

Instituto Tecnológico de Costa Rica

Vicerrectoría de Investigación y Extensión

Centro de Investigación y Desarrollo de Agricultura
Sostenible del Trópico Húmedo (CIDASTH)

Informe Final de Investigación

**Diagnóstico, dinámica poblacional,
caracterización bioquímica y molecular de
nematodos noduladores (*Meloidogyne* spp.) en
cultivos tropicales de Costa Rica**

Código:

5402 2151 8801

Tecnológico de Costa Rica

Ing. Joaquín Durán Mora, M. Sc.
Investigador Responsable

San Carlos, Junio 2012

Índice

Contenido	Página
Documento	
1. Resumen	1
1. Abstrac	2
2. Introducción	3
2.1. Objetivo General	4
2.2. Objetivos Específicos	4
3. Generalidades en la identificación del género <i>Meloidogyne</i>	5
4. Metodología	7
4.1. Ubicación del Estudio	7
4.2. Diagnóstico morfológico del complejo de nematodos noduladores (<i>Meloidogyne</i> spp.) que infectan a cultivos tropicales de la región de Huetar Norte, Valle Occidental y Huetar Atlántica de Costa Rica	7
4.3. Identificación molecular de las poblaciones de <i>Meloidogyne</i> spp. detectadas mediante la PCR-RFLP de regiones conservadas del ADN ribosómico y mitocondrial	8
5. Resultados y Discusión	10
5.1. Diagnóstico morfológico del complejo de nematodos noduladores (<i>Meloidogyne</i> spp.) que infectan a cultivos tropicales de la región de Huetar Norte, Valle Occidental y Huetar Atlántica de Costa Rica	10
5.2. Identificación molecular de las poblaciones de <i>Meloidogyne</i> spp. detectadas mediante la PCR-RFLP de regiones conservadas del ADN ribosómico y mitocondrial	15
6. Conclusiones	27
7. Literatura Citada	28
8. Anexo A	31

Lista de Cuadros

Contenido	Página
Cuadro 1. Iniciadores de PCR utilizados para amplificar diferentes regiones del genoma de <i>Meloidogyne</i>	9
Cuadro 2. Enzimas de restricción utilizadas para la digestión de los productos de PCR	10
Cuadro 3. Muestras de raíces para análisis nematológico colectadas durante la realización del proyecto	11
Cuadro 4. Abundancia estimada de nematodos fitoparásitos y de vida libre en 10 g de raíces, de muestras de cultivos tropicales	13
Cuadro 5. Número de repeticiones (muestras de ADN) preparadas por cada muestra e iniciadores ensayados en cada una durante el análisis de las mismas mediante PCR – RFLP	15
Cuadro 6. Número de reacciones ensayadas, productos de PCR obtenidos e identificaciones logradas, para cada uno de los iniciadores de PCR utilizados en la investigación 3. Generalidades en la identificación del género <i>Meloidogyne</i>	16
Cuadro 7. Especies de <i>Meloidogyne</i> presentes en cada una de las muestra, identificadas mediante análisis del diseño perineal de hembras adultas en la población y mediante el patrón de digestión obtenido por PCR – RFLP4	23

Lista de Figuras

Contenido	Página
Figura 1. Áreas de toma de muestras de raíces para detección de <i>Meloidogyne</i> , se indican en color rojo	13
Figura 2. Fotomicrografías de diseños perineales de hembras de <i>Meloidogyne</i> spp detectadas en las muestras de diferentes cultivos	14
Figura 3. Productos de amplificación obtenidos de diferentes muestras analizadas con los imprimadores D2A/D3B y C2F3/11082	16
Figura 4. Algunos productos de amplificación obtenidos de diferentes muestras analizadas con los imprimadores C2F3/1108	17
Figura 5. Electrofenograma de la digestión de <i>Meloidogyne incognita</i> con cinco diferentes enzimas de restricción (<i>AluI</i> , <i>DraI</i> , <i>HinfI</i> , <i>KpnI</i> , <i>SacI</i>) para los iniciadores D2A/D3B	18
Figura 6. Electrofenograma de la digestión de <i>Meloidogyne exigua</i> con cinco diferentes enzimas de restricción (<i>AluI</i> , <i>DraI</i> , <i>HinfI</i> , <i>KpnI</i> , <i>SacI</i>) para los iniciadores D2A/D3B	18
Figura 7. Electrofenograma de la digestión de <i>Meloidogyne hapla</i> con cinco diferentes enzimas de restricción (<i>AluI</i> , <i>DraI</i> , <i>HinfI</i> , <i>KpnI</i> , <i>SacI</i>) para los iniciadores D2A/D3B	19
Figura 8. Electrofenograma de la digestión de <i>Meloidogyne salasi</i> con cinco diferentes enzimas de restricción (<i>AluI</i> , <i>DraI</i> , <i>HinfI</i> , <i>KpnI</i> , <i>SacI</i>) para los iniciadores D2A/D3B	20
Figura 9. Electrofenograma de la digestión de <i>Meloidogyne salasi</i> con <i>DraI</i> para los iniciadores C2F3/1108	21
Figura 10. Electrofenograma de la digestión de <i>Meloidogyne incognita</i> con <i>HinfI</i> para los iniciadores C2F3/1108	21

Contenido	Página
Figura 11. Electrofenograma de la digestión de <i>Meloidogyne exigua</i> con <i>DraI</i> para los iniciadores C2F3/1108	22
Figura 12. Electrofenograma de la digestión de <i>Meloidogyne hapla</i> con <i>DraI</i> para los iniciadores C2F3/1108	22
Figura 13. Puntos de muestreo en fincas arroceras y especies de <i>Meloidogyne</i> identificadas en los muestreos realizados en la región Huetar Atlántica	25
Figura 14. Puntos de muestreo en fincas cafetaleras y especies de <i>Meloidogyne</i> identificadas en los muestreos realizados en el Valle Occidental	26
Figura 15. Puntos de muestreo y especies de <i>Meloidogyne</i> identificadas en los muestreos realizados en la Región Huetar Norte	26
Figura 1A. Mapa de la digestión de <i>Meloidogyne exigua</i> (GeneBank, AF435796), <i>Meloidogyne hapla</i> (GeneBank, DQ145641) y <i>Meloidogyne incognita</i> (GeneBank, AF435794) con las enzimas de restricción <i>AluI</i> , <i>DraI</i> , <i>HinfI</i> , <i>KpnI</i> y <i>SacI</i>	31

Documento I

Informe sobre el diagnóstico morfológico y molecular del complejo de nematodos noduladores (*Meloidogyne* spp.) que infectan a cultivos tropicales evaluados en la región Huetar Norte, Valle Occidental y Huetar Atlántica de Costa Rica.

Instituto Tecnológico de Costa Rica Sede San Carlos
Vicerrectoría de Investigación y Extensión

Centro de Investigación y Desarrollo de Agricultura Sostenible
del Trópico Húmedo (CIDASTH)

Informe Final de Investigación

1. Resumen

En este trabajo se realizó un diagnóstico morfológico y se evaluaron diferentes imprimadores con el fin de utilizar PCR-RFLPs como métodos de identificación de especies de *Meloidogyne* relacionadas a cultivos tropicales evaluados en la región Huetar Norte, Valle Occidental y Huetar Atlántica de Costa Rica. De los imprimadores utilizados, los D2A/D3B y C2F3/1108 aportaron la mayor cantidad de identificaciones a nivel de especie. Los productos de PCR obtenidos con los D2A/D3B fueron digeridos con cinco diferentes enzimas de restricción (*AluI*, *DraI*, *HinfI*, *SacI* y *KpnI*) mientras que los fragmentos obtenidos con C2F3/1108 solo se digirieron los productos de 1000 pb o más con *HinfI*; o los productos de 500 pb con *DraI*.

Se obtuvieron electrofenogramas a partir de las muestras digeridas que permitieron diferenciar las especies de *Meloidogyne* presentes en las muestras. De esta forma y mediante GPS se logró ubicar espacialmente las poblaciones por especie identificadas siendo *M. incognita* la que se encontró ampliamente distribuida y con mayor cantidad de hospederos, *M. javanica* y *M. arenaria* se encontraron con poca frecuencia y en zonas calientes, *M. hapla* fue ubicada en zonas frías, mientras que *M. exigua* se encontró asociada al café y *M. salasi* asociada al arroz.

La identificación por métodos moleculares fue más sensible en la detección y permitió identificar poblaciones a nivel de especie sin la presencia de hembras en la población, en este caso el análisis molecular permitió un diagnóstico más temprano.

Palabras clave: *Meloidogyne*, distribución, diagnóstico morfológico-molecular, PCR-RFLP.

Instituto Tecnológico de Costa Rica Sede San Carlos
Vicerrectoría de Investigación y Extensión

Centro de Investigación y Desarrollo de Agricultura Sostenible
del Trópico Húmedo (CIDASTH)

Informe Final de Investigación

1. Abstract

In this paper we conducted a morphological diagnosis and evaluated different primers to use PCR-RFLPs as method of identification for *Meloidogyne* species related to tropical crops in the Huetar Norte, Occidental Valley and Huetar Atlantic regions of Costa Rica. From the primers used, the D2A/D3B and C2F3/1108 provided the largest number of species identified. The PCR product obtained with the D2A/D3B were digested with five different restriction enzymes (*AluI*, *DraI*, *HinfI*, *SacI* and *KpnI*) while the PCR products obtained with C2F3/1108 only fragments from 1000 pb or more where digested with *HinfI*; or 500 pb fragments where digested with *DraI*.

Electrophenograms were obtained from the digested samples which allowed to differentiate from *Meloidogyne* species present in the samples. In this way, and using GPS, it was achieved spatially locate identification of the populations by species; being *M. incognita* the most widely distributed and largest number of hosts, *M. javanica* and *M. arenaria* met infrequently and in hot areas, *M. hapla* was located in cool areas, while *M. exigua* was found associated to coffee and *M. salasi* associated with rice.

Identification by molecular methods was more sensitive detection and identified populations at the level of species without the presence of females in the population, in this case the molecular analysis allowed an early diagnosis.

Key Words: *Meloidogyne*, distribution, morfological-molecular diagnosis, PCR-RFLP.

2. Introducción

Los nematodos fitopatógenos causan enfermedades de gran trascendencia en la producción agrícola por la magnitud de las pérdidas que ocasionan y la dificultad para combatirlos eficientemente (Luc *et al.* 2005). Los nematodos formadores de agallas son el grupo de parásitos de plantas de mayor importancia económica alrededor del mundo, y atacan a casi todos los cultivos. Su distribución a nivel mundial, su amplio rango de hospederos y su interacción con otros patógenos de plantas formando un complejo de enfermedades, los hace uno de los mayores grupos que afectan a la agricultura. Este grupo de nematodos, altamente exitoso, causa pérdidas estimadas en los cultivos del 5% aproximadamente a nivel mundial y es uno de los mayores obstáculos en la producción agrícola y adecuada suplencia de alimentos en los países en desarrollo (Hussey y Janssen 2002).

Cuatro especies de *Meloidogyne*: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla* representan un 95% de todas las infestaciones de nematodos formadores de agallas en tierras cultivadas; siendo *M. incognita* la especie de mayor importancia económica (Hussey y Janssen 2002). Existen otras especies dentro del género, como lo son *M. chitwoodi*, *M. fallax* (Trudgill y Blok 2001) y *M. mayaguensis* (Brito *et al.* 2004), considerados altamente destructivos y sujetos a cuarentena en diversos países. No obstante, en Costa Rica no existen registros en lo que respecta a pérdidas de rendimiento en los cultivos ocasionados por las especies de este género, las cuales se encuentran asociadas a una gran diversidad de plantas, afectando el rendimiento y la calidad de los productos (Flores 2008).

Para Costa Rica se han descrito hasta el momento siete especies de *Meloidogyne*: *M. incognita*, especie de mayor distribución geográfica y con mayor cantidad de hospederos; *M. javanica* y *M. arenaria*, encontradas en zonas calientes y con menor frecuencia; *M. hapla*, ubicada en zonas frías; *M. exigua* y *M. arabicida*, asociadas al cafeto; y *M. salasi*, distribuida en las zonas dedicadas al cultivo del arroz (Flores 2008). Algunos hospederos de *Meloidogyne* en el país son: melón (*Cucumis melo*), arroz (*Oryza sativa*), banano (*Musa spp.*), cafeto (*Coffea arabica*), cebolla (*Allium cepa*), tomate (*Solanum lycopersicum*), apio (*Apium graveolens*), chile (*Capsicum annuum*), chayote (*Sechium edule*), lechuga (*Lactuca sativa*), remolacha (*Beta vulgaris*), culantro (*Coriandrum sativum*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), arveja (*Pisum sativum*), zapallo (*Cucurbita sp.*), pepino (*Cucumis sativum*), ñame blanco (*Dioscorea alata*), fresa (*Fragaria spp.*), zanahoria (*Daucus carota*), papa (*Solanum tuberosum*), repollo (*Brassica oleracea*), maíz (*Zea mays*), guayaba (*Psidium guajava*), piña (*Ananas comosus*), mora (*Rubus sp.*), papaya (*Carica papaya*), mango (*Mangifera indica*), jengibre (*Zingiber spp.*) entre otros (Flores 2008).

