

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS



TESIS

IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES DEL
NEMATODO AGALLADOR (*Meloidogyne* SPP.) EN CHILE
(*Capsicum annuum* L.), EN EL ESTADO DE SINALOA

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA
ORIANDY MABEL PEREA LONGORIA

DIRECTOR DE TESIS
DR. TOMÁS DÍAZ VALDÉS

DIRECTOR EXTERNO
DR. JOSÉ ÁNGEL MARTÍNEZ GALLARDO

CULIACÁN ROSALES, SINALOA, ENERO 2019.

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR LA **C. ORIANDY MABEL PEREA LONGORIA**,
BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, HA SIDO
APROBADA POR EL MISMO, Y ACEPTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

COMITÉ PARTICULAR

DIRECTOR DE TESIS _____
DR. TOMÁS DÍAZ VALDÉS

DIRECTOR EXTERNO _____
DR. JOSÉ ÁNGEL MARTÍNEZ GALLARDO

ASESOR _____
MC. JOSÉ ARMANDO CARRILLO FASIO

ASESOR _____
DR. CARLOS LÓPEZ ORONA

ASESOR _____
DR. FELIPE AYALA TAFOYA

CULIACÁN ROSALES, SINALOA, ENERO 2019.

DEDICATORIA

A Dios:

Por permitirme por poner en mi camino cada una de las situaciones que me llevaron a elegir estudiar un posgrado que ahora estoy culminando.

A mis padres:

Olga y Rafael, por no rendirse nunca y apoyarme siempre incondicionalmente, por no cansarse y llevarme a donde ahora estoy, por ser los mejores padres que pude tener, espero se sientan orgullosos de mí, yo me siento muy orgullosa y afortunada de tenerlos en mi vida.

A mi esposo:

Uriel González por brindarme su apoyo y cariño en todo momento y animarme en los momentos que lo necesito.

A mis hermanos:

Rafa y Yomara, por ser mis amigos pase lo que pase y por apoyarme siempre.

Mi tía Irasema:

Por darme sus bendiciones desde donde estas, eres mi favorita y estas en cada una de las metas logradas.

AGRADECIMIENTOS

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme el apoyo económico a lo largo del posgrado.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa por aceptarme y darme la oportunidad de ser uno de sus estudiantes.

Al Colegio de Ciencias Agropecuarias por darme la oportunidad de seguir formándome, así como también agradezco a las personas que ahí laboran, en especial el DR. Romo y Gaby.

A la Facultad de Agronomía por abrirme sus puertas y a través de sus maestros formarme como profesionista.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., coordinación Culiacán, por recibirme y darme la oportunidad de desarrollar mi proyecto de investigación, en especial al laboratorio de nematología.

Al maestro en ciencias José Armando Carrillo Fasio, por compartirme sus conocimientos técnicos, por su paciencia y por mostrar siempre su buena disposición.

Al Dr. Tomás Díaz Valdés, por fungir como mi director y estar siempre en la mejor disposición de apoyarme para que las cosas fueran favorables.

Al Dr. José Ángel Martínez Gallardo, por apoyo brindado a través de sus asesorías y disponibilidad.

Al Ing. Isidro Márquez Zequera, gracias por compartirme sus conocimientos, por ayudarme cada vez que fue que necesario y por brindarme su amistad.

A la Bióloga Belén Tapia, por ser mi maestra en las técnicas de PCR, por su paciencia, por tener siempre la mejor disposición de ayudarme cuando lo necesité y sobre todo gracias por su amistad.

Al Biólogo Daniel por el apoyo técnico en la biología molecular y por la amistad brindada.

A Brissa y Judith, por su amistad, por los consejos y por hacer más fácil este camino.

A mis compañeros de laboratorio: Gabriel, Don Goyo, Yoshio, Militza, David, Alcino, Carlos, Rubén.

A mis compañeros de generación: Natalia, Miguel, Jesús, Juan Carlos, Erick y Citlali; por los momentos felices, así como momentos difíciles que pasamos juntos.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN GENERAL	x
GENERAL ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Importancia del cultivo de chile en Sinaloa	1
II. PROBLEMA CIENTÍFICO	4
III. HIPÓTESIS	4
IV. OBJETIVO GENERAL	4
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
V. REVISIÓN DE LITERATURA	5
5.1 Nematodos fitoparásitos	5
5.2 Características generales de <i>Meloidogyne</i> spp.	6
5.3 Ubicación Taxonómica	8
5.4 Ciclo de vida de <i>Meloidogyne</i>	8
5.5 Forma de reproducción	12
5.6 Sintomatología de <i>Meloidogyne</i> spp. en el cultivo de chile	13
5.7 Métodos de identificación de especies de <i>Meloidogyne</i>	15
5.7.1 Identificación morfológica	15
5.7.2 Prueba de hospedantes diferenciales	16
5.7.3 Análisis electroforéticos de proteínas e isoenzimas	17
5.7.4 Análisis molecular de ácidos nucleicos	18
5.8 Empleo de biología molecular en la identificación de especies de <i>Meloidogyne</i> spp.	19
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1 Ubicación del experimento	22
6.2 Colección de muestras	22
6.3 Extracción y montaje de hembras de <i>Meloidogyne</i> spp.	25
6.4 Extracción de especímenes juveniles de segundo estado de <i>Meloidogyne</i> spp.	26
6.5 Identificación morfológica de poblaciones de <i>Meloidogyne</i> spp.	26
6.6 Identificación molecular mediante PCR de poblaciones de <i>Meloidogyne</i> spp.	28
6.6.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	28

