

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA  
ESCUELA DE BIOLOGÍA**



**CENTRO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS**

**INFORME DE TRABAJO DE GRADUACIÓN**

**IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE NEMATODOS FITOPATÓGENOS DE  
LOS GÉNEROS *Globodera* spp. Y *Meloidogyne* spp. POR MEDIO DE  
DOS TÉCNICAS MOLECULARES**

**Ana Catalina García Arias**

**CARTAGO, 2006**

**IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE NEMATODOS FITOPATÓGENOS DE  
LOS GÉNEROS *Globodera* spp. Y *Meloidogyne* spp. POR MEDIO DE  
DOS TÉCNICAS MOLECULARES**

Ana Catalina García Arias\*

**RESUMEN**

Los nematodos de quiste de la papa (*Globodera* spp.) y los nematodos formadores de nódulos de la raíz (*Meloidogyne* spp.) causan graves pérdidas de importancia económica a diferentes cultivos en Costa Rica. *G. pallida*, *G. rostochiensis* y algunas especies de *Meloidogyne* spp. son plagas cuarentenarias, por lo que se encuentran entre los nematodos de mayor regulación en el comercio agrícola. En este trabajo se pretende estandarizar algunas técnicas para el diagnóstico molecular de estos géneros. Se realizaron amplificaciones en reacción múltiple, con imprimadores universales y específicos (ITS5, PITSr3 y PITSp4, para *Globodera* spp.; JMV1, JMV2, JMVhapla y JMVtropical, para *Meloidogyne* spp.), amplificaciones con PCR Simple (GpaF/GpaR y GroF/GroR, para *Globodera* spp.; Blo4/Blo5, para *Meloidogyne* spp.) y PCR-RFLPs de la región ITS del ADN ribosomal, utilizando las enzimas *AluI*, *MspI*, *DraI* y *RsaI*. Se lograron identificar las muestras locales de *Globodera* spp. como *G. pallida*. En el caso de *Meloidogyne* spp., se identificaron las especies *M. hapla*, *M. incognita* y *M. salasi*; algunas muestras no pudieron ser identificadas, pero se descartó la posibilidad de que fueran una de las tres especies mencionadas. La reacción múltiple con imprimadores específicos es más apropiada y ventajosa para el diagnóstico molecular en análisis de rutina, ya que permite detectar especies simultáneamente en la misma muestra. La enzima *AluI* fue la que mostró los mejores resultados para la distinción de especies de *Meloidogyne* spp. En el caso de *Globodera* spp., ambas enzimas utilizadas (*AluI* y *MspI*) presentaron resultados concluyentes para la diferenciación entre especies. La especie *M. salasi* fue descrita en Costa Rica en 1984 y hasta el momento no existía confirmación molecular de su estatus de especie, así, esta es la primera vez que datos moleculares apoyan la nominación de *M. salasi*.

**Palabras clave:** *Globodera* spp., *Meloidogyne* spp., reacción múltiple, PCR Simple, PCR-RFLP, región ITS, ADN ribosomal, imprimadores específicos y universales.

---

\* Informe de Práctica de Especialidad, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2005.

**IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE NEMATODOS FITOPATÓGENOS DE  
LOS GÉNEROS *Globodera* spp. Y *Meloidogyne* spp. POR MEDIO DE  
DOS TÉCNICAS MOLECULARES**

Ana Catalina García Arias\*

**ABSTRACT**

Potato Cyst Nematodes (*Globodera* spp.) and Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.) cause severe losses of economic importance in different crops in Costa Rica. *G. pallida*, *G. rostochiensis* and some species of *Meloidogyne* spp. are considered quarantine pests and are among the most regulated nematodes in agriculture. The objective in this paper was to standardize some of the molecular diagnostic techniques for both genera. Multiplex PCR, with species-specific and universal primers (ITS5, PITSr3 & PITSp4, for *Globodera* spp.; JMV1, JMV2, JMVhapla & JMVtropical, for *Meloidogyne* spp.), Simple PCR (GpaF/GpaR & GroF/GroR, for *Globodera* spp.; Blo4/Blo5, for *Meloidogyne* spp.), and amplified ITS region of ribosomal DNA PCR-RFLPs, using *AluI*, *MspI*, *DraI* and *RsaI* restriction enzymes, were performed. The local samples of *Globodera* spp. were identified as *G. pallida*. In *Meloidogyne* spp., the species *M. hapla*, *M. incognita* and *M. salasi* were identified; some samples could not be identified, but the possibility of them being one of the mentioned species was discarded. The Multiplex PCR with species-specific primers allows the simultaneous detection of several species in the same sample, making it the most suitable and advantageous technique for routine analysis in molecular diagnostics. The *AluI* enzyme demonstrated the best results for species distinction of *Meloidogyne* spp. In *Globodera* spp., both of the used enzymes (*AluI* y *MspI*) presented conclusive results for differentiation between species. *M. salasi* was described in Costa Rica in 1984, and up until now there wasn't a molecular confirmation of its species estatus, which makes this the first time molecular data support the nomination of *M. salasi*.

**Key Terms:** *Globodera* spp., *Meloidogyne* spp., Multiplex PCR, Simple PCR, PCR-RFLP, ITS region, ribosomal DNA, species-specific & universal primers.

---

\* Informe de Práctica de Especialidad, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2005.

**IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE NEMATODOS FITOPATÓGENOS DE  
LOS GÉNEROS *Globodera* spp. Y *Meloidogyne* spp. POR MEDIO DE  
DOS TÉCNICAS MOLECULARES**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del  
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial  
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

**Miembros del Tribunal**

---

**MSc. Vladimir Villalba V.,  
Profesor Asesor - ITCR**

---

**Dr. Luis Gómez,  
Asesor - CIA**

---

**MSc. Johnny Peraza Moraga,  
Lector**

## **DEDICATORIA**

A mis padres y hermanos, por su apoyo incondicional durante mis estudios

Catalina

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi más sincero agradecimiento a los diferentes colaboradores que, de una forma u otra, permitieron la realización del presente Trabajo de Graduación:

Al Centro de Investigaciones Agronómicas por abrirme las puertas y darme la oportunidad de realizar este proyecto. En especial agradezco de todo corazón a todos los compañeros del Laboratorio de Biotecnología de Plantas, profesores y estudiantes, con los cuales trabajé, gracias por el apoyo brindado.

Al Dr. Luis Gómez por ser mi guía en este proyecto, gracias por su paciencia, colaboración e interés en la realización de mi trabajo y por siempre brindarme su apoyo y enseñanzas.

Al MSc. Vladimir Villalba, mi tutor, por la paciencia, consejos y tiempo brindado durante la realización de este trabajo.

A los funcionarios del Laboratorio de Nematología de la Universidad de Costa Rica, particularmente a la señora Lorena Flores, por su valiosa colaboración en el suministro de materiales.

Al MSc. Johnny Peraza Moraga por su disposición y colaboración en la revisión del presente trabajo.

A la profesora MSc. Claudia Zúñiga por los consejos brindados, no solo durante la realización del proyecto, sino durante mis años de estudio en la carrera.

A los profesores de la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica, mi más profundo agradecimiento por haberme formado durante estos cuatro años de estudios.

# ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>ACREDITACIÓN</b> .....	<b>iii</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>v</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	<b>viii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
GENERALIDADES DE LOS NEMATODOS .....	3
<i>GLOBODERA</i> SPP. ....	5
<i>MELOIDOGYNE</i> SPP. ....	7
DIAGNÓSTICO TRADICIONAL.....	8
DIAGNÓSTICO MOLECULAR .....	9
<i>La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</i> .....	9
<i>Visualización de ADN: La Electroforesis</i> .....	11
<i>Análisis RFLP</i> .....	11
<i>Región espaciadora ITS</i> .....	12
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
OBJETIVO GENERAL .....	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
NEMATODOS .....	15
EXTRACCIÓN DE ADN DE NEMATODOS.....	18
PCR CON IMPRIMADORES ESPECÍFICOS .....	18
<i>Globodera</i> spp. ....	18
<i>Meloidogyne</i> spp.....	19
PCR-RFLP .....	19
ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN Y DE DIGESTIÓN .....	20
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>21</b>
EXTRACCIÓN DE ADN .....	21
PCR CON IMPRIMADORES ESPECÍFICOS .....	21
<i>Globodera</i> spp. ....	21

<i>Meloidogyne</i> spp.....	24
PCR-RFLP .....	26
<i>Globodera</i> spp. ....	26
<i>Meloidogyne</i> spp.....	28
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>34</b>
EXTRACCIÓN DE ADN .....	34
PCR CON IMPRIMADORES ESPECÍFICOS .....	34
<i>Globodera</i> spp. ....	34
<i>Meloidogyne</i> spp.....	35
PCR-RFLP .....	36
<i>Globodera</i> spp. ....	37
<i>Meloidogyne</i> spp.....	37
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>39</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>41</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>42</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>47</b>
ANEXO 1: AMORTIGUADOR DE LISIS DE GUSANOS (WORM LYSIS BUFFER: WLB).....	47
ANEXO 2: AMORTIGUADOR DE LISIS NUCLEAR (CTAB): .....	47
ANEXO 3: NIVELES CATEGÓRICOS APLICABLES DE CADA MARCADOR MOLECULAR O REGIÓN DE GENES .....	47

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Identificación y descripción de las muestras analizadas y de los controles utilizados para el género <i>Globodera</i> spp. ....	<b>16</b>
<b>Cuadro 2.</b> Identificación y descripción de las muestras analizadas y de los controles utilizados para el género <i>Meloidogyne</i> spp. ....	<b>17</b>
<b>Cuadro 3.</b> Resumen del tamaño de los productos de amplificación de las muestras (especies) del género <i>Meloidogyne</i> spp. analizadas con diferentes imprimadores. ....	<b>32</b>
<b>Cuadro 4.</b> Patrones de restricción de las muestras (especies) del género <i>Meloidogyne</i> spp. analizadas con diferentes enzimas. ....	<b>33</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Familia multigénica del ADN ribosomal (ADNr).....	13
<b>Figura 2.</b> Identificación molecular de nematodos de quiste de papa de Costa Rica. ....	21
<b>Figura 3.</b> Identificación molecular de nematodos de quiste de papa de Costa Rica con imprimadores específicos.....	23
<b>Figura 4.</b> Identificación molecular de <i>Meloidogyne</i> sp. de Costa Rica con los imprimadores específicos Blo4 y Blo5. ....	24
<b>Figura 6.</b> Amplificación de la región ITS del género <i>Globodera</i> con los imprimadores ITS4 e ITS6. ....	26
<b>Figura 7.</b> Digestión enzimática del producto de amplificación de la región ITS del género <i>Globodera</i> con la enzima <i>AluI</i> . ....	27
<b>Figura 8.</b> Digestión enzimática del producto de amplificación de la región ITS del género <i>Globodera</i> con la enzima <i>MspI</i> . ....	28
<b>Figura 9.</b> Amplificación de la región ITS del género <i>Meloidogyne</i> con los imprimadores ITS4 e ITS6. ....	29
<b>Figura 10.</b> Digestión enzimática del producto de amplificación de la región ITS del género <i>Meloidogyne</i> con la enzima <i>AluI</i> . ....	30
<b>Figura 11.</b> Digestión enzimática del producto de amplificación de la región ITS del género <i>Meloidogyne</i> con la enzima <i>DraI</i> . ....	30
<b>Figura 12.</b> Digestión enzimática del producto de amplificación de la región ITS del género <i>Meloidogyne</i> con la enzima <i>RsaI</i> . ....	31

## INTRODUCCIÓN

El Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica (UCR) se dedica a la investigación en distintas áreas, labor que ha sido orientada hacia la investigación participativa en fincas. Esto último le ha permitido una mejor y más rápida adopción de tecnologías desarrolladas. La Biotecnología es una de las áreas de investigación de este centro, trabajo que se realiza en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas (LBP), cuyo objetivo es el de aplicar técnicas biotecnológicas para el mejoramiento de cultivos agrícolas, especialmente aquellos en que el país presenta ventajas comparativas de producción, como por ejemplo, las raíces y tubérculos tropicales. Un cultivo sensible en el que se trabaja fuertemente es la papa, con el objetivo de suplir material de siembra de alta pureza varietal y fitosanitaria.

La papa es un tallo subterráneo y suculento, que presenta un alto contenido de carbohidratos, vitaminas y minerales. Actualmente, este tubérculo es el cuarto cultivo de mayor importancia a nivel mundial, luego del trigo, el maíz y el arroz, los cuales son los cuatro cultivos básicos en la alimentación humana (Ramírez, 2001).

El tubérculo de papa en Costa Rica, por su consumo, es el tercer producto en importancia a nivel nacional, luego del arroz y los frijoles. Más del 90% de la producción nacional se obtiene de Cartago, donde además, se concentra el 95% del área nacional dedicada al cultivo (Cglobal, 2003).

Los nematodos de quiste de la papa y los nematodos formadores de nódulos de la raíz, dependen del grado de asociación hospedante-nematodo, de la raza y densidad poblacional del nematodo, la susceptibilidad del hospedante, la fertilidad del suelo, las condiciones ambientales y la interrelación entre los nematodos y otros organismos fitopatógenos. La combinación de todos estos factores determina la severidad de la enfermedad y, consecuentemente, la disminución en la producción (Ortuño *et al.*, 1999; Agrios, 2004).

Las especies *Globodera pallida* (Stone) Behrens (nematodo blanco de la papa) y *Globodera rostochiensis* (Woll.) Behrens (nematodo dorado de la papa) son consideradas como las plagas más importantes del cultivo de papa, y han sido identificadas como las causantes del daño más importante alrededor del mundo en estas plantaciones (Fullaondo *et al.*, 1999; Manduric y Andersson, 2003; Vejl *et al.*, 2002).

Estas especies son consideradas, generalmente, como plagas de regiones templadas, aunque, según Powers (2004), aproximadamente un tercio de las 65 especies descritas de *Heterodera*, sinónimo de *Globodera*, provienen de los trópicos. Este autor menciona que tanto *G. rostochiensis* como *G. pallida* se encuentran entre los nematodos de mayor regulación en el comercio agrícola.

El género *Meloidogyne* spp. es un nematodo que causa agallas o nudosidades en las raíces de su hospedero, de ahí su nombre común nematodo formador de nódulos de la raíz. Estos nematodos ocasionan una condición anormal en la planta, la cual puede

tratarse de un debilitamiento de las puntas de la raíz, lo cual inhibe su desarrollo, o bien, de la estimulación de una formación radical excesiva, induciendo una formación de hinchamientos en las raíces, privando a las plantas de sus nutrimentos, además de deformarlas y disminuir su valor comercial (Agrios, 2004).

La identificación correcta de las especies de nematodos presentes en las plantaciones de papa es esencial como parte de una efectiva estrategia de manejo integrado de plagas, es decir, el control efectivo de estos nematodos, se basa en la exactitud del conocimiento de las especies y patotipos presentes en el suelo. De manera que una identificación rápida y precisa de las diferentes especies de nematodos es necesaria para un efectivo control y manejo de los mismos (Bates *et al*, 2002; Bulman y Marshall, 1997; Xu *et al*, 2004).

Existen diferentes métodos para la identificación de los nematodos. Los métodos tradicionales de identificación (morfológicos) son lentos, muy subjetivos y laboriosos, por lo cual a veces pueden ser inefectivos. Por otro lado, las herramientas de Biología Molecular se han estado utilizando con mayor frecuencia para la separación de especies y patotipos de nematodos, y se espera que lleguen a ser de uso rutinario. Algunas de estas herramientas incluyen la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) con imprimadores específicos y la de PCR-RFLP, entre otros (Vejl *et al*, 2002).

Como se mencionó anteriormente, uno de los objetivos del LBP dentro del CIA es el de aplicar las técnicas biotecnológicas, en este caso el diagnóstico molecular, para el mejoramiento de cultivos agrícolas. Los géneros de nematodos *Globodera* spp. y *Meloidogyne* spp. causan graves daños a las plantaciones de papa, entre otros cultivos, en Costa Rica, lo cual es de gran importancia económica para el mismo, además, su diagnóstico tradicional implica muchas veces dificultades que podrían evitarse si se utilizara un diagnóstico molecular rápido y preciso. En este trabajo se pretende estandarizar algunas de las técnicas para el diagnóstico molecular de especies de estos géneros, así como identificar las especies predominantes en las fincas muestreadas.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### GENERALIDADES DE LOS NEMATODOS

Los nematodos constituyen un grupo de organismos importantes en las plantas como agentes causantes de enfermedades. Es un grupo bastante homogéneo desde el punto de vista anatómico y morfológico, pero habitan una amplia variedad de hábitats y constituyen uno de los grupos más numerosos y diversos del reino animal, encontrándose en el suelo a densidades cercanas a los 30 millones de individuos por metro cuadrado. Estos individuos no se alimentan de materia orgánica muerta, sino de otros organismos, ya sea como depredadores o como parásitos. En la mayoría de los casos se alimentan de las raíces de las plantas, aunque también es posible encontrar algunos géneros que atacan las partes aéreas (Agrios, 2004; Arauz, 1998).

