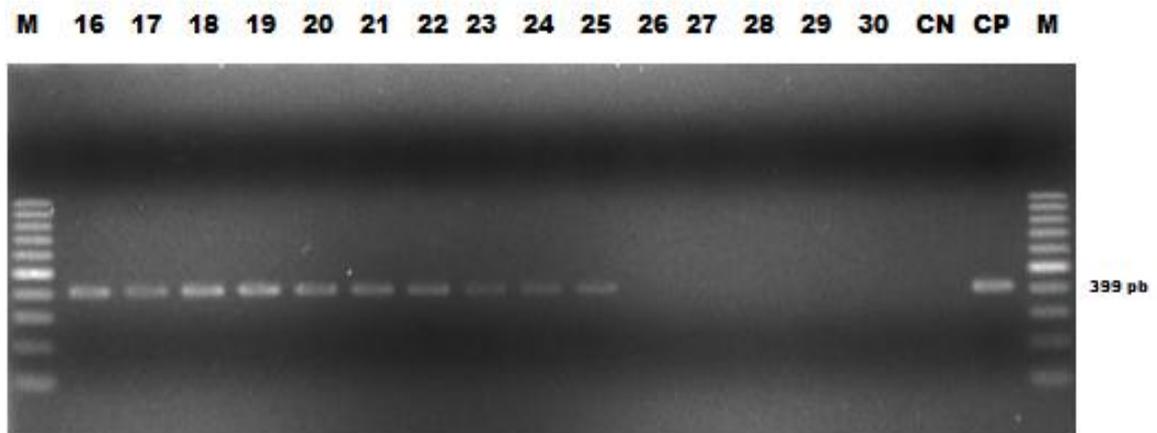
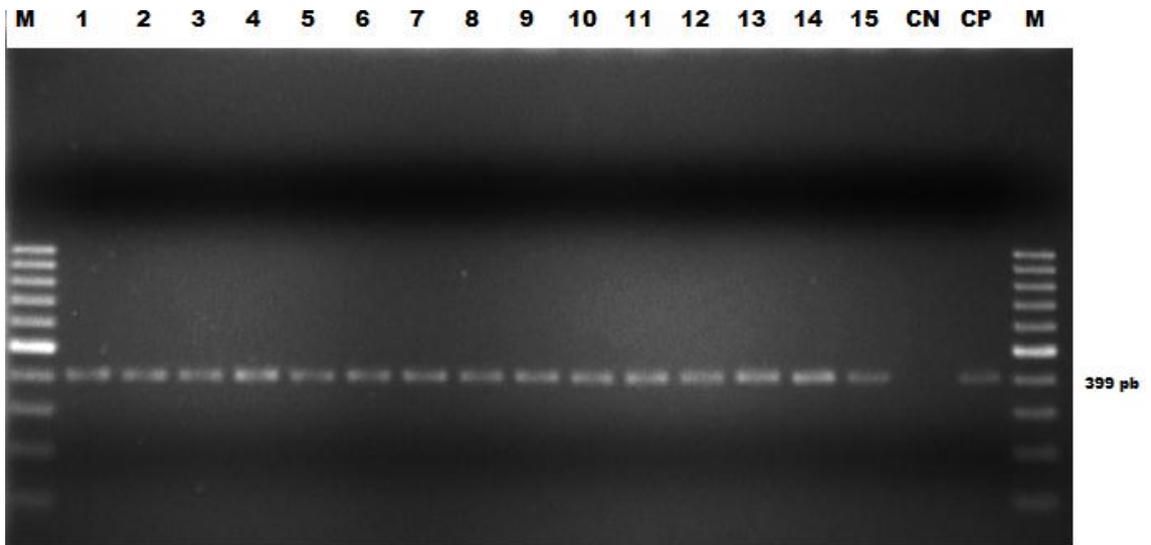


Figura 21: Productos de amplificación de PCR usando el iniciador INC-K14F/INC-K14R (*Meloidogyne incognita*), con ADN extraído de 10 juveniles de segundo estado (J2) de 30 poblaciones de *Meloidogyne* (Cuadro 1), un control positivo (CP), un control agua, sin ADN (CN) y 100 bp ladder (M).

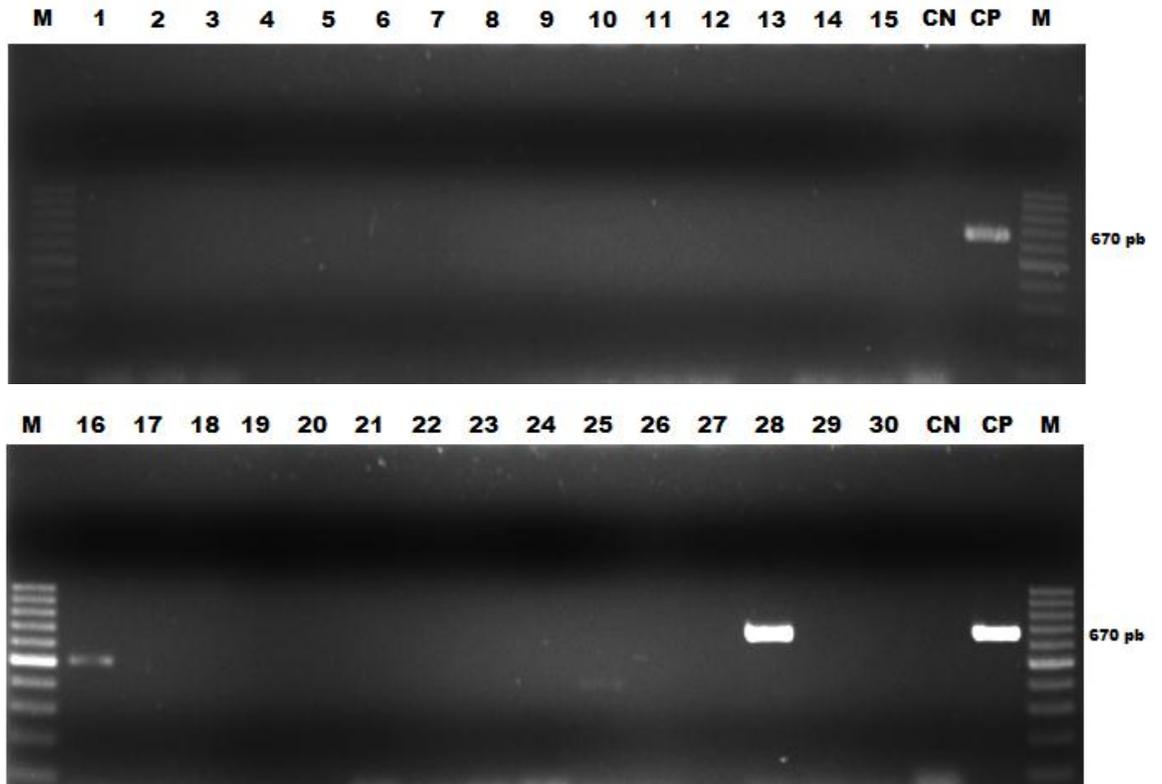


Figura 22: Productos de amplificación de PCR usando el iniciador Fjav/Rjav (*Meloidogyne javanica*), con ADN extraído de 10 juveniles de segundo estado (J2) de 30 poblaciones de *Meloidogyne* (Cuadro 1), un control positivo (CP), un control agua, sin ADN (CN) y 100 bp ladder (M).

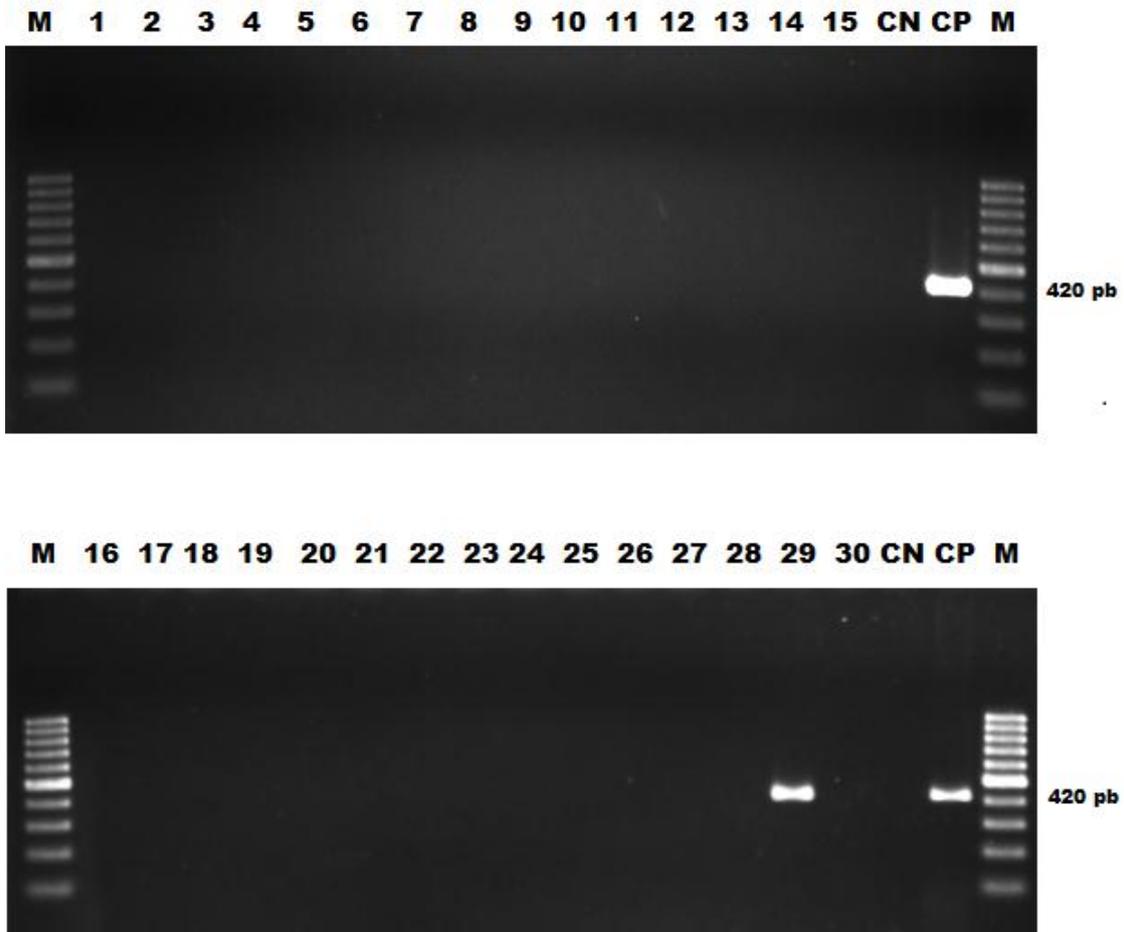


Figura 23: Productos de amplificación de PCR usando el iniciador Far/Rar (*Meloidogyne arenaria*), con ADN extraído de 10 juveniles de segundo estado (J2) de 30 poblaciones de *Meloidogyne* (Cuadro 1), un control positivo (CP), un control agua, sin ADN (CN) y 100 bp ladder (M).