6.6.2 Visualización de ADN amplificado, por electroforesis.	29
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
7.1 Identificación morfométrica y morfológica de las poblaciones de <i>Meloidogyne</i> spp. en las zonas productoras de chile en Sinaloa.	30
7.2 Identificación de especies de hembras del género <i>Meloidogyne</i> spp.	32
7.3 Identificación molecular de las especies de <i>Meloidogyne</i> , presentes en las zonas productoras de chile en Sinaloa.....	34
7.4 Determinación de las especies de <i>Meloidogyne</i> presentes en el cultivo de chile y su distribución.....	34
VIII. CONCLUSIONES	37
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Georreferenciación. Variedad de chile, municipio y coordenadas de los puntos muestreados en las zonas productoras de chile en el Estado de Sinaloa.....	24
Cuadro 2. Características usadas para la identificación de <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>M. javanica</i> , <i>M. arenaria</i> y <i>M. hapla</i> basadas en el patrón perineal de la hembra (Eisenback et al., 1983).	27
Cuadro 3. Iniciadores utilizados. se utilizaron seis pares de iniciadores: un iniciador general y cinco iniciadores específicos, con las cadenas correspondientes, se indica también el número de pares de bases esperado para cada iniciador. .	29
Cuadro 4. Características morfométricas obtenidas de cada especie de juveniles de segundo estadio y descripción de cada especie.....	30
Cuadro 5. Incidencia de especies de <i>Meloidogyne</i> en las zonas productoras del Estado de Sinaloa.....	35
Cuadro 6. Distribución de <i>Meloidogyne</i> spp., variedades de chile afectadas, en las zonas productoras de chile en el Estado de Sinaloa.	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Puntos de muestreo en los Municipio que representan la zona productora de chile del Estado de Sinaloa.....	23
Figura 2. Estilete de <i>M. enterolobii</i>	31
Figura 3. Juvenil dos de <i>M. enterolobii</i>	31
Figura 4. Estilete de <i>M. incognita</i>	31
Figura 5. Cola de un Juvenil dos de <i>M. incognita</i>	31
Figura 6. Corte perineal de una hembra de <i>M. enterolobii</i>	33
Figura 7. Corte perineal de una hembra de <i>M. incognita</i>	33
Figura 8. Identificación molecular de las especies de <i>Meloidogyne</i> , en gel de agarosa.	34
Figura 9. Mapa de distribución de especies de <i>Meloidogyne</i> presentes en las zonas productoras de chile en el Estado de Sinaloa.	36

RESUMEN GENERAL

La presente investigación tuvo como objetivo conocer la distribución de especies de *Meloidogyne*, presentes en el cultivo de chile, en el estado de Sinaloa. Se colectaron muestras de planta de chile con daño de nematodos en raíces y suelo en la zona norte, centro, centro-norte, centro-sur y sur del estado de Sinaloa. Las muestras de suelo, se utilizaron para la extracción e identificación de larvas; y las de raíz agallada, para la extracción e identificación hembras. La identificación se llevó a cabo a partir de características morfológicas y morfométricas, y los resultados fueron confirmados por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Se encontraron dos tipos de larvas; con medidas de 360 μm a 435 μm , presentaron el disco labial redondeado, la región cefálica sin anillos, el estilete tiene una longitud de 10-14 μm , los nódulos son anchos y posteriormente redondeados, la cola es cónica y mide 49-65 μm ; estas características corresponden a *M. incognita*. Los juveniles se caracterizaron por ser vermiformes anillados. Los machos son ligeramente anillados hacia adelante, redondeados de la parte posterior y el estilete oscila entre 21.3 y 24.9 μm , la cola tiene una terminación pronunciada y mide 44.2-61 μm para el caso de *M. enterolobii*. En los cortes perineales se observa un arco dorsal alto y cuadrado formado por estrías onduladas sin campos laterales evidentes para el caso de *M. incognita* y se observan ondulaciones pronunciadas de las estrías dorsales, haciendo parecer que el arco dorsal posee "hombreras". El arco dorsal es bajo y redondeado, a excepción donde las estrías ventrales se extienden para formar "alas", para la especie *M. enterolobii*. En la confirmación por PCR se observó un amplicon de 900 pb que corresponden a *M. incognita*, mientras que para *M. enterolobii* se observa un amplicon de 256 lo cual coincide con lo reportado por Martínez-Gallardo *et al* (2015). *M. enterolobii* se encuentra presente en todas las zonas muestreadas, mientras que *M. incognita* se encuentra únicamente en los municipios que comprenden la zona sur del Estado (Escuinapa y El Rosario).