Existen al menos 68 especies de nematodos fitoparásitos que afectan el cultivo de la papa alrededor del mundo, las cuales representan 24 géneros. La importancia económica sobre el cultivo y producción de la papa para muchas de estas especies aún no ha sido establecida, sin embargo, otras especies son plagas importantes reconocidas mundialmente (Brodie, 1998).

Algunos tipos de nematodos fitoparásitos que afectan la producción de este tubérculo son:

- *Nematodos formadores de quistes*: dentro de este grupo se encuentra el género *Globodera* spp. Son patógenos económicamente importantes de la papa en las regiones templadas del mundo. La característica diagnóstica de las infecciones por este tipo de nematodos es la presencia de quistes sobre las raíces de las plantas. Muchas veces se les denomina nematodos de quiste asociados al cultivo de la papa, o PCN, por sus siglas en inglés (Potato cyst nematodes). Éstos causan el daño restringiendo el crecimiento radicular de las plantas y por ende la absorción de nutrientes de las mismas (Agrios, 2004; Brodie, 1998; Bates *et al*, 2002; Bulman y Marshall, 1997).
- *Nematodos formadores de nódulos en la raíz*: el ejemplo más representativo lo constituye *Meloidogyne* spp. Se encuentran distribuidos en todo el mundo y son muy patogénicos para gran cantidad de cultivos. Se nutren de las raíces y poseen hábito endoparasítico sedentario. *Meloidogyne* spp se fija en las raíces y provoca la aparición de células gigantes que forman una agalla. Esta estructura dificulta la absorción de elementos del suelo. Los síntomas ocasionados por el ataque de este nematodo son similares a los producidos por deficiencias nutricionales e invasión de hongos del suelo (Agrios, 2004; Brodie, 1998; Crozzoli, 2002).

Los nematodos fitopatógenos son organismos pequeños (300 - 1 000  $\mu\text{m}$  de longitud). Tienen un aspecto vermiforme (forma de gusano), presentan simetría bilateral y en corte transversal se ven redondos; sus cuerpos son lisos y carecen de patas y otros

apéndices. Las hembras de algunas especies se hinchan en la madurez y adquieren forma de una pera o de cuerpos esféroides. Un aspecto que los caracteriza es su transparencia (hialinos). Poseen los principales sistemas fisiológicos de los animales superiores. En algunas especies existe un dimorfismo sexual definido, con hembras y machos bien diferenciados. Los sistemas reproductores están bien desarrollados: los nematodos hembras tienen de uno a dos ovarios y un útero que termina en una vulva, los nematodos machos son similares a las hembras, pero hay un testículo, una vesícula seminal y termina en un orificio común con el intestino. La reproducción se realiza por la copulación de hembras y machos, llamada anfimixis, pero también se dan otras formas como la partenogénesis, el hermafroditismo, la pseudo fertilización, en la cual se da una falsa fertilización del óvulo, y los nematodos intersexos, cuando un individuo tiene ambos órganos reproductivos, pero solo uno es funcional. Una de las principales características que permite identificar a un nematodo parásito de plantas, es la presencia del estilete, ubicado en el extremo anterior del tracto digestivo. Es una estructura protráctil y hueca que le permite al nematodo penetrar los tejidos vegetales, perforar las células y consecuentemente extraer los nutrimentos necesarios para su crecimiento y desarrollo. (Agrios, 2004; Arauz, 1998; Rivera, 1999).

El ciclo de vida de los nematodos está compuesto por cuatro etapas larvarias y se lleva a cabo en un tiempo aproximado de 3 a 4 semanas bajo condiciones óptimas. Los huevecillos se incuban y se desarrollan en larvas, las cuales poseen una apariencia y estructura similar a la de los nematodos adultos. Cada etapa larvaria consiste en un aumento de tamaño de las larvas y una muda. Al finalizar la última etapa larvaria los nematodos se diferencian en machos y hembras adultas (Agrios, 2004; Rivera, 1999).

En cuanto a la clasificación de los nematodos, taxonómicamente, éstos se ubican en el reino Animalia; *Phylum* Nematoda; Clases Secernentea y Adenophorea; Ordenes Dorilaimyda y Tylenchida, siendo el orden Tylenchida el más numeroso en géneros fitoparásitos. En términos de hábitat, se clasifican en endoparásitos, especies que penetran el hospedante y se alimentan de él, y ectoparásitos, que no penetran en los tejidos de la raíz, sino que se alimentan de las células cerca de su superficie. Ambos grupos pueden ser migratorios, vivir libremente en el suelo, alimentándose superficialmente de las raíces y tallos subterráneos de las plantas, o ser sedentarios, que se fijan a las raíces. Otra forma de clasificación consiste en la preferencia de hospederos de los nematodos: pueden ser polífagos, se alimentan de un amplio rango de plantas; o monófagos, que sobreviven a partir de un grupo específico de plantas. Muchos nematodos necesitan de un hospedero apropiado para su supervivencia, en caso de no estar presente este hospedero, los nematodos buscan hospederos alternos para sobrevivir, como por ejemplo malezas o residuos de cosechas, aunque en el caso de algunas especies de nematodos todos los individuos pueden morir al término de unos cuantos meses (Agrios, 2004; OIRSA, 1999).

Los nematodos pueden causar dos tipos de daños: directo e indirecto. El daño directo es provocado por el rompimiento de las células de la planta con el estilete del nematodo, es decir, se trata de daños mecánicos directos que producen los individuos

al alimentarse. El daño indirecto surge como consecuencia del daño directo, causando una mayor susceptibilidad de la planta al ataque de otros microorganismos patógenos como por ejemplo hongos y bacterias. Por lo general, los síntomas de enfermedades producidas por nematodos pueden relacionarse con el deterioro de la raíz, como el desarrollo deficiente, formación de lesiones necróticas, disminución de la resistencia al invierno y pérdida de la corteza en plantas perennes, además se pueden observar otros síntomas, como: achaparramiento, marchitez, crecimiento lento, baja productividad, desbalance nutricional y síntomas de estrés de agua (Agrios, 2004).

### ***Globodera spp.***

Los nematodos de este género existen alrededor de todo el mundo, aunque son más frecuentes y abundantes en regiones con clima cálido y de inviernos cortos y moderados. Infectan a más de 2 000 especies de plantas, incluyendo los mayores cultivos y causando una reducción significativa tanto en la producción como en la calidad de los mismos (Román, 1978; Wishart *et al*, 2002; Agrios, 2004).

Los síntomas causados por los nematodos de quiste de la papa no son específicos. Alguna sintomatología general incluye parches de poco crecimiento en la plantación, con algunas plantas cloróticas, marchitas o con follaje necrótico, lo cual da como resultado una disminución en el tamaño del tubérculo. Sin embargo, existen otras posibles causas para estos síntomas, por lo que debe realizarse una revisión visual, levantando las plantas y buscando la presencia de quistes y especímenes jóvenes femeninos en las raíces o evaluando una muestra de suelo en el laboratorio, siendo este último el mejor método para determinar la presencia de nematodos de quiste de la papa (EPPO, 2004).

Una vez determinada la presencia de los nematodos de quiste de la papa en una plantación, se requiere identificar la especie presente en la misma, para darle así el mejor tratamiento y poner en práctica una estrategia de manejo integrado de plagas que resulte efectiva para erradicar el problema presente en el cultivo.

*Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida* son especies que se encuentran morfológica y fisiológicamente muy relacionadas entre sí. Sin embargo, existen variaciones en diversos rasgos discriminatorios entre estas especies, como por ejemplo el largo del estilete, así como su forma; también, una diferencia importante entre estas especies, es la diferencia en la transición del color de los especímenes femeninos durante la formación de los quistes (Fullaondo *et al*, 1999). En el boletín #34 de la Organización Europea y Mediterránea para la Protección Vegetal (EPPO) (2004) se indica que el color femenino en la etapa adecuada puede ser utilizado como indicador, ya que una hembra que cambia de blanco a amarillo y luego a un quiste café corresponde a *G. rostochiensis*, mientras que una que cambia de blanco directamente a un quiste café corresponde a *G. pallida*.

El daño que causan los nematodos de quiste de la papa a las plantas, descrito anteriormente, provoca una pérdida en el rendimiento de tubérculos. En la actualidad, se piensa que estos microorganismos son los causantes de pérdidas de más del 12% del promedio mundial de la producción de papa (Bates *et al*, 2002; Bulman y Marshall, 1997).

Estas plagas se incluyeron en el archivo de la Organización Europea y Mediterránea para la Protección Vegetal como plagas cuarentenarias de importancia mundial, ya que se han reportado pérdidas millonarias, tanto en calidad como en cantidad de tubérculos. De manera que, si estos fitoparásitos son detectados en alguna plantación dedicada a la producción de semilla de papa, la misma debe detenerse por al menos 10 años si se encontrara aunque sea un quiste de las especies *Globodera rostochiensis* y *G. pallida*. Para plantaciones dedicadas a la venta de papa, si en el suelo se detectan únicamente individuos de *Globodera rostochiensis*, se pueden utilizar cultivares de papa resistentes, lo cual ayudaría a reducir la densidad de la población. Sin embargo, la presencia de un solo quiste puede causar el rechazo de todo un cargamento de papas destinadas a la exportación. (EPPO, 2004; Fullaondo *et al*, 1999; Manduric y Andersson, 2003; Powers, 2004; Vejl *et al*, 2002).

El control de los nematodos de quiste de la papa es muy difícil, debido a la existencia de diferentes patotipos. Según Fullaondo y colaboradores (1999), se han distinguido numerosos patotipos dentro de cada especie, basándose en la capacidad de multiplicarse en clones diferenciales de papa (Vejl *et al*, 2002).

A pesar de las diferencias morfológicas entre ambas especies, la identificación y diferenciación entre ellas a partir de características morfológicas y fisiológicas de los quistes requiere de un alto grado de habilidad y especialización, ya que las diferencias son muy pequeñas, además de que es una técnica que requiere de mucho tiempo (Bates *et al*, 2002; Fullaondo *et al*, 1999). Debido a la cercanía morfológica de *G. rostochiensis* y *G. pallida*, se han desarrollado otro tipo de técnicas para separar estas dos especies. Recientemente, los métodos de análisis basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se han convertido en el método de escogencia para la identificación de especies. (Bates *et al*, 2002; EPPO, 2004).

Bates *et al*. (2002), en una comparación de las técnicas para la detección y determinación de nematodos de quistes de la papa en muestras de campo, demostraron que los métodos de PCR tienen una mayor sensibilidad y habilidad de identificar poblaciones de especies mixtas. Varios investigadores han desarrollado ensayos de PCR para separar las dos especies de nematodos (EPPO, 2004).

*Globodera rostochiensis* y *G. pallida* pueden ser diferenciadas de varias maneras. Una de éstas consiste en el uso de enzimas de restricción que pueden digerir diferencialmente la región del Espaciador Transcrito Interno (ITS, por sus siglas en inglés) del ADN ribosomal, lo cual se explicará más adelante, produciendo patrones de banda específicos. Otra manera de diferenciación corresponde al uso de imprimadores específicos que se diseñan a partir de secuencias de la misma región ITS (Internal Transcribed Spacer) mencionada anteriormente. Ésta es una región

variable del ADN ribosomal que ha sido examinada ampliamente en estudios de poblaciones (Bulman y Marshall, 1997; Fullaondo *et al*, 1999; Powers, 2004).

La mayoría de los estudios recientes han incorporado acercamientos de PCR-RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphisms) basados en la región ITS para la identificación de especies, o utilizan juegos de imprimadores múltiples, un juego como control positivo para la amplificación y un segundo juego que incluye un imprimador específico de una especie.

En su artículo, Fullaondo *et al*. (1999) describieron dos juegos de imprimadores específicos para las especies de *Globodera*: GroF y GroR (5'-GCAAGCCCAGCGTCAGCAAC-3' y 5'-GAACATCAACCTCCTATCGG-3') para *G. rostochiensis*, los cuales resultan en una banda de 315 pb; GpaF y GpaR (5'-TGTCATTCTCCACCAG-3' y 5'-CCGCTTCCCCATTGCTTTCG-3') para *G. pallida*, los cuales resultan en una banda de 798 pb.

En un estudio se utilizó un imprimador universal ITS-5 (5'-GGAAGTAAAA GTCGTAACAAGG-3'), y también imprimadores específicos: para *G. pallida* el PITSp4 (5'-ACAACAGCAATCGTCGAG-3'), que resulta en una banda de 265 pb y para *G. rostochiensis* el PITSr3 (5'-AGCGCAGACATGCCGCAA-3'), resultando en una banda de 434 pb. Los imprimadores también pueden utilizarse en una mezcla, resultando en productos de amplificación de los mismos tamaños (Bulman y Marshall, 1997).

### ***Meloidogyne* spp.**

Los nematodos del género *Meloidogyne* spp. son considerados como los de mayor importancia económica en el cultivo de diversos productos, debido a que crecen e infectan muchas de las especies más importantes a nivel mundial, entre ellos las de los cultivos de hortalizas y tubérculos (Wishart *et al*, 2002; Román, 1978).

Entre las especies de este género se pueden mencionar: *M. hapla*, *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, *M. fallax*, *M. chitwoodi*, entre otras. Algunas especies de *Meloidogyne* spp., como *M. chitwoodi* y *M. fallax*, son plagas cuarentenarias y varían mucho, tanto en organismos hospederos como en el nivel de virulencia, por lo que su rápida y acertada identificación es de gran importancia en el manejo que se le da a estas plagas (Wishart *et al*, 2002). Las plantas de papa son extremadamente susceptibles a *M. incognita*, la cual es considerada como la especie de nematodo formador de nódulos de raíz de mayor distribución. Cuando las condiciones favorecen la infección de la papa con esta especie, pueden llegar a existir pérdidas hasta del 25% del rendimiento del cultivo (Brodie, 1998).

Las especies de *Meloidogyne* tradicionalmente son diferenciadas por caracteres morfológicos y fenotipos izoenzimáticos. Sin embargo, al igual que las especies de *Globodera*, la identificación morfológica requiere de una gran habilidad y podría no ser confiable debido a variaciones morfológicas intraespecíficas significativas en *Meloidogyne* spp. Por otro lado, el uso de fenotipos izoenzimáticos es una

herramienta valiosa para la identificación de las especies más importantes de *Meloidogyne*, aunque esta técnica tiene una limitación, debido a que los nematodos en estado juvenil, los machos y los huevos no son diagnosticados de forma confiable (Xu *et al*, 2004).

Así, para enfocarse en problemas de manejo y cuarentena, los métodos de identificación deben proporcionar no solo precisión, sino también rapidez, veracidad, sensibilidad y una amplia aplicabilidad. Los métodos moleculares se aplican cada vez más, no solo porque satisfacen estas demandas, sino también porque su aplicación en los laboratorios es relativamente simple. Es decir, el diagnóstico molecular se convierte en un reemplazo o, dicho de mejor manera, en un complemento del diagnóstico tradicional. Algunos de estos métodos incluyen la amplificación de la región ITS con los primers ITS-4 e ITS-6 para su posterior digestión con diferentes enzimas de restricción, el uso de primers específicos para la diferenciación entre especies y la amplificación de una región intergénica entre los genes *COII* y *lrRNA* del ADN mitocondrial por medio de PCR-RFLP (Xu *et al*, 2004).

En su artículo, Wishart *et al* (2002) utilizan imprimadores específicos para algunas especies de *Meloidogyne*, creados a partir de la región IGS, que se explicará más adelante. En una parte de su estudio utilizaron el par de imprimadores Blo4 (5'-CTGCGATCTGTTGAGACTT-3') y Blo5 (5'-TCCGATCTGGCAAGTTAAGC-3'), de la región intergénica (IGS) 28S-5S. Con estos imprimadores se obtienen los siguientes productos de amplificación que permiten diferenciar entre algunas especies de *Meloidogyne*: para *M. chitwoodi* una banda de 280 pb, para *M. fallax* una banda de 320 pb, para *M. hapla* se puede obtener una sola banda de 705 pb o un patrón de bandas múltiples y para *M. incognita* se obtiene un patrón de bandas múltiples.

Asimismo, Wishart y su equipo de investigadores (2002) utilizaron una reacción múltiple de imprimadores específicos de la región IGS: JMV1 (5'-GGATGGCGTGCTTTCAAC-3'), JMV2 (5'-TTTCCCCTTATGATGTTTACCC-3'), JMVhapla (5'-AAAAATCCCCTCGAAAAAT CCACC-3') y JMVtropical (5'-GCKGGTAATTAAGCTGTCA-3'). En este caso, los productos de amplificación que permiten diferenciar entre algunas especies de *Meloidogyne* son: para *M. chitwoodi* una banda de 540 pb, para *M. fallax* una banda de 670 pb, para *M. hapla* una banda de 440 pb y para *M. incognita* se obtiene una banda de 670 pb.