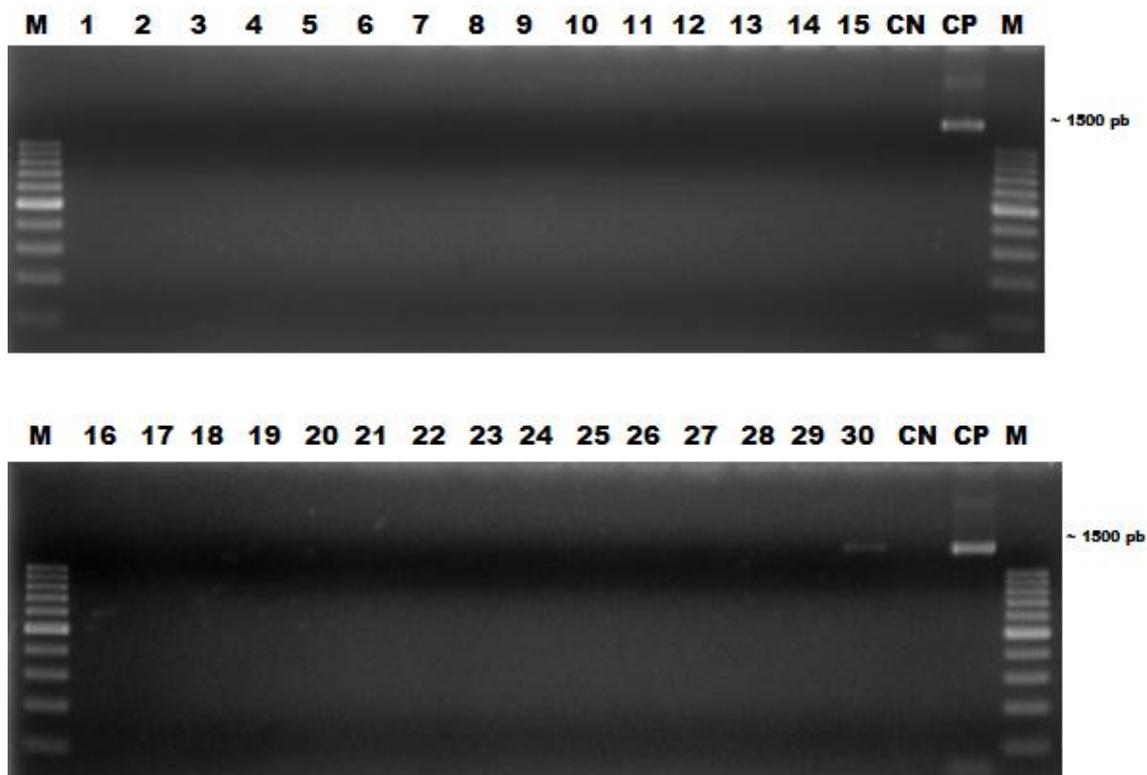


Figura 24: Productos de amplificación de PCR usando el iniciador DHF/DHR (*Meloidogyne hapla*), con ADN extraído de 10 juveniles de segundo estado (J2) de 30 poblaciones de *Meloidogyne* (Cuadro 1), un control positivo (CP), un control agua, sin ADN (CN) y 100 bp ladder (M).

Cuadro 10: Consolidado de identificación molecular mediante iniciadores específicos, con su respectivo peso de banda e identificación morfológica de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla*, provenientes de Perú.

Co	MIF/MIR (SCAR)	INC-K14F/INC-K14R (SCAR)	Fjav/Rjav (SCAR)	Far/Rar (SCAR)	DHF/DHR (SCAR)	Identificación Molecular	Identificación Morfológica
1	999 pb	399 pb	-	-	-	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
2	999 pb	399 pb	-	-	-	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
3	999 pb	399 pb	-	-	-	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
4	999 pb	399 pb	-	-	-	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
5	999 pb	399 pb	-	-	-	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
6	999 pb	399 pb	-	-	-	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
7	999 pb	399 pb	-	-	-	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
8	999 pb	399 pb	-	-	-	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
9	999 pb	399 pb	-	-	-	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
10	999 pb	399 pb	-	-	-	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
11	999 pb	399 pb	-	-	-	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
12	999 pb	399 pb	-	-	-	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
13	999 pb	399 pb	-	-	-	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
14	999 pb	399 pb	-	-	-	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
15	999 pb	399 pb	-	-	-	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
16	999 pb	399 pb	-	-	-	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
17	999 pb	399 pb	-	-	-	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
18	999 pb	399 pb	-	-	-	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
19	999 pb	399 pb	-	-	-	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
20	999 pb	399 pb	-	-	-	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
21	999 pb	399 pb	-	-	-	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
22	999 pb	399 pb	-	-	-	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
23	999 pb	399 pb	-	-	-	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
24	999 pb	399 pb	-	-	-	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
25	999 pb	399 pb	-	-	-	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
26	-	-	-	-	-	<i>Meloidogyne sp.</i>	<i>Meloidogyne sp.</i>
27	-	-	-	-	-	<i>Meloidogyne sp.</i>	<i>Meloidogyne sp.</i>
28	-	-	670 pb	-	-	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
29	-	-	-	420 pb	-	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
30	-	-	-	-	~1500 pb	<i>M. hapla</i>	<i>M. hapla</i>

4.3.3 UTILIZACIÓN DE INICIADORES DE LA REGIÓN RIBOSOMAL IGS Y REGIÓN MITOCONDRIAL EN EL ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES DE MELOIDOGYNE

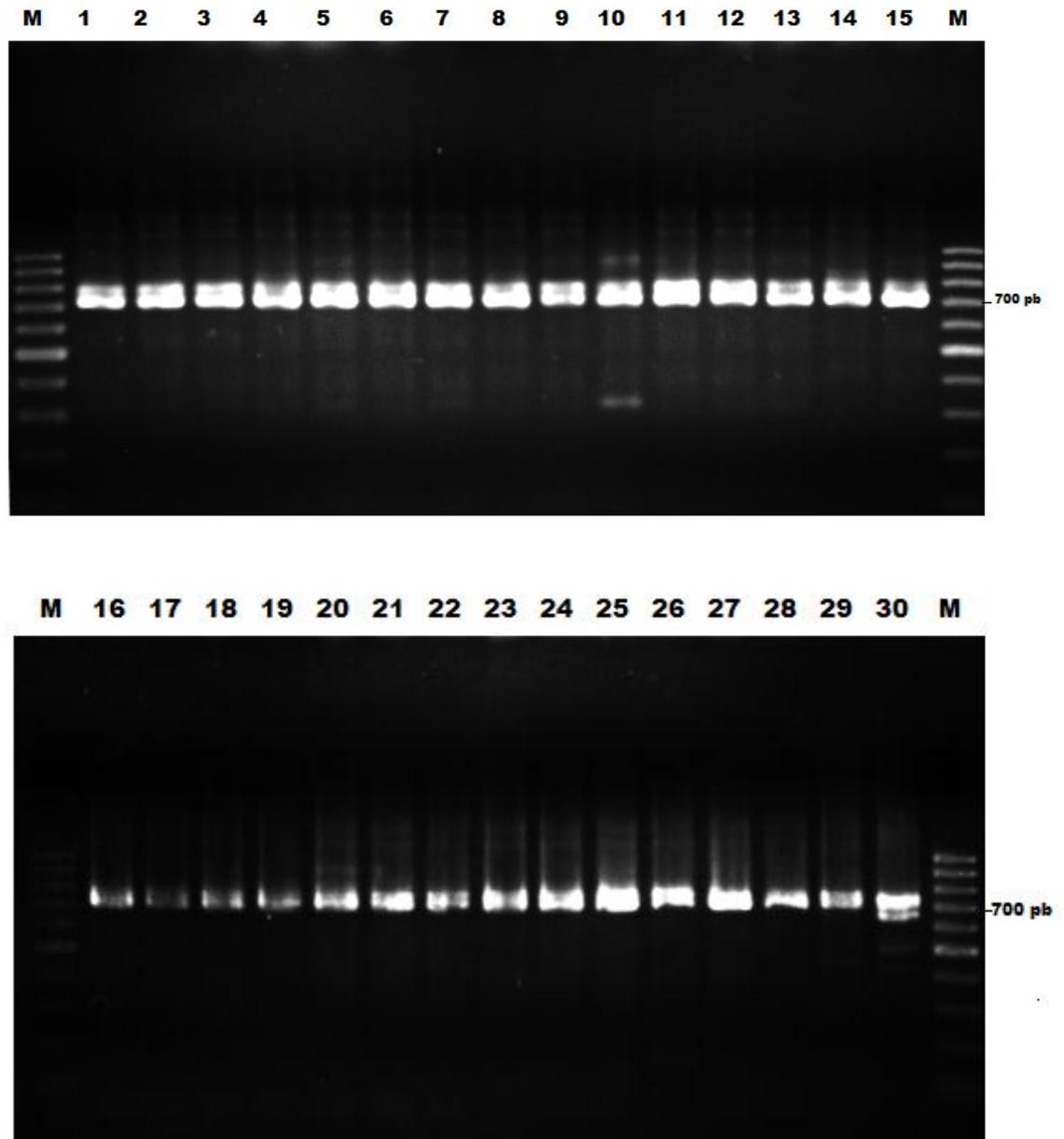


Figura 25: Productos de amplificación de PCR usando el iniciador 194(5SF)/195(18SR) (rDNA IGS), con ADN extraído de 10 juveniles de segundo estado (J2) de 30 poblaciones de Meloidogyne (Cuadro 1), un control positivo (CP), un control agua, sin ADN (CN) y 100 bp ladder (M).