En Costa Rica, la identificación de nematodos fitoparásitos, particularmente del género *Meloidogyne*, se ha realizado tradicionalmente sólo hasta nivel de género debido a las limitaciones en relación a la taxonomía tradicional y a la falta de personal capacitado para llevarla a cabo. Además, esta identificación es realizada sólo por unos pocos centros de investigación especializados, lo que dificulta la detección rápida y efectiva de estos patógenos a nivel nacional. El desarrollo de técnicas bioquímicas y moleculares ha venido a fortalecer las capacidades de diagnóstico de los distintos centros de investigación del país. Para ello, se caracterizarán molecularmente las poblaciones de *Meloidogyne* spp. detectadas mediante la

secuenciación de regiones conservadas del ADN ribosómico (18S, ITS, D2-D3) y mitocondrial (COI).

La complejidad de las enfermedades que afectan al sistema radical de la planta, junto con las dificultades de identificación específica de los nematodos fitoparásitos limita el control eficiente de estos y determinan que las acciones y medidas más adecuadas para ello requieran la aplicación de estrategias preventivas y de control integrado. Es por ello que la toma de decisiones debe estar basada en el diagnóstico rápido y específico de los nematodos que parasitan dichos cultivos mediante un abordaje holístico que combine las técnicas de taxonomía clásica con la utilización de nuevas tecnologías, incluyendo técnicas bioquímicas (análisis de isoenzimas) y genómicas, como lo son la secuenciación de genes conservados del ADN ribosómico (i.e. 28S, ITS, 18S) y marcadores moleculares especie-específicos, entre otros (Castillo *et al.* 2003).

Por ello, este proyecto buscó identificar morfológica y molecularmente las posibles especies del género *Meloidogyne* que afectan a los cultivos agrícolas de las regiones Huetar Norte, Valle Occidental y Región Atlántica en Costa Rica, así como de su distribución.

2.1. Objetivo General

Establecer un diagnóstico para nematodos noduladores del género *Meloidogyne* que infectan cultivos tropicales de Costa Rica mediante técnicas morfológicas y moleculares

2.2. Objetivos Específicos

Realizar un diagnóstico morfológico del complejo de nematodos noduladores (*Meloidogyne* spp.) que infectan a cultivos tropicales de las regiones Huetar Norte, Valle Occidental y Atlántica de Costa Rica.

Identificar molecularmente las poblaciones de *Meloidogyne* spp. detectadas mediante PCR-RFLP de regiones conservadas del ADN ribosómico (18S, ITS, D2-D3) y mitocondrial (COI).

3. Generalidades en la identificación del género *Meloidogyne*

A pesar de la presencia de varias especies del género *Meloidogyne* entre los nematodos que presentan serios problemas en el desarrollo y productividad de una gran variedad de cultivos en Costa Rica, lo cierto es que la información cuantificable de los daños que provocan prácticamente es inexistente (Ramírez-Moreno *et al.* 2001). Irónicamente, en el periodo 2000-2004, el país importó unas 4000 toneladas de nematicidas (ia), precisamente para combatir muchos de los problemas causados por nematodos en sistemas agrícolas de Costa Rica.

Los nematodos noduladores del género *Meloidogyne* comprenden más de 80 especies diferentes con un amplio rango de plantas huésped (más de 5.000 especies de plantas) y una distribución mundial, constituyen uno de los grupos de agentes fitopatógenos de mayor importancia económica en todo el mundo. Las especies del género *Meloidogyne* son morfológicamente muy similares y de amplia distribución a nivel global, lo que dificulta su identificación, incluso a especialistas en Nematología (Karszen y Moens 2006).

La correcta identificación de la/s especie/es de *Meloidogyne* que atacan un cultivo es esencial para establecer las estrategias de control apropiadas para ella/s. En la última década se ha incrementado el uso de análisis moleculares para la identificación de *Meloidogyne* spp. Estas técnicas son más rápidas y seguras que la identificación morfológica clásica basada en la morfología del patrón perineal (Eisenback y Triantaphyllou 1991). El análisis de los polimorfismos en las secuencias del ADN representa uno de los desarrollos en biología molecular que más han ayudado al diagnóstico específico de nematodos, incluyendo a especies de *Meloidogyne*. Una de las formas de detección de dichos polimorfismos es la digestión del ADN genómico con enzimas de restricción, lo que genera un conjunto de fragmentos de ADN cuyo tamaño y número vendrá determinado por la secuencia específica del genoma del organismo, dando lugar a los RFLPs ("Restriction Fragment Length Polymorphism") (Zheng *et al.* 2000).

La mayoría de los métodos de diagnóstico molecular desarrollados en la última década están basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que facilita el uso de pequeñas cantidades de material nematológico y evita el requerimiento de extremada pureza del ADN. Una de las variantes de la PCR, RAPD-PCR ("Random Amplified Polymorphic DNA-PCR") genera una clase específica de marcadores moleculares (RAPDs) que se han usado ampliamente en la identificación de numerosas especies y poblaciones de nematodos fitoparásitos incluyendo especies de *Meloidogyne* (Cenis 1993; Williamson *et al.* 1997; Zijlstra 2000 y Zijlstra *et al.* 2000). El problema que presenta el análisis RAPD es que la reproducibilidad entre experimentos es relativamente baja. Un prerrequisito para obtener patrones RAPDs reproducibles y fiables es el uso de cantidades iguales de ADN muestra en cada ensayo así como que el resto de condiciones de la reacción se mantengan invariables entre experimentos (Zijlstra 2000).

Más recientemente, elementos repetitivos del genoma, denominados ADN satélites (ADNsat) han sido aislados de nematodos fitoparásitos, y la secuencia de ADNsat ha mostrado ser especie-específica, no pudiéndose encontrar incluso en el genoma de especies próximas. Las secuencias de ADNsat han sido usadas con éxito en la separación de

Meloidogyne spp. (Castagnone-Sereno *et al.* 1994; Dautova *et al.* 2001). Finalmente, el uso de técnicas como los AFLPs ("Amplified Fragment Length Polymorphism"), ha posibilitado la realización de estudios más refinados basados en los polimorfismos de ADN. La aplicación de AFLs facilita la generación de un gran número de marcadores moleculares, lo que permite generar mapas genéticos de especies de nematodos de interés fitopatológico que sirven de base para estudios dirigidos al aislamiento y caracterización de genes tan importantes como los genes de resistencia o de virulencia. De hecho, esta tecnología ha permitido identificar mediante marcadores moleculares de los genes *Me* y *N* en pimiento, que confieren resistencia frente a *M. incognita*, *M. arenaria*, y *M. javanica* (Wang *et al.* 2001; Djian-Caporalino *et al.* 2007).

Actualmente, debido al abaratamiento de la secuenciación de fragmentos de ADN y la disponibilidad de un mayor número de laboratorios que ofrecen este servicio, se puede llegar a estudiar fragmentos de ADN altamente específicos para cada especie. En el caso de los nematodos fitoparásitos, las regiones del ADN más estudiadas han sido las del ADN ribosómico (ADNr), que es muy adecuado para estudios de diagnóstico. En la mayoría de los genomas de organismos eucariotas los genes del ADNr tienen una estructura típica que consiste en repeticiones en tándem de una unidad básica de transcripción, separadas por espacios no transcritos. Cada repetición contiene tres genes de ARN ribosómico: los genes 18S, 5,8S y 26S, con dos espacios internos transcritos (ITS, "Internal Transcribed Spacers") entre ellos (Powers, 2004).

Por otro lado, la tecnología de microarrays de ADN es una alternativa prometedora para el diagnóstico de especies de *Meloidogyne*, (aunque actualmente relativamente cara para un uso rutinario) ya que combina la amplificación de ADN con la hibridación de oligonucleótidos y se puede aplicar para múltiples secuencias. Con esta tecnología se pueden evaluar de cientos a miles de oligonucleótidos frente a secuencias específicas en un portaobjetos microscópico en el cual se ha marcado con fluorescencia el producto de PCR que va a ser probado y detectado. Esta tecnología se ha utilizado con éxito en la detección del nematodo de cuarentena para la UE, *M. chitwoodi* (Williamson *et al.* 1997).

No obstante a lo anterior, la caracterización morfológica sigue siendo aun esencial para la identificación de los nematodos fitoparásitos y en ocasiones, son también necesarios ensayos de patogenicidad sobre huéspedes diferenciales. Sin embargo, actualmente esta caracterización morfológica y patogénica se debe integrar con nuevas técnicas diagnóstico como el uso de marcadores isoenzimáticos en *Meloidogyne* (Castillo *et al.* 2003), o marcadores moleculares, como los RAPD, PCR-RFLP y la secuenciación (Landa *et al.* 2008; Castillo *et al.* 2009; Zijlstra 2000; Zijlstra *et al.* 2000). Por tanto, la identificación específica y patogénica rápida y correcta de los nematodos noduladores del género *Meloidogyne* que infectan un cultivo o un área agrícola, constituye un prerrequisito esencial para diseñar estrategias de control de dichos nematodos. Esto es particularmente relevante en estos nematodos donde encontramos especies crípticas (especies de morfología y morfometría muy similar; pero biológica y genéticamente diferenciables) (Anderson *et al.* 1998; Blouin 2002; Powers 2004).

4. Metodología

4.1. Ubicación del Estudio

La presente investigación fue realizada en conjunto entre el Laboratorio de Biotecnología de Plantas Tropicales, el Laboratorio de Nematología (ambos pertenecientes a la Escuela de Agronomía) y la colaboración del Laboratorio de Biología Molecular (de la Escuela de Ciencias y Letras) del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede Regional San Carlos.

4.2. Diagnóstico morfológico del complejo de nematodos noduladores (*Meloidogyne* spp.) que infectan a cultivos tropicales de la región de Huetar Norte, Valle Occidental y Huetar Atlántica de Costa Rica

Se realizaron muestreos en cultivos tropicales (tomate, arroz, cordelina, chile dulce, café, caña, piña, banano, plátano, china, ñampí, culantro coyote, papa china, tiquizque, maracuyá, jengibre, yuca, papaya y maíz) que tuvieran alguna evidencia de afectación por *Meloidogyne* spp. (síntomas, historial de afectación, susceptibilidad), esto con el fin de maximizar los muestreos y aumentar los datos de distribución de las especies de *Meloidogyne*.

Para el muestreo de las parcelas en cada cultivo, se definió un área homogénea en la parcela, en donde, por la sintomatología observada en las plantas, la posibilidad de detectar el nematodo de interés fuera mayor. En esta área se tomó una muestra de raíz compuesta por entre tres y diez submuestras, dependiendo del área de la parcela, tomadas de manera uniforme incluyendo toda el área definida y a una profundidad de 20 cm. Por ser *Meloidogyne* un género endoparásito, que realiza la mayor parte de su ciclo de vida en la raíz, solo se tomaron muestras de raíz. Los campos muestreados se referenciaron mediante sistemas de posicionamiento geográfico (GPS) para incorporar estos datos en los resultados obtenidos.

Las muestras fueron colocadas en bolsas debidamente identificadas y luego fueron trasladadas en cajas de aislamiento térmico al laboratorio de Nematología del Instituto Tecnológico de Costa Rica sede San Carlos, para su procesamiento. Una vez en el laboratorio, las muestras fueron procesadas. En primera instancia se revisaron las raíces para evaluar la presencia de agallas y posteriormente se procesó la muestra por el método de centrifugación-maceración descrito por Coolen (1979). En caso de que las raíces presentaran agallas se extrajeron hembras adultas de las mismas y se prepararon diseños perineales, los cuales, fueron fijados de forma temporal en placas con ácido láctico, fueron fotografiados y se identificó la población a nivel de especie mediante la caracterización morfológica clásica atendiendo a la morfología del patrón perineal (Jepson 1987). Otras fueron colocadas en viales con etanol 70% para posteriormente preparar muestras para realizar análisis moleculares.