## **DIAGNÓSTICO TRADICIONAL**

El diagnóstico de nematodos se ha basado tradicionalmente en la cuidadosa medición y comparación de las estructuras morfológicas de los mismos, dado que se han observado diferencias significativas en dichas estructuras. Sin embargo, algunas veces la discriminación entre especies se basa en medidas promedio de una población de individuos, lo cual puede llegar a complicarse cuando las poblaciones están compuestas por mezclas de especies muy estrechamente relacionadas entre sí (Powers, 2004).

El primer paso en el desarrollo de un protocolo de diagnóstico involucra la selección de un ejemplar o individuo representativo, lo cual es un punto crítico en el diagnóstico tradicional, por lo cual resulta extraño o irónico que en la mayoría de los estudios este paso es el menos examinado. Además, este es un paso muy delicado, que en la mayoría de los casos requiere de un alto grado no solo de conocimiento sino también de habilidades por parte del investigador (Powers, 2004).

Por medio del diagnóstico tradicional se han logrado identificar aproximadamente 25000 especies de nematodos y se estima que faltan por describir entre 10 y 40 veces más especies. Así, se piensa que los métodos moleculares pueden ayudar a agilizar este proceso (Powers, 2004).

Algunas de las desventajas de los métodos tradicionales de identificación incluyen los bajos niveles de sensibilidad y la necesidad de suficientes cantidades de material para los análisis. Además, se requiere de personal altamente calificado, con un alto grado de habilidad y especialización, ya que las diferencias morfológicas suelen ser muy pequeñas. Asimismo, esta técnica requiere de mucho tiempo, por lo que se han empezado a realizar estudios utilizando las técnicas moleculares, ya que brindan varias ventajas en el diagnóstico de nematodos (Bates *et al*, 2002; Fullaondo *et al*, 1999).

## **DIAGNÓSTICO MOLECULAR**

Como se mencionó en la sección anterior, el uso de técnicas de diagnóstico tradicionales o morfológicas puede presentar una serie de desventajas, por lo que se han desarrollado una gran cantidad de métodos alternos a éstos, para facilitar el diagnóstico de nematodos.

### **La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en una técnica que permite multiplicar exponencialmente pequeños fragmentos de ADN, es un procedimiento experimental que reproduce en un tubo de ensayo un proceso esencial en la vida de la célula: la replicación del material genético. Es indispensable la presencia de una ADN polimerasa termoestable (*Taq* polimerasa o PfuI), imprimadores que flanquean la región de ADN patrón que se desea amplificar, dNTPs (A, C, G, T) 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 (Madriz, 2005).

Un imprimador está formado por una pequeña secuencia de oligonucleótidos (de 6 a 50 nt de longitud), es decir, consiste en una molécula de ácidos nucleicos de banda sencilla, 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 “madre”, lo cual permite que la ADN polimerasa encuentre un lugar de doble banda en donde iniciar la extensión o elongación de la molécula de ADN (Lyons, Sf.). Los imprimadores pueden ser específicos a una secuencia de ADN o pueden ser universales. Los imprimadores

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 gran variedad de muestras de ADN, de diferentes especies (Veilleux, 2004).

La técnica como tal consiste en varios pasos. En el primer ciclo, primero, la doble banda de ADN ocupa ser desnaturalizada a una temperatura de 94°C por un período aproximado de un minuto; segundo, se necesita inducir a la unión de los imprimadores a cada una de las bandas simples de ADN. En este punto la temperatura puede variar significativamente ya que va a depender de la temperatura de recocido (*annealing* temperature) de los imprimadores que se estén usando; y tercero, se utiliza una temperatura de extensión (72°C) en la cual la ADN polimerasa va a producir bandas complementarias a partir de los imprimadores hasta que la polimerización sea interrumpida (cuando empieza el segundo ciclo con 94°C). En el segundo ciclo, cuando se esté en el paso de desnaturalización, se van a generar cuatro bandas simples de ADN. En cada una de estas bandas se van a unir los imprimadores (temperatura de recocido) y al incrementar la temperatura a 72°C (temperatura de extensión) la ADN polimerasa nuevamente empezará a polimerizar nucleótidos. Dos de las cuatro extensiones (las de banda simple original) serán idénticas a las obtenidas en el primer ciclo por lo que finalizarán la polimerización cuando nuevamente se inicie otro ciclo. Las otras dos (bandas nuevas que derivan de la banda simple original de ADN) finalizarán la polimerización justo donde el otro imprimador está unido. Los ciclos siguientes generarán dos bandas nuevas largas y dos bandas nuevas cortas (Dale & von Schantz, 2002; Klug & Cummings, 1999).

La PCR ha ampliado enormemente el poder de la investigación del ADN recombinante y ha encontrado aplicaciones en un amplio rango de disciplinas, incluyendo la biología molecular, la genética y la evolución. Una de las grandes ventajas de esta técnica radica en que, a diferencia de otras técnicas de ADN recombinante, en las que se requiere la disponibilidad de grandes cantidades de un segmento específico de ADN, la PCR permite la amplificación directa de segmentos de ADN específicos sin clonación, y pueden utilizarse fragmentos de ADN que están presentes en cantidades ínfimamente pequeñas. Además, la PCR tiene la ventaja de ser más rápida y menos laboriosa que las técnicas de clonación convencionales, y ha reemplazado la utilización de sondas clonadas en campos como el diagnóstico prenatal (Klug & Cummings., 1999).

Existen una gran variedad de técnicas moleculares que han sido utilizadas satisfactoriamente en la identificación de nematodos, entre las cuales se pueden citar:

- PCR Simple: PCR en la que se utiliza un único par de imprimadores, específicos o universales, para amplificar una secuencia de ADN.
- PCR-Multiplex: es una variante de la PCR que permite la amplificación simultánea de más de una secuencia de interés (blanco) en una reacción, por medio de la utilización de más de un par de imprimadores. La ventaja es que reduce el tiempo de diagnóstico, ya que se pueden identificar más de una especie en el mismo ensayo (Bulman y Marshall, 1997).

- PCR-RFLP: este método se utiliza en muchos estudios de diagnóstico de especies de nematodos y se detallará más adelante.

### **Visualización de ADN: La Electroforesis**

Todos los seres vivos, están conformados por una gran variedad de moléculas, dentro de ellas se encuentran los ácidos nucleicos, específicamente el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN), que son los que se encargan de guardar la información genética. Estas moléculas tienen una estructura muy simple, conformada por un azúcar, un grupo fosfato y una base nitrogenada. Las bases se unen por puentes de hidrógeno para formar una doble cadena helicoidal (Smith & Wood, 1998).

La electroforesis en gel es una técnica crucial tanto para el análisis como para la purificación de los ácidos nucleicos. Cuando una molécula cargada se coloca en un campo eléctrico, migrará hacia el electrodo con la carga opuesta; los ácidos nucleicos son moléculas cargadas negativamente, debido a la presencia de grupos fosfato en su estructura, por lo que migrarán hacia el polo positivo (ánodo). Este campo eléctrico se aplica a geles o matrices, que consisten en una red compleja de poros, sobre los cuales las moléculas de ácidos nucleicos migrarán (Dale & von Schantz, 2002).

La electroforesis requiere dos elementos indispensables: la fase móvil y la fase estacionaria. La fase móvil es el medio amortiguador que permite la movilidad de las moléculas cargadas hacia los electrodos correspondientes cuando se genera un campo eléctrico. La fase estacionaria o soporte, es un polímero de naturaleza gelatinosa con un tamaño de poro homogéneo que se haya sumergido y embebido en la fase móvil (Bbmbi, 2004).

El polímero utilizado para el análisis electroforético de ácidos nucleicos de gran tamaño (100pb-10kb) es la agarosa al igual que la poliacrilamida. En la agarosa el rango de concentración oscila entre el 0,5 %, que puede separar moléculas del orden de 1 a 30 Kb, y el 2% que puede separar ácidos nucleicos de 0,1 a 2 Kb. Sin embargo, algunos tipos de agarosa de alto grado de resolución pueden separar moléculas de ADN que se diferencian hasta en 10 bases (Madriz, 2005).

Transcurrida la electroforesis, la localización relativa de los fragmentos se determina mediante distintos métodos de detección. La tinción con bromuro de etidio, una sonda fluorescente tras iluminación con luz ultravioleta, es un método generalizado de detección de fragmentos de ADN, ya que la sonda se intercala entre la doble hélice de ADN y emite luz (Bbmbi, 2004).

### **Análisis RFLP**

La técnica Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) da como resultado variaciones detectables en la longitud de los fragmentos generados al cortar el ADN con una enzima de restricción, también llamadas endonucleasas de restricción, las cuales reconocen una secuencia específica de nucleótidos de una molécula de ADN de doble banda y lo cortan en esa secuencia.

Los RFLP representan la variación de origen natural causada por cambios en un solo par de nucleótidos, o por deleciones o inserciones de uno ó más pares de nucleótidos. Los RFLP se distribuyen aleatoriamente. Se encuentran tanto en regiones intergénicas como dentro de genes; pueden estar en las regiones reguladoras adyacentes a unidades transcripcionales adyacentes a genes, y dentro de intrones y de exones (Klug & Cummings., 1999).

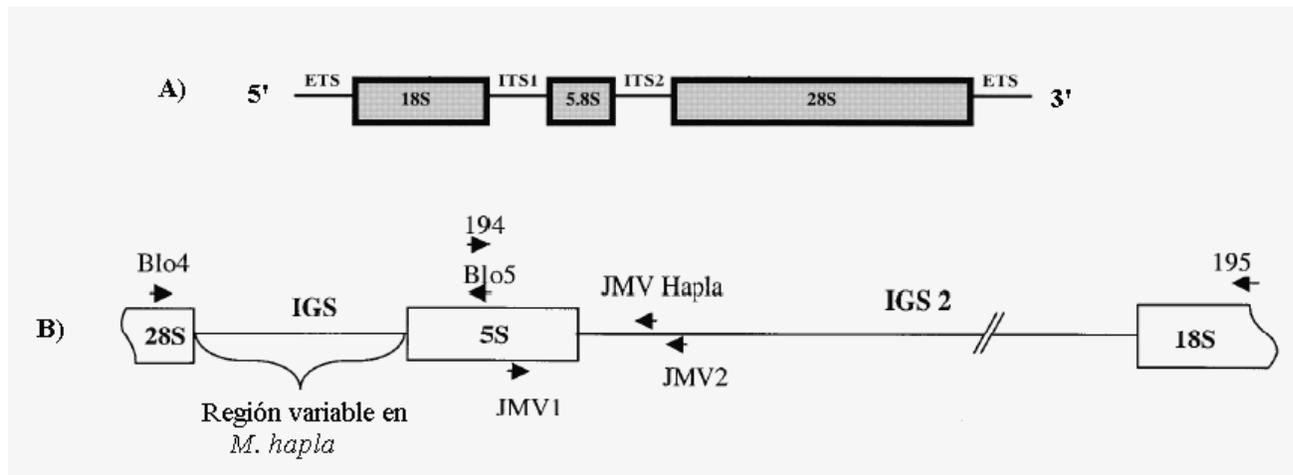
Este tipo de análisis (RFLP), combinado con la PCR, ha demostrado ser útil en la caracterización de especies y poblaciones de nematodos, utilizando muestras de genes ribosomales de múltiples copias. Además del desarrollo de métodos de identificación, esta técnica permite también la realización de estudios filogenéticos a diferentes niveles taxonómicos. Sin embargo, para este tipo de estudios entre parásitos se deben emplear marcadores moleculares o regiones génicas más conservadas de las que se utilizan generalmente para organismos independientes, como el ADNr nuclear (Hwang y Kim, 1999; Wang *et al.*, 2003).

Desde la última década, diferentes técnicas de PCR y análisis de secuencias nucleares se han utilizado para la identificación de muchos organismos, así como para solucionar problemas taxonómicos y en estudios de filogenia. El análisis de PCR-RFLP de las regiones ITS del ADNr ha sido utilizado en una gran cantidad de estudios para el diagnóstico de una gran variedad de géneros de nematodos, incluyendo los géneros estudiados en este trabajo (Reid y Pickup, 2005; Subbotin *et al.*, 2005)).

### **Región espaciadora ITS**

El estudio de regiones específicas del genoma resulta ser muy útil para la realización de análisis moleculares. Una de estas regiones es la de la familia multigénica del ADN ribosomal (ADNr), la cual está conformada por muchas copias de genes que codifican para tres componentes ribosomales: 28S, 5.8S y 18S. 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 cual se puede observar en la Figura 1A. La región IGS es seguida por otra copia de la familia génica (Devran *et al.*, 2002; UNL, sf).

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 no es 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, sin embargo, ha demostrado ser útil en el estudio de relaciones filogenéticas en niveles bajos de categoría, como órdenes o familias (Ver anexo 3) (Powers, 2004; Hwang y Kim, 1999).



**Figura 1.** Familia multigénica del ADN ribosomal (ADNr). **A)** Diagrama esquemático de la familia multigénica del ADN ribosomal (ADNr) (Modificado de: Jobes y Thien, 1997). **B)** Diagrama esquemático del ADNr, mostrando el gen 5S dentro de la región IGS (Wishart et al, 2002).

Las regiones espaciadoras del ADNr nuclear evolucionan mucho más rápido que las regiones codificantes, ya que las sustituciones en las regiones espaciadoras no muestran efectos letales para los organismos. 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 (Subbotin *et al.*, 2005; Hwang y Kim, 1999).

Este arreglo de genes muy conservados y regiones espaciadoras menos conservadas es lo que ha hecho de estos genes un objetivo muy popular, ya que permite el diseño de imprimadores universales en secciones de secuencias conservadas, y estos imprimadores pueden utilizarse para amplificar fragmentos homólogos, tanto de especies distantes como de especies estrechamente relacionadas. La utilización de la técnica PCR-RFLP de la región ITS, ha permitido distinguir diferentes especies de nematodos. (Wang *et al.*, 2003).

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).

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Identificar especies de nematodos de los géneros *Globodera* spp. y *Meloidogyne* spp. presentes en distintas muestras, provenientes de dos fincas de papa de la región de Cartago, en el caso de *Globodera* spp., y de fincas ubicadas en diferentes regiones de Costa Rica, en el caso de *Meloidogyne* spp., por medio de dos técnicas moleculares: PCR con imprimadores específicos y análisis PCR-RFLP.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar las poblaciones de *Meloidogyne* spp. y *Globodera* spp. utilizando la técnica de PCR con imprimadores específicos y universales (PCR Simple).
- Identificar las poblaciones de *Meloidogyne* spp. y *Globodera* spp. utilizando la técnica de PCR con una mezcla de imprimadores (Reacción Múltiple).
- Identificar las poblaciones de *Meloidogyne* spp. y *Globodera* spp. utilizando la técnica de PCR-RFLP.
- Determinar, por medio del diagnóstico molecular, cuales son las especies de cada género de nematodos predominantes en diferentes fincas muestreadas en Costa Rica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los protocolos de extracción y amplificación de ADN y el procedimiento de RFLPs fueron proporcionados por el Dr. Luis Gómez, del Laboratorio de Biotecnología de Plantas (LBP) ubicado en el Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica (UCR).

### NEMATODOS

Las muestras de nematodos fueron colectados de fincas en Costa Rica infectadas tanto con *Globodera* spp. como con *Meloidogyne* spp. Estas muestras se obtuvieron gracias a la colaboración del Laboratorio de Nematología de la Universidad de Costa Rica, quienes se encargaron de la colecta y extracción de los nematodos. De esta manera, lo que entregaron al LBP fueron los nematodos vivos. En el caso de *Meloidogyne* spp. el material recibido constó de masas de huevos y/o hembras juveniles en tubos eppendorf de 1,5 ml. Para el género *Globodera* spp., el material recibido constó de quistes que se encontraron en las muestras recolectadas en el campo.

Los controles utilizados fueron para los nematodos *Globodera pallida*, *G. rostochiensis*, *Meloidogyne hapla* y *M. incognita*; para *Globodera* spp. se utilizaron controles de ADN ya extraídos para ambas especies y también una mezcla de ambas, suministradas por el Dr. E. Ritter del Instituto Vazco de Investigación y Desarrollo Agrario, España. En el caso de *Meloidogyne* spp., se utilizaron controles de *M. hapla* y *M. incognita*, presentes en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas (LBP) del CIA de la Universidad de Costa Rica.

En los cuadros 1 y 2 se puede observar la información básica de las muestras utilizadas, así como la procedencia y estadio de desarrollo en que fueron procesados los nematodos. Asimismo, se proporciona la información concerniente de los controles positivos utilizados en este estudio.

**Cuadro 1.** Identificación y descripción de las muestras analizadas y de los controles utilizados para el género *Globodera* spp.