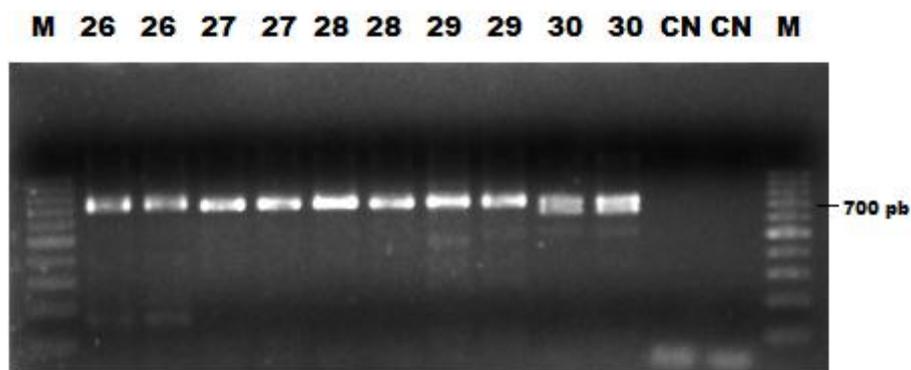


Figura 26: Productos de amplificación de PCR usando el iniciador 194(5SF)/195(18SR) (rDNA IGS), con ADN extraído de un juvenil de segundo estado (J2) de las poblaciones N° 26, N° 27, N° 28, N° 29 y N° 30 de *Meloidogyne* (Cuadro 1), un control agua, sin ADN (CN) y 100 bp ladder (M).

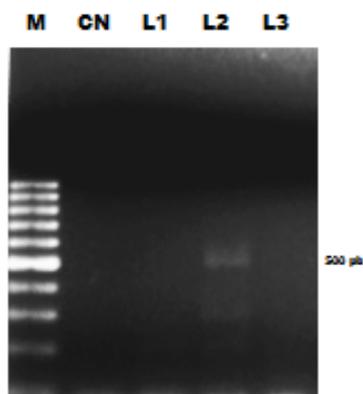


Figura 27: Productos de amplificación de PCR usando el iniciador C2F3 (COIR) /1108(1RNAF), con ADN obtenido de diferentes métodos de extracción de la población N° 30 proveniente de aguaymanto, Cajamarca. L1: Método de extracción de Lisis a partir de un juvenil de segundo estado, L2: Método de extracción de Lisis a partir de 10 juveniles de segundo estado, L3: Método de extracción de Lisis a partir de un espécimen hembra, CN: Control agua, sin ADN, M: 100 bp ladder.

Cuadro 11: Producto de amplificación con su respectivo peso de banda, utilizando iniciadores 194(5SF)/195 (18SR) de la región ribosomal IGS.

		194(5SF)/ 195 (18SR)	Reporte propuesto por Adam <i>et al.</i> (2007)	Identificación molecular con iniciadores específicos evaluados
26		~ 720	Meloidogyne especie tropical	<i>Meloidogyne sp.</i>
27		~ 720	Meloidogyne especie tropical	<i>Meloidogyne sp.</i>
28		~ 720	Meloidogyne especie tropical	<i>M. javanica</i>
29		~ 720	Meloidogyne especie tropical	<i>M. arenaria</i>
30		~ 700	<i>M. hapla</i>	<i>M. hapla</i>

V. DISCUSIÓN

La aplicación de biología molecular en la identificación de especies de *Meloidogyne* spp. se ha incrementado en los últimos años, esto se debe a la alta sensibilidad y precisión de esta metodología, que la consolidan como una herramienta útil y complementaria a otras técnicas de identificación.

Las técnicas moleculares, otorgan también algunas ventajas frente a otros métodos de identificación, como por ejemplo: en la realización de un diagnóstico morfológico es necesario emplear un número significativo de individuos, sin embargo, se puede ejecutar una prueba molecular mediante PCR con el material obtenido de un sólo juvenil infectivo, lo que resulta muy importante para el diagnóstico en muestras de suelo que contengan pequeñas cantidades de individuos.

Otra ventaja frente al análisis de isoenzimas y la identificación morfológica mediante el patrón perineal del nematodo es que estos dos métodos requieren de especímenes hembras, y los métodos moleculares no necesariamente. Por lo tanto, debido a que las hembras del nematodo no están disponibles en muestras de suelo, ya que se desarrollan en las raíces, y muchas veces se requiere el diagnóstico antes de la siembra del cultivo, estos métodos requieren mayor tiempo y espacio para establecer y mantener las poblaciones hasta el desarrollo de hembras en las raíces. Por el contrario, los juveniles de segundo estado se encuentran en el suelo y el método de identificación molecular que los utiliza resulta ser el más indicado cuando sólo se dispone de este tipo de muestras. En el presente trabajo se pudo demostrar el empleo de juveniles de segundo estado y especímenes individuales en la identificación de especies de *Meloidogyne* por la técnica molecular de PCR.

Además de estas ventajas, se ha reportado que el uso de técnicas moleculares para la detección de ciertos patógenos tiene un costo menor que las técnicas convencionales, sobre todo en microorganismos que requieren ser cultivados en laboratorio (Tokue *et al.*, 1992; Freymuth *et al.*, 2006), además de ello se menciona que los costos, una vez implementado un laboratorio de biología molecular, se ven reducidos comparados con los de una identificación morfológica cuando se debe trabajar con un número elevado de muestras y se debe contar con recursos humanos altamente especializados en la identificación de estas especies, como es el caso para el género *Meloidogyne* (Morgan *et al.*, 1998), donde los costos de una identificación morfológica y molecular a nivel de

especie son aproximadamente 180 y 80 nuevos soles, respectivamente. Los valores de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo de fácil interpretación señalan que las pruebas moleculares son aceptables en las condiciones en que se justifique su utilización, por las ventajas frente a otras metodologías.

Las identificación morfológica de especies de *Meloidogyne* se dificulta por el creciente número de especies descritas, existencia de especies crípticas y las variaciones morfológicas intraespecíficas bajo la influencia de condiciones geográficas y ecológicas, que hacen indispensable el conocimiento del rango de variabilidad de una característica particular, en condiciones diferentes (Siddiqi, 2000). Es así que, los patrones perineales de algunas especies de *Meloidogyne* como: *Meloidogyne paranaensis*, *Meloidogyne izalcoensis* y *Meloidogyne mayaguensis* (ahora *Meloidogyne enterolobii*) en café, han sido confundidos con el patrón perineal de *M. incognita* (Carneiro *et al.*, 2004, 2005). La especie *M. enterolobii*, fue reconocida cuando se reportaron nódulos radiculares en raíces de tomate resistentes a *M. incognita* en Florida (Brito *et al.*, 2004) y *Meloidogyne floridensis* fue reconocida al encontrarla en portainjertos de melocotón resistentes (Handoo *et al.*, 2004). *Meloidogyne morocciensis* (Rammah y Hirschmann, 1990) y *Meloidogyne hispanica* (Hirschmann, 1986), presentan también valores morfológicos y morfométricos que se superponen a los de las especies de *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*.

Estas dificultades han requerido la incorporación de técnicas que incluyan, además del análisis de características morfológicas, características fisiológicas y moleculares, ya que la información morfológica sola, no es suficiente para determinar la identidad de estas especies. A esto se suma que en los últimos 20 años, han sido nominadas la mitad de las 97 especies de *Meloidogyne* (Hunt y Handoo, 2009), algunas de ellas consideradas como especies emergentes, lo que significa que los campos agrícolas con múltiples especies de *Meloidogyne* no son el único desafío de diagnóstico, sino que el interés más básico es la naturaleza genética de este género.

Para llevar a cabo técnicas moleculares, es importante contar con una óptima calidad y concentración de ácidos nucleicos, ya que son el punto de partida para llevar a cabo una reacción de PCR. Es por ello que se debe contar con metodologías de extracción adecuadas para obtener estas condiciones. Los resultados obtenidos en el presente trabajo con el método de extracción de ADN descrito por Doyle y Doyle

(1987), con modificaciones, a partir de nódulos en raíces; el método de minipreparación (Cenis, 1992), a partir de una y 10 hembras adultas y el método de lisis (Williams *et al.*, 1992; McClure *et al.*, 2012), a partir de una y 10 juveniles de segundo estado, indican que utilizando estas metodologías es posible llevar a cabo amplificaciones en PCR con los iniciadores empleados. Para la evaluación de métodos de extracción se utilizó los iniciadores MIF/MIR (Meng *et al.*, 2004), SEC-1F/SEC-1R (Tesařová *et al.*, 2003) y DHF/DHR (Dong *et al.*, 2001) (Figura 17, 18 y 19). Se debe tener en cuenta que la cantidad y calidad de extracción puede ser óptima con un iniciador más que con otro, o simplemente no serlo. Esto es debido a particularidades propias del iniciador como la cantidad de región diana que se encuentran en las células, presencia de inhibidores de PCR o bloqueo de la reacción por elevadas cantidades de ácido nucleico.

Adam *et al.* (2007), propusieron una clave para la identificación molecular de siete especies de *Meloidogyne* spp., a partir de juveniles individuales, como una secuencia de pasos, en un sólo esquema con combinaciones de iniciadores que fueron previamente reportados y validados. De sus evaluaciones, los iniciadores MIF/MIR para *M. incognita* amplificaron productos a partir de ADN extraído de un sólo juvenil de segundo estado, produciendo un fragmento de 999 pb. Además de ello Meng *et al.* (2004), reportaron que los iniciadores MIF/MIR pueden amplificar productos de tamaño deseado a partir de un tercio de juveniles de segundo estado, machos y hembras. Esto fue corroborado en el presente trabajo, donde se pudo obtener productos de amplificación a partir de un solo espécimen juvenil con este iniciador, utilizando el método de extracción de lisis (Figura 17).