Posteriormente, las raíces fueron homogenizadas y submuestras de 10 g de raíz, fueron procesadas por el método de centrifugación maceración para la extracción de los nematodos. Las raíces se cortaron en trozos pequeños y luego fueron maceradas en un licuadora por 10 segundos a velocidad baja y 5 segundos a velocidad alta; posteriormente, se decantó la solución en un juego de cribas superpuesto de 100 y 400 mallas, los residuos retenidos en la criba de 400 mallas fueron transferidos a tubos de centrifuga de 50 ml con la ayuda de una

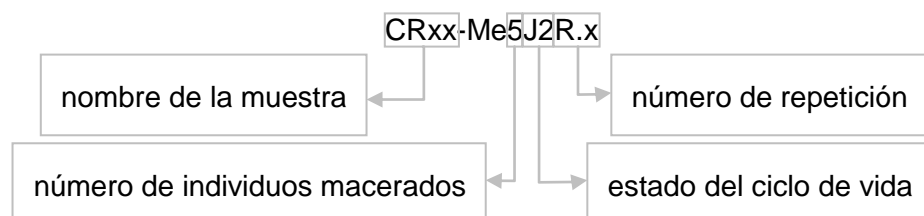
piseta y se procedió a centrifugar por cinco minutos, a 3000 r.p.m. Después de la centrifugación, se decantó cuidadosamente el sobrenadante, se mezcló el precipitado con solución azucarada (484 g/l) y se centrifugó a la misma velocidad por tres minutos. El sobrenadante conteniendo los nematodos se vertió sobre una criba de 400 mallas, y se lavó el exceso de azúcar con suficiente agua. Una vez enjuagada el azúcar se procedió a coleccionar los nematodos del tamiz haciendo un lavado con la ayuda de una piseta.

Cada muestra fue observada en el microscopio invertido para determinar la presencia de nematodos del género *Meloidogyne*, únicamente se continuó trabajando con aquellas muestras en las que se detectó este género, para cada una se determinó la abundancia de nematodos fitoparásitos, y se seleccionaron juveniles y machos adultos de *Meloidogyne* que se almacenaron en alcohol 70% o fueron procesados para los estudios posteriores de diagnóstico mediante la amplificación y análisis de RFLP de regiones conservadas del ADN ribosómico y mitocondrial.

4.3. Identificación molecular de las poblaciones de *Meloidogyne* spp. detectadas mediante la PCR-RFLP de regiones conservadas del ADN ribosómico y mitocondrial

Para identificar molecularmente las poblaciones de *Meloidogyne* detectadas, cinco juveniles o una hembra fueron macerados en 20 µl de buffer de lisis (265 mM Tris-HCl pH 8.8, 70 mM (NH₄)₂SO₄, 1,2 mM MgCl₂), sobre un portaobjetos estéril en el estereomicroscopio según el protocolo de Castillo y colaboradores (2003). El macerado fue introducido en un tubo ependorff de 0,2 ml, se le añadió 2 µl de proteinasa K (2,5 µg/µl). Se llevó a cabo un ciclo de tiempo y temperaturas: 15 min a -80 °C, 60 min a 65 °C y 10 min a 95°C. El ADN total extraído se almacenó a -20 °C hasta su posterior utilización (Castillo *et al.* 2003; Subbotin *et al.* 2005).

Para cada una de las muestras se preparó un número variable de repeticiones, dependiendo de la cantidad de material disponible y de los resultados obtenidos con los análisis morfológicos. Cada repetición se identificó de la siguiente manera:



Cada población de *Meloidogyne* se caracterizó mediante la amplificación de segmentos de varios genes, incluyendo la región D2-D3 del gen 28S, ITS1-5.8-ITS2, 18S, citocromo oxidasa II (COII) y 16S ARNr. Los fragmentos de ADN ribosómico y mitocondrial se amplificaron usando los iniciadores universales, que se detallan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Iniciadores de PCR utilizados para amplificar diferentes regiones del genoma de *Meloidogyne* (Santa Clara, San Carlos. 2011).

Iniciador	Secuencia (5'→3')	Gen amplificado	Referencia
Me1F	TAC GGA CTG AGA TAA TGG T	18S	Tigano <i>et al.</i> 2005
Me1R	GGT TCA AGC CAC TGC GA		
D2A	ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG	28S	Subbotin <i>et al.</i> 2005
D3B	TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA		
18S	TTG ATG ACG TCC CTG CCC TTT	ITS	Powers <i>et al.</i> 1997
26S	TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG		
C2F3	GGT CAA TGT TCA GAA ATT TGT GG	CO II y 16S ARNr	Powers y Harris, 1993
1108	TAC CTT TGA CCA ATC ACG CT		

El PCR se realizó en un termociclador Peltier Thermal Cycler (PTC-200), la reacción para los iniciadores, D2A/D3B y 18S/26S tuvo un volumen total de 50 µl conteniendo 0,15 µM de los iniciadores, 0,05 mM de dNTPs, 0,5 X Dream taq buffer® (Fermentas), 1 U de Taq Polimerasa (Dream Taq DNA polimerasa®, Fermentas) y 2 µl de ADN del nematodo. El perfil térmico utilizado constó de 94°C por cuatro minutos, 40 ciclos (a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por dos minutos), seguido de una extensión final de 72°C por cuatro minutos.

La reacción para los iniciadores Me1F/Me1R, tuvo un volumen total de 50 µl conteniendo 0,2 µM de los iniciadores, 0,4 mM de dNTPs, 1 X Dream taq buffer® (Fermentas), 1,25 U de Taq Polimerasa (Dream Taq DNA polimerasa®, Fermentas) y 2 µl de ADN del nematodo. El perfil térmico a utilizar constó de 94°C por siete minutos, 40 ciclos (94°C por un minuto, 50°C por un minuto y 72°C por un minuto), seguido de una extensión final de 72°C por 10 minutos.

La reacción para los iniciadores C2F3/1108 tuvo un volumen total de 25 µl conteniendo 0,8 µM de los iniciadores, 0,08 mM de dNTPs, 1 X Dream taq buffer® (Fermentas), 2 U de Taq Polimerasa (Dream Taq DNA polimerasa®, Fermentas) y 4 µl de ADN del nematodo. El perfil térmico a utilizar constó de 94°C por dos minutos, 10 ciclos (a 94°C por 10 segundos, 48°C por 30 segundos y 68°C por dos minutos), seguido de 25 ciclos (a 94°C por 10 segundos, 48°C por 30 segundos y 68°C por dos minutos aumentado 20 segundos en cada ciclo), y una extensión final de 72°C por dos minutos.

El producto de amplificación se separó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,8% (p/v) en TAE 1X (40 mM Tris acetato y 1 mM EDTA), teñidos con bromuro de etidio (0,1 mg/ml); la electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 45 minutos.

Los productos de PCR obtenidos se digirieron con las enzimas de restricción que se detallan en el Cuadro 2 en forma independiente y según el tamaño inicial del producto. Para los productos de los iniciadores D2A/D3B, Me1F/Me1R y 18S/26S se realizó digestión con todas las enzimas individualmente, mientras que para los productos del iniciador C2F3/1108 se digirieron los productos de 1000 pb o más con *Hinf*I; o los productos de 500 pb con *Dra*I (Powers *et al.* 2005).

Cuadro 2. Enzimas de restricción utilizadas para la digestión de los productos de PCR (Santa Clara, San Carlos. 2011).

Enzima	Sitio de corte (5'→3')
<i>Alu</i> I	AG ↓ CT
<i>Dra</i> I	TTT ↓ AAA
<i>Hinf</i> I	G ↓ ANTC
<i>Sac</i> I	GAGCT ↓ C
<i>Kpn</i> I	GGTAC ↓ C

Para realizar la digestión de los productos se prepararon 20 µl de mezcla enzimática conteniendo 1X de buffer de la enzima, 2,5 U de la enzima y 5 µl de producto de PCR. La digestión se realizó a 37°C por 10 horas. Los productos digeridos fueron analizados mediante un Sistema de Electroforesis Automatizada de Microchip, MultiNA MCE-202 (Shimadzu®, Kioto Japón). Para dicho fin, las muestras fueron colocadas en el equipo y mezcladas en el microchip con el buffer de separación, la solución de marcado (Shimadzu® DNA-1000 kit 292-27911-91) y una dilución 1/100 (en buffer TE) de SYBR® Gold.

Debido a las condiciones en las que fue aprobado el proyecto (ver Documento II) no fue posible realizar la secuenciación de los productos de PCR obtenidos, por esta razón no se realizaron análisis de variación genética ni análisis filogenéticos.

5. Resultados y Discusión

5.1. Diagnóstico morfológico del complejo de nematodos noduladores (*Meloidogyne* spp.) que infectan a cultivos tropicales de la región de Huetar Norte, Valle Occidental y Huetar Atlántica de Costa Rica

En el Cuadro 3 se detallaron los muestreos realizados, se realizó muestreo nematológico de parcelas con diferentes cultivos tropicales en siete fechas diferentes durante el año 2011: 22 febrero, 17 de mayo, 30 de agosto, 6, 21 y 27 de setiembre y 11 de octubre, en las cuáles se colectaron un total de 34 muestras. Los muestreos se efectuaron en la Región Huetar Norte (Fortuna, La Tigra, Aguas Zarcas, Ciudad Quesada), en la zona cafetalera del Valle Occidental (Naranjo, Palmares, San Ramón) y en la Región Huetar Atlántica (Matina y Batán). En la Figura 1 se muestra el mapa indicando los sitios de toma de muestras. Una vez procesadas las muestras, se detectaron nematodos del género *Meloidogyne* en 14 de éstas, las estimaciones de su abundancia se muestran a en el Cuadro 4.

Cuadro 3. Muestras de raíces para análisis nematológico colectadas durante la realización del proyecto (Santa Clara, San Carlos. 2011).

Muestra	Fecha de Colecta (2011)	Localidad	Altura (msnm)	Coordenadas geográficas		Cultivo	Nombre común
				Latitud Norte	Longitud Oeste		
CR01	22-feb	El Futuro de la Tigra	205	10°21,620'	84°33,086'	<i>Cordelina sp.</i>	cordelina
CR02	22-feb	San Vicente, C.Q.	1392	10°16,820'	84°23,972'	<i>Capsicum annum</i>	chile dulce
CR03	22-feb	Piedades Sur, San Ramón	974	10°06,861'	84°31,943'	<i>Coffea arabica</i>	café
CR04	22-feb	Piedades Sur, San Ramón	1001	10°06,750'	84°31,918'	<i>Saccharum officinarum</i>	caña
CR05	17-may	Naranjo	1220	10°07,225'	84°24,845'	<i>Coffea arabica</i>	Café
CR06	17-may	Naranjo	1278	10°07,468'	84°24,963'	<i>Coffea arabica</i>	Café
CR07	17-may	Palmares	1060	10°04,968'	84°26,152'	<i>Coffea arabica</i>	Café
CR08	30-ago	Cerro Cortéz, Aguas Zarcas	125	10°26,973'	84°22,397'	<i>Ananas comosus</i>	piña
CR09	30-ago	Cerro Cortéz, Aguas Zarcas	118	10°26,960'	84°22,363'	<i>Musa AAA</i>	banano
CR10	30-ago	Cerro Cortéz, Aguas Zarcas	115	10°27,582'	84°22,796'	<i>Oryza sativa</i>	arroz
CR11	30-ago	Cerro Cortéz, Aguas Zarcas	98	10°27,444'	84°23,090'	<i>Musa AAB</i>	plátano
CR12	6-sep	San Miguel, Naranjo	1028	10°04,702'	84°24,033'	<i>Lycopersicum esculentum</i>	tomate
CR13	6-sep	San Miguel, Naranjo	1019	10°04,682'	84°24,019'	<i>Coffea arabica</i>	café
CR14	6-sep	San Jerónimo, Naranjo	940	10°05,693'	84°22,259'	<i>Coffea arabica</i>	café
CR15	6-sep	San Jerónimo, Naranjo	936	10°05,681'	84°22,262'	<i>Lycopersicum esculentum</i>	tomate
CR16	6-sep	San Vicente, C.Q.	1383	10°16,701'	84°23,663'	<i>Impatiens sp</i>	china
CR17	21-sep	Agua Azul de la Fortuna	169	10°29,663'	84°36,729'	<i>Colocasia esculenta</i>	ñampí
CR18	21-sep	El Futuro de La Tigra	217	10°22,136'	84°33,817'	<i>Eryngium foetidum</i>	culantro coyote
CR19	21-sep	Agua Azul de la Fortuna	161	10°29,776'	84°36,681'	<i>Colocasia esculenta</i>	papa china
CR20	21-sep	Agua Azul de la Fortuna	168	10°29,596'	84°36,699'	<i>Xanthosoma saggitifolium</i>	tiquizque
CR21	21-sep	Agua Azul de la Fortuna	168	10°29,576'	84°36,440'	<i>Passiflora edulis</i>	maracuyá