Código	Procedencia	Tipo de material	Fecha de colecta	Posible Identificación Morfológica
QLC11	Finca Liebres, Cartago	Quistes (hembras)	Setiembre, 2005	<i>G. pallida</i>
QLC50a				<i>G. pallida</i>
QLC50b				<i>G. pallida</i>
QLC1a				<i>G. pallida</i>
QLC1b				<i>G. pallida</i>
QLC2a				<i>G. pallida</i>
QLC2b				<i>G. pallida</i>
QLC4a				<i>G. pallida</i>
QLC4b				<i>G. pallida</i>
QLC8a				<i>G. pallida</i>
QLC8b				<i>G. pallida</i>
QLC16a				<i>G. pallida</i>
QLC16b				<i>G. pallida</i>
QLC16c				<i>G. pallida</i>
QLC32				<i>G. pallida</i>
QLC100	<i>G. pallida</i>			
QPC100	Finca La Pastora, Cartago			<i>G. pallida</i>
Pa			-----	<i>G. pallida</i>
Pa + Ro	España	Controles positivos	-----	Mezcla de ambas especies
Ro			-----	<i>G. rostochiensis</i>

**Cuadro 2.** Identificación y descripción de las muestras analizadas y de los controles utilizados para el género *Meloidogyne* spp.

<b>Código</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Tipo de material</b>	<b>Fecha de colecta</b>	<b>Posible Identificación Morfológica</b>
♀ ar	Juan Viñas	Hembras	19-Ago-05	<i>M. arabicida</i>
HCH	?	Hembras	?	<i>M. chitwoodi</i>
HMP	Pacayas	Hembras	?	<i>M. hapla</i>
mHS	?	Masa de Huevos	?	<i>M. chitwoodi</i>
mH	?	Masa de Huevos	?	<i>M. chitwoodi</i>
X	?	Masa de Huevos	?	<i>M. chitwoodi</i>
Eha	?	Masa de Huevos	?	<i>M. hapla</i>
#1 a	Cañas, Guanacaste	Hembras	29-Set-05	<i>M. salasi</i>
#1 b	Cañas, Guanacaste	Hembras	29-Set-05	<i>M. salasi</i>
#4 a	Paraíso, Cartago	Hembras y Masa de Huevos	19-Ago-05	<i>M. incognita</i>
#4 b	Paraíso, Cartago	Hembras y Masa de Huevos	19-Ago-05	<i>M. incognita</i>
#6 a	Llano Grande, Cartago	Hembras y Masa de Huevos	19-Ago-05	<i>M. hapla</i>
#6 b	Llano Grande, Cartago	Hembras y Masa de Huevos	19-Ago-05	<i>M. hapla</i>
#6 c	Llano Grande, Cartago	Hembras y Masa de Huevos	19-Ago-05	<i>M. hapla</i>
6+K	Ecuador	Control positivo	12-Jul-04	<i>M. hapla</i>
4+K	Nicoya, Guanacaste	Control positivo	08-Jul-04	<i>M. incognita</i>

## **EXTRACCIÓN DE ADN DE NEMATODOS**

El ADN genómico se extrajo utilizando el procedimiento de extracción del amortiguador de lisis nuclear (CTAB). Inicialmente se realizó una maceración de los especímenes en un tubo eppendorf de 1,5 ml, con un pistilo para macerar; en el caso del género de *Globodera* spp., se contó el número de quistes a utilizar, el cual varió entre 1 y 100 quistes por extracción de ADN. En el caso del género *Meloidogyne* spp., las extracciones de ADN se realizaron con aproximadamente 30 µl de material.

Después de la maceración inicial se adicionaron 150 µl del amortiguador de lisis de gusanos o “Worm Lysis Buffer” (WLB) y 2 µl de Proteinasa K (600µg/ml). Se continuó macerando muy bien el material, hasta lograr que no se vieran partículas del mismo, por lo menos dentro de lo posible. Se adicionaron 150 µl de CTAB para posteriormente colocar las muestras a 65°C por un lapso aproximado de una hora.

Pasada la hora se realizaron dos extracciones con fenol – cloroformo – alcohol isoamilo (25:24:1). En la primera extracción se adicionaron 300 µl de esta mezcla, se centrifugó durante 15 minutos a 12 000 rpm y se transfirió la fase acuosa a un tubo eppendorf nuevo, de forma cuantitativa. En la segunda extracción se hizo lo mismo, pero de la mezcla se adicionó un volumen igual al rescatado de la fase acuosa.

Posteriormente se adicionaron 20 µl de Acetato de Sodio [(3M) pH: 8] y 300 µl de isopropanol. Esto se dejó precipitar a –20°C toda la noche. Se centrifugó a 13 000 rpm por 15 minutos, se eliminó el acetato de sodio e isopropanol y el precipitado obtenido se lavó dos veces con etanol al 70%, centrifugando a 13 000 rpm por 5 minutos entre lavados. Se dejó secar y se resuspendió en 40 µl de agua destilada estéril.

## **PCR CON IMPRIMADORES ESPECÍFICOS**

### ***Globodera* spp.**

Se utilizó los imprimadores PITSr3 (5'-AGCGCAGACATGCCGCAA-3') y PITSp4 (5'-ACAACAGCAATCGTCGAG-3') descritos por Bulman y Marshall (1997), en combinación con el imprimador universal ITS5, para diferenciar entre las dos especies de *Globodera* spp., en una reacción múltiple.

El perfil térmico aplicado constó de: a) 94°C, 3 min., b) 94°C, 45 s; 60°C, 60 s; 72°C, 45 s (35 ciclos) y c) 72°C, 5 min.

Además, se utilizó dos pares de imprimadores específicos, uno para cada especie a analizar: GpaF (5'-TGTCATTCTCTCCACCAG-3') – GpaR (5'-CCGCTTCCCCA TTGCTTTTCG-3') para *G. pallida* y GroF (5'-GCAAGCCCAGCGTCAGCAAC-3') – GroR (5'-GAACATCAACCTCCTATCGG-3') para *G. rostochiensis*, descritos por Fullaondo *et al.* (1999).

El perfil térmico aplicado en este caso constó de: a) 94°C, 4 min., b) 94°C, 60 s; 60°C, 60 s; 72°C, 120 s (40 ciclos) y c) 72°C, 10 min.

### ***Meloidogyne* spp.**

Se utilizó los imprimadores Blo4 (5'-CTGCGATCTGTTGAGACTT-3') y Blo5 (5'-TCCGATCTGGCAAGTTAAGC-3') descritos por Wishart, *et al.* (2002). Estos imprimadores se diseñaron a partir de la región IGS del ADNr y permiten diferenciar entre varias especies de *Meloidogyne* spp.

El perfil térmico aplicado constó de: a) 94°C, 5 min., b) 94°C, 30 s; 50°C, 30 s; 72°C, 90 s (35 ciclos) y c) 72°C, 10 min.

Se utilizó también los siguientes imprimadores específicos, descritos igualmente por Wishart, *et al.* (2002): JMV1 (5'-GGATGGCGTGCTTTCAAC-3'), JMV2 (5'-TTTCCCCTTATGATGTTTACCC-3'), JMVhapla (5'-AAAAATCCCCTCGAAA AATCCACC-3') y JMVtropical (5'-GCKGGTAATTAAGCTGTCA-3'). Estos imprimadores se diseñaron, al igual que los anteriores, a partir de la región IGS y también permiten diferenciar entre varias especies de *Meloidogyne* spp., solo que de forma más específica.

El perfil térmico aplicado en este caso constó de: a) 94°C, 5 min., b) 94°C, 30 s; 55°C, 30 s; 72°C, 90 s (35 ciclos) y c) 72°C, 10 min.

Todas las reacciones de PCR constaban de agua destilada estéril, amortiguador de PCR (10X) con KCl, dNTPs (2mM), cada uno de los imprimadores (5 µM), MgCl<sub>2</sub> (25mM), BSA (10 mg/ml) y *Taq* polimerasa (5u/µl), para un volumen total de reacción de 25 µl. El volumen de ADN de las muestras varió entre 5 y 2 µl.

### **PCR-RFLP**

Se realizó una amplificación de la región ITS de las muestras y los controles utilizando los imprimadores universales ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS-6 (5'-GCTTATTGATATGCTTAAA-3') (White *et al.*, 1990). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen total de 25 µl, los cuales se componen de: agua destilada, amortiguador de PCR (10X), el par de imprimadores (5 µM cada uno), ADN del nematodo (2 µl), MgCl<sub>2</sub> (25 mM), dNTPs (2mM), Albúmina Bovina (BSA) (10 mg/ml) y *Taq* polimerasa (5u/ µl).

El perfil térmico aplicado para este PCR constó de: a) 94°C, 3 min., b) 94°C, 45 s; 57°C, 60 s; 72°C, 45 s (25 ciclos) y c) 72°C, 5 min.

Del producto de esta amplificación, se tomó entre 10 y 15 µl para realizar la digestión con las enzimas *AluI* y *MspI*, en el caso de *Globodera* spp., y las enzimas *RsaI*, *AluI* y *DraI* en el caso de *Meloidogyne* spp. Estas digestiones se realizaron en un volumen total de 12 µl, los cuales se componen de: producto de amplificación, amortiguador de la enzima, enzima respectiva y BSA. Las digestiones se realizaron a 37°C durante aproximadamente 4 horas, aunque en ocasiones se dejó de un día para otro.

## **ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN Y DE DIGESTIÓN**

Los productos de PCR se separaron por medio de electroforesis en geles de agarosa, al 1,6% para imprimadores específicos e ITS y al 2% para los productos de digestión (RFLP).

Para la preparación del gel, se pesó la agarosa, dependiendo del volumen total del gel y de la concentración deseada. Por ejemplo, para un gel de 50 ml al 1% se pesó 0,5 g de agarosa. Esta agarosa se colocó en un erlenmeyer, al cual se le adicionó el volumen deseado del amortiguador de electroforesis (TBE) 0,5X. Esto se calentó en microondas hasta que se viera transparente. Una vez listo, se dejó enfriar hasta que se pudiera levantar el erlenmeyer con la mano sin quemarse y se le adicionó 0,68  $\mu$ l de bromuro de etidio. Se dejó enfriar un poco más, sin que solidificara, se dispensó en una cámara de electroforesis, sin hacer burbujas, y se colocó el peine. Se dejó que solidificara por aproximadamente 40 minutos.

Una vez que el gel solidificó, se removió cuidadosamente el peine, llenando la cámara con TBE hasta cubrir un poco el gel. Al quitar el peine los pozos se llenaron con el amortiguador y se terminó de llenar la cámara con el TBE hasta que el gel quedara cubierto aproximadamente con 1 cm del mismo.

Mientras el gel estaba listo se procedió a preparar las muestras que se deseaban correr. Se colocó un volumen determinado de muestra (8  $\mu$ l para ADN y 10  $\mu$ l para amplificaciones y digestiones) en tubos de PCR o en parafilm. A esto se le adicionaron 2  $\mu$ l de azul de carga, tinte o colorante. Una vez que el gel estuvo listo se procedió a cargar las muestras en el mismo.

Las electroforesis se dejaron correr a 90 V (para ADN y amplificaciones) ó 70 V (para digestiones) por aproximadamente 1 hora, dependiendo del tamaño y concentración del gel.

## RESULTADOS

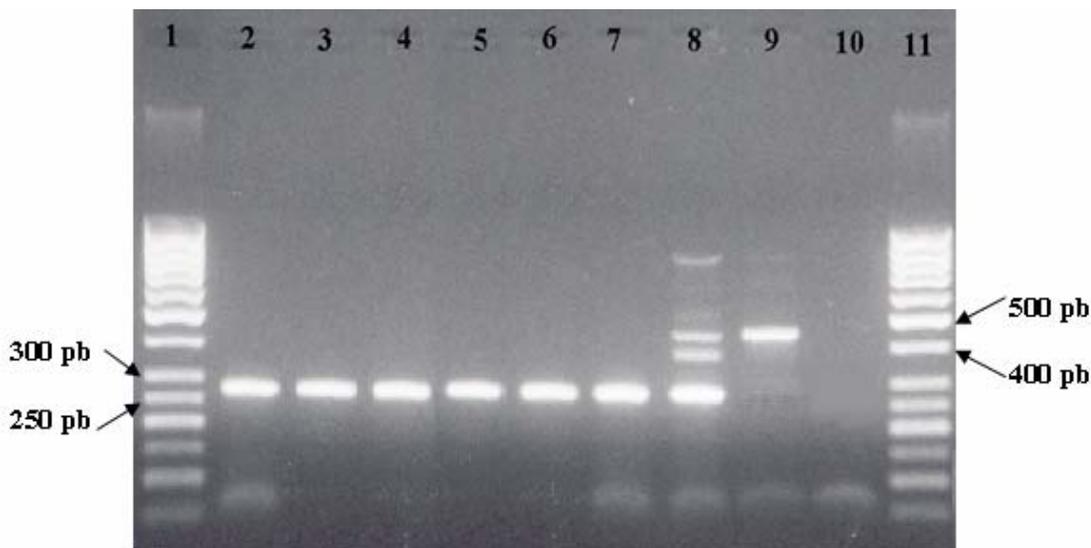
### EXTRACCIÓN DE ADN

Algunas de las extracciones de ADN no fueron exitosas, lo cual se notó al no observarse bandas de ADN en las electroforesis de agarosa al 1% (Fotografías no incluidas). Tal fue el caso de las muestras de *Globodera* spp. denominadas QLC1, QLC2, QLC4, QLC8, QLC16, QLC32 y sus respectivas réplicas. En las demás muestras de los cuadros 1 y 2 sí se obtuvo una exitosa extracción de ADN.

### PCR CON IMPRIMADORES ESPECÍFICOS

#### *Globodera* spp.

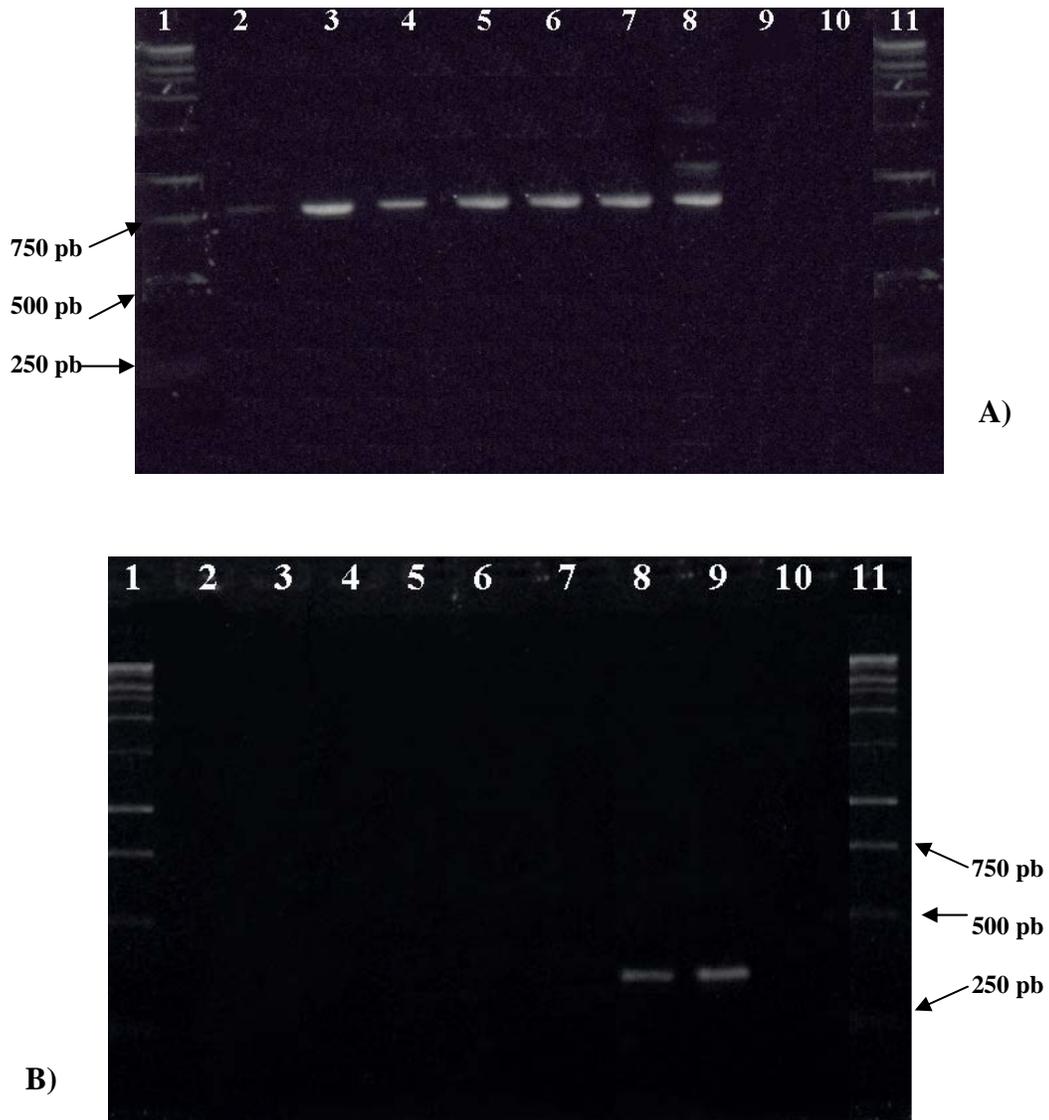
En el caso de la reacción múltiple, donde se utilizó los imprimadores PITSr3, PITSp4 e ITS5, se observó la amplificación de todas las muestras, excepto de aquellas en las cuales la extracción de ADN no fue exitosa. En la figura 2 se puede observar el patrón de bandas obtenido para las muestras analizadas que sí amplificaron, así como el patrón de bandas correspondiente a los controles utilizados.