GENERAL ABSTRACT

The objective of the present investigation was to know the distribution of *Meloidogyne* spp. present in the pepper culture in the state of Sinaloa. The pepper plant samples were collected with nematode damage in roots and soil in the north, center, north-central, south-central and southern regions of the state of Sinaloa. The soil samples were used for the extraction and identification of larvae; and those with a gilled root, for the extraction and identification of females. The identification was carried out from morphological and morphometric characteristics, and the results were confirmed by PCR (Polymerase Chain Reaction). Two types of larvae were found; with measurements of 360 μm to 435 μm , presented the rounded labial disc, the cephalic region without rings, the stylet has a length of 10-14 μm , the nodules are wide and then rounded, the tail is conical and measures 49-65 μm ; these characteristics correspond to *M. incognita*. The juveniles were characterized by being ringed vermiforms. The males are slightly ringed forward, rounded from the back and the stylet oscillates between 21.3 and 24.9 μm , the tail has a pronounced termination and measures 44.2-61 μm for the case of *M. enterolobii*. In the perineal sections, a tall, square dorsal arch formed by wavy striations without evident lateral fields is observed for the case of *M. incognita* and pronounced undulations of the dorsal striae are observed, making it appear that the dorsal arch has "shoulder pads". The dorsal arch is low and rounded, except where the ventral striae extend to form "wings", for the species *M. enterolobii*. In the confirmation by PCR, an amplicon of 900 bp was observed corresponding to *M. incognita*, while for *M. enterolobii* an amplicon of 256 was observed, which coincides with that reported by Martínez-Gallardo et al (2015). *M. enterolobii* is present in all the sampled areas, while *M. incognita* is found only in the municipalities that comprise the southern zone of the State (Escuinapa and El Rosario).

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Importancia del cultivo de chile en Sinaloa

En Sinaloa los cultivos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), pepino (*Cucumis sativus* L.), berenjena (*Solanum melongena* L.) y chile (*Capsicum annuum* L.) son considerados las hortalizas más importantes debido a su volumen de producción y superficie de siembra a nivel nacional, además de ser productos hortícolas de exportación por excelencia y el sostén principal de la estructura productiva y comercial de este sector (Carrillo *et al.*, 2000). Su versatilidad como producto de consumo fresco o procesado y su gran adaptabilidad han jugado un papel muy importante en su rápida y extensa distribución en el mundo (Carrillo *et al.*, 2000).

A nivel mundial 136 países exportan algún tipo de cultivo de chile conjuntando un volumen anual de 3.3 millones de t, de las cuales 28.7% son de origen mexicano, razón por la que nuestro país se ubica como el principal exportador (SIAP, 2017). México exporta la producción de chile a 16 naciones; sin embargo, son Estados Unidos y Canadá los países que mayormente lo importan: 992 mil y 3 mil t, respectivamente; aunque Estados Unidos es el principal importador del mundo, Malasia y Polonia son mercados de oportunidad para comercialización de este producto mexicano (SAGARPA, 2017).

La producción de este cultivo continua en acenso ya que durante el año 2016 aumentó 17.9% respecto al año anterior, fundamentalmente por un incremento en la superficie sembrada y cosechada (SIAP, 2017). Entre los países que siembran chile, México presenta la tercer mayor superficie cosechada (7.4% del total de la producción mundial del cultivo); durante el ciclo agrícola 2016-2017 se cosecharon 2' 732,635 t; durante este periodo en Sinaloa se cultivaron 59,519 ha de hortalizas de las cuales 14,046 ha fueron para el cultivo de chile verde, con una producción de 637,924 t en el ciclo, colocándose Sinaloa en el segundo estado de mayor producción de chile (CAADES, 2018).

La producción del chile se ve afectada por diversos organismos patógenos causantes enfermedades (Ruiz, 1994). Dentro de éstos, se encuentran hongos, bacterias, virus y nematodos (Hernández *et al.*, 1991).

Dentro del grupo de nematodos fitoparásitos sobresalen las especies del género *Meloidogyne*, las que se caracterizan por ser endoparásitos sedentarios obligados, además son de gran importancia económica y constituyen uno de los principales factores limitantes en la producción de campos de cultivos hortícolas a nivel mundial y nacional. A esto se suman las estrategias de manejo empleadas para su control que involucran el uso de productos químicos, que conllevan a un mayor gasto económico y problemas de residuos y contaminación ambiental (Carrillo *et al.*, 2000). El mismo autor señala que *Meloidogyne* spp. es un nematodo polífago, capaz de parasitar 3000 especies de plantas, entre silvestres y cultivadas. Además de ello, debido al exitoso parasitismo y alta especialización desarrollada en su hospedante; así como, su permanencia en el suelo, son de difícil erradicación, constituyendo un problema de importancia global.

La correcta identificación de nematodos presentes en un campo de cultivo, tiene implicaciones importantes en muchas áreas, incluyendo la sistemática (taxonomía y filogenia), la genética de poblaciones, ecología y epidemiología, además es fundamental para la implementación de medidas de manejo y control, como el uso de cultivos resistentes, la rotación de cultivos y el establecimiento de medidas cuarentenarias (Carrillo *et al.*, 2000).

Existen diferentes métodos para la identificación de nematodos, con frecuencia son identificados sobre la base de características morfológicas y morfométricas, el hospedante que parasitan, su efecto patológico en el hospedante o su origen geográfico (Carrillo *et al.*, 2000). Sin embargo, estos criterios tienen ciertas limitaciones al llevar a cabo una identificación específica y necesitan de métodos complementarios y confirmatorios, donde el método morfológico constituye el método de "rutina" en los laboratorios de nematología, y se desarrolla generalmente mediante

el análisis de patrones perineales de hembras y otras características morfológicas como la forma de la cabeza de machos y estilete de hembras, también es de utilidad la prueba de hospedantes diferenciales, la caracterización fenotípica de isoenzimas de hembras adultas y recientemente el diagnóstico molecular mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

Los métodos moleculares basados en PCR, se caracterizan por su alta sensibilidad y especificidad, permitiendo la amplificación de genes o fragmentos de genes a partir de cantidades muy pequeñas (Carrillo *et al.*, 2000). Así mismo señalan que estos métodos vienen revolucionando la taxonomía y la genética de nematodos y constituyen una herramienta importante en la detección de nematodos fitopatógenos, donde su implementación tiene un efecto en el tiempo que implica un diagnóstico correcto y confiable, ya que éste se ve reducido; siendo esto importante, especialmente cuando se trata de nematodos cuarentenados.