Adam *et al.* (2007), también evaluaron los iniciadores Inc-14k F/Inc-14k R para *M. incognita* (Randing *et al.*, 2002) y no obtuvieron amplificaciones a partir de un sólo juvenil de segundo estado. Sin embargo, Randing *et al.* (2002, 2004), utilizaron ADN extraído de una masa de huevos, e indican que se puede utilizar cualquier estado del nematodo, incluso la cuarta parte de una masa de huevos, para obtener una amplificación efectiva con estos iniciadores. En el presente trabajo se obtuvo productos de 399 pb a partir de ADN extraído de 10 juveniles de segundo estado (Figura 21), lo que demuestra que estos iniciadores también pueden ser utilizados si se cuenta con este estado del nematodo. El método de extracción llevado a cabo por Adam *et al.* (2007) fue similar al de lisis utilizado en el presente trabajo, exceptuando algunos componentes del buffer empleado y el volumen total que en ese caso fue menor. Estos resultados

también nos indican que es importante determinar el método de extracción de ADN adecuado para la obtención de resultados positivos de amplificación de productos de PCR.

Además de los iniciadores mencionados para la identificación de *M. incognita*, se pudieron dar las condiciones adecuadas para que usando el iniciador SEC-1F/SEC-1R se puedan dar productos de amplificación a partir de un juvenil de segundo estado, produciendo un fragmento de 502 pb (Figura 18). Tesařová *et al.* (2003), menciona que utilizó extracciones de ADN de nódulos, hembras y pocas cantidades de nematodos con este iniciador, pero no a partir de estados juveniles individuales. Este iniciador fue diseñado a partir de genes de una proteína de la glándula esofágica, los cuales, mencionan, fueron diseñados para detectar *M. incognita* sin los inconvenientes de la unión inespecífica del iniciador debido a que los genes de la proteína glándula esofágica serían probablemente más diferentes entre diversas especies y sus regiones altamente conservadas (Tesařová *et al.*, 2003).

El iniciador DHF/DHR para la identificación de *M. hapla* fue desarrollado con ADN extraído a partir de masas de huevos por el método de fenol/cloroformo (Dong *et al.*, 2001), sin embargo en el presente trabajo se pudo demostrar que también puede ser utilizado material a partir de uno y 10 juveniles de segundo estado, una y 10 hembras y nódulos de raíces (Figura 19).

Para la evaluación de las 30 poblaciones en estudio, se realizó la extracción de ADN mediante el método de lisis a partir de 10 juveniles de segundo estado. Veinticinco de estas poblaciones (1-25), mostraron productos de amplificación de PCR correspondientes a *M. incognita* utilizando los iniciadores MIF/MIR e Inc-14k F/Inc-14k R (Figuras 20 y 21), Estos resultados concuerdan con la identificación morfológica del patrón perineal de *M. incognita*, llevada a cabo previamente, que mostró un arco dorsal alto (Figura 13) y para el caso de especímenes machos una cápsula cefálica plana a cóncava, con el disco labial sobresaliendo de labios medios y un DGED corto (2-4 μm) (Figura 14).

Los iniciadores Fjav/Rjav amplificaron satisfactoriamente una banda del tamaño esperado (670 pb) correspondientes a *M. javanica*, a partir de 10 juveniles de segundo estado, provenientes de la población 28 (Figura 22), confirmando así la identificación

morfológica del patrón perineal para dicha población que presentó líneas laterales claramente visibles formando doble incisuras (Figura 13).

Al utilizar los iniciadores Far/Rar, se obtuvo amplificación de productos de 420 pb para *M. arenaria*, en la población 29, a partir de 10 juveniles de segundo estado (Figura 23). Al comparar caracteres morfológicos de la cabeza de especímenes machos, de la misma población, se observó una cápsula cefálica baja, con declive hacia la parte posterior, nódulos basales no separados, ligeramente fusionados con el eje y un DGED largo (4-7 μm) (Figura 15) y los diseños perineales de especímenes hembras presentaron estrías dorsales y ventrales bifurcadas, uniéndose en ángulo en los campos laterales, estrías dorsales con ondulaciones, formando “hombreras” (Figura 13), confirmando así la especie. Estos iniciadores, al igual que Fjav/Rjav, también fueron incluidos en la clave de Adam *et al.* (2007), donde obtuvieron amplificaciones a partir de ADN extraído de un solo juvenil de segundo estado.

Para la identificación molecular de *M. hapla*, se evaluó el par de iniciadores DHF/DHR, desarrollados por Dong *et al.* (2001), los cuales amplificaron un fragmento de aproximadamente 1500 pb., a partir de 10 juveniles de segundo estado provenientes de la población 30 (Figura 24). Estos resultados confirmaron la identificación morfológica de acuerdo al patrón perineal de la hembra, el cual mostró puntuaciones en el área terminal de la cola (Figura 13) y a la forma de la cabeza de macho, que evidenció una cápsula cefálica alta y angosta, una región cefálica lisa y separada del cuerpo, un cono del estilete angosto y delicado y nódulos basales del estilete pequeños, además de un DGED largo de 4-7 μm . (Figura 16). También se pudo determinar que la extracción de ADN a partir de 3 juveniles de segundo estado conservados en DESS (DMSO/ EDTA/ NaCl) (control positivo utilizado en el presente trabajo), es efectiva para la utilización de este par de iniciadores en la identificación de *M. hapla*.

Para el desarrollo de los iniciadores específicos de las cuatro especies evaluadas, empleados en el presente trabajo, se clonaron y secuenciaron fragmentos de ADN obtenidos a través de RAPD-PCR. Los iniciadores SCAR, diseñados por Zijlstra (2000), así como el diseñado por Meng *et al.* (2004) han sido considerados en diversos estudios para la identificación de *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. incognita*. Es así que fueron utilizados por Robertson *et al.* (2009), Devran *et al.* (2009), Karajeh *et al.* (2010), Hu *et al.* (2011), Singh *et al.* (2012), Naz *et al.* (2012), Akyazi *et al.* (2012), quienes pudieron

llevar a cabo la identificación correspondiente de especies del nematodo. En el presente trabajo se pudo demostrar que estos iniciadores pueden ser empleados para la diferenciación de *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla* en poblaciones provenientes de Perú, incluso cuando sólo se cuenta con especímenes juveniles de segundo estado.

Los iniciadores DAF/DAR (*M. arenaria*), no pudieron amplificar ningún producto a las condiciones probadas, esto concuerda con Devran *et al.* (2009), quién llevó a cabo un estudio de identificación de especies de *Meloidogyne* en Turquía, donde evaluó sets de iniciadores, y no obtuvo amplificaciones con el iniciador DAF/DAR. Esto debido posiblemente a que es necesario realizar mayor número de ensayos para encontrar las condiciones adecuadas de reproducibilidad, a la presencia de algún inhibidor para la reacción de PCR o a que el diseño de estos iniciadores no fue el adecuado.

La poblaciones 26 y 27, no amplificaron fragmentos del tamaño esperado con los iniciadores específicos usados en el presente trabajo, pero sí con el iniciador 194/195 de la región ribosomal IGS, con el cual se obtuvo productos de amplificación de aproximadamente 720 pb. (Figura 25 y 26). La identificación morfológica del patrón perineal de estas poblaciones mostró características variables pudiendo ser confundidas con las de las especies más comunes. Estos resultados nos indican que posiblemente la poblaciones 26 y 27 son especies diferentes a *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla*, pero dentro de la denominación de especies tropicales. Adam *et al.* (2007), quienes utilizaron los mismos iniciadores específicos usados en el presente trabajo, mencionan que la falta de identificación de una muestra desconocida con estos, podría ser causado también por un cambio en el sitio de unión del iniciador que evita la amplificación del producto esperado o a un cambio en la región intermedia entre los sitios de los iniciadores. Es por ello que para su identificación, son necesarias otras herramientas moleculares como secuenciamiento y su posterior análisis de secuencias.

Los pares de iniciadores 194/195 y C2F3/1108 han sido utilizados por Singh *et al.* (2012), Onkendi (2012), Naz *et al.* (2012), Akyazi *et al.* (2012), para la identificación molecular y estudios de diversidad genética de *Meloidogyne* spp. Los iniciadores 194/195 de la región IGS, son empleados en la identificación de especies de *Meloidogyne*, no sólo para el análisis de secuencias, sino también en la diferenciación de especies por el tamaño variable del producto amplificado de PCR, es así que han sido

utilizados como un punto de partida que orienta hacia la dirección a seguir en la identificación. Con respecto a las especies en estudio, los productos con un tamaño de 720 pb son reportados para las especies tropicales de *Meloidogyne* y un producto de 700 pb para *M. hapla*. Todas las 30 poblaciones fueron analizadas con estos iniciadores, además de las poblaciones 26 y 27, las poblaciones correspondientes a *M. incognita*, la población 28 (*M. javanica*) y 29 (*M. arenaria*), obtuvieron productos de amplificación de PCR de aproximadamente 720 pb, indicando así que se trata de especies tropicales de *Meloidogyne*. La población 30, obtuvo un producto de amplificación de PCR de aproximadamente 700 pb, correspondiente a *M. hapla*. Se pudo demostrar también que el iniciador 194/195 puede ser utilizado a partir de ADN extraído de uno y 10 juveniles de segundo estado ,utilizando el método de extracción de lisis (Figura 25 y 26).

La población 30, también fue evaluada con el par de iniciadores del genoma mitocondrial C2F3/1108, obteniéndose un fragmento amplificado de aproximadamente 530 pb, el cual es reportado para *M. hapla*. Para este caso se obtuvo productos de amplificación al utilizar el método de extracción de ADN de lisis con 10 juveniles de segundo estado (Figura 27). Se sabe que el genoma mitocondrial, proporciona una rica fuente de marcadores genéticos para la identificación y que cada célula contiene múltiples copias de este genoma circular, proporcionando un amplio ADN molde o plantilla para la PCR.