CR22	21-sep	La Perla de la Fortuna	90	10°27,591'	84°31,525'	<i>Oryza sativa</i>	arroz
CR23	27-sep	El Tanque de la Fortuna	119	10°29,363'	84°35,275'	<i>Zingiber officinale</i>	jengibre
CR24	27-sep	El Tanque de la Fortuna	116	10°29,394'	84°35,235'	<i>Manihot esculenta</i>	yuca
CR25	27-sep	El Tanque de la Fortuna	120	10°29,194'	84°35,344'	<i>Musa AAB</i>	plátano
CR26	27-sep	El Tanque de la Fortuna	121	10°29,129'	84°35,289'	<i>Carica papaya</i>	papaya
CR27	27-sep	El Bosque de la Fortuna	144	10°26,790'	84°36,790'	<i>Colocasia esculenta</i>	ñampí
CR28	27-sep	El Bosque de la Fortuna	141	10°26,828'	84°36,585'	<i>Colocasia esculenta</i>	ñampí
CR29	27-sep	Santa Clara de San Carlos	188	10°22,060'	84°30,812'	<i>Zea mays</i>	maíz
CR30	11-oct	San Miguel de Matina	45	10°03,679'	83°22,128'	<i>Oryza sativa</i>	arroz
CR31	11-oct	San Miguel de Matina	27	10°01,943'	83°20,334'	<i>Oryza sativa</i>	arroz
CR32	11-oct	Sahara de Batán	27	10°09,100'	83°21,854'	<i>Oryza sativa</i>	arroz
CR33	11-oct	San Miguel de Matina	67	10°02,371'	83°20,738'	<i>Oryza sativa</i>	arroz
CR34	11-oct	San Miguel de Matina	40	10°01,618'	83°19,768'	<i>Oryza sativa</i>	arroz

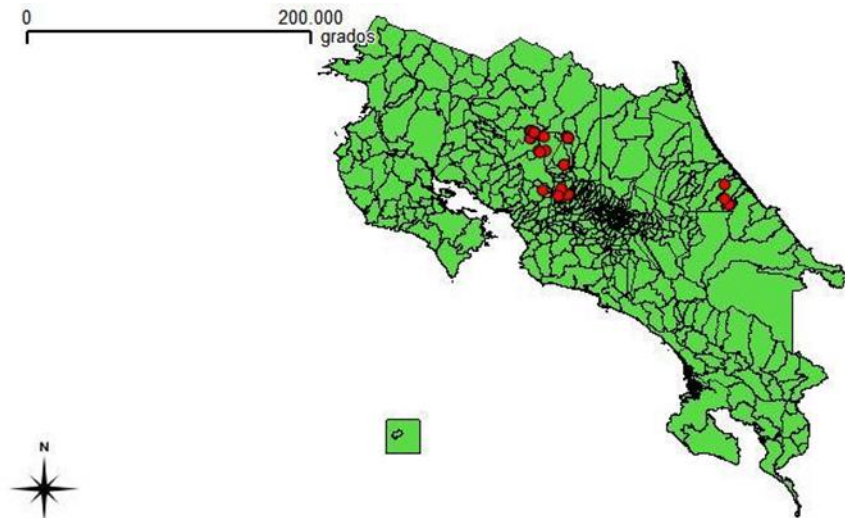


Figura 1. Áreas de toma de muestras de raíces para detección de *Meloidogyne* (Santa Clara, San Carlos. 2011), se indican en color rojo.

Cuadro 4. Abundancia estimada de nematodos fitoparásitos y de vida libre en 10 g de raíces, de muestras de cultivos tropicales (Santa Clara, San Carlos. 2011).

Muestra	Cultivo	Nematodos en 10 g de raíz			
		Nematodos de vida libre	<i>Meloidogyne</i>	<i>Pratylenchus</i>	<i>Helicotylenchus</i>
CR01	Cordelina	88	214	2	10
CR02	Chile dulce	180	184	8	-
CR05	Café	204	418	77	-
CR06	Café	160	1172	75	-
CR07	Café	51	1095	170	-
CR12	Tomate	30	39	33	357
CR13	Café	162	6228	-	-
CR14	Café	60	552	20	-
CR17	Ñampí	41	686	2	-
CR18	Culantro coyote	10	34	-	-
CR23	Jengibre	33	16	-	1
CR30	Arroz	238	1814	1350	-
CR31	Arroz	183	4867	167	-
CR32	Arroz	90	2815	450	90

Los datos de abundancia obtenidos, con poblaciones sobre los 150 individuos/10 g de raíz, evidencian la susceptibilidad de los cultivos muestreados a *Meloidogyne*, aunque en los cultivos de culantro coyote, jengibre y tomate la densidad estimada no sobrepasó los 50 individuos/10 g de raíz, en éstos las raíces presentaban un fuerte agallamiento y necrosis de las raíces. Esto se debe a que las poblaciones de nematodos fitoparásitos fluctúan dependiendo de la capacidad de carga de la plantación, misma que depende del total de biomasa radical en el campo, y de la competencia interespecífica por los sitios de alimentación, la población de nematodos fluctúa porque su población agota la biomasa radical, provocando escasez de sitios de alimentación (García *et al.* 2005).

La identificación de las especies de *Meloidogyne* detectadas en las muestras se realizó inicialmente por el análisis de diseños perineales, en la Figura 2 se muestran algunos de los diseños perineales realizados, el patrón perineal de *Meloidogyne incognita* se caracteriza por su arco dorsal alto (Figura 2A), el patrón perineal de *Meloidogyne exigua* se caracteriza por estriaciones transversales en la región latero anal (Figura 2B) y el patrón de *Meloidogyne arenaria* (Figura 2C) se caracteriza las líneas laterales muy marcadas.

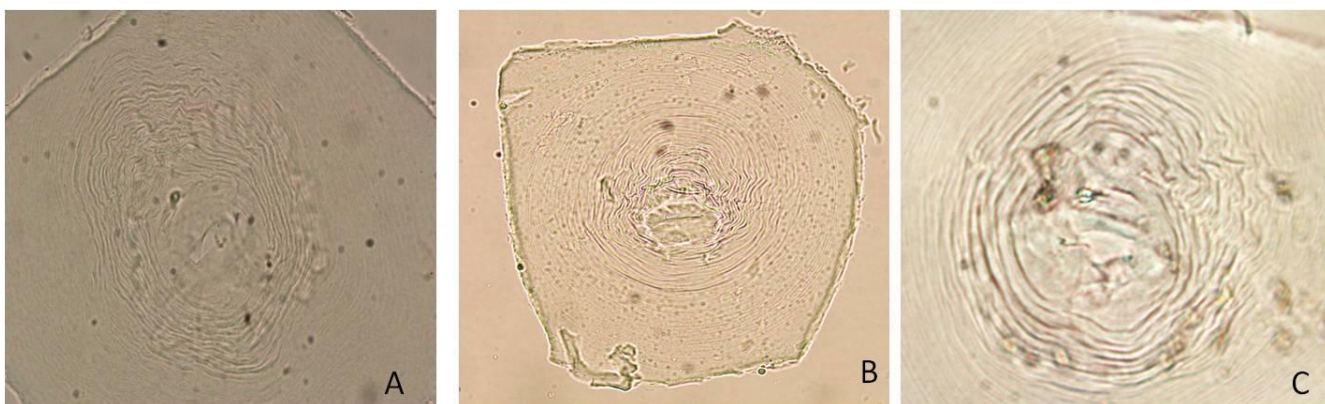


Figura 2. Fotomicrografías de diseños perineales de hembras de *Meloidogyne* spp detectadas en las muestras de diferentes cultivos (A. *Meloidogyne incognita*, muestra CR01; B. *Meloidogyne exigua*, muestra CR05; C. *Meloidogyne arenaria*, muestra CR17. Santa Clara, San Carlos. 2011).

No fue posible realizar cortes perineales para todas las poblaciones estudiadas, esto porque en varias de las muestras únicamente se encontraron juveniles y huevos. Para realizar la identificación por medio de diseños perineales es necesario que el grado de infección haya alcanzado el punto de formación de agallas.

Los diseños perineales permitieron la identificación a nivel de especie, sin embargo, para interpretar algunos de los patrones fue necesario consultar con nematólogos de más experiencia, y aun así, algunos de los diseños no pudieron ser identificados. Por las razones expuestas, la taxonomía actual se debe complementar con estudios moleculares, por un lado existen variaciones morfológicas intraespecíficas (Xu *et al.* 2004), y por el otro especies diferentes pueden presentar diseños muy parecidos como en el caso de *M. mayaguensis* y *M. incognita* (Brito *et al.* 2004).

5.2. Identificación molecular de las poblaciones de *Meloidogyne* spp. detectadas mediante la PCR-RFLP de regiones conservadas del ADN ribosómico y mitocondrial

En el Cuadro 5 se detalla el número de repeticiones preparadas por muestra y los iniciadores ensayados para la identificación de las especies de *Meloidogyne* por métodos moleculares. Después de analizar las primeras repeticiones mediante PCR – RFLP se determinó que los iniciadores 18S/26S y Me1F/Me1R no son suficientemente eficientes para la identificación de especies de *Meloidogyne* a nivel molecular. Esto debido a que se obtuvieron pocos productos de PCR y estos no fueron muy útiles en la identificación de especies debido a los pocos puntos de corte que presentan para el análisis por RFLPs. Los productos de PCR obtenidos con tales iniciadores (18S/26S y Me1F/Me1R) no tienen en su secuencia suficientes puntos de corte con las enzimas de restricción utilizadas, por lo que la caracterización de las diferentes especies se dificulta. Por esta razón los iniciadores mencionados no se utilizaron para analizar las demás muestras.

La eficiencia de los iniciadores utilizados se muestra en el Cuadro 6, para las repeticiones preparadas por cada muestra, se ensayó un total de 201 reacciones, de las cuales la mayor parte fueron con los iniciadores D2A/D3B (75 reacciones); no obstante, con estos imprimadores solo se obtuvieron 25 productos de PCR. De estos se lograron identificar como especies de *Meloidogyne* 9 fragmentos, los restantes no pudieron ser procesados debido a la baja concentración de ADN obtenida. Para los iniciadores C2F3/1108, se realizaron un total de 59 reacciones, de las cuales 43 generaron productos de PCR. La mayor parte de las identificaciones se realizó con estos últimos iniciadores (un total de 30), esto porque para estos iniciadores ya existe un protocolo de identificación de especies de *Meloidogyne* mediante PCR-RFLP desarrollado por Powers y colaboradores (1993). Con los otros imprimadores no se obtuvieron suficientes productos de PCR para realizar identificaciones.

Cuadro 5. Número de repeticiones (muestras de ADN) preparadas por cada muestra e iniciadores ensayados en cada una durante el análisis de las mismas mediante PCR – RFLP (Santa Clara, San Carlos. 2011).

Muestra	Repeticiones	Cultivo	Iniciadores ensayados
CR01	10	cordelina	18S/26S, Me1F/Me1R, C2F3/1108, D2A/D3B
CR02	8	chile dulce	18S/26S, Me1F/Me1R, C2F3/1108, D2A/D3B
CR05	10	Café	18S/26S, Me1F/Me1R, C2F3/1108, D2A/D3B
CR06	9	Café	18S/26S, Me1F/Me1R, C2F3/1108, D2A/D3B
CR07	10	Café	18S/26S, Me1F/Me1R, C2F3/1108, D2A/D3B
CR12	6	tomate	D2A/D3B y C2F3/1108
CR13	6	café	D2A/D3B y C2F3/1108
CR14	6	café	D2A/D3B y C2F3/1108
CR17	6	ñampí	D2A/D3B y C2F3/1108
CR18	6	culantro coyote	D2A/D3B y C2F3/1108
CR23	6	jengibre	D2A/D3B y C2F3/1108
CR30	7	arroz	18S/26S, C2F3/1108, D2A/D3B
CR31	5	arroz	18S/26S, C2F3/1108, D2A/D3B
CR32	3	arroz	18S/26S, C2F3/1108, D2A/D3B

Cuadro 6. Número de reacciones ensayadas, productos de PCR obtenidos e identificaciones logradas, para cada uno de los iniciadores de PCR utilizados en la investigación (Santa Clara, San Carlos. 2011).

	Iniciadores				Total
	18S/26S	D2A/D3B	Me1F/Me1R	C2F3/1108	
Reacciones ensayadas	45	75	22	59	201
Productos de PCR obtenidos	1	25	1	43	70
Repeticiones identificadas	0	9	0	30	39

A partir de los productos de PCR obtenidos con los imprimadores D2A/D3B y C2F3/1108 se procedió a realizar un análisis e identificación molecular según el tamaño en pares de bases (pb) y la digestión obtenida a partir de los fragmentos amplificados. Las Figuras 3 y 4 muestran el tamaño de las bandas obtenidas con ambos iniciadores. En el caso de las muestras amplificadas con los imprimadores D2A/D3B se obtuvo en todos los casos fragmentos de aproximadamente 800 pb, mientras que con el C2F3/1108 se obtuvo fragmentos de 1500, 1000 o 500 pb dependiendo de la especie presente. Para este último par de imprimadores, *M. incognita* y *M. javanica* presentaron fragmentos de 1500 pb, *M. arenaria* presentó un tamaño de 1000 pb, *M. exigua*, *M. salasi* y *M. hapla* presentaron fragmentos de 500 pb. En relación con los tamaños de las bandas obtenidos, los resultados coincidieron con los reportados por Powers y Harris (1993); así como por Flores (2008).