En el presente trabajo, se aplicaron las técnicas de caracterización e identificación de patrones perineales y la técnica de PCR, utilizando iniciadores específicos, para el diagnóstico molecular de especies de *Meloidogyne* presentes en los cultivos de chile de diferentes zonas hortícolas del estado de Sinaloa y de esta manera contribuir para una identificación más sensible, rápida y confiable de estas especies.

II. PROBLEMA CIENTÍFICO

El cultivo de chile en México es de gran importancia debido a la superficie sembrada y cosechada respecto al resto de los países, Sinaloa es el segundo Estado productor de esta hortaliza en México. En el ciclo de vida de la planta, es afectada por diversos patógenos, destacando actualmente los daños ocasionados al sistema radicular *Meloidogyne* spp. Para poder lograr un control eficiente de este fitonematodo, la adecuada identificación es fundamental. Los avances en la biología molecular en los últimos años han permitido mayor precisión en identificar las especies de *Meloidogyne*, complementados de análisis morfométricos y morfológicos. Mediante la presente investigación se busca tener conocimiento sobre que especies de *Meloidogyne* se encuentran presentes en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) en las zonas productoras del estado de Sinaloa.

III. HIPÓTESIS

En el estado de Sinaloa, México existen al menos dos especies de *Meloidogyne* presentes en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.).

IV. OBJETIVO GENERAL

Conocer la distribución de especies de *Meloidogyne*, presentes en el cultivo de chile, en el estado de Sinaloa.

4.1 Objetivos específicos

1. Identificar morfológicamente y morfométricamente las especies de nematodos agalladores (*Meloidogyne* spp.) presentes en el cultivo de chile en el estado de Sinaloa.
2. Identificar molecularmente las especies de nematodos agalladores (*Meloidogyne* spp.) presentes en el cultivo de chile en el estado de Sinaloa.
3. Generar un mapa de distribución de *Meloidogyne* spp. presentes en el cultivo de chile en el estado de Sinaloa.

V. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1 Nematodos fitoparásitos

Los nematodos son los organismos pluricelulares más numerosos en los agroecosistemas, encontrándose como organismos de vida libre, alimentándose de hongos, bacterias, protozoarios y nematodos, o como parásitos de plantas y animales; además, forman parte importante de las cadenas tróficas del suelo. Los nematodos fitoparásitos son organismos que afectan en distinto grado una amplia variedad de cultivos, en especial los hortícolas, causando graves daños económicos al disminuir la productividad de los mismos. De la diversidad de géneros fitoparásitos destacan principalmente *Meloidogyne* sp., *Pratylenchus* sp., *Ditylenchus* sp., *Rotylenchus* sp., *Rotylenchulus* sp., *Gobodera* sp., *Tylenchus* sp.

Entre los nematodos fitoparásitos que reducen significativamente la producción agrícola de las hortalizas sobresale el nematodo formador de agallas del género *Meloidogyne* spp., el cual se considera como una plaga de gran importancia económica en todo el mundo, especialmente en países tropicales y subtropicales. Se reportan pérdidas de producción por causa de este nematodo en aproximadamente 115 millones de dólares anuales. En Sinaloa se encuentra presente en todas las regiones productoras de hortalizas, con incidencias variables. Las especies de *Meloidogyne* reportadas en Sinaloa son: *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* y *M. enterolobii*, detectadas en los cultivos de tomate, chile, pepino y berenjena (Carrillo *et al.*, 2000; Cid *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2015).

5.2 Características generales de *Meloidogyne* spp.

Los nematodos agalladores de la raíz son miembros del género *Meloidogyne* Göldi, 1892 (la palabra *Meloidogyne* es de origen griego y significa "hembra con forma de manzana") y es un grupo polífago económicamente importante de parásitos obligados de plantas altamente adaptados. Se distribuyen en todo el mundo y parasitan casi todas las especies de plantas superiores. Normalmente se reproducen y se alimentan de células vegetales vivas modificadas dentro de las raíces de las plantas, donde inducen agallas pequeñas a grandes en la raíz, de ahí su nombre común. Los síntomas en la parte aérea de la planta no son evidentes y pueden ser similares a los producidos en cualquier planta que tenga deficiencias nutricionales o un sistema radicular dañado. La rápida tasa de desarrollo y reproducción en los hospedantes susceptibles resulta, en la mayoría de las especies, en varias generaciones durante una temporada de cultivo, lo que lleva a daños severos en los mismos. El daño puede consistir en varios grados de retraso en el crecimiento, falta de vigor y debilitamiento bajo el estrés de la humedad. La infección secundaria por otros patógenos a menudo resulta en una extensa descomposición de los tejidos infectados por nematodos. La explicación común de estos síntomas sobre el suelo es que la infección por *Meloidogyne* afecta la absorción de agua y nutrientes y la translocación ascendente por parte del sistema radicular. Al interrumpir la fisiología de la planta hospedante, los nematodos agalladores de las raíces pueden no solo reducir el rendimiento del cultivo sino también la calidad del producto y por lo tanto son de gran importancia económica y social (Sasser, 1952).