Los iniciadores mitocondriales C2F3/1108 amplifican la porción del ADNmt flanqueado por el gen COII y el gen ribosómico grande (16S). Entre estos dos genes se encuentra el gen tRNA-His (53 pb), y en las especies con partenogénesis mitótica (*M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*) se encuentran una secuencia no codificante que incluyen a la región rica en AT (AT-rich) o región controladora de la molécula mitocondrial. Esta región fue utilizada en un inicio para la diferenciación de las especies “comunes” de *Meloidogyne* debido a los diferentes tamaños de los productos amplificados generados con los iniciadores posicionados en la porción 3' de COII y la porción 5' del ARNr 16S (Powers y Harris , 1993) . Al obtener los productos de amplificación se pudieron reconocer tres tamaños: (i) 530 pb en *M. hapla* , que incluía las partes colindantes de CO II y 16S ARNr y la porción completa tRNA-His, pero ninguna región rica en AT, ya que esta especie no presenta una partenogénesis mitótica sino una partenogénesis meiotica (ii) 1,1 kb se encontró en *M. arenaria* , que incluyó un aproximado de 570 pb de la región rica en AT , y (iii) *M. incognita* y *M. javanica* tenido

los mayores productos de amplificación (~ 1,6 kb) debido a una región rica en AT de aproximadamente 1,0 kb .

En la actualidad, se han analizado otras especies de *Meloidogyne* con los iniciadores C2F3/1108, resultando diversas clases de tamaño, los cuales pueden ser similares a los de las especies más “comunes”. Estas clases de tamaño resultan principalmente de las inserciones y deleciones en la región rica en AT. Es así que otras especies presentan también la clase de tamaño más pequeño, que carece de una región rica en AT. Junto con *M. hapla* ,se incluyen *M. chitwoodi*, *M. fallax* , *M. graminicola* , *M. graminis* , *M. mali* , *M. marylandi* , *M. microtyla* , *M. naasi* , *M. oryzae* , *M. suginamiensis* y *M. trifolliophila*. Sin embargo, los productos de amplificación de este tamaño nos otorgan información preliminar acerca de la especie de la que se trata, descartando otras. Los productos obtenidos con este par de iniciadores también son degradados por enzimas de restricción que los cortan en fragmentos cuyo tamaño es también relacionado a una especie en particular (Powers y Harris, 1993).

Todos los iniciadores usados en la identificación molecular en el presente trabajo han sido previamente probados con aislamientos que se describen en las publicaciones originales. Sin embargo Adam *et al.* (2007), menciona que pueden presentarse dificultades para identificar una muestra desconocida debido a que se puede dar un cambio en el sitio del iniciador, dando un producto con un tamaño aberrante. Se menciona que pueden existir uniones no específicas en la región ITS, cuando se trabaja con iniciadores que involucran esta región. Esto es debido posiblemente a que no se conoce con exactitud algunas posiciones de las secuencias diana de estos iniciadores. También puede ocurrir que estas uniones se dan al haber secuencias muy similares, este es el caso de *Globodera pallida* y *G. rostochiensis*, donde la diferenciación requiere un ajuste muy preciso de la temperatura de alineamiento de ambos iniciadores para evitar su unión no específica (Zijlstra *et al.* 2000). Es por ello que se debe realizar una estandarización de las condiciones adecuadas para poder obtener resultados óptimos. Estas condiciones pueden variar de un laboratorio a otro, debido a diferente equipamiento y reactivos empleados. También es importante tener en cuenta que el método de extracción y la calidad de ADN puede ser crucial al momento de llevar a cabo la reacción.

Con respecto a la identificación de las especies en estudio en Perú, los primeros reportes de nematodos de importancia fitopatológica realizados por Krusberg y Hirschmann (1958), Martín (1959) y Gómez y Martín (1967), este último a nivel de especies, indican al género *Meloidogyne* como el nematodo mayormente diseminado a lo largo de la costa del país. Gómez y Martín (1967), reportan también a *M. javanica* y *M. arenaria*, en cultivos de papayo y melocotonero en la costa central y Chanchamayo. Posteriormente, Mullin *et al.* (1991), reportan a *M. javanica* en frijol en los departamentos de Ica y La Libertad, observando también que cultivares de frijol resistentes a *M. incognita*, presentaron nodulación radicular, ocasionada por *M. javanica*, ya que se encontró mezclas de estas dos especies afectando el cultivo. García (1992), determina también la presencia de *M. javanica* en cultivos de café en Villa Rica, Pasco, junto con *M. incognita* y *M. exigua*. Murga-Gutiérrez, *et al.* (2012), colectaron suelo de espárrago infestado con *Meloidogyne* en Virú y Chao, La Libertad, enviando las muestras al Istituto per la Protezione delle Piante y al Istituto di Bioscienze e BioRisorse (ex Istituto di Genetica Vegetale) en Italia, donde realizaron su identificación molecular, reportando a *M. incognita* y *M. ethiatica* por secuenciamiento de la región ITS. A su vez utilizaron los iniciadores MIR/MIF, Fjav/Rjav y Far/Rar, usados también en el presente trabajo.

La identificación molecular de especies de *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla* con el set de iniciadores utilizados en la presente tesis, es el primer trabajo realizado en nuestro país que utiliza esta metodología para la confirmación de las especies mencionadas. Además de ello, la presencia de *M. javanica* en tacaco, *M. arenaria* en vid y *M. hapla* en aguaymanto, constituyen los primeros reportes de estas especies en dichos cultivos en Perú. Tabaco es un cultivo susceptible a *M. javanica* y existen diversos reportes de búsqueda de resistencia en variedades de este cultivo. *M. arenaria* ha sido reportada en vid en Cuba (Rodríguez, 2011), donde se encontró en mayor proporción que *M. incognita* y *M. javanica*, en el mismo trabajo no se pudo determinar, por características del patrón perineal, la especie de algunas poblaciones presentes en el cultivo y se menciona que se realizarán pruebas moleculares posteriores, en Grecia se indicó a *M. arenaria* como una especie prevalente junto con *M. javanica* en vid (Karanastasi, 2008), también se ha reportado *M. arenaria* en vid en Chile (Magunacelaya y Dagnino, 1999) y más recientemente la especie *M. ethiopia*, la cual indican es la más importante no sólo por estar mayormente presente en el cultivo sino

por su mayor agresividad y difícil control (Carneiro *et al.*, 2004; 2007; Aballay *et al.*, 2009; 2013, Vilches, 2010).

La presencia de *M. hapla* en aguaymanto, ha sido indicada en Colombia; Niño (2008), menciona que Castillo (2002), realizó un estudio donde determinó que *Meloidogyne* spp. afecta la producción de aguaymanto, en particular, la especie *M. hapla*. Esta especie causa serias pérdidas a cultivos en regiones frías y cuando está presente en zonas subtropicales y tropicales, se encuentra siempre en alturas elevadas (1000 o más msnm), es así que en el presente trabajo se lo reporta en la localidad de José Gálvez, en la provincia de Celendín, Cajamarca que se encuentra a una altura de 2600 msnm.

La identificación de patógenos constituye la base de estudios de investigación e implementación de estrategias para un manejo eficiente, estas dependen de la información confiable acerca de las poblaciones de fitonematodos que habitan los suelos y parasitan los cultivos. Es así que en el manejo integrado que incluye el uso de cultivares resistentes y la rotación de cultivos, es indispensable el conocimiento de las especies involucradas, ya que las variedades o patrones de plantas pueden responder en forma diferente a cada una.

Los métodos morfológicos y moleculares empleados para la identificación de estas especies de nematodos han demostrado ser útiles para este fin y pueden ser utilizadas complementándose y con fines confirmatorios. Una ventaja de este enfoque combinado es que pueden utilizarse dependiendo del estado de desarrollo del nematodo con el que se cuenta y se puede aplicar técnicas de biología molecular cuando existen caracteres variables que hacen difícil la identificación. De esta manera, también se puede descartar la presencia de otras especies diferentes a las cuatro más comunes.

VI. CONCLUSIONES

- Se adoptó metodologías de extracción de ácidos nucleicos descritas previamente, con algunas modificaciones, a partir de uno y 10 juveniles de segundo estado, una y 10 hembras adultas y nódulos en raíces, de esta manera se pudo comprobar que estas metodologías pueden ser utilizadas para la identificación molecular de especies de *Meloidogyne* spp.
- De las 30 poblaciones en estudio, 25 mostraron productos de amplificación con los iniciadores MIF/MIR e Inc-14k F/Inc-14k R, diseñados para la identificación de *M. incognita*, una población afectando tabaco proveniente de Lambayeque fue identificada como *M. javanica* con el par de iniciadores Fjav/Rjav, una población afectando vid proveniente de Lima fue identificada como *M. arenaria* con el par de iniciadores Far/Rar y *M. hapla* fue identificada en una población afectando aguaymanto proveniente de Cajamarca, utilizando el par de iniciadores DHF/DHR, todos estos resultados concordaron con la identificación morfológica según el patrón perineal.
- No se obtuvo productos de amplificación con los iniciadores evaluados en la población de clavel proveniente de Ayacucho y la que se encontraba afectando vid en Piura. Lo que nos indica que se podría tratar de especies diferentes a las cuatro evaluadas en el presente trabajo.