**Figura 2.** Identificación molecular de nematodos de quiste de papa de Costa Rica. Reacción múltiple utilizando los imprimadores específicos PITSr3 y PITSp4 y el imprimador universal ITS5. Carriles 1 y 11: Marcador 50 pb (FERMENTAS). Carril 2: QLC11. Carril 3: QLC50a. Carril 4: QLC50b. Carril 5: QLC100. Carril 6: QPC100. Carril 7: Pa. Carril 8: Pa+Ro. Carril 9: Ro. Carril 10: Control negativo. Fuente: Laboratorio de Biotecnología de Plantas, CIA y Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Fitopatología, Agronomía. UCR. 2005.

Se obtuvo un patrón característico para cada una de las especies de *Globodera*. Para *G. pallida* (carril 7) se observó una sola banda de un tamaño aproximado a 270 pb. La especie *G. rostochiensis* presentó una sola banda de aproximadamente 440 pb (carril 9). Para la mezcla de especies (carril 8) se observó un patrón de bandas múltiples, que incluyó las bandas correspondientes a cada una de las especies y otras bandas menores. Las muestras locales analizadas presentaron una sola banda similar a la del control positivo de *G. pallida*.

La utilización de los pares de imprimadores específicos en forma independiente también permitió la identificación de ambas especies de *Globodera* spp. En la figura 3 se observa la amplificación con los pares de imprimadores específicos, GpaF/GpaR para *G. pallida* (Figura 3A) y GroF/GroR para *G. rostochiensis* (Figura 3B). En el primer caso (A) se obtuvo, tanto para los controles denominados Pa y Pa + Ro como para las muestras locales, una banda fuerte de aproximadamente 795 pb. En el segundo caso (B) se observó una única banda para los controles Pa + Ro y Ro, con un tamaño aproximado de 350 pb. Ninguna de las muestras locales fue amplificada con el uso de los imprimadores GroF/GroR.



**Figura 3.** Identificación molecular de nematodos de quiste de papa de Costa Rica con imprimadores específicos. A) Reacción con par de imprimadores GpaF y GpaR y B) Reacción con par de imprimadores GroF y GroR. Tanto para A como para B: Carriles 1 y 11= Marcador 1 kb (FERMENTAS). Carril 2= QLC11. Carril 3= QLC50a. Carril 4= QLC50b. Carril 5= QLC100. Carril 6= QPC100. Carril 7= Pa. Carril 8= Pa+Ro. Carril 9= Ro. Carril 10= Control negativo.

**Fuente:** Laboratorio de Biotecnología de Plantas, CIA y Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Fitopatología, Agronomía. UCR. 2005.

### ***Meloidogyne* spp.**

En la figura 4 se observa los productos de amplificación para las muestras del género *Meloidogyne* spp. con los imprimadores Blo4 y Blo5.



**Figura 4.** Identificación molecular de *Meloidogyne* sp. de Costa Rica con los imprimadores específicos Blo4 y Blo5. Carriles 1 y 19= Marcador 100 pb (FERMENTAS). Carril 2= ♀ ar. Carril 3=HCH. Carril 4=HMP. Carril 5=mHS. Carril 6= mH. Carril 7= X. Carril 8= Eha. Carril 9= #1 a. Carril 10= #1 b. Carril 11= #4 a. Carril 12= #4 b. Carril 13= #6 a. Carril 14= #6 b. Carril 15= #6 c. Carril 16= 6+K. Carril 17= 4+K Carril 18= Control negativo.

**Fuente:** Laboratorio de Biotecnología de Plantas, CIA y Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Fitopatología, Agronomía. UCR. 2005.

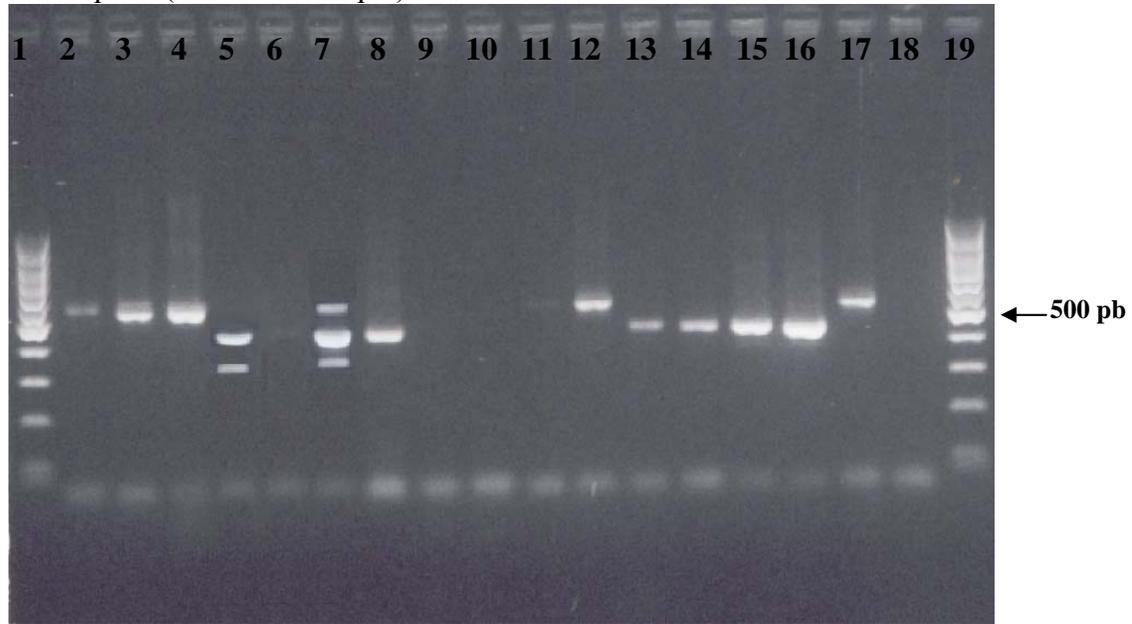
Los productos de amplificación consistieron en patrones de bandas simples o de bandas múltiples según la muestra (especie) analizada. Algunas de las bandas fueron tenues. Considerando únicamente las bandas fuertes, las especies *M. arabicida* (carril 2) y *M. hapla* (carril 16) presentaron una sola banda aunque de tamaño diferente: 500 pb y 690 pb, respectivamente. Las especies *M. incognita* (carril 17) y *M. salasi* (carril 9) presentaron patrones de bandas múltiples, diferentes entre sí. Para *M. incognita* el tamaño aproximado de las bandas fue de: 530 y 480 pb. Para *M. salasi* fue de 750 pb, 660 pb, 580 pb y 480 pb.

Las muestras HMP, # 4a y # 4b (carriles 4, 11 y 12, respectivamente) presentaron un patrón de bandas múltiple similar a *M. incognita*, mientras que el patrón de bandas de las muestras #6a, #6b y #6c (carril 13, 14 y 15, respectivamente) fue idéntico al de *M. hapla*. La muestra #1b (carril 10) correspondió a *M. salasi*.

La muestra HCH (carril 3) mostró una sola banda de 500 pb y su patrón fue similar al de *M. arabicida*. Las muestras mHS y mH (carriles 5 y 6) mostraron el mismo patrón de bandas múltiples con tamaños aproximados de 830 pb, 500 pb, 390 pb y 340 pb.

La muestra X (carril 7) también presentó un patrón de cuatro bandas con los pesos moleculares de: 990 pb, 850 pb, 380 pb y 340 pb. Ninguno de estos patrones correspondió con el patrón de ninguna de las especies utilizadas como control. No se obtuvo ningún producto de amplificación claramente visible de la muestra Eha (carril 8).

La figura 5 muestra los productos de amplificación obtenidos a partir de las muestras de *Meloidogyne* spp. con los imprimadores específicos JMV1, JMV2, JMVhapla y JMVtropical (reacción múltiple).



**Figura 5.** Identificación molecular de *Meloidogyne* sp. de Costa Rica. Reacción múltiple con los imprimadores específicos JMV1, JMV2, JMVhapla y JMVtropical. Carriles 1 y 19= Marcador 100 pb (FERMENTAS). Carril 2= ♀ ar. Carril 3=HCH. Carril 4=HMP. Carril 5=mHS. Carril 6= mH. Carril 7= X. Carril 8= Eha. Carril 9= #1 a. Carril 10= #1 b. Carril 11= #4 a. Carril 12= #4 b. Carril 13= #6 a. Carril 14= #6 b. Carril 15= #6 c. Carril 16= 6+K. Carril 17= 4+K Carril 18= Control negativo.

**Fuente:** Laboratorio de Biotecnología de Plantas, CIA y Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Fitopatología, Agronomía. UCR. 2005.

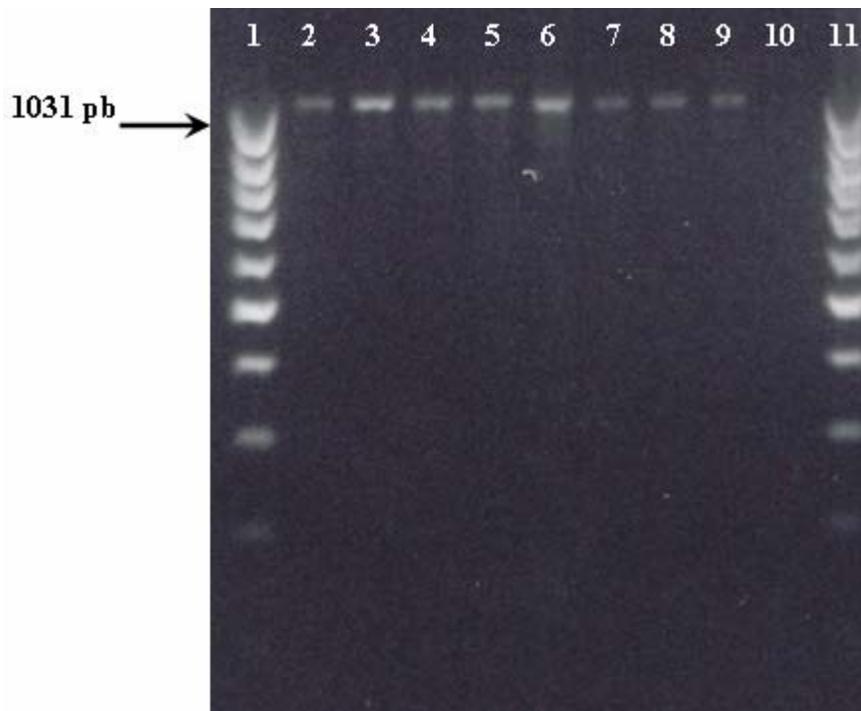
En esta reacción múltiple (figura 5) se obtuvo un patrón de una sola banda para las muestras estudiadas, con excepción de las muestras mHS y X (carriles 5 y 7), las cuales presentaron un patrón de dos y tres bandas, respectivamente. No se obtuvo producto de amplificación para las muestras mH, #1a y #1b (carriles 6, 9 y 10). Las muestras #1a y #1b corresponden a *M. salasi*. El tamaño de las bandas difirió entre las especies y permitió su identificación: *M. arabicida* 700 pb (carril 2); *M. hapla* 440 pb (carril 16) y *M. incognita* 670 pb (carril 17). Las muestras HMP, #4a y #4b (carriles 4, 11 y 12) presentaron una sola banda de 670 pb correspondiente a *M. incognita*, en tanto que las muestras Eha, #6a, #6b y #6c (carriles 8, 13, 14 y 15) mostraron un patrón idéntico a *M. hapla*, una sola banda de 440 pb. El tamaño de las bandas obtenidas con la muestra mHS fue de 440 pb y 335 pb. Para la muestra X se

obtuvo un tamaño de bandas de 670 pb, 440 pb y 335 pb. Ambas muestras, mHS y X comparten la banda de 440 pb característica de *M. hapla.*, mientras que la muestra X también presenta la banda de 670 pb asociada con *M. incognita*. La muestra HCH (carril 3) presentó una banda de un tamaño aproximado de 690 pb y no correspondió a ninguna de las especies control.

## PCR-RFLP

### *Globodera* spp.

En la figura 6 se observa la amplificación de la región ITS de las muestras del género *Globodera* spp. con los imprimadores ITS4 e ITS6.

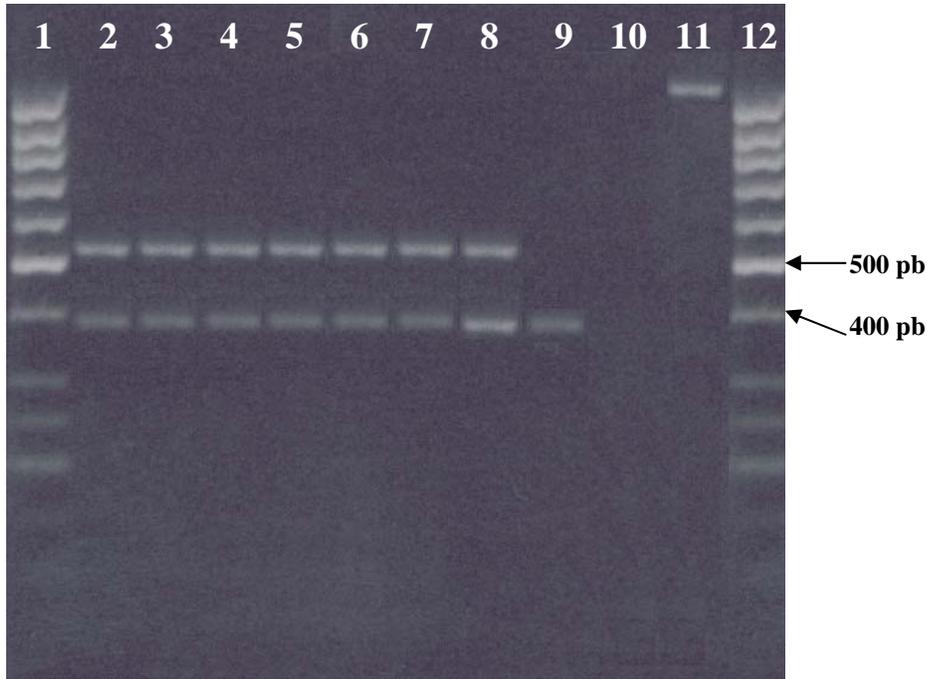


**Figura 6.** Amplificación de la región ITS del género *Globodera* con los imprimadores ITS4 e ITS6. Carriles 1 y 11= Marcador 100 pb (FERMENTAS). Carril 2= QLC11. Carril 3= QLC50a. Carril 4= QLC50b. Carril 5= QLC100. Carril 6= QPC100. Carril 7= Pa. Carril 8= Pa+Ro. Carril 9= Ro. Carril 10= Control negativo.

**Fuente:** Laboratorio de Biotecnología de Plantas, CIA y Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Fitopatología, Agronomía. UCR. 2005.

Se puede observar como todas las muestras (especies) analizadas amplificaron exitosamente y como el producto de amplificación fue del mismo peso molecular para todos: 1130 pb aproximadamente.

Las figuras 7 y 8 muestran los resultados de las digestiones enzimáticas de los productos de amplificación de la región ITS con las enzimas *AluI* y *MspI*, respectivamente.