Por lo que los nematodos del género *Meloidogyne* constituyen un grupo de parásitos obligados altamente especializados. Esta característica, junto con su amplia distribución en el mundo, su extenso rango de hospedantes y su interacción con otros fitopatógenos en complejos de enfermedades, hacen que sea el fitonematodo de mayor impacto económico, objeto de diversas investigaciones, que incluyen estudios de taxonomía, biología, interacciones planta-nematodo y enfoques para su control. La gravedad de los daños causados por *Meloidogyne* spp varían con la especie de

nematodo, la planta hospedante, las labores culturales, la época de siembra y el tipo de suelo. Del mismo modo, los umbrales económicos varían, dependiendo de los mismos factores. Son mayormente prevalentes en regiones con temperaturas templadas y tropicales, las cuales favorecen también al cultivo hospedante.

El primer informe ilustrado de enfermedad de agallas en la raíz apareció a mediados del siglo XIX cuando el clérigo Miles Joseph Berkeley (1855) atribuyó por primera vez agallas detectadas en raíces de pepino de invernadero a nematodos. La primera descripción de un nematodo agallador fue hecha por Cornu (1879); se basó en nematodos encontradas en agallas radiculares que se detectaron en las plantas de *Onobrychis sativus* Lam. en el valle del Loira, Francia. En 1887, Göldi describió brevemente e ilustró un nematodo agallador de plantas de café en Brasil y lo llamó *Meloidogyne exigua*. Aunque la publicación de 1887 fue una copia anticipada o una impresión previa del artículo completo publicado posteriormente por Göldi en 1892, el artículo de 1887 cumple con los requisitos para establecer la fecha de publicación real para el género y la especie tipo como 1887. Los estudios sobre *Meloidogyne* spp. se centran con frecuencia en las cuatro principales especies: *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne arenaria* y *Meloidogyne hapla*. El reconocimiento de estas cuatro especies como las principales, comienza al ser consideradas dentro de las cinco primeras especies descritas por Chitwood en 1949. Luego, su extenso rango de hospedantes y distribución global contribuyeron en el reconocimiento de su importancia. El Proyecto Internacional de *Meloidogyne* reporta que constituyen el 95% de las especies identificadas de una colección de aislamientos estudiados a nivel mundial, lo que fortaleció aún más su estatus de principales especies (Sasser *et al.*, 1983).

5.3 Ubicación Taxonómica

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

Phylum Nemata

Clase Secernentea, Von Linstow 1950, Dougherty 1958.

Orden Tylenchida, Thorne 1949.

Suborden Tylenchina, Chitwood 1950.

Superfamilia Tylenchoidea, Örley 1880.

Familia Heteroderidae, Filipjev, Schuurmans, Sterkhoven 1941

Subfamilia Meloidogyninae, Skarbilovich 1959.

Género *Meloidogyne*, Göldi 1892.

5.4 Ciclo de vida de *Meloidogyne*

Las hembras de los nematodos agalladores opositan los huevecillos en masas gelatinosas compuestas de una matriz de glicoproteínas, producida por las glándulas rectales de la hembra, que mantienen los huevos juntos y los protegen contra las condiciones ambientales extremas y la depredación. Las masas de los huevecillos se encuentran generalmente en la superficie de las raíces hendidas, aunque también pueden estar incrustadas dentro del tejido de la raíz. La masa del huevecillo es inicialmente suave, pegajosa e hialina, pero se vuelve más firme y marrón oscuro con la edad. Hasta la fecha sólo se ha realizado un análisis limitado de las glicoproteínas (Sharon y Spiegel, 1993) u otros componentes de la matriz gelatinosa, a pesar de su importancia. Además de proporcionar cierta protección a los huevecillos de los extremos ambientales, se ha demostrado que la matriz tiene propiedades antimicrobianas (Orion y Kritzman, 1991).

De acuerdo a Moens *et al.* (2009) mencionan que se pueden encontrar más de 1,000 huevecillos en una masa ovpositada, que puede ser más grande que el cuerpo de la

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

Dentro del óvulo, la embriogénesis precede al juvenil 1º de la primera etapa, que se traslada al J2 infectivo. La eclosión hacia el J2 depende principalmente de la temperatura y de la humedad suficiente, aunque otros factores, como los exudados de la raíz y la generación, modifican la respuesta de la eclosión de los huevecillos de modo que la presencia del J2 cuando se dan las condiciones favorables para el movimiento y la ubicación. La capacidad de *Meloidogyne* para sobrevivir se a distintas adaptaciones fisiológicas y bioquímicas, entre las que se incluyen la embriogénesis retardada, la inactividad y la diapausa, y las reservas de lípidos que prolongan la viabilidad hasta que el J2 alcanza e invade a un hospedante.

El juvenil de segundo estado que ha emergido, se mueve a través del suelo en busca de una raíz de la que pueda alimentarse. Su capacidad de sobrevivir se ve reforzada por varias adaptaciones fisiológicas y bioquímicas, incluyendo la quiescencia y la diapausa, y las reservas de lípidos que prolongan su viabilidad hasta que llega e invade la planta hospedante (Moens *et al.*, 2009). La búsqueda de la raíz es al azar hasta que se acerca a unos cuantos centímetros. Luego, son atraídos por los exudados radiculares, acumulándose y penetrando la raíz por la zona de elongación debajo del punto de crecimiento. Se considera que el dióxido de carbono es el factor

más importante para atraer a los juveniles de segundo estado (Taylor y Sasser, 1983; Hussey y Janssen, 2001; Karssen y Moens, 2006).