VII. RECOMENDACIONES

- El presente trabajo apoya la importancia de un enfoque integrado que combine las características morfológicas con los resultados moleculares para la identificación precisa de las cuatro especies más comunes de *Meloidogyne* spp.
- Los resultados obtenidos en el presente trabajo constituyen la primera aplicación práctica de técnicas moleculares para el diagnóstico de nematodos fitopatógenos en nuestro país, por lo tanto es importante poner en práctica esta tecnología y realizar prospecciones en las principales zonas productoras afectadas por *Meloidogyne* spp., para conocer qué especies de nematodos se encuentran presentes.
- Es necesario evaluar el comportamiento de las especies de *Meloidogyne* spp. frente a los diferentes cultivos y sus variedades y así poder llevar a cabo un manejo integrado adecuado con el uso de variedades resistentes y rotación de cultivos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abad, P; Castagnone-Sereno, P; Rosso, MN; De Almeida, J; Favery, B. 2009. Invasion, feeding and development. In Perry, RN; Moens, M; Starr, JL. eds. Root-knot nematodes. London, UK. CAB International. p. 163-176.
2. Aballay, E; Ordenes, P; Mårtensson, A; Persson, P. 2013. Effects of rhizobacteria on parasitism by *Meloidogyne ethiopica* on grapevines. *European Journal of Plant Pathology* 135, 137-145.
3. Aballay, E; Persson, P; Mårtensson, A. 2009. Plant-parasitic nematodes in Chilean vineyards. *Nematropica* 39, 85-97.
4. Adam, MAM; Phillips, MS; Blok VC. 2007. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). *Plant Pathology* 56, 190–197.
5. Agrios, GN. 1996. *Fitopatología*. D.F, México. 2 ed. Limusa. 838 p.
6. Akyazi, F; Han, H; Cetintas, R; Felek, AF. 2012. First report of root-knot nematodes, *Meloidogyne arenaria* and *M. Hapla* (Nemata: Meloidogynidae) from pepino in Turkey. *Nematol. Medit.* 40: 107-110.
7. Berry, SD; Fargette, M; Spaull, VW; Morand, S; Cadet, P. 2008. Detection and quantification of rootknot nematode (*Meloidogyne javanica*), lesion nematode (*Pratylenchus zaeae*) and adagger nematode (*Xiphinema elongatum*) parasites of sugarcane using real-time PCR. *Molecular and Cellular Probes* 22, 168–176.
8. Bird, FA; Wallace, HR. 1966. The influence of temperature on *Meloidogyne hapla* and *Meloidogyne. javanica*. *Nematologica* 11:581-589.
9. Blok, VC; Phillips, MS; Fargette, M. 1997. Comparison of sequences from the ribosomal DNA intergenic region of *Meloidogyne mayaguensis* and other major tropical root knot nematodes. *Journal of Nematology* 29, 16–22
10. Blok, VC; Wishart, J; Fargette, M; Berthier, K; Phillips, MS. 2002. Mitochondrial differences distinguishing *Meloidogyne mayaguensis* from the major species of tropical root-knot nematodes. *Nematology* 4, 773–781.
11. Blok, VC; Powers, TO. 2009. Biochemical and Molecular Identification. In Perry, R.; Moens, M; Starr, J. eds. Root-knot nematodes. London, UK. CAB International, p. 98-112.

12. Brito, J; Powers, TO; Mullin, PG; Inserra, RN; Dickson, DW. 2004. Morphological and molecular characterization of *Meloidogyn mayaguensis* isolates from Florida. *Journal of Nematology* 36(3):232–240.
13. Canto-Sáenz, M. 2010. Separatas del Curso de Nematología. Lima, Perú. Escuela de Posgrado. Especialidad de Fitopatología. Universidad Nacional Agraria La Molina.
14. Carneiro, RMDG; Almeida, MRA; Quénhervé, P. 2000. Enzyme phenotype of *Meloidogyne* spp. populations. *Nematology* 2:645-654.
15. Carneiro, RMDG; Randig, O; Ritta, M; Almeida, A; Gomes, ACMM. 2004. Additional information on *Meloidogyne ethiopica* Whitehead, 1968 (Tylenchida: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitising kiwi fruit and grape-vine from Brazil and Chile. *Nematology* 6, 109-123.
16. Carneiro, RMDG; Tigano, MS; Randig, O; Almeida, MRA; Sarah, JL. 2004. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. *Nematology* 6:287-298.
17. Carneiro, RMDG; Almeida, MRA; Gomes, ACMM, Hernandez, A. 2005. *Meloidogyne izalcoensis* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in El Salvador. *Nematology* 7: 819-832.
18. Carneiro, RMDG; Almeida, MRA, Cofcewicz, ET, Magunacelaya, JC, Aballay, E. 2007. *Meloidogyne ethiopica*, a major root-knot nematode parasitising *Vitis vinifera* and other crops in Chile. *Nematology* 9 635-641.
19. Castagnone-Sereno, P; Leroy, F; Bongiovanni, M; Zijlstra, C; Abad, P. 1999. Specific diagnosis of two root-knot nematodes, *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*, with satellite DNA probes. *Phytopathology* 89:380-384.
20. Cenis, JL. 1992. Identification of four major *Meloidogyne* spp. by Random Amplified Polimorphic DNA (RAPD-PCR). *Phytopathology* 83:76-78.
21. Chitwood, DJ; Perry, RN. 2009. Reproduction, Physiology and Biochemistry. In Perry, R; Moens, M; Starr, J. eds. *Root-knot nematodes*. London, UK. CAB International. p. 182-194.
22. Curran, J; Baillie DL; Webster, JM. 1985. Use of restriction fragment length differences in genomic DNA to identify nematode species. *Parasitology* 90: 137-144.

23. Curran, J.; McClure MA; Webster, JM. 1986. Genotypic analysis of *Meloidogyne* populations by detection of restriction fragment length differences in total DNA. *Jour. Nematol.* 18: 83-86.
24. Curtis, RHC; Robinson, AF; Perry, RN. 2009. Hatch and host location. In Perry, RN; Moens, M; Starr, JL. eds. *Root-knot nematodes*. London, UK. CAB International. p. 139-155.
25. De Luca, F; Reyes, A; Veronico, P; Di Vito, M; Lamberti, F; De Giorgi, C. 2002. Characterization of the (GAAA) microsatellite region in the plant parasitic nematode *Meloidogyne artiellia*. *Gene* 293, 191-198.
26. De Weerd, M; Kox, L; Waeyenberge, L; Viaene, N; Zijlstra, C. 2011. A Real-time PCR Assay to identify *Meloidogyne minor*. *Journal of Phytopathology* 159 (2), 73–136.
27. Devran, Z and Sògüt, A. 2009. Distribution and identification of root-knot nematodes from Turkey *Journal of Nematology* 41 (2), 128-133.
28. Dong, K; Dean, RA; Fortnum, BA; Lewis, AS. 2001. Development of PCR primers to identify species of root-knot nematodes *Meloidogyne arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* and *M. javanica*. *Nematropica*. 31(2): 271-280.
29. Dorris, M; De Ley, P; Blaxter ML. 1999. Molecular analysis of nematode diversity and the Evolution of Parasitism. *Parasitology Today* 15(5): 188-193.
30. Doyle, JJ, y Doyle, JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-19.
31. Dropkin, VH. 1989. *Introduction to Plant Nematology*. New York, USA. Willey-Interscience. 304 p.
32. Eisenback, JD; Hirschmann, H; Sasser, JN; Triantaphyllou, AC. 1983. Guía para la identificación de las cuatro especies más comunes del nematodo agallador (*Meloidogyne* spp.), con una clave pictórica. North Carolina. USA. Dept. Plant Pathology and Genetics North Carolina State University and United State Agency for International Development. North Carolina State University Graphics. 48 p.
33. Eisenback, JD.1985. Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). In Sasser, JN; Carter, CC. eds. *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. v 1: Biology and Control. North Carolina. USA. Dept. Plant Pathology and United State Agency for International Development. North Carolina State University Graphics. p. 95-112.

34. Eisenback, JD; Hirschmann, H. 1991. Root-knot nematode: *Meloidogyne* spp. and races. In Nickle, WR. eds. Manual of Agricultural Nematology. New York. USA. Marcel Dekker. p. 191-274.
35. Eisenback, JD; Hunt DJ. 2009. General Morphology. In Perry, R; Moens, M; Starr, J. eds. Root-knot nematodes, UK. CAB International, p. 18-50.
36. Esbenshade, PR; Triantaphyllou, AC. 1985. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. Journal of Nematology 17, 6-20.
37. Evans, AAF; Perry, RN. 2009. Survival mechanisms. In Perry, RN; Moens, M; Starr, JL. eds. Root-knot nematodes. London, UK. CAB International. p. 201-219.
38. Fatemy, F; Trindler, PKE; Wingfield, JN; Evans, K. 1985. Effects of *Globodera rostochiensis*, water stress and exogenous abscissic acid on stomatal function and water use of Cara and Pentland dell potato plants. Revue de Nematologie 8:249-255.
39. Freymuth, F; Vabret, A; Cuvillon-Nimal, D; Simon, S; Dina, J; Legrand, L; Gouarin, S; Petitjean, J; Eckart, P; Brouard, J. 2006. Comparison of multiplex PCR assays and conventional techniques for the diagnostic of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute respiratory illness. Journal of Medical Virology 78 (11):1498–1504.
40. García, A. 2006. Identificación de especies de nematodos fitopatógenos de los géneros *Globodera* spp. y *Meloidogyne* spp. por medio de dos técnicas moleculares. Informe de Práctica de Especialidad en Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 47 p.
41. García, T. 1992. Identificación de especies de *Meloidogyne* en cafeto en Villa Rica, Pasco. Tesis Ing. Agrónomo. Lima, Perú. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Agraria La Molina. 74 p.
42. Gómez, TJ; Martin, RA. 1967. Problemas nematológicos en cultivos de costa, sierra y selva del país. Rev. Peru. Entomol. 10:32-39.
43. Handoo, ZA; Nyczepir, AP; Esmenjaud, D; Van der Beek, JG, Castagnone-Sereno, P, Carta, LK; Skantar, AM; Higgins, JA. 2004. Morphological, molecular, and differential-host characterization of *Meloidogyne floridensis* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing peach in Florida. Journal of Nematology 36:20–35