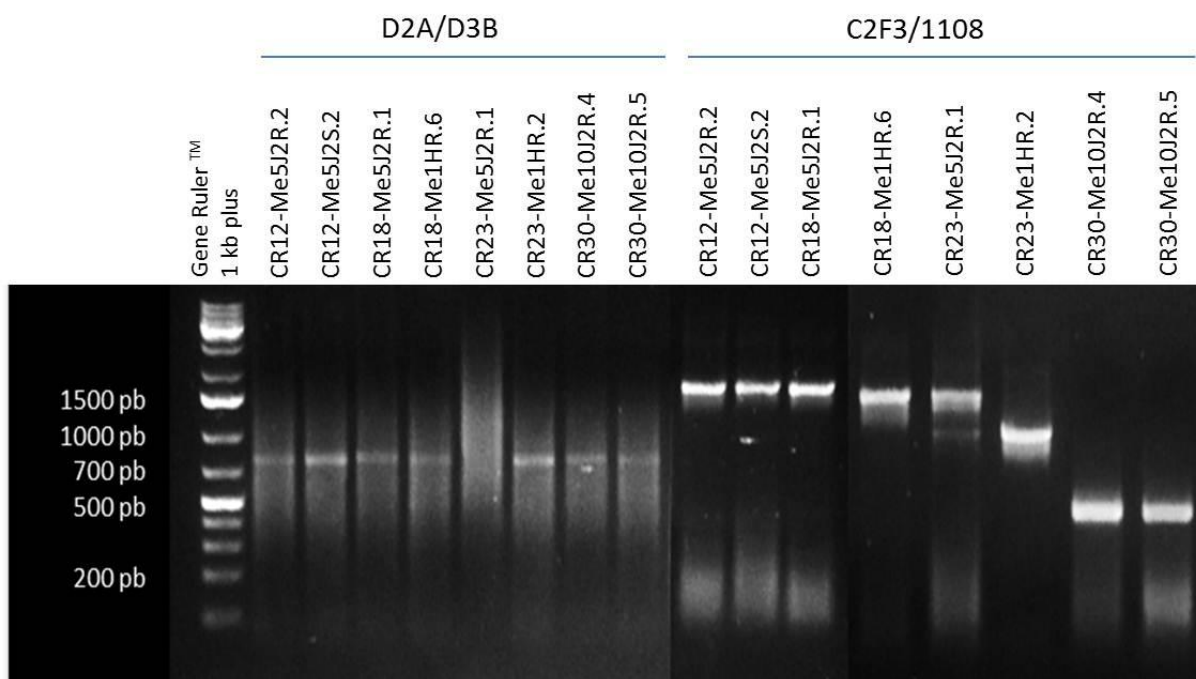


Figura 3. Productos de amplificación obtenidos de diferentes muestras analizadas con los imprimadores D2A/D3B y C2F3/1108 (Santa Clara, San Carlos. 2011).

En algunos caso se obtuvo doble bandaje en una única muestra (Figura 4), evidenciando una mezcla de especies en un único hospedero, por ejemplo en las muestras CR13-Me5J2R.1 y CR13-Me5J2R.2 se observan dos bandas correspondientes a *M. incognita* (1500 pb) y *M. hapla* (500 pb). En la muestra CR17-Me5J2R.2 se observa una banda de 1000 pb (correspondiente a *M. arenaria*) en una de las repeticiones, mientras que en la otra CR17-Me5J2R.1 se observa una banda de 1500 pb, correspondiente a *M. javanica*.

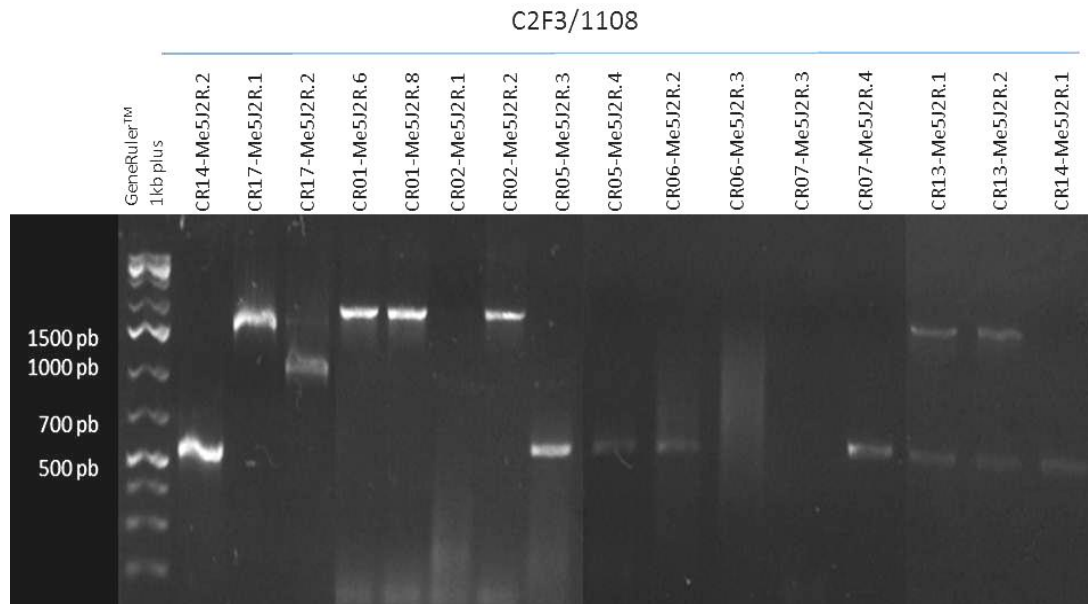


Figura 4. Algunos productos de amplificación obtenidos de diferentes muestras analizadas con los imprimadores C2F3/1108 (Santa Clara, San Carlos. 2011).

Los productos de PCR obtenidos con los iniciadores D2A/D3B (todos de 800 pb aproximadamente) fueron digeridos con las enzimas de restricción *AluI*, *DraI*, *HinfI*, *SacI* y *KpnI*. Los patrones de digestión obtenidos se muestran en las Figuras 5 a 8. Los productos de las digestiones con estas cinco enzimas de digestión permitieron identificar las especies *M. incognita*, *M. exigua* y *M. hapla* a partir de los mapas de restricción característicos según secuencias reportadas con los mismos imprimadores en el GeneBank para estas especies (ver Figura 1A, Anexo).

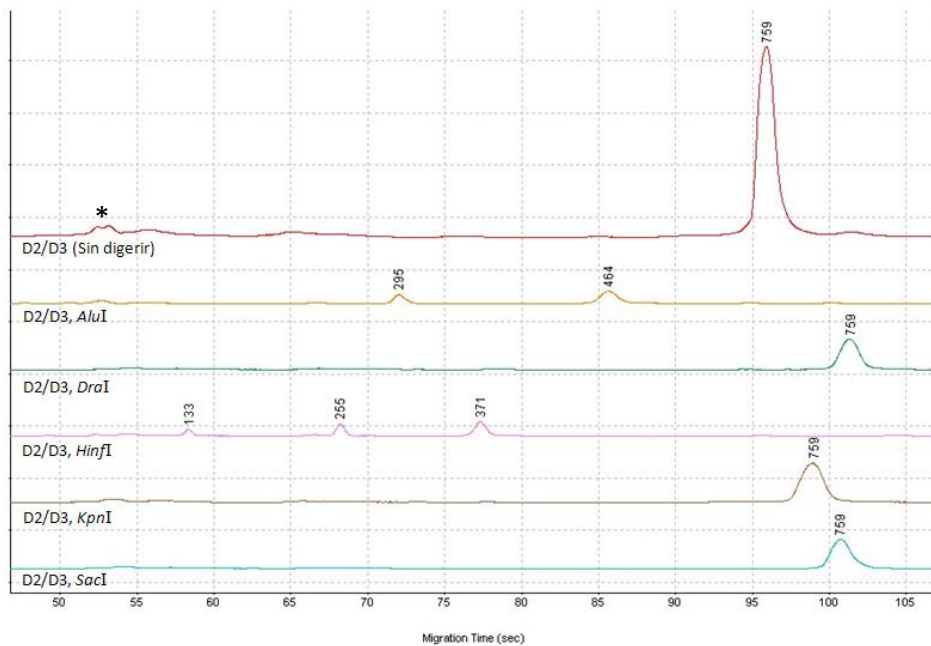


Figura 5. Electrofenograma de la digestión de *Meloidogyne incognita* con cinco diferentes enzimas de restricción (*AluI*, *DraI*, *HinfI*, *KpnI*, *SacI*) para los iniciadores D2A/D3B (peso molecular en pb, * indica la presencia de dímeros. Santa Clara, San Carlos. 2011).

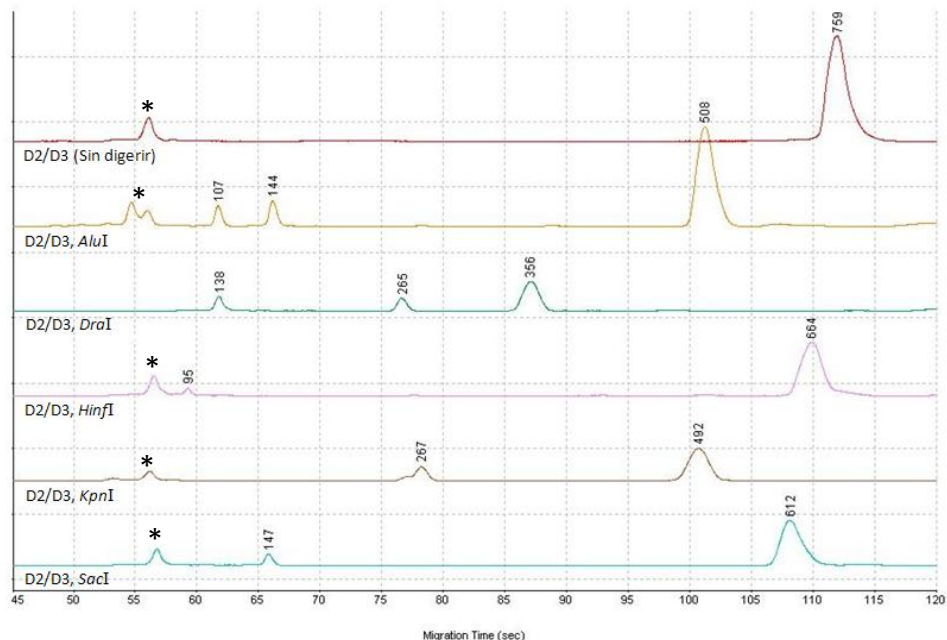


Figura 6. Electrofenograma de la digestión de *Meloidogyne exigua* con cinco diferentes enzimas de restricción (*AluI*, *DraI*, *HinfI*, *KpnI*, *SacI*) para los iniciadores D2A/D3B (peso molecular en pb, * indica la presencia de dímeros. Santa Clara, San Carlos. 2011).

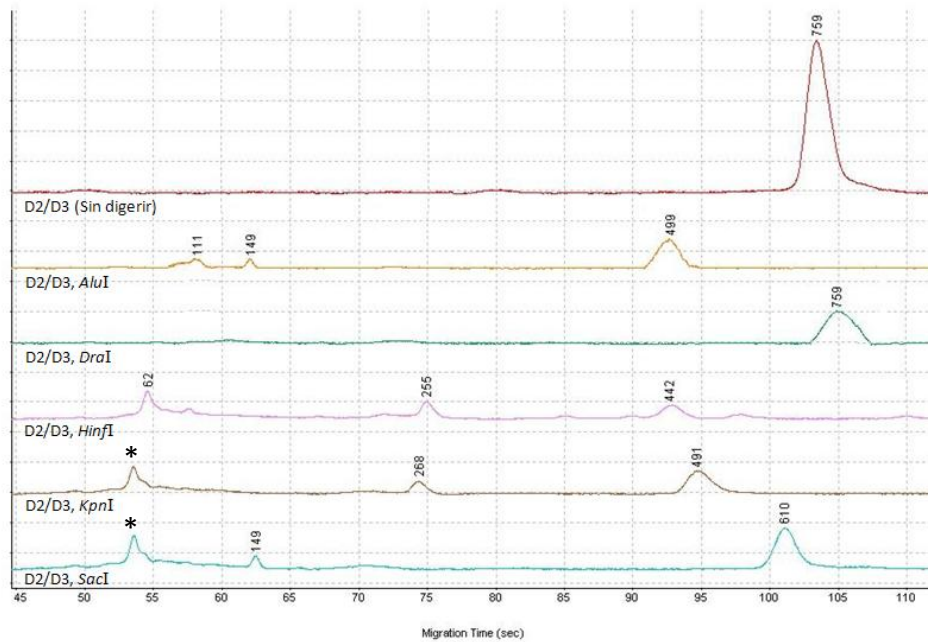


Figura 7. Electrofenograma de la digestión de *Meloidogyne hapla* con cinco diferentes enzimas de restricción (*AluI*, *DraI*, *HinfI*, *KpnI*, *SacI*) para los iniciadores D2A/D3B (peso molecular en pb, * indica la presencia de dímeros. Santa Clara, San Carlos. 2011).