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

Algunos estudios en las células gigantes han revelado que el ARNm de algunos genes puede estar presente en niveles muchas veces mayor que en células de una raíz no infectada (He *et al.*, 2005; Ramsey *et al.*, 2004). También se ha reportado que los niveles de enzimas oxido reductasas se incrementan, indicando un aumento en la actividad metabólica (Hussey y Janssen, 2001; Karssen y Moens, 2006). Los nematodos agalladores de la raíz secretan a través de su cutícula, enzimas antioxidantes que son producidas en la hipodermis y protegen al nematodo de la respuesta oxidativa del hospedante frente a la infección. Así también, las proteínas producidas y secretadas por las células de las glándulas esofágicas dentro de la planta

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

Mientras se están formando las células gigantes y las agallas, aumenta el ancho del nematodo y hay una dilatación considerable de las glándulas esofágicas. Las células del primordio genital se dividen y éste se agranda haciéndose notorio, dos ramificaciones en la hembra o formando un cuerpo alargado en el macho (Taylor y Sasser, 1983). Cuando se completan la segunda y tercera muda en la hembra, evidenciadas por las dos cutículas desprendidas, el estilete y el bulbo esofágico medio desaparecen. Poco después de la cuarta muda el estilete y el bulbo medio son regenerados, se forman el útero y la vagina y el patrón perineal se hace visible. La hembra de la cuarta etapa continúa aumentando de grosor y un poco más de longitud, sufriendo la última muda y desarrollándose como hembra adulta, de forma piriforme. Las hembras pueden producir huevecillos por dos a tres meses y viven algún tiempo más después de que cesa la producción de huevos. El ciclo termina cuando la hembra pone su primer huevecillo (Taylor y Sasser, 1983). Después de la segunda y tercera muda en el macho, el estilete no es visible, el bulbo esofágico medio se ha degenerado y sólo la gónada se ha alargado. Luego ocurre una rápida metamorfosis: el cuerpo alargado se desarrolla dentro de la cutícula, completo con estilete, esófago con bulbo medio, espículas, y esperma en los testículos. El macho de la cuarta etapa es vermiforme y sufre una última muda y emerge de la raíz ya como adulto. No hay evidencia de alimentación por parte de machos adultos y pueden ser encontrados en especies partenogenéticas cuando las condiciones son desfavorables para el desarrollo de la hembra, por ejemplo, cuando las densidades son muy altas y hay una limitación del suministro de alimentos. Los machos probablemente viven sólo semanas (Taylor y Sasser, 1983; Moens *et al.*, 2009).

5.5 Forma de reproducción

Existen tres tipos de reproducción dentro del género *Meloidogyne*: (a) anfimixis, en el cual el esperma de los machos fertiliza los ovocitos en las hembras y posteriormente se produce una meiosis, (b) partenogénesis meiótica facultativa, en el cual en presencia de machos se produce una anfimixis, pero en su ausencia, se lleva a cabo una meiosis en los ovocitos, con dos de sus núcleos, con una reducción de complemento cromosómico (el pronúcleo y el segundo cuerpo polar), posteriormente se fusionan (automixis), y (c) partenogénesis mitótica obligada, donde los machos no están involucrados y uno de los dos núcleos producidos durante la división mitótica inicial dentro del ovocito se deteriora y el otro se convierte en el precursor del embrión posterior (apomixis) (Chitwood y Perry, 2009). Sólo siete de las 37 especies de *Meloidogyne* descritas por Taylor y Sasser (1983), son anfimícticas. Estas especies se consideran de menor importancia debido a su restringida distribución, baja gama de hospedantes y menor impacto económico. Al igual que muchos nematodos del suelo, la mayoría de especies de *Meloidogyne* spp. son partenogénicas. El modo de reproducción apomíctico se encuentra en las especies más importantes en cuanto a su distribución geográfica e impacto agronómico. Las poblaciones de una misma especie de *Meloidogyne* pueden ser diferentes en el modo de reproducción, por ejemplo, 29 de las 32 poblaciones estudiadas de *M. hapla* se reprodujeron por partenogénesis meiótica facultativa, las otras por partenogénesis mitótica. Una forma un poco diferente de la partenogénesis meiótica ha sido reportada en *M. floridensis*, donde se produce una supresión de la segunda división en la maduración, lo que indica que esta especie tiene un tipo de partenogénesis intermedia entre la partenogénesis meiótica con dos divisiones y la mitótica (Chitwood y Perry, 2009). La mayoría de especies anfimícticas y automícticas son diploides, con un número haploide de cromosomas. Mientras que la mayoría de especies apomícticas son poliploides o aneuploides y por lo general muestran una amplia variación en el número de cromosomas ($2n = 30-55$ cromosomas). Las especies de *Meloidogyne* también se diferencian en su proporción de machos y hembras, las especies con fertilización cruzada por lo general tienen una proporción de 1:1, mientras que las especies que