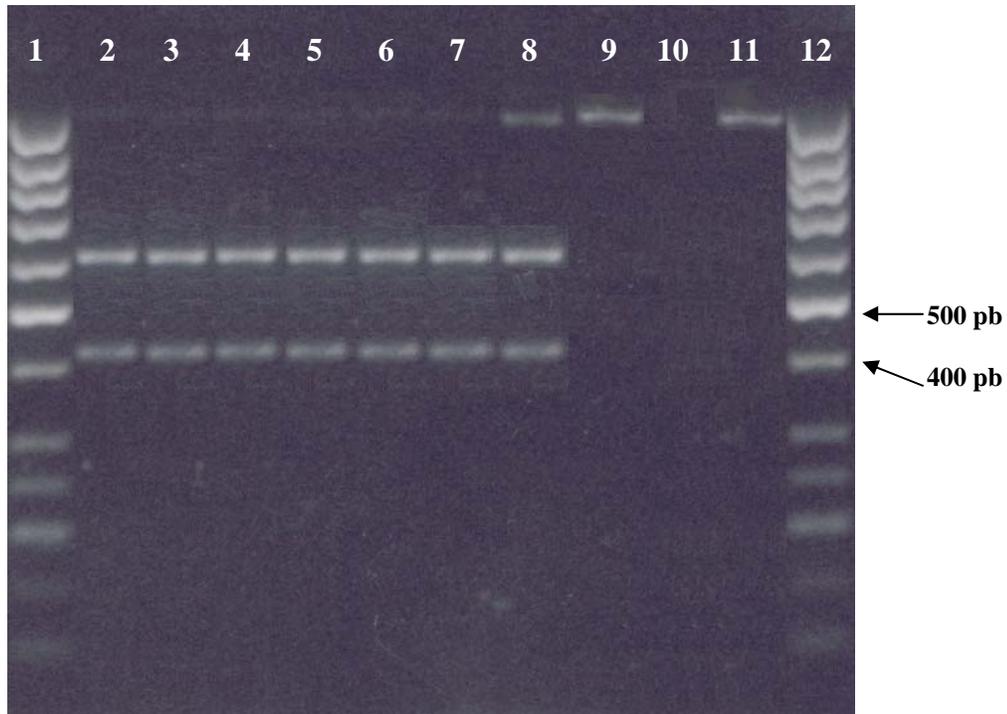
**Figura 7.** Digestión enzimática del producto de amplificación de la región ITS del género *Globodera* con la enzima *AluI*. Carriles 1 y 12= Marcador 50 pb (FERMENTAS). Carril 2= QLC11. Carril 3= QLC50a. Carril 4= QLC50b. Carril 5= QLC100. Carril 6= QPC100. Carril 7= Pa. Carril 8= Pa+Ro. Carril 9= Ro. Carril 10= Control negativo. Carril 11= Producto de amplificación sin digerir (1130 pb)

**Fuente:** Laboratorio de Biotecnología de Plantas, CIA y Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Fitopatología, Agronomía. UCR. 2005.

En la figura 7 se ve como las muestras locales mostraron el mismo patrón de dos bandas de la especie *G. pallida* (carril 7), una de 540 pb y otra de 390 pb. Además, aunque en la figura no se aprecia claramente, hay dos bandas más en cada uno de los carriles, de pesos aproximados a los 145 pb y 50 pb cada una. Para la especie *G. rostochiensis* (carril 9) se observa una única banda de 390 pb, y al igual que los carriles anteriores, hay dos bandas que no se logran ver en la fotografía, de 130 pb y 45 pb aproximadamente. Para el control Pa + Ro (carril 8) se observó un patrón de bandas múltiples, que incluyó las bandas correspondientes a cada una de las especies. Por último, en el carril 11 se corrió el producto de amplificación sin digerir como control, donde se puede ver la banda de 1130 pb. Estos resultados confirman la presencia de *G. pallida* en las muestras costarricenses.

El patrón de digestión con la enzima *MspI* (Figura 8) consistió de dos bandas, una de 630 pb y otra de 425 pb, para *G. pallida* (carril 7), de una sola banda para *G.*

*rostochiensis* (carril 9), 1130 pb (producto no digerido) y de tres bandas para la mezcla *G. pallida* y *G. rostochiensis* (carril 8): 1130 pb, 630 pb y 425 pb. Además, aunque en la figura no se aprecia, hay una banda más en cada uno de los carriles (excepto en los carriles 9,10 y 11), de un peso molecular aproximado a los 70 pb. Las muestras locales (carriles 2 al 6) presentaron un patrón idéntico al de *G. pallida*. Estos resultados coinciden con los obtenidos con la enzima *AluI*.



**Figura 8.** Digestión enzimática del producto de amplificación de la región ITS del género *Globodera* con la enzima *MspI*. Carriles 1 y 12= Marcador 50 pb (FERMENTAS). Carril 2= QLC11. Carril 3= QLC50a. Carril 4= QLC50b. Carril 5= QLC100. Carril 6= QPC100. Carril 7= Pa. Carril 8= Pa+Ro. Carril 9= Ro. Carril 10= Control negativo. Carril 11= Producto de amplificación sin digerir (1130 pb)

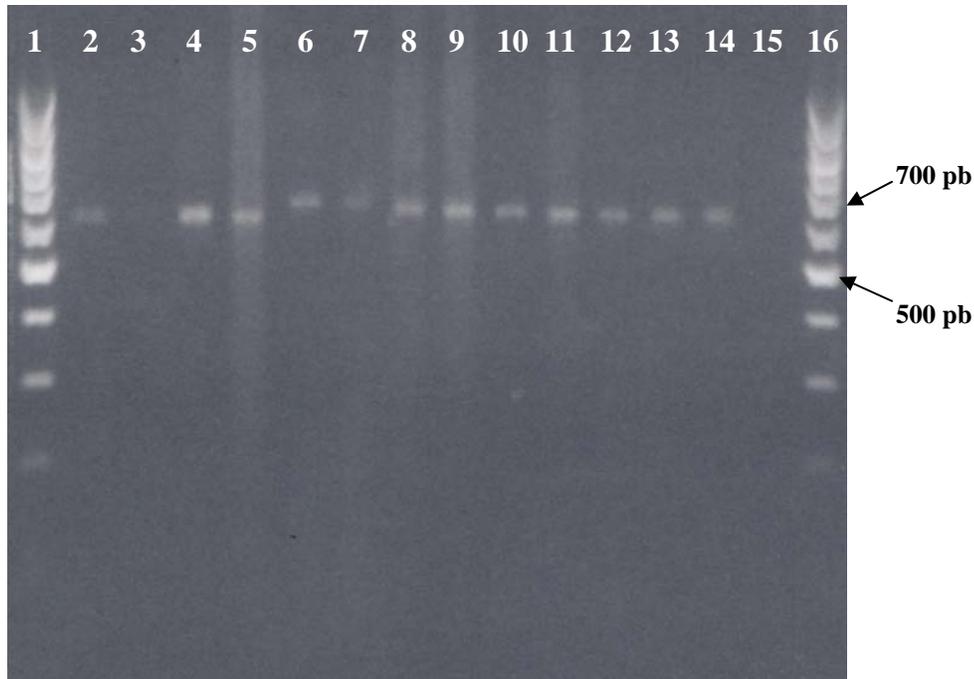
**Fuente:** Laboratorio de Biotecnología de Plantas, CIA y Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Fitopatología, Agronomía. UCR. 2005

### ***Meloidogyne spp.***

En la figura 9 se observa la amplificación de la región ITS de las muestras del género *Meloidogyne spp.* con los imprimadores ITS4 e ITS6.

Se puede observar como todas las muestras (especies) analizadas amplificaron exitosamente. El producto de amplificación fue del mismo peso molecular para todas las muestras (690 pb), excepto las #1 a y #1 b (carriles 6 y 7), cuyo peso molecular fue algo mayor, de 710 pb aproximadamente. Esto demuestra que, en algunas

situaciones, con base en el tamaño del producto de amplificación de la región ITS se puede diferenciar entre especies de nematodos.

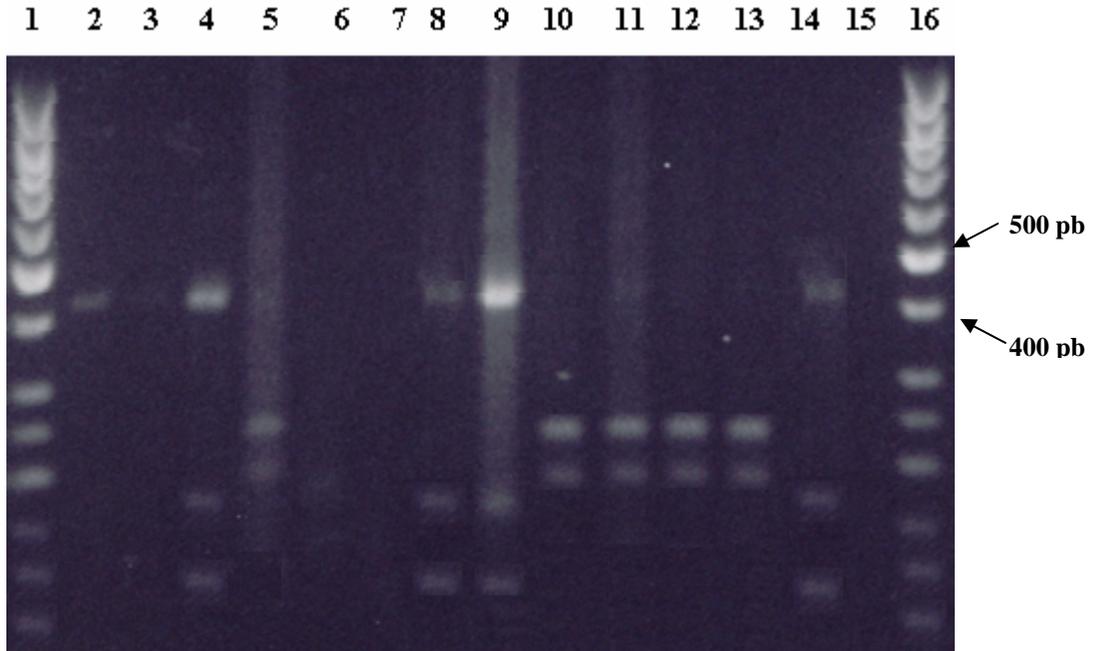


**Figura 9.** Amplificación de la región ITS del género *Meloidogyne* con los imprimadores ITS4 e ITS6. Carriles 1 y 16= Marcador 100 pb (FERMENTAS). Carril 2= ♀ ar. Carril 3=HCH. Carril 4=HMP. Carril 5= Eha. Carril 6= #1 a. Carril 7= #1 b. Carril 8= #4 a. Carril 9= #4 b. Carril 10= #6 a. Carril 11= #6 b. Carril 12= #6 c. Carril 13= 6+K. Carril 14= 4+K Carril 15= Control negativo.

**Fuente:** Laboratorio de Biotecnología de Plantas, CIA y Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Fitopatología, Agronomía. UCR. 2005.

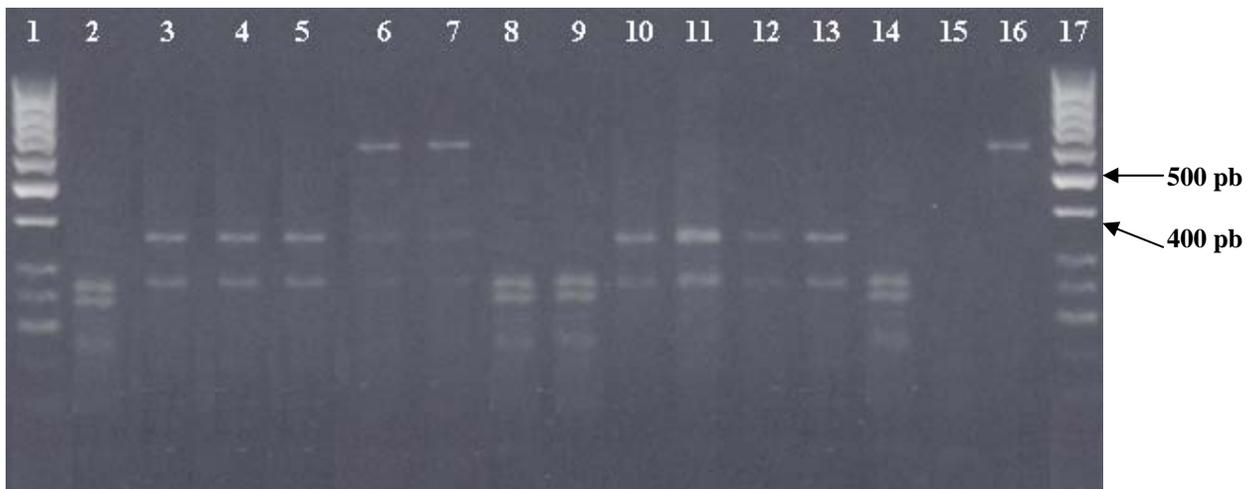
Las figuras 10, 11 y 12, muestran los resultados de las digestiones enzimáticas de los productos de amplificación de la región ITS de *Meloidogyne* spp. En la figura 10 se observa la digestión con la enzima *AluI*, en la figura 11 la digestión con la enzima *DraI* y en la figura 12 la digestión con la enzima *RsaI*.

Con la enzima *AluI*, el patrón de digestión de la región ITS para *M. hapla* (carril 13) consistió de dos bandas con un tamaño aproximado de 250 pb y 190 pb. *M. incognita* (carril 14) presentó un patrón de tres bandas: 450 pb, 160 pb y 80 pb. *M. arabicida* (carril 2) mostró una sola banda de 435 pb. No se observó ninguna banda en *M. salasi* (carriles 6 y 7). Las muestras HMP, #4a y # 4b (carriles 4, 8 y 9) presentaron un patrón idéntico a *M. incognita*. En tanto que el patrón de las muestras Eha, #6a, #6b y #6c (carriles 5, 10, 11 y 12) correspondió al de *M. hapla*. La muestra HCH presentó una sola banda de 435 pb, similar a *M. arabicida*.



**Figura 10.** Digestión enzimática del producto de amplificación de la región ITS del género *Meloidogyne* con la enzima *AluI*. Carriles 1 y 16= Marcador 50 pb (FERMENTAS). Carril 2= ♀ ar. Carril 3=HCH. Carril 4=HMP. Carril 5= Eha. Carril 6= #1 a. Carril 7= #1 b. Carril 8= #4 a. Carril 9= #4 b. Carril 10= #6 a. Carril 11= #6 b. Carril 12= #6 c. Carril 13= 6+K. Carril 14= 4+K Carril 15= Control negativo.

**Fuente:** Laboratorio de Biotecnología de Plantas, CIA y Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Fitopatología, Agronomía. UCR. 2005.



**Figura 11.** Digestión enzimática del producto de amplificación de la región ITS del género *Meloidogyne* con la enzima *DraI*. Carriles 1 y 17= Marcador 50 pb (FERMENTAS). Carril 2=HMP. Carril 3=mHS. Carril 4= X. Carril 5= Eha. Carril 6= #1 a. Carril 7= #1 b. Carril 8= #4 a. Carril 9= #4 b. Carril 10= #6 a. Carril 11= #6 b. Carril 12= #6 c. Carril 13= 6+K. Carril 14= 4+K Carril 15= Control negativo. Carril 16= Producto de amplificación sin digerir (685 pb).

**Fuente:** Laboratorio de Biotecnología de Plantas, CIA y Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Fitopatología, Agronomía. UCR. 2005.

Con la enzima *DraI* (Figura 11) se obtuvo resultados similares a los anteriores. *M. incognita* (carril 14) mostró un patrón de tres bandas con tamaños aproximados de 270 pb, 240 pb y 180 pb. Las muestras locales HMP, #4a y #4b (carriles 2, 8 y 9) presentaron este mismo patrón. El patrón correspondiente a *M. hapla* (carril 13) consistió de dos bandas de 390 pb y 270 pb. Las muestras mHS, X, Eha, #6a, #6b y #6c (carriles 3, 4, 5, 10, 11 y 12) fue similar al de *M. hapla*. A *M. salasi* (carriles 6 y 7) correspondió un patrón de tres bandas de 710 pb, 390 pb y 270 pb. Para esta enzima no se incluyó *M. arabicida*, ni las muestras HCH y mH.



**Figura 12.** Digestión enzimática del producto de amplificación de la región ITS del género *Meloidogyne* con la enzima *RsaI*. Carriles 1 y 19= Marcador 50 pb (FERMENTAS). Carril 2= ♀ ar. Carril 3=HCH. Carril 4=HMP. Carril 5= mHS. Carril 6= X Carril 7= Eha. Carril 8= #1 a. Carril 9= #1 b. Carril 10= #4 a. Carril 11= #4 b. Carril 12= #6 a. Carril 13= #6 b. Carril 14= #6 c. Carril 15= 6+K. Carril 16= 4+K Carril 17= Control negativo. Carril 18= Producto de amplificación sin digerir (685 pb).

**Fuente:** Laboratorio de Biotecnología de Plantas, CIA y Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Fitopatología, Agronomía. UCR. 2005.

La enzima *RsaI* no cortó los productos de amplificación ITS de las especies *M. arabicida*, *M. incognita* y *M. salasi* (carriles 2, 16, 8 y 9, respectivamente), por lo que se observó una sola banda en estos casos, de 690 (*M. arabicida* y *M. incognita*) y de 710 pb (*M. salasi*), correspondientes al tamaño del producto ITS amplificado de estas especies (Figura 9). Las muestras HCH, HMP, #4a y #4b (carriles 3, 4, 10 y 11) tampoco fueron digeridas con *RsaI*. La enzima sí digirió el producto de amplificación de la región ITS de *M. hapla* (carril 15) generando un patrón de tres bandas de 690 pb, 540 pb y 140 pb. Los productos ITS de las muestras mHS, X, Eha, #6a, #6b y #6c (carriles 5, 6, 7, 12, 13 y 14) también fueron cortados por la enzima y presentaron el mismo patrón de tres bandas de *M. hapla*.