La especie determinada en arroz (*Meloidogyne salasi*, según los iniciadores C2F3/1108) presentó un mapa de bandas distinto al de otras especies identificadas, mostrando bandas de aproximadamente 500 pb para *AluI*, 460 y 300 pb para *DraI*, 400 y 250 pb para *HinfI*, 500 y 260 pb para *KpnI*, 600 y 150 pb para *SacI* (Figura 8). Este patrón de bandas no coincidió con ninguno de los patrones de las especies reportadas para Costa Rica que presenten al menos una secuencia en el GeneBank. Esto se debe a que no existe ninguna secuencia de *Meloidogyne salasi* reportada en el Gene Bank, la identificación de esta especie se logró mediante la digestión del producto obtenido con los iniciadores C2F3/1108 con la enzima *DraI* (Figura 9) y comparando los resultados con los obtenidos por Flores (2008).

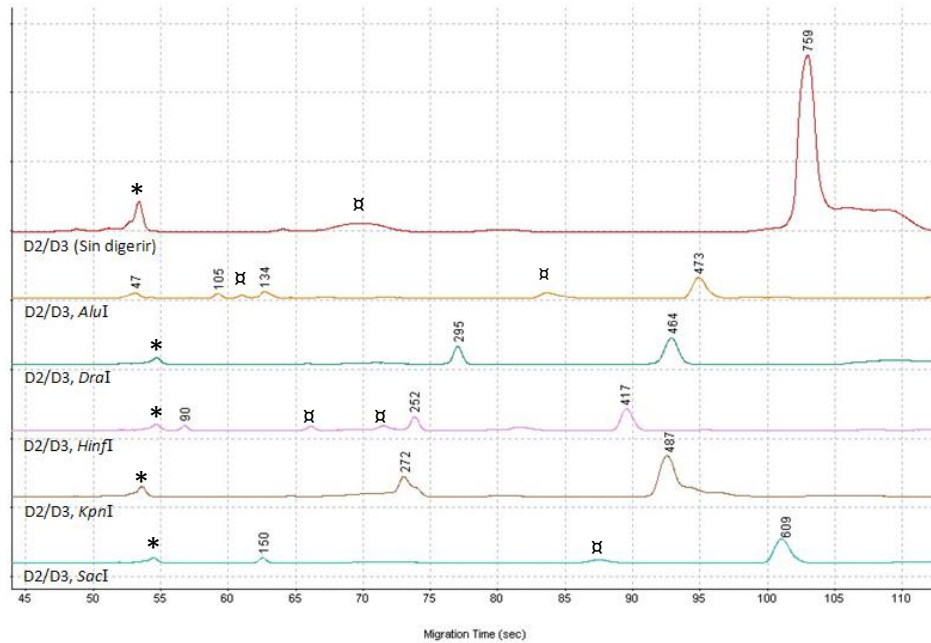


Figura 8. Electrofenograma de la digestión de *Meloidogyne salasi* con cinco diferentes enzimas de restricción (*AluI*, *DraI*, *HinfI*, *KpnI*, *SacI*) para los iniciadores D2A/D3B (peso molecular en pb, * indica la presencia de dimeros, α indica la presencia de impurezas en el chip. Santa Clara, San Carlos. 2011).

Para la identificación de *Meloidogyne salasi*, el mapa de restricción obtenido con la enzima *DraI* fue comparado con el reportado por Flores (2008). Para ambos resultados las bandas de 50, 150 y 300 pb fueron características para esta especie (Figura 9).

En el caso de los patrones obtenidos con la digestión de los productos de los iniciadores C2F3/1108, se compararon con la información publicada por Flores (2008) y Powers y Harris (1993). La Figura 10 muestra el patrón de restricción obtenido con la enzima *HinfI*, de un producto de PCR de 1500 pb, que consiste en dos bandas de 1150 y 350 pb, característico de *Meloidogyne incognita*. El tamaño del fragmento obtenido después de la amplificación de ADN de *M. javanica* con los iniciadores C2F3/1108 también es de 1500 pb, sin embargo este fragmento no presenta un sitio de corte para la enzima *HinfI*, permitiendo diferenciar esta especie de *M. incognita* (Flores, 2008).

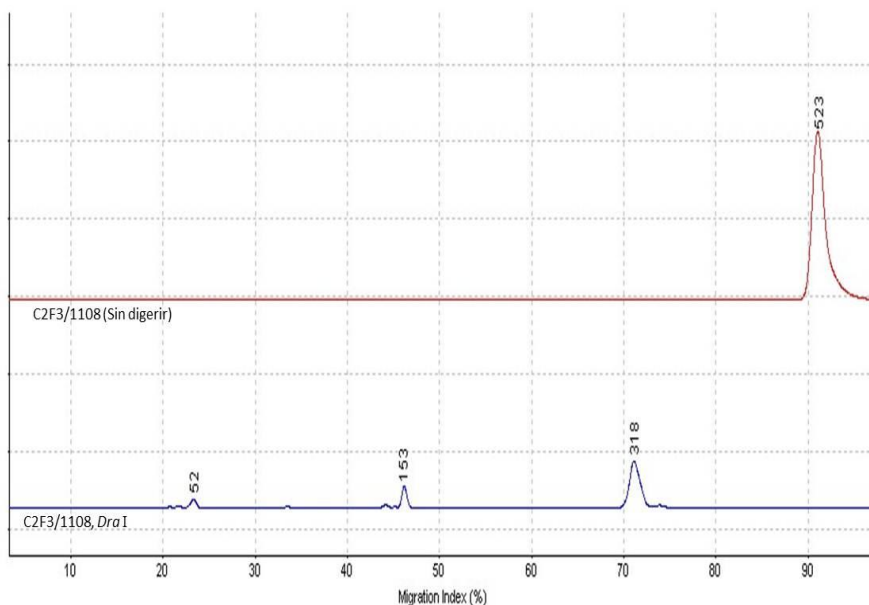


Figura 9. Electrofenograma de la digestión de *Meloidogyne salasi* con *DraI* para los iniciadores C2F3/1108 (peso molecular en pb. Santa Clara, San Carlos. 2011).

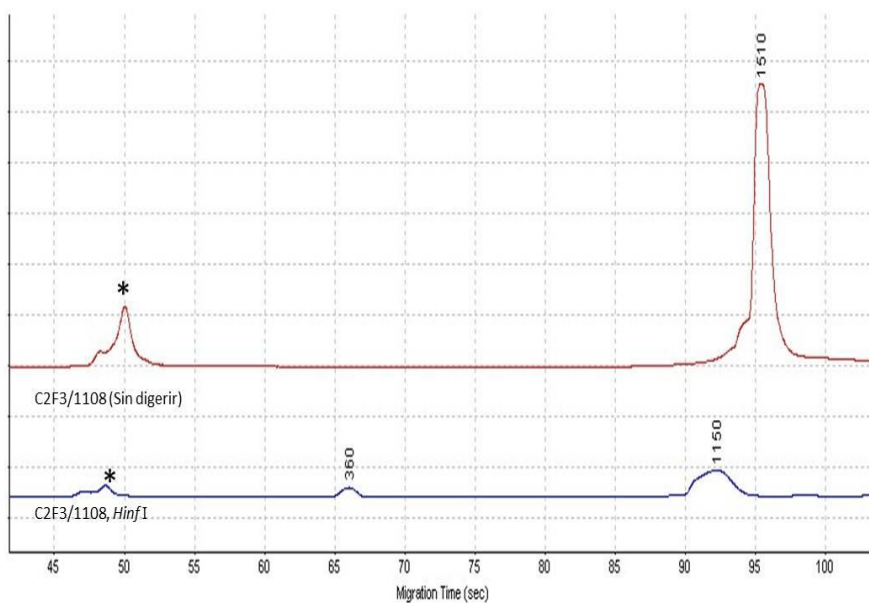


Figura 10. Electrofenograma de la digestión de *Meloidogyne incognita* con *HinfI* para los iniciadores C2F3/1108 (peso molecular en pb, * indica la presencia de dímeros. Santa Clara, San Carlos. 2011).

Los productos de amplificación obtenidos cuyo tamaño fue de 500 pb fueron digeridos con *Dra*I, según Powers y Harris (1993). Para *Meloidogyne exigua* se obtuvieron bandas de 75, 79, 113, 122 y 135 pb (Figura 11) y en el caso de *Meloidogyne hapla* se obtuvo dos bandas de 200 y 250 pb (Figura 12). Es importante aclarar que en el caso de *Meloidogyne exigua* las bandas de 75 y 79 pb y también las de 113 y 122 pb por su sercanía podrían observar como una sola banda en un gel de agarosa; lo que justificaría la diferencia observadas con el patrón de bandas reportado por Flores en el 2008 (solo tres bandas de 75, 100 y 150 pb aproximadamente y cuya suma no alcanza los 500 pb reportadas para el fragmento original).

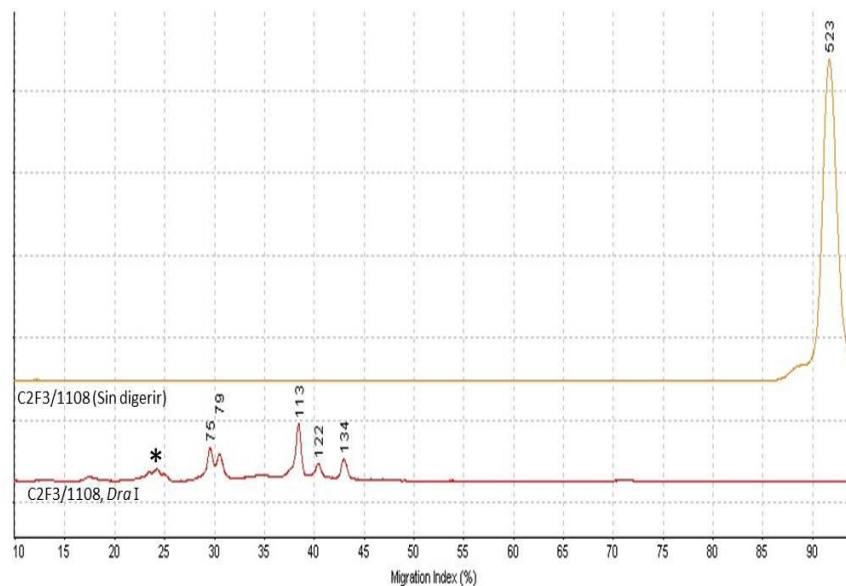


Figura 11. Electrofenograma de la digestión de *Meloidogyne exigua* con *Dra*I para los iniciadores C2F3/1108 (peso molecular en pb, * indica la presencia de dímeros. Santa Clara, San Carlos. 2011).

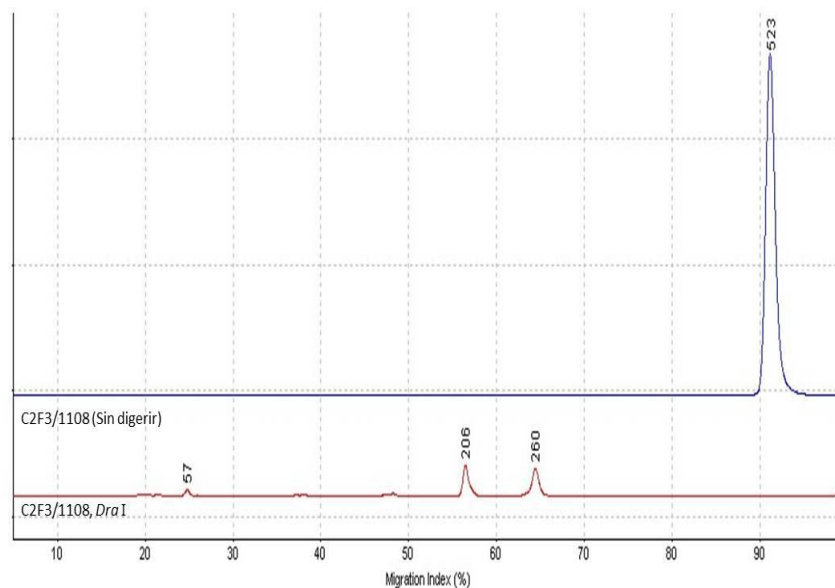


Figura 12. Electrofenograma de la digestión de *Meloidogyne hapla* con *Dra*I para los iniciadores C2F3/1108 (peso molecular en pb. Santa Clara, San Carlos. 2011).

Basados en los análisis de diseños perineales, y los patrones de digestión obtenidos se identificó a nivel de especie las poblaciones de *Meloidogyne* asociadas a los diferentes hospederos muestreados (Cuadro 7).