se reproducen por partenogénesis facultativa u obligatoria como *M. hapla* y *M. incognita* tienen valores variables de dicha proporción (Moens *et. al*, 2009). Tanto en el género *Meloidogyne*, como en *Globodera* y *Heterodera*, los cromosomas sexuales están ausentes y la proporción de machos y hembras puede estar influida por factores ambientales. En las especies que se reproducen por partenogénesis meiótica y mitóticas, el hacinamiento, la escasez de alimentos, las temperaturas extremas u otras tensiones ambientales adversas, pueden dar lugar a la formación de machos por inversión sexual. Estos machos raramente inseminan hembras, e incluso cuando lo hacen, una división mitótica en el ovocito inicia la embriogénesis sin fusión con el núcleo de espermatozoide (Chitwood y Perry, 2009). La inversión sexual ocurre cuando en condiciones desfavorables para el nematodo, una vez formado el primordio genital de hembras, éste cambia para dar lugar a un nematodo macho. Dependiendo de la etapa de desarrollo en la cual ocurre la inversión sexual, los machos involucrados pueden tener 1 o 2 gónadas de tamaño variable. La inversión sexual en un período inicial de desarrollo da lugar a machos con un testículo, casi indistinguible del de machos normales. La inversión sexual en una etapa media de desarrollo del segundo estado da lugar a la degeneración del núcleo de una de las células que resulta en machos con un testículo atrofiado y otro bien desarrollado. La inversión sexual en un periodo más avanzado resulta en machos con dos testículos de tamaño aproximadamente igual. Para explicar estos patrones de desarrollo, se supone que la diferenciación sexual es controlada por hormonas y que el ambiente influye en el equilibrio hormonal, al afectar la expresión génica. (Papadopoulou y Triantaphyllou, 1982; Karssen y Moens, 2006; Eisenback y Hunt, 2009).

5.6 Sintomatología de *Meloidogyne* spp. en el cultivo de Chile

Los nematodos del género *Meloidogyne* se reproducen y alimentan de células vegetales vivas modificadas en la raíz, en la que induce agallas; de ahí su nombre común. Los síntomas aéreos son similares a los producidos en plantas que tienen un sistema radicular afectado y en mal funcionamiento. El tamaño y la forma de las agallas dependen de la especie de nematodo, número de nematodos en el tejido de

la raíz, grado de susceptibilidad y edad de la planta hospedante. En las agallas formadas puede haber una o más hembras adultas, localizadas en el cilindro central. Con respecto a la especie de nematodo; *M. hapla* es especialmente conocida por la alta incidencia de las raíces adventicias que se desarrollan a partir de agallas radiculares; *M. trifoliophila*, en trébol, produce agallas alargadas dentro de las cuales se encuentran incrustadas masas de huevecillos; *M. partityla*, en nogal, no forma agallas y tanto la hembra madura como la masa de huevecillos están expuestas en la superficie de la raíz (Moens *et al.*, 2009). Algunas agallas en la raíz pueden ser muy pequeñas y no se pueden reconocer, por ejemplo: en gramíneas, rara vez se forman agallas; en cebolla, las agallas son muy discretas, siendo notoria la producción de masas de huevecillos; en camote y pimiento, las agallas son también generalmente pequeñas. La mayoría de las plantas con raíces fibrosas o leñosas forman agallas pequeñas o indistintas, especialmente al inicio de una temporada de cultivo o cuando la densidad de población de nematodos es baja. Otras especies tienen una tendencia a producir agallas en el extremo de la raíz. El algodón y el cacahuate, son ejemplos de cultivos altamente sensibles en los que las agallas en la raíz pueden ser difíciles de detectar en forma temprana, en la temporada de crecimiento; pero el gran número de agallas pueden ser evidentes en la madurez del cultivo. Las plantas con raíces carnosas, especialmente las cucurbitáceas y tomate, desarrollan agallas fácilmente detectables, a pesar de la baja incidencia de infección (Luc *et al.*, 1990; Moens *et al.*, 2009). Además de la formación de agallas, las raíces de plantas muy infectadas, son mucho más cortas, con menos raíces laterales y menos pelos radiculares; lo que conlleva a la reducción del sistema radicular. La deformación en las raíces y su ineficiencia causan un desarrollo limitado; con una menor cantidad de hojas, las cuales son pequeñas y de color verde pálido o amarillento; se observa marchitez y otros síntomas propios de la deficiencia de agua y nutrientes, aun cuando éstos abundan en el suelo (Taylor y Sasser, 1983; Agrios, 1996). El ritmo rápido de desarrollo y reproducción del nematodo, en plantas muy susceptibles, permite el desarrollo de varias generaciones durante una temporada de cultivo; dando lugar a grandes daños agrícolas. Estos daños pueden consistir en diversos grados de retraso en el

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

5.7 Métodos de identificación de especies de *Meloidogyne*.

5.7.1 Identificación morfológica

La identificación clásica de especies del género *Meloidogyne* está basada en caracteres morfológicos y morfométricos. El procedimiento más frecuente para su identificación es el estudio del patrón perineal en la región posterior del cuerpo de los especímenes hembras. Esta región comprende el área de la vulva-ano (el perineo), el término de la cola, fasmidios, líneas laterales, y estriaciones cuticulares circundantes (Hunt y Handoo, 2009). Chitwood (1949), fue el primero en indicar que los patrones perineales de poblaciones puras de *M. incognita* y *M. javanica* sufrían variaciones morfológicas bajo la influencia de factores como el hospedante. Es por ello que también son utilizadas características morfológicas de la región cefálica y estilete de la hembra, macho y segundo estado juvenil; así como, forma y tamaño de la cola del segundo estado juvenil. (Eisenback, 1985; Hirschmann, 1985; Eisenback y Hirschmann, 1991). Sin embargo, los caracteres del segundo estado juvenil son suplementarios y generalmente no son utilizados en la identificación rutinaria de especies (Magunacelaya y Dagnino, 1999).