**Cuadro 3.** Resumen del tamaño de los productos de amplificación de las muestras (especies) del género *Meloidogyne* spp. analizadas con diferentes imprimadores.

<b>Código</b>	<b>Blo4/Blo5</b>	<b>Reacción Múltiple (JMV)</b>	<b>ITS4/ITS6</b>	<b>Identificación Molecular</b>
♀ ar	500 pb	700 pb	690 pb	<i>M. arabicida</i>
HCH	500 pb	690 pb	690 pb	?
HMP	530 y 480 pb	670 pb	690 pb	<i>M. incognita</i>
mHS	830, 500, 390 y 340 pb	440 y 335 pb	690 pb	Posible variante de <i>M. hapla</i>
mH	830, 500, 390 y 340 pb	No amplificó	690 pb	?
X	990, 850, 380 y 340 pb	670, 440 y 335 pb	690 pb	Posible variante de <i>M. hapla</i>
Eha	No amplificó	440 pb	690 pb	<i>M. hapla</i>
#1 a	750, 660, 580 y 480 pb.	No amplificó	710 pb	<i>M. salasi</i>
#1 b	750, 660, 580 y 480 pb.	No amplificó	710 pb	<i>M. salasi</i>
#4 a	530 y 480 pb	670 pb	690 pb	<i>M. incognita</i>
#4 b	530 y 480 pb	670 pb	690 pb	<i>M. incognita</i>
#6 a	690 pb	440 pb	690 pb	<i>M. hapla</i>
#6 b	690 pb	440 pb	690 pb	<i>M. hapla</i>
#6 c	690 pb	440 pb	690 pb	<i>M. hapla</i>
6+K	690 pb	440 pb	690 pb	<i>M. hapla</i>
4+K	530 y 480 pb	670 pb	690 pb	<i>M. incognita</i>

**Rosado:** Bandas compartidas con *M. arabicida*

**Rojo:** Bandas compartidas con *M. incognita*

**Azul:** Bandas compartidas con *M. hapla*

**Cuadro 4.** Patrones de restricción de las muestras (especies) del género *Meloidogyne* spp. analizadas con diferentes enzimas.

<b>Código</b>	<b><i>AluI</i></b>	<b><i>DraI</i></b>	<b><i>RsaI</i></b>
♀ ar	435 pb	No incluida	690 pb
HCH	435 pb	No incluida	690 pb
HMP	450, 160 y 80 pb	270, 240 y 180 pb	690 pb
mHS	No incluida	390 y 270 pb	690, 540 y 140 pb
mH	No incluida	No incluida	No incluida
X	No incluida	390 y 270 pb	690, 540 y 140 pb
Eha	250 y 190 pb	390 y 270 pb	690, 540 y 140 pb
#1 a	No bandas	710, 390 y 270 pb	710 pb
#1 b	No bandas	710, 390 y 270 pb	710 pb
#4 a	450, 160 y 80 pb	270, 240 y 180 pb	690 pb
#4 b	450, 160 y 80 pb	270, 240 y 180 pb	690 pb
#6 a	250 y 190 pb	390 y 270 pb	690, 540 y 140 pb
#6 b	250 y 190 pb	390 y 270 pb	690, 540 y 140 pb
#6 c	250 y 190 pb	390 y 270 pb	690, 540 y 140 pb
6+K	250 y 190 pb	390 y 270 pb	690, 540 y 140 pb
4+K	450, 160 y 80 pb	270, 240 y 180 pb	690 pb

En los cuadros 3 y 4 se puede observar un resumen de los resultados obtenidos mediante los diferentes análisis realizados para el género *Meloidogyne* spp.

## DISCUSIÓN

### EXTRACCIÓN DE ADN

El protocolo utilizado para la extracción de ADN a partir de quistes (*Globodera* spp.) o masa de huevos y estadíos juveniles (*Meloidogyne* spp.) permitió obtener ADN de buena calidad para las aplicaciones de PCR de un buen número de muestras. De algunas muestras no fue posible extraer el ADN. No se tiene una clara explicación para esta situación; pero indica la posibilidad de optimizar el protocolo y la necesidad de evaluar el manejo de las muestras.

### PCR CON IMPRIMADORES ESPECÍFICOS

En todos los ensayos de PCR, tanto de imprimadores específicos como del ensayo de RFLP, se utilizó un control negativo (sin ADN) con el fin de evaluar la pureza de los reactivos, la eficiencia del programa de PCR y el buen o mal manejo por parte del investigador. También para todos los ensayos se utilizaron controles positivos, para de esta manera asegurar la especificidad de los imprimadores utilizados y tener un punto de comparación para la identificación de las especies.

#### ***Globodera* spp.**

La reacción múltiple con los imprimadores PITSr3, PITSp4 e ITS5 y el uso de imprimadores específicos para cada especie de este género de manera independiente, permitieron diferenciar claramente *G. pallida* de *G. rostochiensis*, tal como ha sido descrito por otros (Bulman y Marshall, 1997; Fullaondo *et al.*, 1999; Bates *et al.*, 2002). La reacción múltiple permitió detectar ambas especies simultáneamente en la misma muestra, lo cual representa una ventaja sobre el uso de imprimadores específicos de manera independiente y sería más apropiada para análisis de rutina.

Las muestras provenientes de las fincas Liebres y La Pastora fueron identificadas como *G. pallida* por ambas metodologías. Esto concuerda con los resultados presentados por García *et al.* (2005) sobre la identidad de la especie de nematodo formador de quiste asociado con el cultivo de la papa en Costa Rica. En adición, indica una amplia distribución geográfica de esta especie. García *et al.* (2005) solo analizaron quistes provenientes de la finca Liebres. No se detectó la presencia de *G. rostochiensis* en ninguna de las muestras analizadas, aún cuando se extrajo ADN de muestras compuestas por 100 quistes. Bates *et al.* (2002) fueron capaces de detectar la presencia de ambas especies en muestras de 50 quistes cuando la relación fue al menos 20:30. *G. rostochiensis* fue reportada en Costa Rica en 1973 (Ramírez, 1979). No obstante en muestreos extensivos en años siguientes (1975-77, 1981, 1984-85, 1988, 1989, 1995-1997, 1998) no fue posible detectar el nematodo, aún en áreas donde había sido encontrado previamente. En 1999, la Organización Europea y

Mediterránea para la Protección Vegetal (EPPV) declaró a Costa Rica libre de *G. rostochiensis*. Los datos presentados aquí apoyan esta declaratoria.

### ***Meloidogyne* spp.**

El par de imprimadores Blo4/Blo5 amplifica una parte de la región intergénica (IGS) 28S-5S, generando productos de diferentes tamaños que permiten diferenciar algunas especies de *Meloidogyne* spp: para *M. chitwoodi* una banda de 280 pb, para *M. fallax* una banda de 320 pb, para *M. hapla* se puede obtener una sola banda de 705 pb o un patrón de bandas múltiples y para *M. incognita* se obtiene un patrón de bandas múltiples (Wishart *et al*, 2002). De igual manera, los imprimadores específicos JMV1, JMV2, JMVhapla y JMVtropical fueron diseñados para diferenciar básicamente las mismas especies de *Meloidogyne* spp. que Blo4/Blo5. En este caso, los productos de amplificación que permiten diferenciar entre estas especies de *Meloidogyne* spp. son: para *M. chitwoodi* una banda de 540 pb, para *M. fallax* una banda de 670 pb, para *M. hapla* una banda de 440 pb y para *M. incognita* se obtiene una banda de 670 pb. La diferencia entre *M. fallax* y *M. incognita* radica en que el imprimador específico para *M. fallax* es el JMV2 y el de *M. incognita* es el JMVtropical (Wishart *et al*, 2002).

El uso de ambos grupos de imprimadores permitió distinguir claramente las especies de *Meloidogyne* spp. analizadas. Cuando se utilizó especies control (*M. incognita*, *M. hapla*) fue posible identificar las especies presentes en las muestras provenientes de campo (Figuras 4 y 5). Las muestras HMP, #4a y #4b correspondieron a *M. incognita*, mientras que las muestras Eha, #6a, #6b y #6c a *M. hapla*. En relación a la muestra HCH, en el Laboratorio de Nematología de la UCR se observó un diseño perineal diferente a *M. hapla* y *M. incognita*, lo que condujo a pensar que se trataba de una reciente introducción al país de *M. chitwoodi*, especie no presente en Costa Rica (L. Salazar, Comunicación Personal). Los datos obtenidos descartan que se trate de *M. chitwoodi*. El patrón de bandas obtenido no corresponde al indicado por Wishart *et al.* (2002) para esta especie; mostró, sin embargo, una alta similitud a los patrones de bandas de *M. arabicida* (Cuadro 3). Esto debe ser investigado más a fondo utilizando otros genes nucleares y mitocondriales.

No fue posible identificar las muestras mHS, mH y X, lo que indica que posiblemente se trata de otras especies del género *Meloidogyne* spp. no identificables con los imprimadores utilizados. Wishart *et al.* (2002) indican que con estos imprimadores es posible detectar otras especies de *Meloidogyne* spp., como *M. javanica*, *M. mayaguensis* e incluso una raza B de *M. hapla*, de las cuales no se contó con un control positivo. Alternativamente, estas muestras podrían representar una mezcla de especies. Cuando se utilizó los imprimadores Blo4/Blo5, las muestras mHS y mH presentaron un patrón de cuatro bandas, una de las cuales fue del mismo tamaño de la banda de *M. arabicida* (Fig. 4; Cuadro 3). Con los imprimadores JMV, las muestras mHS y X presentaron un patrón de dos y tres bandas respectivamente. Ambas muestras presentaron una banda en común con *M. hapla* (Fig. 5, Cuadro 3); la

muestra X presentó además una banda en común con *M. incognita*. (Fig. 5, Cuadro 3). Los patrones de digestión con las enzimas *AluI*, *DraI* y *RsaI* de las muestras mHS y X fue idéntico al de *M. hapla*, por lo que esta especie puede ser parte de la mezcla o las muestras representan variantes de *M. hapla* (Wishart *et al.* 2002).

Las muestras #1a y #1b fueron identificadas morfológicamente como *M. salasi* en el Laboratorio de Nematología de la UCR. Esta especie fue descrita en 1984 y se encuentra únicamente en Costa Rica y Panamá (López, 1984). A la fecha no se conoce de evidencia molecular que confirme su estatus como especie. Con los imprimadores Blo4/Blo5, las muestras analizadas produjeron un patrón de bandas diferente al de las otras especies estudiadas, indicando que efectivamente *M. salasi* es una especie diferente. Estas bandas podrían ser utilizadas para la identificación de *M. salasi*. De manera que esta es la primera vez que datos moleculares apoyan la nominación de *M. salasi*.

La muestra ♀ ar corresponde a *M. arabicida*. Esta especie se considera nativa de Costa Rica y fue descrita por primera vez en 1989 (López y Salazar, 1989). Es un patógeno asociado al cafeto. Inicialmente se discutió su condición de especie y algunos sugirieron que se trataba de *M. incognita* (L. Flores, Laboratorio de Nematología, UCR, comunicación personal). Los patrones obtenidos con los imprimadores Blo4/Blo5 para *M. arabicida* difieren de los de *M. incognita* (Figs. 4 y 5) lo que apoya la designación de *M. arabicida* como una especie diferente a *M. incognita*. Esto fue corroborado por los diferentes patrones de digestión de la región ITS obtenidos para cada especie (Figs. 10, 11 y 12). Estos resultados concuerdan con los de Radig *et al.* (2004) quienes presentaron evidencia molecular que apoya la diferencia entre *M. arabicida* y *M. incognita*.

## PCR-RFLP

Las secuencias de las regiones ITS1 e ITS2 de las especies utilizadas como control en este trabajo se encuentran reportadas en el banco de genes del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), las cuales se pueden encontrar en línea, en la dirección electrónica <<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>>. Estas secuencias se analizaron en el software computacional BioEdit Sequence Alignment Editor, para observar los mapas de restricción de cada una y así tener una idea de que esperar en cada digestión enzimática. Sin embargo, existe la posibilidad de que haya ciertas diferencias, ya que la región que se amplificó en el presente estudio con los imprimadores ITS4 e ITS6 es un poco más extensa a la analizada en el programa BioEdit.

### ***Globodera* spp.**

Para este género se utilizaron dos enzimas de restricción: *AluI* y *MspI*. En el mapa de restricción obtenido en el sitio NCBI se observan los puntos de corte de cada una de estas enzimas. Para la especie *G. pallida*, de una secuencia de 927 pb, se tiene que con la enzima *AluI* existen cuatro puntos de corte, es decir, se visualizaría un patrón de bandas múltiples de cinco bandas. Con la enzima *MspI* se reporta un solo punto de corte, con lo cual se obtienen dos bandas. Para *G. rostochiensis*, de una secuencia de 895 pb, con la enzima *AluI* existen tres puntos de corte, es decir, se visualizaría un patrón de bandas múltiples de cuatro bandas; la enzima *MspI* no corta esta especie en ningún punto. Es importante recordar que los fragmentos amplificados en este estudio son diferentes a los obtenidos en línea, por lo que existe la posibilidad de variación en los puntos de corte y, por ende, en el número de bandas visualizadas.

El análisis PCR-RFLP también permitió diferenciar entre las especies *G. pallida* y *G. rostochiensis*, tal como ha sido descrito por Reid y Pickup (2005) y por García *et al.* (2005). En ambas digestiones, con las enzimas *AluI* y *MspI* (Figuras 7 y 8, respectivamente), se observan los patrones obtenidos para los controles positivos, los cuales, al ser comparados con los patrones de bandas de las muestras costarricenses de ambas fincas, Liebres y La Pastora, permiten identificarlas como *G. pallida*. En el caso de la enzima *AluI*, estos resultados concuerdan con los presentados por Reid y Pickup (2005) y García *et al.* (2005) sobre la identidad de esta especie. Por otro lado, la digestión con la enzima *MspI* no fue realizada por estos autores, sin embargo, con los resultados presentados se demuestra que con esta enzima también es posible realizar una identificación de ambas especies. Las muestras costarricenses nuevamente mostraron el patrón de *MspI* correspondiente a *G. pallida*. No se detectó la presencia de *G. rostochiensis* en ninguna de las muestras analizadas, confirmando la ausencia de esta especie.

### ***Meloidogyne* spp.**

Para este género se utilizaron tres enzimas de restricción: *AluI*, *DraI* y *RsaI* (Figuras 10, 11 y 12, respectivamente). En el mapa de restricción, obtenido en el sitio NCBI, se observan los puntos de corte de cada una de estas enzimas. Para la especie *M. hapla*, de una secuencia de 645 pb, se tiene que con la enzima *AluI* existen tres puntos de corte, es decir, se visualizaría un patrón de bandas múltiples de cuatro bandas. Para las enzimas *DraI* y *RsaI* se reporta un solo punto de corte, con lo cual se obtienen dos bandas. En el caso de *M. incognita*, de una secuencia también de 645 pb, con la enzima *AluI* existen dos puntos de corte, es decir, se visualizaría un patrón de bandas múltiples de tres bandas; la enzima *DraI* corta a esta especie en dos puntos, con lo que se obtendría un patrón de tres bandas; y la enzima *RsaI* no corta a esta especie en ningún punto. Es importante recordar, al igual que con el género *Globodera*, que los fragmentos amplificados en este estudio son algo diferentes a los obtenidos en línea, por lo que existe la posibilidad de variación en los puntos de corte y, por ende, en el número de bandas visualizadas.

El uso de las tres enzimas en el análisis de PCR-RFLP también permitió distinguir claramente las especies de *Meloidogyne* spp. analizadas. Al utilizar especies control (*M. incognita*, *M. hapla* y *M. salasi*) se lograron identificar las muestras de campo, comparando los patrones de digestión obtenidos. Las muestras Eha, #6a, #6b y #6c corresponden a *M. hapla* y las muestras HMP, #4a y #4b a *M. incognita*.

En relación a la muestra HCH, como se mencionó anteriormente, según el diagnóstico morfológico realizado en el Laboratorio de Nematología de la UCR se pensó que se trataba de una reciente introducción de *M. chitwoodi*. Con los datos obtenidos con el análisis PCR-RFLP no se puede descartar que se trate de *M. chitwoodi*, únicamente se descarta la posibilidad de que se trate de *M. hapla*, *M. incognita* o *M. salasi*, ya que los patrones de las digestiones enzimáticas no concuerdan con ninguno de los obtenidos para estas especies. Sin embargo, con los imprimadores Blo4/Blo5 y la reacción múltiple JMV sí se descarta que se trate de una nueva introducción de *M. chitwoodi* en Costa Rica, como se mencionó en la sección anterior.