44. Handoo, ZA; Skantar, AM; Carta, LK; Schmitt, DP. 2005. Morphological and molecular evaluation of a *Meloidogyne hapla* population damaging coffee (*Coffea Arabica*) in Maui, Hawaii. *Journal of Nematology* 37(2): 136-145.
45. Harris, TS; Sandall, LJ, Powers TO. 1990. Identification of single *Meloidogyne* juveniles by Polymerase Chain Reaction Amplification of Mitochondrial DNA. *Journal of Nematology* 22(4):518-524.
46. He, B; Magill, C; Starr, JL. 2005. Laser capture microdissection and real-time PCR for measuring mRNA in giant cells induced by *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology* 37, 308–312.
47. Hirschmann, H. 1985. The genus *Meloidogyne* and morphological characters differentiating its species. In Sasser, JN; Carter, CC. eds. *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. v. 1: Biology and Control. North Carolina. USA. Dept. Plant Pathology and United State Agency for International Development. North Carolina State University Graphics. p. 79-93.
48. Hirschmann, H. 1986. *Meloidogyne hispanica* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), the ‘Seville Root-Knot Nematode’. *Journal of Nematology*. 18(4): 520-532.
49. Hu, MX; Zhuo, K; Liao, JL. 2011. Multiplex PCR for the simultaneous identification and detection of *Meloidogyne incognita*, *M. enterolobii*, and *M. javanica* using DNA extracted directly from individual galls. *Phytopathology* 101 (11):1270-1277.
50. Hunt, DJ; Handoo, ZA. 2009. Taxonomy, identification and principal species. In Perry, R.; Moens, M; Starr, J. eds. *Root-knot nematodes*. London, UK. CAB International. p. 55-88.
51. Hussey, RS. 1979. Biochemical systematics of nematodes: a review. *Helminthological abstracts (series B)* 48: 141-148.
52. Hussey, RS. 1985. Host-parasite relationships and associated physiological changes. In Sasser, JN, Carter; CC. eds. *An Advanced Treatise on Meloidogyne: I. Biology and Control*. North Carolina State University Graphics. p. 143-154.
53. Hussey, RS; Mims, CW. 1991. Ultrastructure of esophageal glands and their secretory granules in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Protoplasma* 156:9-18.
54. Hussey, RS; Williamson, VM. 1998. Physiological and Molecular Aspects of Nematode Parasitism. In Barker, KR; Pederson, GA; Windham, GL. eds. *Plant*

- and Nematode Interactions. Madison, Wisconsin, USA. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc. p. 87-108.
55. Hussey, RS; Janssen, G. 2001. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. In Starr, J; Cook, R; Bridge, J. eds. *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*. London, UK. CAB International. p. 43-70.
 56. Hwang, U; Kim, W. 1999. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *The Korean Journal of Parasitology* 37(4): 215-228.
 57. Karajeh, M., Abu-Gharbieh, WI, Masoud, SA. 2010. DNA Extraction and PCR-Based Diagnosis of the Root-Knot Nematodes. (*Meloidogyne* Species and Races) of Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*. 6(3): 342-352.
 58. Karanastasi, E.; da Conceição, I.LPM; Dos Santos, MCV; Tzortzakakis, EA; Abrantes, IM de O. 2008. Occurrence of the root-knot nematode *Meloidogyne arenaria* on balm and in a mixed population with *M. javanica* on grapevine in Greece. *Helminthologia* 45(1): 52-53.
 59. Karssen, G; Moens, M. 2006. Root-knot nematodes. In Perry, RN; Moens, M. eds. *Plant Nematology*. London, UK. CAB International. p. 59-88.
 60. Krusberg, L; Hirschmann, H. 1958. A survey of plant parasitic nematodes in Perú. *Plant Dis. Rep.* 42:604-686.
 61. Landa, BB; Palomares Rius, JE; Vovlas, N; Carneiro, RMDG; Maleita, CMN; Abrantes, IM de O. 2008. Molecular characterization of *Meloidogyne hispanica* (Nematoda, Meloidogynidae) by phylogenetic analysis of genes within the rDNA in *Meloidogyne* spp. *Plant Disease* 92, 1104–1110.
 62. Louws, FJ; Rademake, JLW; De Bruijin, FJ. 1999. The three Ds of PCR-Based Genomic Analysis of Phytobacteria: Diversity, Detection, Disease Diagnose. *Annual Review Phytopathology* 37:81- 125.
 63. Loveys, BR; Bird, AF. 1973. The influence of nematodes on photosynthesis in tomato plants. *Physiol. Plant. Pathol.* 11:11-21.
 64. Luc, M; Sikora, RA; Bridge, J. 1990. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Wallingford, UK. CAB International, 629 p.
 65. Lunt, DH; Whipple, LE; Hyman, BC. 1998. Mitochondrial DNA variable number tandem repeats (VNTRs): Utility and problems in molecular ecology. *Molecular Ecology* 7:1441–1455.

66. Magunacelaya, J; Dagnino, E. 1999. Nematología agrícola en Chile. Chile. Serie Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas. 253 p.
67. Manzanilla-López, R; Evans, K; Bridge, J. 2004. Plant diseases caused by nematodes. In Chen ZX, Chen SY, Dickson, DW. eds. Nematology: Advances and perspectives. v. 2. UK. CAB International. p. 637-703.
68. Martin, RA. 1959. Los nematodos parásitos de plantas en el Perú y su importancia para la agricultura. Rev. Peru. Entomol. 2:68-74.
69. McClure, MA; Nischwitz, C; Skantar, AM; Schmitt, ME; Subbotin, SA. 2012. Root-knot nematodes in golf course greens of the western United States. Plant Dis. 96:635-647.
70. Melakerberhan, H; Webster, JM; Brooke, RC. 1985. The influence of *Meloidogyne incognita* on growth, nutrient content and physiology of *Phaseolus vulgaris*. Physiol. Plant. Pathol. 26:259-268.
71. Melakerberhan, H; Webster, JM; Brooke, RC. 1986. Relationship between physiological response and yield loss of different age French bean to *Meloidogyne incognita*. Plant Pathol. 35:203-213.
72. Melakerberhan, H; Webster, JM; Brooke, RC; D'Auria, JM; Cackette, M. 1987. Effect of *Meloidogyne incognita* on plant nutrient concentration and its influence on the physiology of beans. J. Nematol. 19:324-330.
73. Melakerberhan, H; Ferris, H. 1989. Impact of *Meloidogyne incognita* on physiological efficiency of *Vitis vinifera*. J. Nematol. 21:74-80.
74. Melakerberhan, H; Ferris, H; Dias, J. 1990. Physiological response of resistant and susceptible *Vitis vinifera* cultivars to *Meloidogyne incognita*. J. Nematol. 22:224-230.
75. Melakerberhan, H; Webster, JM. 1993. The phenology of plant-nematode interaction and yield loss. In Khan, MW, ed. Nematode interactions. New York. EE.UU. Chapman & Hall. p. 26-41.
76. Meng, QP; Long, H; Xu JH. 2004. PCR assays for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. Acta Phytopathologica Sinica 34, 204–210.
77. Meon, S; Wallace, HR; Fisher, JR. 1978. Water relations of tomato (*Lycopersicon sculentum* Mill cv. Early Dwarf Red) infected with *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood. Physiol. Plant. Pathol. 13:275-281.

78. Michailides, TJ; Morgan, DP; Ma, Z; Luo, Y; Felts, D.; Doster, MA; Reyes, H. 2005. Conventional and molecular assays aid diagnosis of crop diseases and fungicide resistance. *California Agriculture* 59:115-123.
79. Moens, M; Perry, RN; Starr, JL. 2009. *Meloidogyne* species - a diverse group of novel and important plant parasites. In Perry, RN; Moens, M; Starr, JL. eds. Root-knot nematodes. London, UK. CAB International, p. 1-13.
80. Morgan, UM; Pallant, L; Dwyer, BW; Forbes, DA; Rich, G; Thompson, RCA. 1998. Comparison of PCR and Microscopy for Detection of *Cryptosporidium parvum* in Human Fecal Specimens: Clinical Trial. *J. Clin. Microbiol.* 36(4):995.
81. Mullin, BA; Abawi, GS; Pastor-Corrales, MA; Kornegay, JL. 1991. Root-knot nematodes associated with beans in Colombia and Peru and related yield loss. *Plant Dis.* 75:12081211.
82. Murga-Gutierrez SN; Colagiero, M; Rosso, LC; Finetti-Sialer, MM; Ciancio, A. 2012. Root-knot nematodes from asparagus and associated biological antagonists in Peru. *Nematropica* 42:57-62.
83. Naz, I; Palomares-Rius, J, Blok, V; Sardar Ali, S; Ahmed, M. 2012. Prevalence, incidence and molecular identification of root-knot nematodes of tomato in Pakistan. *African Journal of Biotechnology.* 11(100), 16546-16556.
84. Nico, A. 2002. Incidencia y patogenicidad de nematodos fitopatógenos en plantones de olivo (*Olea europea* L.) en viveros de Andalucía y estrategias para su control. Tesis Grado de Doctor. Córdoba, España. Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales ETSIAM, Universidad de Córdoba. Instituto de Agricultura Sostenible CSIC. 291 p.
85. Niño, NE; Arbeláez, G; Navarro, R. 2008. Efecto de diferentes densidades poblacionales de *Meloidogyne hapla* sobre uchuva (*Physalis peruviana* L.) en invernadero. *Agronomía Colombiana* 26(1): 58-67.
86. Niu, J; Guo, Q; Jian, H; Chen, C; Yang, D; Liu, Q. 2011. Rapid detection of *Meloidogyne* spp, by LAMP assay in soil and roots. *Crop Protection* 30, 1063-1069.
87. Onkendi EM. 2012. Molecular characterization of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) parasitizing potatoes in South Africa. Tesis Degree of Magister Scientiae MSc. Microbiology. South Africa. University of Pretoria, 123 p.