Cuadro 7. Especies de *Meloidogyne* presentes en cada una de las muestra, identificadas mediante análisis del diseño perineal de hembras adultas en la población y mediante el patrón de digestión obtenido por PCR – RFLP (Santa Clara, San Carlos. 2011).

Muestra	Repetición	Cultivo	Iniciadores con los que se realizó la identificación	Especie identificada según patrón de digestión	Especie identificada según diseño perineal
CR01	CR01-Me3J3R.2	Cordelinea	C2F3/1108	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
	CR01-Me5J2R.5		C2F3/1108	<i>M. incognita</i>	
	CR01-Me5J2R.6		C2F3/1108	<i>M. incognita</i>	
	CR01-Me5J2R.7		C2F3/1108	<i>M. incognita</i>	
	CR01-Me5J2R.8		C2F3/1108	<i>M. incognita</i>	
	CR01-Me2J3R.10		C2F3/1108	<i>M. incognita</i>	
CR02	CR02-Me5J2R.2	Chile dulce	C2F3/1108	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
	CR02-Me5J2R.3		C2F3/1108 y D2A/D3B	<i>M. incognita</i> y <i>M. hapla</i>	
	CR02-Me5J2R.4		C2F3/1108	<i>M. incognita</i>	
CR05	CR05-Me5J2R.1	Café	D2A/D3B	<i>M. exigua</i>	<i>M. exigua</i>
	CR05-Me5J2R.3		C2F3/1108	<i>M. exigua</i>	
	CR05-Me5J2R.4		C2F3/1108	<i>M. exigua</i>	
CR06	CR06-Me5J2R.2	Café	D2A/D3B y C2F3/1108	<i>M. exigua</i>	<i>M. exigua</i>
CR07	CR07-Me5J2R.2	Café	D2A/D3B	<i>M. exigua</i>	<i>M. exigua</i>
	CR07-Me5J2R.4		C2F3/1108	<i>M. exigua</i>	
CR12	CR12-Me5J2R.1	tomate	D2A/D3B y C2F3/1108	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
	CR12-Me5J2R.2		C2F3/1108	<i>M. javanica</i>	
CR13	CR13-Me5J2R.1	café	C2F3/1108	<i>M. exigua</i>	no se detectaron hembras
	CR13-Me5J2R.2		C2F3/1108	<i>M. exigua</i> y <i>M. incognita</i>	
CR14	CR14-Me5J2R.1	café	C2F3/1108	<i>M. exigua</i>	no se detectaron hembras
	CR14-Me5J2R.2		C2F3/1108	<i>M. exigua</i>	
CR17	CR17-Me5J2R.1	ñampí	C2F3/1108	<i>M. javanica</i>	<i>M. arenaria</i>
	CR17-Me5J2R.2		C2F3/1108	<i>M. arenaria</i>	
CR18	CR18-Me1HR.6	culantro coyote	D2A/D3B y C2F3/1108	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
	CR18-Me5J2R.1		D2A/D3B y C2F3/1108	<i>M. incognita</i>	
CR23	CR23-Me1HR.2	jengibre	C2F3/1108	<i>M.arenaria</i>	<i>M. incognita</i>
	CR23-Me5J2R.1		C2F3/1108	<i>M. incognita</i>	

Cuadro 7. Especies de *Meloidogyne* presentes en cada una de las muestra, identificadas mediante análisis del diseño perineal de hembras adultas en la población y mediante el patrón de digestión obtenido por PCR – RFLP (continuación).

Muestra	Repetición	Cultivo	Iniciadores con los que se realizó la identificación	Especie identificada según patrón de digestión	Especie identificada según diseño perineal
CR30	CR30-Me10J2R.4	arroz	D2A/D3B y C2F3/1108	<i>M. salasi</i>	no se detectaron hembras
	CR30-Me10J2R.5		D2A/D3B	*	
	CR30-Me5J2R.6		C2F3/1108	<i>M. salasi</i>	
	CR30-Me5J2R.7		C2F3/1108	<i>M. salasi</i> y <i>M. incognita</i>	
CR31	CR31-Me5J2R.1	arroz	C2F3/1108	<i>M. salasi</i>	no se detectaron hembras
	CR31-Me5J2R.2		C2F3/1108	<i>M. salasi</i>	
	CR31-Me5J2R.3		C2F3/1108	<i>M. salasi</i>	
	CR31-Me10J2R.4		C2F3/1108	<i>M. salasi</i>	
CR32	CR32-Me5J2R.1	arroz	D2A/D3B	*	no se detectaron hembras
	CR32-Me5J2R.2		D2A/D3B	*	
	CR32-Me5J2R.3		D2A/D3B	<i>M. incognita</i>	

* Este patrón de digestión no coincide con el de ninguna de las especies reportadas para Costa Rica.

En seis de las muestras el análisis molecular permitió la identificación de más de una población de *Meloidogyne*, sin embargo, mediante el análisis de diseños perineales no fue posible detectar mezcla de poblaciones, esto porque para detectar mezcla de poblaciones mediante esta técnica es necesario realizar una gran cantidad de cortes, lo que es definido por la población de hembras presentes. La identificación por métodos moleculares fue en este caso más sensible en la detección y permitió identificar poblaciones a nivel de especie sin la necesidad de que en la población hubiera hembras, en este caso el análisis molecular permitiría un diagnóstico más temprano.

Las repeticiones marcadas con asteriscos indican que se obtuvo el patrón de digestión que no coincide para ninguna de las especies reportadas para Costa Rica, en éste, por tratarse de arroz y por los resultados obtenidos con el imprimador C2F3/1108 se asume que la secuencia corresponde a *Meloidogyne salasi*, sin embargo no fue posible verificar este patrón porque no existe ninguna secuencia reportada en el Gene Bank para este nematodo. La única información que existe para la identificación de esta especie por métodos moleculares es el mapa de digestión para el producto de PCR obtenido con el C2F3/1108 y digerido con DraI, reportado por Flores (2008). *Meloidogyne exigua* y *Meloidogyne salasi* consideradas endémicas para Costa Rica han sido estudiadas por Flores (2008), aunque para *Meloidogyne exigua* existen secuencias reportadas en el Gene Bank, aún no las hay para *Meloidogyne salasi*. Se espera que para finales del año 2012 se cuente con al menos una secuencia de *Meloidogyne salasi*, sin embargo es necesario analizar más muestras, obtener secuencias y realizar análisis filogenéticos para caracterizar completamente esta especie. De ser esto posible se tendría la primera secuencia para *M. salasi* reportada en el Gene Bank.

Como se puede observar en el Cuadro 7, la mayor parte de las identificaciones se realizaron con los iniciadores C2F3/1108, estos iniciadores han sido muy utilizados en la identificación de las cuatro especies de mayor distribución mundial: *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne javanica* y *Meloidogyne hapla* (Powers y Harris 1993). Por otro lado, los iniciadores D2A/D3B han sido utilizados ampliamente para la identificación de nematodos por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas en España (Castillo *et al.* 2003) mediante la secuenciación de los productos obtenidos, sin embargo estos iniciadores no habían sido utilizados para realizar identificación a nivel de especie mediante PCR- RFLP, es hasta ahora que se está explorando la posibilidad de aplicar esta técnica con estos iniciadores.

Por otro lado la distribución geográfica de las especies identificadas (Figuras 13 a 15) corresponde con la reportada por López (1984) y López y Salazar (1989). De esta forma *M. incognita* ampliamente distribuida y con mayor cantidad de hospederos, *M. javanica* y *M. arenaria* encontradas con poca frecuencia en zonas calientes, *M. hapla* ubicada en zonas frías, *M. exigua* asociada al café y *M. salasi* asociada al arroz.

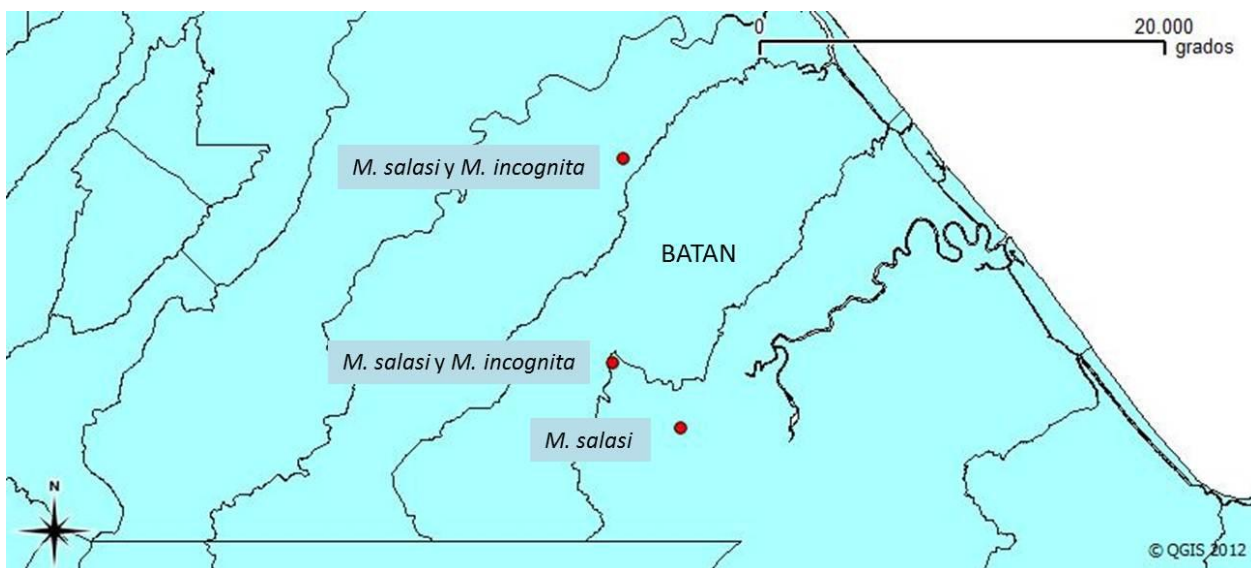


Figura 13. Puntos de muestreo en fincas arroceras y especies de *Meloidogyne* identificadas en los muestreos realizados en la región Huetar Atlántica (Santa Clara, San Carlos. 2011).



Figura 14. Puntos de muestreo en fincas cafetaleras y especies de *Meloidogyne* identificadas en los muestreos realizados en el Valle Occidental (Santa Clara, San Carlos. 2011).

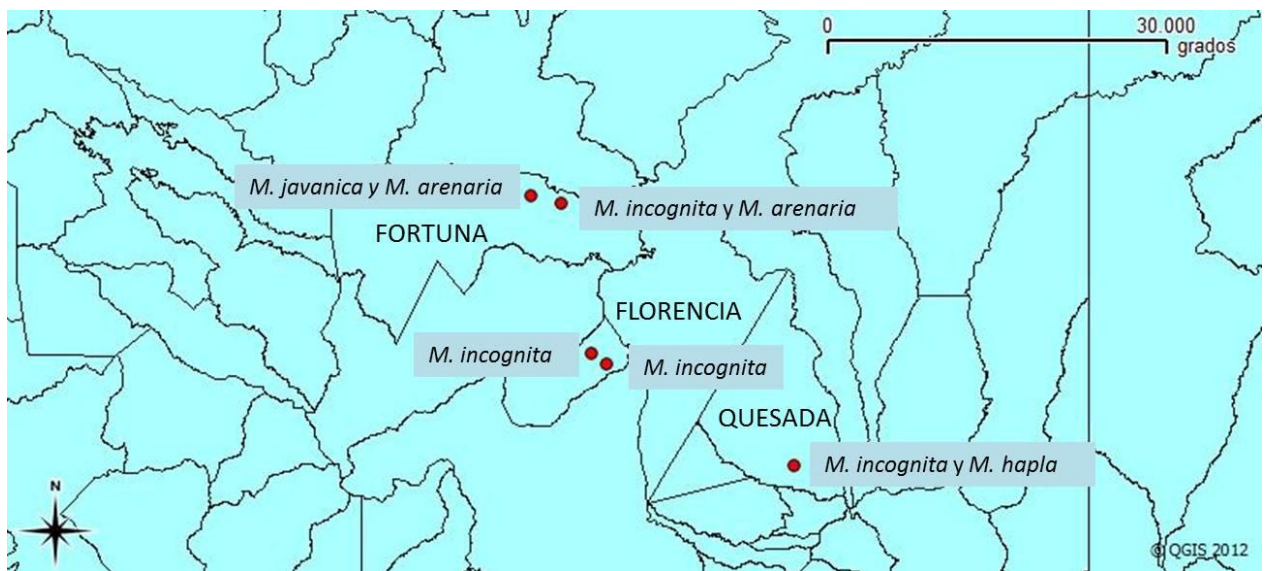


Figura 15. Puntos de muestreo y especies de *Meloidogyne* identificadas en los muestreos realizados en la Región Huetar Norte (Santa Clara, San Carlos. 2011).

6. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en esta investigación se puede concluir lo siguiente:

El diagnóstico morfológico del complejo de nematodos noduladores permitió identificar a *M. incognita* y *M. salasi* en fincas arroceras de la región Huetar Atlántica; *M. incognita* y *M. exigua* en fincas cafetaleras en el Valle Occidental; y *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. hapla* y *M. javanica* en los muestreos realizados en la Región Huetar Norte.

Mediante PCR-RFLP se lograron identificar molecularmente las especies *M. incognita*, *M. exigua*, *M. hapla* y *M. salassi* detectadas mediante de regiones conservadas del ADN ribosómico (D2A/D3B) y las especies *M. incognita*, *M. exigua*, *M. hapla*, *M. salassi*, *M. javanica* y *M.arenaria* detectadas mediante de regiones mitocondrial (C2F3/1108).

EL PCR-RFLP facilitó el proceso de identificación de especies de *Meloidogyne*, sin la necesidad de obtener nematodos hembras para el desarrollo de cortes perineales.

7. Literatura Citada

- Anderson, TJC; Blouin, MS; Beech, RN. 1998. Population biology of parasitic nematodes: applications of genetic markers. *Adv. Parasitol.* 41, 219–83.
- Brito, J; Powers, T; Mullin, P; Inserra, R; Dickson, D. 2004. Morphological and molecular characterization of *Meloidogyne mayaguensis* isolates from Florida. *Journal of Nematology* 36(3):232-240.
- Blouin, MS. 2002. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: Mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *International Journal for Parasitology* 32:527–531.
- Castagnone-Sereno, P; Vanlerberghe-Masutti, F; Leroy, F. 1994. Genetic polymorphism between and within *Meloidogyne* species detected with RAPD markers. *Genome*, 37: 904–909.
- Castillo, P; Vovlas, N; Subbotin, S; Troccoli, A. 2003. A new root-knot nematode, *Meloidogyne baetica* n. sp. (Nematoda: Heteroderidae), parasitizing wild olive in Southern Spain. *Phytopathology* 93:1093-1102.
- Castillo, P; Vovlas, N; Troccoli, N; Liébanas, G; Palomares-Rius, J.E; Landa, B.B. 2009. A new root-knot nematode, *Meloidogyne silvestris* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), parasitizing European holly in northern Spain. *Pant Pathology* 58:606-619.
- Genis, JL. 1993. Identification of four major *Meloidogyne* spp. by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR). *Pathology* 83:76-78.
- Coolen, WA. 1979. Methods for the extraction of *Meloidogyne* spp. and other nematodes from roots and soil. En: Lamberti, F; Taylor, E (eds). *Root-knot Nematodes (Meloidogyne species) Systematics, Biology and Control*. Academic Press, London, UK, 319-329 pp.
- Dautova, M; Rosso, M-N; Abad, P; Gommers, FJ; Bakker, J; Smant, G. 2001. Single pass cDNA sequencing - a powerful tool to analyze gene expression in preparasitic juveniles of the southern rootknot nematode *Meloidogyne incognita*. *Nematology* 3:129-139.
- Djian-Caporalino, CA; Fazari, MJ; Arguel, T; Vernie, C. 2007. Root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) Me resistance genes in pepper (*Capsicum annuum* L.) are clustered on the P9 chromosome. *Theor. Appl. Genet.* 114 473–486.
- Eisenback, JD; Triantaphyllou, HH. 1991. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. Pages 191-274 *In: Manual of Agricultural Nematology*. W. R. Nickle, ed. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Flores, L. 2008. Identificación de especies de *Meloidogyne* descritas en Costa Rica con base en la variabilidad del ADN mitochondrial. Tesis de Maestría, Universidad de Costa Rica, Costa Rica. p 60.
- García de la Cruz, R; Palma López, D; García Espinoza, R; Rodríguez, M; González Hernández, H. 2005. Effect of Legumes Rotation on Pineapple Root Diseases in Huimanguillo, Tabasco, Mexico. *Acta Horticulturae* no 666: 247-256.

- Hussey, R. S., and G. J. W. Janssen. 2002. Chapter 3: Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. Pp. 43-70. In J. L. Starr, R. Cook, and J. Bridge (eds). Plant Resistance to Parasitic Nematodes. CAB International, United Kingdom
- Jepson, SB. 1987. Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). CABI Publishing. Wallingford, UK. 265p.
- Karssen, G; and Moens, M. 2006. Root-knot nematodes. In: Perry, RN; Moens, M (eds). Plant Nematology. CABI, Cambridge. sp.
- Landa, BB; Palomares-Rius, JE; Vovlas, N; Carneiro, RMDG; Maleita, CMN; Abrantes, IMO; Castillo, P. 2008. Molecular Characterization of *Meloidogyne hispanica* (Nematoda, Meloidogynidae) by Phylogenetic Analysis of Genes Within the rDNA in *Meloidogyne* spp. Plant Disease 92:1104-1110
- López, R. 1984. Differential plant responses, morphometrics and electrophoretic patterns of some *Meloidogyne* spp. from Costa Rica and Florida, USA and the description of *Meloidogyne salasi* sp. N. Tesis de doctorado, Universidad de Florida, Florida, Estados Unidos. 124p.
- López, R; Salazar, L. 1989. Microscopía electrónica de rastreo de varias poblaciones del nematodo nodulador del cafeto *Meloidogyne exigua* (Nemata: Meloidogynidae). Turrialba 39(3): 299-304.
- Luc, M, Sikora, RA, and Bridge, J. (Eds). 2005. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. CAB International, Wallingford, UK. p 871.
- Powers, T; Harris, T. 1993. A polymerase chain reaction method for identification for five major *Meloidogyne* species. Journal of Nematology. 25 (1): 1-6.
- Powers, T; Todd, TC; Burnell, AM; Murray, PCB; Fleming, CC; Szalanski, AL; Adams, BA; Harris, TS. 1997. The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. Journal of Nematology. 29: 441-450.
- Powers T, 2004. Nematode Molecular Diagnostics: From Bands to Barcodes. Annual Review of Phytopathology 42:, 367-83.
- Powers, T; Mullin, PG; Harris, TS; Sutton, LA; Higgins, RS. 2005. Incorporating molecular identification of *Meloidogyne* spp. into a large-scale regional nematode survey. Journal of Nematology 37: 226-235.
- Ramírez-Moreno, L.A; García-Barríos, L.E; Rodríguez-Hernández, C; Morales, H; Castro-Ramírez, A. 2001. Evaluación del efecto de insecticidas de extractos de plantas sobre *Leptophobia aripa* Elodia. Manejo integrado de plagas (Costa Rica) 60:50-56.
- Subbotin, SA; Vovlas, N; Crozzoli, R; Sturhan, D; Lamberti, F; Moens, M; Baldwin, JG. 2005. Phylogeny of *Criconematina Siddiqi*, 1980 (Nematoda: Tylenchida) based on morphology and D2-D3 expansion segments of the 28S-rRNA gene sequences with application of a secondary structure model. Nematology. no 7:927-944.
- Tigano, MS; Carneiro, RMDG; Jeyaprakash, A; Dickson, DW; Adams, BJ. 2005. Phylogeny of

Meloidogyne spp. based on 18S rDNA and the intergenic region mitochondrial DNA sequences. *Nematology*. 7(6): 851-862.

- Trudgill, DL; Blok, VC. 2001. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: Exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Reviews of Phytopathology* 39:53-77
- Wang, X; Allen, R; Ding, X; Goellner, M; Maier, T; de Boer, JM; Baum, TJ; Hussey, RS; Davis, EL. 2001. Signal peptide-selection of cDNA cloned directly from the esophageal gland cells of the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 14: 536-544.
- Williamson, VM; Caswell-Chen, EP; Westerdahl, BB; WU, FF; Caryl, G. 1997. A PCR assay to identify and distinguish single juveniles of *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. *Journal of Nematology* 29:9-15.
- Xu, J; Liu, P; Meng, Q; Long, H. 2004. Characterization of *Meloidogyne* species from China using isoenzyme, phenotypes and amplified mitochondrial DNA restriction fragments length polymorphism. *European Journal of Plant Pathology*, no 110:309-315.
- Zheng, J; Subbotin, SA; Waeyenberge, L; Moens, M. 2000. Molecular characterization of Chinese *Heterodera glycines* and *H. avenae* population based on RFLPs and sequences or rDNA-ITS regions. *Russian Journal of Nematology* 8:109-113.
- Zijlstra, C. 2000. Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* based on SCARPCR: a powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits. *European Journal of Plant Pathology* 106:283-290.
- Zijlstra, CD; Donkers-Venne, THM; Fargette, M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterised amplified region (SCAR) based PCR assays. *Nematology* 2:847-853.

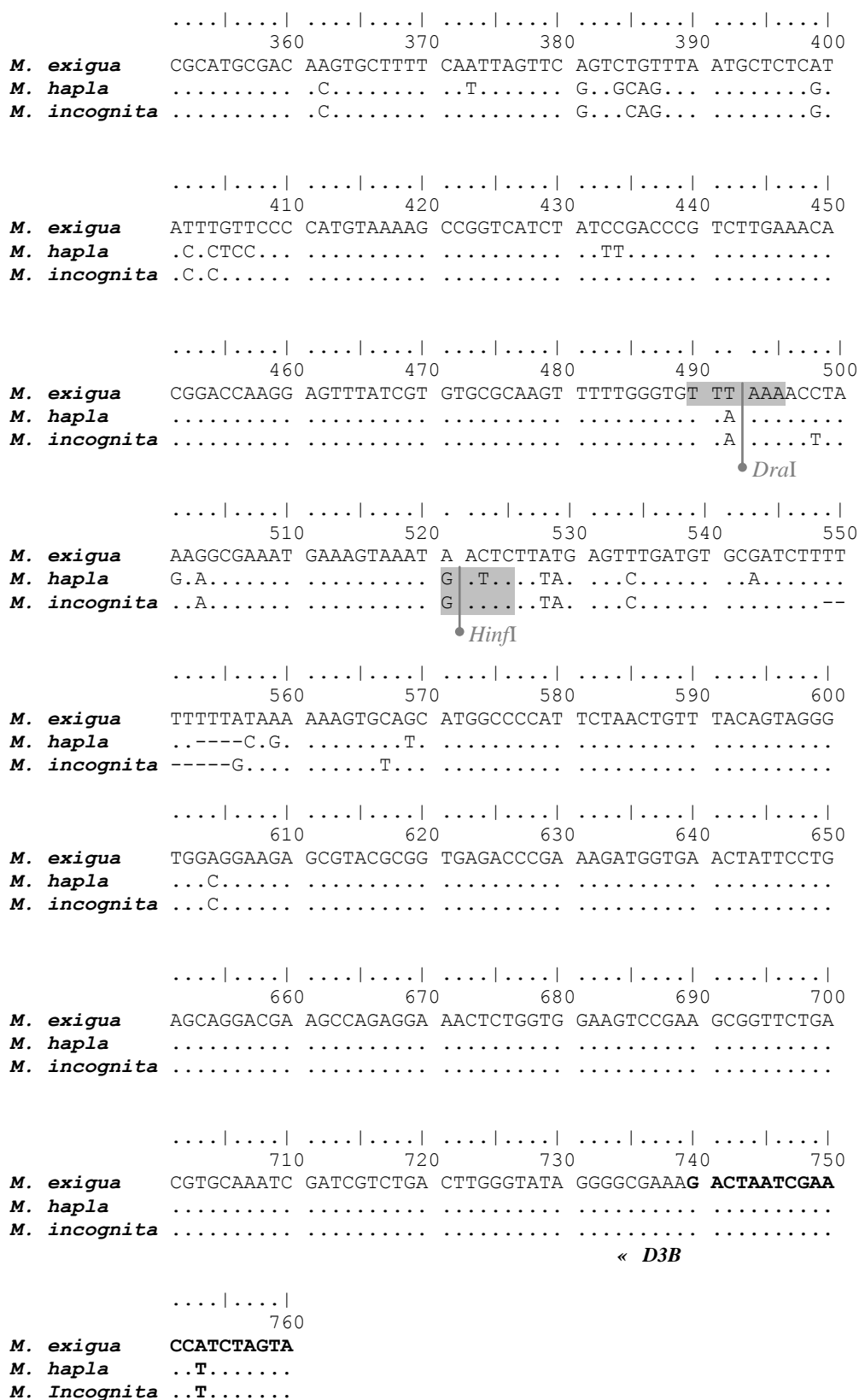


Figura 1A (Continuación). Mapa de la digestión de *Meloidogyne exigua* (GeneBank, AF435796), *Meloidogyne hapla* (GeneBank, DQ145641) y *Meloidogyne incognita* (GeneBank, AF435794) con las enzimas de restricción *AluI*, *DraI*, *HinfI*, *KpnI* y *SacI*.