Los patrones de restricción obtenidos para las muestras mHS, y X, fueron similares a los de *M. hapla*, aunque como se indicó anteriormente, estas muestras no presentaron el patrón correspondiente a *M. hapla* cuando se utilizaron los imprimadores Blo4/Blo5 y los imprimadores específicos JMV en la reacción múltiple. Es posible que se trate de otras especies del género *Meloidogyne* spp. o una mezcla de especies, una de las cuales es *M. hapla*. Alternativamente, podría tratarse de variantes de *M. hapla*. Los patrones obtenidos con las enzimas *DraI* y *RsaI* de las muestras mHS y X corresponden a los de *M. hapla* y los productos de amplificación con los otros imprimadores presentaron un patrón de bandas múltiples, similar al de *M. hapla* raza B (Wishart *et al.* 2002).

Las muestras #1a y #1b, identificadas morfológicamente como *M. salasi* en el Laboratorio de Nematología de la UCR, no fueron digeridas por ninguna de las enzimas utilizadas, lo que apoya su condición de especie diferente. La muestra ♀ ar correspondiente a *M. arabicida*, también mostró un patrón de bandas producto de la digestión enzimática diferente al de las otras especies, confirmando su condición de especie diferente dentro del género *Meloidogyne* spp.

## CONCLUSIONES

Una identificación diferencial, a nivel de especie, de los nematodos de quiste de la papa (*Globodera* spp.) y de los nematodos formadores de nódulos de la raíz (*Meloidogyne* spp.) es de suma importancia, ya que según las regulaciones actuales, dictadas por diferentes organismos internacionales, las repercusiones en la economía del país por estas plagas serían catastróficas, especialmente en una época en la que los cultivos son transportados a través de fronteras internacionales.

El diagnóstico molecular de nematodos ofrece amplias ventajas sobre el diagnóstico tradicional. Además de las ya mencionadas, este tipo de diagnóstico ofrece no solo un mejor enfoque sobre nematodos problemáticos, sino que también permite identificar especies en cualquier punto del ciclo de vida, así como mezclas de poblaciones.

El uso de imprimadores específicos para el diagnóstico de nematodos puede ser, dependiendo de las especies o géneros a analizar, suficiente para llegar a un resultado confiable, como en el caso del género *Globodera* spp., que con solo la reacción múltiple con tres imprimadores se logró identificar la especie asociada a las muestras locales. Sin embargo, en algunas ocasiones es necesario realizar otros ensayos, como el de PCR-RFLP, para que la identificación de nematodos sea verdaderamente confiable, como fue el caso del género *Meloidogyne* spp. En este caso, algunas de las muestras incluso no se lograron identificar, sino que únicamente se descartaron aquellas que no eran.

En las fincas La Pastora y Liebres, ubicadas en la región de Cartago, predomina la presencia de la especie *Globodera pallida* y de hecho fue la única especie que se encontró, ya que ninguna de las muestras se identificó como *G. rostochiensis* ni como una mezcla de ambas especies. La especie de nematodo formador de quiste asociado al cultivo de la papa en Costa Rica es por lo tanto *G. pallida*.

La mayoría de las muestras analizadas del género *Meloidogyne* spp. pertenece a las especies *M. hapla* y *M. incognita*. Algunas de las muestras no pudieron ser identificadas claramente, pero se descartó la posibilidad de que fueran una de esas dos especies.

La especie *M. salasi* fue descrita en Costa Rica en 1984 y hasta el momento no existía confirmación molecular de su estatus de especie. Los análisis de PCR y PCR-RFLP presentados representan a mi mejor entender, la primera evidencia molecular en apoyo de *M. salasi* como una nueva especie dentro del género *Meloidogyne* spp. De igual forma se corroboró la condición de especie para *M. arabicida*.

La reacción múltiple con imprimadores específicos se considera más apropiada, además de ventajosa, para el diagnóstico molecular en análisis de rutina, ya que permite reducir el uso de reactivos, de ADN y el tiempo de identificación de especies.

En el análisis de PCR-RFLP, la enzima *AluI* fue la que mostró los mejores resultados para la distinción de especies del género *Meloidogyne* spp. En el caso de *Globodera*

spp., ambas enzimas, *AluI* y *MspI*, presentaron resultados concluyentes para la diferenciación entre las especies analizadas. La enzima *RsaI*, en el caso de *Meloidogyne* spp, fue la que dio los resultados más inconclusos de las tres enzimas utilizadas. La combinación de los patrones enzimáticos permitió la diferenciación de las especies.

## **RECOMENDACIONES**

La extracción de ADN de los nematodos debe realizarse con sumo cuidado, de forma que se tenga el material para realizar todas las pruebas necesarias y pertinentes para llegar a un resultado e identificación confiable.

Se deben realizar pruebas con el protocolo de extracción de ADN para lograr extraerlo con la menor cantidad de nematodos posible, no solo por la dificultad que hay algunas veces en la recolección del material, sino también para evitar la posibilidad de que haya una mezcla de especies.

Además, se recomienda probar otros protocolos de extracción de ADN de nematodos, con el fin de estandarizar este procedimiento y obtener la mejor calidad de ADN con la menor cantidad posible de nematodos.

En las pruebas con imprimadores específicos, es recomendable, cuando se trata de reacciones múltiples, realizar pruebas primero con los imprimadores por separado, para asegurarse de que no exista posibilidad de error en el resultado.

Por último, se recomienda realizar pruebas moleculares utilizando otros genes o regiones génicas, como la del ADN mitocondrial, para llegar a una identificación certera de las muestras que no fueron concluyentemente identificadas en este trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

- AGRIOS, G. 2004. Fitopatología. 2 ed. LIMUSA. México D.F, México. 838 p.
- ARAUZ, L. 1998. Fitopatología: Un Enfoque Agroecológico.. San José, Costa Rica. Editorial de la Universidad de Costa Rica. 476p.
- ARMSTRONG, M.; BLOK, V.; PHILLIPS, M. 2000. A Multipartite Mitochondrial Genome in the Potato Cyst Nematode *Globodera pallida*. *Genetics*. Scottish Crop Research Institute. Dundee, Scotland. 154: 181 – 192.
- BATES, J.; TAYLOR, E.; GANS, P. & THOMAS, J. 2002. Determination of relative proportions of *Globodera* species in mixed populations of potato cyst nematodes using PCR product melting peak analysis. *Molecular Plant Pathology*. Cambridge, United Kingdom. 3 (3): 153 – 161.
- BBMBI. 2004. Análisis electroforético de ácidos nucleicos en geles de agarosa. <<<http://www.um.es/bmbi/AyudasDocentes/Practicas/Medicina/PracticasLaboratorio/Practica07.htm>>> (3 de abril, 2005)
- BRODIE, B. 1998. Plant and Nematode Interactions. American Society Of Agronomy, Crop Science Society Of America & Soil Science Society Of America. *Agronomy Monograph # 36*. Wisconsin, United States of America. p. 567 – 594.
- BULMAN, S. R. & MARSHALL, J.W. 1997. Differentiation of Australasian Potato cyst nematode (PCN) populations using the polymerase chain reaction (PCR). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. New Zealand Institute for Crop & Food. Christchurch, New Zealand. 25: 123 – 129.
- CGLOBAL. 2003. Papa. <<<http://www.cglobal.imn.ac.cr/Papa.htm>>> (6 de junio, 2005)
- CROZZOLI, R. 2002. Especies de Nematodos Fitoparasíticos en Venezuela. INCI. Vol 27(7).

- DALE, J. & VON SCHANTZ, M. 2002. From genes to genome. E. Jhon Wiley and Sons. Sussex, Inglaterra. 360 p.
- DEVTRAN, Z; GÖZEL, U; SÖĞÜT, M.; YILDIZ, Ş. ELEKÇİOĞLU, İ. 2002. Identification of Root-Knot Nematodes in the Mediterranean Region of Turkey by Using rDNA and mtDNA Markers. *Turk J Agric For. Citrus and Greenhouse Crops Research Institute. Antalya, Turkey.* 26: 337 – 341.
- EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION (EPPO). 2004. Diagnostic protocols for regulated pests. *EPPO Bulletin.* Paris, France. 34: 155 – 157.
- EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION (EPPO). 2004. *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. *EPPO Bulletin.* Paris, France. 34: 309 – 314.
- FULLAONDO, A.; BARRENA, E.; VIRIBAY, M.; BARRENA, I.; SALAZAR, A. & RITTER, E. 1999. Identification of potato cyst nematode species *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* by PCR using specific primer combinations. *Nematology.* España. 1(2): 157 – 163.
- GARCÍA, D.; SALAZAR, L.; BRENES, A. & GÓMEZ, L. 2005. Identification of the potato cyst-forming nematode in soil samples from Costa Rica by PCR. Centro de Investigaciones Agronómicas y Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos, Universidad de Costa Rica.
- 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.* Yonsei University, College of Medicine, Department of Parasitology. Seoul, Korea. 37(4): 215-228.
- JOBES, D. & THIEN, L. 1997. A Conserved Motif in the 5.8S Ribosomal RNA (rRNA) Gene is a Useful Diagnostic Marker for Plant Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequences. *Plant Molecular Biology Reporter.* Tulane University, Department of Cell and Molecular Biology. New Orleans, USA. 15: 326 – 334.

- KLUG, W.S; CUMMINGS, M.R. 1999. Conceptos de Genética. Trad. por: Ménsua, JL. y Bueno, D. 5ª edición. Prentice Hall. Iberia, S.R.L. Madrid, España. 814 p.
- LÓPEZ, R. 1984. *Meloidogyne salasi* sp.n. (Nematoda: Meloidogynidae), a new parasite of rice (*Oryza sativa* L) from Costa Rica and Panama. *Turrialba*. IICA. Costa Rica. 34(3): 275 – 286.
- LÓPEZ, R. & L. SALAZAR. 1989. *Meloidogyne arabicida* sp. n. (Nemata: Heteroderidae) nativo de Costa Rica: un nuevo y severo patógeno del cafeto. *Turrialba*. IICA. Costa Rica. 39: 313 – 323.
- LYONS, R. Sf. A Molecular Biology Glossary: A Quick and Dirty Reference to Terms Used in Molecular Biology DNA Sequencing Core, University of Michigan, USA. <<<http://seqcore.brcf.med.umich.edu/doc/educ/dnapr/mbglossary/mbgloss.html>>>. (15 de diciembre, 2005)
- MADRIZ, K *et al.* 2005. Manual de laboratorio biología molecular. Escuela de biología, Laboratorio de biología molecular. Instituto Tecnológico de Costa Rica. pp 49
- MANDURIC, S. & ANDERSSON, S. 2003. Potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis* and *G. pallida*) from Swedish potato cultivation – an AFLP study of their genetic diversity and relationships to other European populations. *Nematology*. Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Crop Science. Alnarp, Sweden. 5(6): 851 – 858.
- OIRSA. 1999. Manejo de enfermedades en ornamentales. <<<http://www.oirsa.org/Publicaciones/VIFINEX/Manuales/Manuales-1999/Manual-03/II-Manejo.htm>>> (28 de noviembre, 2005)
- OIRSA. 1999 Manual Técnico: Fitosanidad en Pitahaya. <<[http://www.oirsa.org/Publicaciones/VIFINEX/Manuales/Manuales-1999/Manual-01/Agentes\\_Causales.htm](http://www.oirsa.org/Publicaciones/VIFINEX/Manuales/Manuales-1999/Manual-01/Agentes_Causales.htm)>> (28 de noviembre, 2005)
- ORTUÑO, N. *et al.* 1999. Producción de tubérculos para semilla de papa libre de nematodos. *Manejo Integrado de Plagas*. CATIE, Costa Rica. No. 52.

- POWERS, T. 2004. Nematode Molecular Diagnostics: From Bands To Barcodes. *Annual Reviews Phytopathology*. Department of Plant Pathology, University of Nebraska. Lincoln, Nebraska, USA. 42: 367 – 83.
- PYLYPENKO, L.A.; UEHARA, T.; PHILLIPS, M.S.; SIGAREVA, D.D. & BLOK, V.C. 2005. Identification of *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* in the Ukraine by PCR. *European Journal of Plant Pathology*. 111: 39 – 46.
- RAMÍREZ, A. 1979. Muestreo poblacional del nematodo dorado (*Globodera rostochiensis*) y otros nematodos asociados al cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) *Agronomía Costarricense*. San José, Costa Rica. 3 (1): 13 – 20.
- RAMÍREZ, C. 2001. Cultivo de la papa. Fitotecnia Especial. Universidad Austral de Chile.
- RANDIG, O.; R.M.D.G. CARNEIRO & CASTAGNONE-SERENO, P. 2004. Identificação das principais espécies de *Meloidogyne* parasitas do cafeeiro no Brasil com marcadores SCAR-café em multiplex-PCR. *Nematologia Brasileira*. Vol. 28(1):1-10
- REID, A. & PICKUP, J. 2005. Molecular Characterization of a morphologically unusual potato cyst nematode. *EPPO Bulletin*. Edinburgh, Scotland. 35: 69 – 72.
- RIVERA, G. 1999. Conceptos introductorios a la Fitopatología. 1ed. EUNED. San José, Costa Rica. 308 p.
- ROMÁN, J. 1978. Fitonematología Tropical. Universidad de Puerto Rico. Río Piedras, Puerto Rico. 256 p.
- SMITH, C & WOOD, E. 1998. Biología molecular y biotecnología. Adisson-Wesley Iberoamericana. Estados Unidos de América.
- SUBBOTIN, S. A.; 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.

- TURNER, S. & FLEMING, C. 2002. Multiple selection of potato cyst nematode *Globodera pallida* virulence on a range of potato species. I. Serial selection on *Solanum*-hybrids. *European Journal of Plant Pathology*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 108: 461 – 467.
- UNL. Sf. ITS Size Variation in Plant Parasitic Nematodes. <<[http://nematode.unl.edu/its\\_id/its\\_var.htm](http://nematode.unl.edu/its_id/its_var.htm)>> (15 de diciembre, 2005)
- VEILLEUX, C. 2004. PCR Technology. Science Seminars. <<[http://www.accessexcellence.org/LC/SS/PS/PCR/PCR\\_technology.html](http://www.accessexcellence.org/LC/SS/PS/PCR/PCR_technology.html)>> (15 de diciembre, 2005)
- VEJL, P.; SKUPINOVÁ, S.; SEDLÁK, P.; DOMKÁŘOVÁ, J. 2002. Identification of PCN species (*Globodera rostochiensis*, *G. pallida*) by using of ITS-1 region's polymorphism. *Rostlinná Výroba*. Czech University of Agriculture in Prague & Potato Research Institute, Havlíčkův Brod, Czech Republic. 48 (11): 486 – 489.
- WANG, X.; BOSSELUT, N.; CASTAGNONE, C.; VOISIN, R.; ABAD, P. & ESMENJAUD, D. 2003. Multiplex polymerase chain reaction identification of single individuals of the Longidorid nematodes *Xiphinema index*, *X. diversicaudatum*, *X. vuittenezi*, and *X. italiae* using specific primers from ribosomal genes. *Phytopathology* 93:160-166.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. *In*: PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic Press Inc. San Diego, USA. p. 315 – 322.
- WISHART, J.; PHILLIPS, M. S.; BLOK, V. C. 2002. Ribosomal Intergenic Spacer: A Polymerase Chain Reaction Diagnostic for *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax*, and *M. hapla*. *Nematology*. Scottish Crop Research Institute. Invergowrie, United Kingdom. 92 (8): 884 – 892.
- XU, J.; LIU, P.; MENG, Q. & LONG, H. 2004. Characterisation of *Meloidogyne* species from China using isoenzyme phenotypes and amplified mitochondrial DNA restriction fragment polymorphism. *European Journal of Plant Pathology*. Nanjing, People's Republic of China. 110: 309 – 315.

## ANEXOS

### ANEXO 1: AMORTIGUADOR DE LISIS DE GUSANOS (WORM LYSIS BUFFER: WLB)

- ☒ KCl 50 mM
- ☒ Tris pH 8.3 10 mM
- ☒ MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM
- ☒ SDS 0,45%
- ☒ Tween 20 0,45 %
- ☒ Proteínasa K 60 µg/ml, (se agregó justo antes de la extracción).

### ANEXO 2: AMORTIGUADOR DE LISIS NUCLEAR (CTAB):

- ☒ 0,2 M Tris base ph 7,5
- ☒ 0,05 M EDTA
- ☒ 2,0 M NaCl
- ☒ 2% CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)

### ANEXO 3: NIVELES CATEGÓRICOS APLICABLES DE CADA MARCADOR MOLECULAR O REGIÓN DE GENES

	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Population
Nuclear rDNA								
SSU (16-18S)	████████████████████	████████████████████	████████████████████	████████████████████	████████████████████	-----		
LSU (23-28S)			████████████████████	████████████████████	████████████████████	-----		
5.8S	████████████████████	████████████████████	████████████████████	████████████████████	-----			
IGS							████████████████████	
ITS						████████████████████	████████████████████	

The bold lines indicate mainly applicable categorical levels of each molecular marker or gene region while the dot lines indicate less frequently applicable categorical levels.

Modificado de: Hwang y Kim, 1999