88. Okimoto, R; Chamberlin, HM; Macfarlane, JL; Wolstenholme, DR. 1991. Repeated sequence sets in mitochondrial DNA molecules of root knot nematodes (*Meloidogyne*): nucleotide sequences genome location and potential for host-race identification. *Nucleic Acids Research* 19:1619-1626.
89. Papadopoulou, J; Triantaphyllou, C. 1982. Sex differentiation in *Meloidogyne incognita* and anatomical evidence of sex reversal. *Journal of Nematology* 14(4):549-566.
90. Peterson, DJ; Zijlstra, C; Wishart, J; Blok, V; Vrain, TC. 1997. Specific probes efficiently distinguish root-knot nematode species using signature sequences in the ribosomal intergenic spacer. *Fundam. Appl. Nematol.* 20:619-626.
91. Poskuta, JW; Dropkin, VH; Nelson, CJ. 1986. Photosynthesis, photorespiration, and respiration of soybean after infection with root nematodes. *Photosynthetica* 20:405-410.
92. Powers, TO; Harris, TS. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* spp. *Journal of Nematology* 25, 1-6.
93. Powers TO; Mullin PG; Harris TS; Sutton LA; Higgins RS. 2005. Incorporating molecular identification of *Meloidogyne* spp. into a large-scale regional nematode survey. *Journal of Nematology* 37, 226–35.
94. Randing, O; Bongiovanni, M; Carneiro, RMDG; Castagnone-Sereno, P. 2002. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. *Genome* 45, 862-870.
95. Randing, O; Carneiro, RMDG; Castagnone-Sereno, P. 2004. Identificação das principais espécies de *Meloidogyne* parasitas do cafeeiro no Brasil com marcadores SCAR-café em multiplex-PCR. *Nematologia Brasileira* 28(1):1-10.
96. Rammah, A; Hirschmann, H. 1990. *Meloidogyne morocciensis* n. sp. (Meloidogyninae), a root-knot nematode from Morocco. *Journal of Nematology.* 22(3): 279-291
97. Ramsey, K; Wang, Z; Jones, MGK. 2004. Using laser capture microdissection to study gene expression in early stages of giant cells induced by root-knot nematodes. *Molecular Plant Pathology* 5,587–592.
98. Robertson, L; Díez-Rojo, MA; López-Pérez, JA; Piedra Buena, A; Escuer, M; López Cepero, J; Martínez, C; Bello, A. 2009. New host races of *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*, and *M. javanica* from horticultural regions of Spain. *Plant Dis.* 93:180-184.

99. Rodríguez, M. 2000. Identificación y caracterización de *Meloidogyne mayaguensis* (Nemata: Meloidogynidae) en el cafeto en Cuba. Tesis Grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. Cuba. Universidad Agraria de la Habana Fructuoso Rodríguez Pérez, 145 p.
100. Rodriguez, MG; Hernandez, D; Enrique, R; Gomez, L; Diaz-Viruliche, I; Peteira, B. 2011. Sintomatología y especies de *Meloidogyne* asociadas a vid (*Vitis vinifera* L. cv. Aramond) en Guira de Melena, Artemisa. Trabajos Preliminares. Rev. Protección Veg. 26(2):111-117.
101. Saeed, IAM; McGuidiwin, AE; Rouse, DI. 1997. Synergism of *Pratylenchus penetrans* and *Verticillium dahliae* manifested by reduced gas exchange in potato. Phytopathology 87:435-439.
102. Sasser, JN; Eisenback, JD; Carter, CC; Triantaphyllou AC. 1983. The International Meloidogyne Project-Its Goals and Accomplishments. Annual Review of Phytopathology 21: 271-288.
103. Semblat, JP; Wajenberg, E; Dalmaso, A; Abad, P; Castagnone-Sereno, P. 1998. High-resolution DNA fingerprinting of parthenogenetic root-knot nematodes using AFLP analysis. Molecular Ecology 7, 119-125.
104. Siddiqi, MR. 2000. Morphological characters and taxonomic methods. In: Tylenchide parasites of plant and insects. Second edition. CAB Internacional. UK.
105. Singh, SK; Khurma, UR; Lockhart, P. 2012. Distribution and diversity of root-knot nematodes in agricultural areas of Fiji. Nematropica 42:16-25.
106. Skantar, AM; Carta, LK. 2004. Molecular Characterization and phylogenetic evaluation of the Hsp90 gene from selected nematodes. Journal of Nematology 36(4):466-480.
107. Stanton, J; Hugall, A; Moritz, C. 1997. Nucleotide polymorphisms and an improved PCR-based mtDNA diagnostic for parthenogenetic root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Fundam. Appl. Nematol. 20:261-268.
108. Subbotin, SA; Madani, M; Krall, E; Sturhan, D; Moens, M. 2005. Molecular diagnostics, taxonomy, and phylogeny of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* species complex based on the sequences of the internal transcribed spacer-rDNA. Phytopathology 95:1308-1315.
109. Subbotin, SA; Moens, M. 2006. Molecular taxonomy and phylogeny. In. Perry, R.; Moens, M. eds. Plant Nematology. London, UK. CAB International. p, 33-58.

110. Taylor, A; Sasser, J. 1983. Biología, identificación y control de los nemátodos del nódulo de la raíz. North Carolina. EE.UU. Proyecto Internacional de *Meloidogyne*. Publicación Cooperativa entre el Departamento de Fitopatología de la Universidad del Estado de Carolina del Norte y la Agencia de EEUU para el desarrollo Internacional. 111 p.
111. Tesařová, B; Zouhar, M.; Ryšánek, P. 2003. Development of PCR for specific determination of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Plant Protect. Sci. 39: 23–28.
112. Tigano, MS; Carneiro, RMDG; Jeyaprakash, A; Dickson, DWD; Adams, BJA. 2005. Phylogeny of *Meloidogyne* spp. based on 18S rDNA and the intergenic region of mitochondrial DNA sequences. Nematology 7, 851-862.
113. Tigano, MS; Siqueira, KD; Castagnone-Sereno, P; Mulet, K; Queiroz, P. 2010. Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* and development of a SCAR marker for this guava-damaging species. Plant Pathology 59, 1054-1061.
114. Tokue, Y; Shoji, S; Satoh, K; Watanabe, A; Motomiya, M. 1992. Comparison of a polymerase chain reaction assay and a conventional microbiologic method for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 36(1):6.
115. Toyota, K; Shirakashi, T; Sato, E; Wada, S. 2008. Development of a real-time PCR method for the potato-cyst nematode *Globodera rostochiensis* and the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Soil Science and Plant Nutrition 54, 72–76.
116. Veilleux, C. 2004. PCR Technology (en línea). Consultado 15 de agosto. 2010. Disponible en: http://www.accessexcellence.org/LC/SS/PS/PCR/PCR_technology.html.
117. Vilches, OA. 2010. Evaluación de la resistencia de portainjertos de vid a tres especies del género *meloidogyne*. Tesis Ing. Agrónomo. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 22 p.
118. Wallace, H. 1964. The biology of plant parasitic nematodes. London, UK. Edward Arnold. 280 p.
119. Wallace, H. 1987. Effects of nematode parasites on photosynthesis. In Veech, JA; Dickson, DW. eds. Vistas in nematology. Soc. Nematol., Hyattsville, MD, p. 253-259.

120. Wilcox-Lee, DA; Loria, R. 1986. Water relations, growth, and yield in two snap vean cultivars infected with root-knot nematode *Meloidogyne hapla* (Chitwood). J. Am. Soc. Hortic. Sci. 111:34-38.
121. Williams, BD, Schrank, B, Huynh, C, Shownkeent, R and Waterston, R. 1992. A genetic mapping system in *Caenorhabditis elegans* based on Polymorphic Sequence-Tagged Sites. Genetics 131: 609-624.
122. Williamson, VM. 1991. Molecular Techniques for Nematode Species Identification. In Nickle, WR. ed. Manual of Agricultural Nematology. New York. USA. Marcel Dekker Inc. p. 107-123.
123. Williamson, VM; Caswell-Chen, EP; Westerdahl, BB; Wu, FF; Caryl, G. 1997. A PCR assay to identify and distinguish single juveniles of *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. J. Nematol. 29:9-15.
124. Wishart, J; Phillips, MS; Blok, VC. 2002. Ribosomal intergenic spacer: A polymerase chain reaction diagnostic for *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax*, and *M. hapla*. Phytopathology 92:884-892.
125. Wyss, U; Grundler, FMW; Münch, A. 1992. The Parasitic Behaviour of Second-Stage Juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. Nematologica 38:98-111.
126. Zijlstra, C; Lever, AEM; Uenk, BJ; Van Silfhout, CH. 1995. Differences between ITS regions of isolates of root-knot nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. Phytopathology 85:1231-1237.
127. Zijlstra, C. 1997. A fast PCR assay to identify *Meloidogyne hapla*, *M. chitwoodi* and *M. fallax* and to sensitively differentiate them from each other and from *M. incognita* in mixtures. Fundam. Appl. Nematol. 20:505-511.
128. Zijlstra, C; Uenk, BJ; Van Silfhout, CH. 1997. A reliable, precise method to differentiate species of root-knot nematodes in mixtures on the basis of ITS-RFLPs. Fundam. Appl. Nematol. 20:59-63.
129. Zijlstra, C. 2000. Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* based on SCAR-PCR: A powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits. Eur. J. Plant Pathol. 106:283-290.
130. Zijlstra C; Donkers-Venne DTHM; Fargette M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using Sequence

Characterised Amplified Region (SCAR) based PCR assays. *Nematology* 2,847–53.

131. Zijlstra, C; van Hoof, RA. 2006. A multiplex real-time polymerase chain reaction (TaqMan) assay for the simultaneous detection of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*. *Phytopathology* 96, 1255–1262.
132. Xu, J; Liu, P; Meng, Q; Long, H. 2004. Characterisation of *Meloidogyne* species from China using isozyme phenotypes and amplified mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism. *European Journal of Plant Pathology* 110, 309–315.

IX. ANEXOS

ANEXO 1

BUFFER DE LISIS

Componentes	
10 mM Tris (pH 8.2)	121 mg
2.5 mM MgCl₂	23.7 mg
50 mM KCl	5 ml de 1 M (stock)
0.45 % tween 20	0.45 ml
0.05 % gelatin	50 mg
H₂O	Hasta 100 ml
Proteinasa K	60 ug/ml

ANEXO 2

BUFFER DE EXTRACCIÓN (MÉTODO DE MINIPREPARACIÓN)

Componentes
250 mM Tris-HCl pH 8.0
50 mM EDTA
250 mM NaCl
0.5 SDS %

ANEXO 3

BUFFER DE EXTRACCIÓN CTAB

BUFFER DE EXTRACCIÓN (CTAB 2X)

Componentes

0.1 M Tris-HCl pH 8

1.4 M NaCl

0.02 M Na₂-EDTA pH 8

2 % CTAB

2 % PVP

BUFFER DE EXTRACCIÓN (CTAB 10X)

Componentes

10 % CTAB

0.5 M Na Cl