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

electrónico de rastreo se encuentran los de la región cefálica en hembras, machos y juveniles; así como, detalles de las estructuras que se presentan en la cutícula y región de la cola en hembras y machos (Rodríguez, 2000). El estudio de los caracteres morfológicos y su descripción va acompañado de dimensiones y radios (cocientes), establecidos y complementados con parámetros señalados por varios autores a lo largo de los últimos años. Sin embargo, debe considerarse que una población no debe identificarse únicamente con medidas, debido a que éstas pueden ser variables e incluso pueden sobreponerse entre especies (Eisenback *et al.*, 1983).

5.7.2 Prueba de hospedantes diferenciales

La prueba de hospedantes diferenciales otorga una indicación preliminar de la especie de *Meloidogyne* spp.; al comparar su capacidad de desarrollo con el cuadro de respuesta típica de las plantas hospedantes. Con esta prueba pueden detectarse también variaciones en el comportamiento parasítico y la capacidad patogénica dentro de poblaciones de una especie dada; al observarse respuestas, significativamente diferentes a la típica (Eisenback *et al.*, 1983). La determinación se basa en la respuesta de la población que se encuentra en estudio a seis hospedantes (*Nicotiana tabacum* L. cv. NC-95; *Gossypium hirsutum* L. cv. Deltapine 16; *Capsicum annun* L. cv. California Wonder; *Citrullus vulgaris* Schard cv. Charleston Gray; *Arachis hypogaea* L. cv. Florunner, *L. esculentum* Mill. cv. Rutgers) (Taylor y Sasser, 1983). Se debe considerar que los resultados no pueden ser interpretados como el establecimiento de un rango de hospedantes para estas especies y razas, ya que la resistencia del nematodo en diferentes cultivos varía ampliamente y evaluar todas las especies de cualquier cultivo sería muy difícil. No se puede afirmar que una especie determinada del nematodo nunca se reproduce en determinada especie de planta (Taylor y Sasser, 1983; Eisenback *et al.*, 1983). Esta prueba tiene restricciones con respecto a la identificación de nuevas especies, ya que puede tratarse de una especie para la cual no hay información, o la que hay es muy limitada. Sin embargo, su aplicación es útil para identificar las cuatro especies más comunes y sus razas (Eisenback *et al.*, 1983).

5.7.3 Análisis electroforéticos de proteínas e isoenzimas

Hussey (1979) y Esbenshade y Triantaphyllou (1985) describieron metodologías para identificar especies de *Meloidogyne* spp mediante electroforesis de proteínas e isoenzimas. Éstos fueron los primeros métodos moleculares aplicados en nematología. En los últimos años Carneiro et al. (2000) y Xu *et al.* (2004), evaluaron poblaciones mediante análisis de isoenzimas, reportando 18 y 5 fenotipos de esterasas respectivamente. Los extractos solubles de proteínas son separados en gel de poliacrilamida bajo un campo eléctrico de acuerdo a su diferente masa molecular (PAGE). La electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2-D- PAGE) puede también ser usada para una mejor separación. En este caso las proteínas son separadas en la primera dimensión de acuerdo a su punto isoeléctrico y en la segunda de acuerdo a su masa molecular. Los perfiles electroforéticos de isoenzimas, particularmente de esterasas EST (EC 3.1.1.1) y malato deshidrogenasa MDH (EC 1.1.1.37) son diferentes para cada especie. También se usan perfiles de super óxido dismutasa SOD (1.15.1.1) glutamato-oxalacetato transaminasa GOT (EC 2.6.1.1) (Karssen y Moens, 2006; Subbotin y Moens, 2006; Blok y Powers, 2009). Esta metodología es muy sensible, siendo necesaria una sola hembra joven para obtener resultados. La comparación de perfiles electroforéticos de esterasas muestra gran consistencia para distinguir especies de *Meloidogyne* spp; sin embargo, los perfiles de malato deshidrogenasa ayudan en la identificación cuando los perfiles de esterasas son similares, por ejemplo, con *M. incognita* y *M. hapla* (Williamson, 1991). Algunas especies, como *M. arenaria*, muestran perfiles diferentes, aunque esto puede indicar de la existencia de especies crípticas (Hunt y Handoo, 2009).

5.7.4 Análisis molecular de ácidos nucleicos

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En años recientes, los avances en biología molecular y el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por Mullis en el año 1986, han facilitado el análisis del genoma de los organismos, permitiendo una identificación y diagnóstico rápido y preciso de los mismos (Louws *et al.*, 1999). Los análisis basados en PCR son específicos, muy sensitivos y permiten el estudio de un número considerable de muestras en menor tiempo que los métodos morfológicos (Michailides *et al.*, 2005). La PCR consiste en un método que permite multiplicar exponencialmente un pequeño fragmento de ADN, con el objetivo de incrementarlo hasta niveles detectables, es un procedimiento experimental que reproduce en el laboratorio un proceso esencial en la vida de la célula; la replicación del material genético. Requiere de un molde de ADN (material de partida) que contiene la región a amplificar, iniciadores o cebadores que flanquean la región de ADN patrón que se desea amplificar, el ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa o PfuI) y cuatro trifosfatos desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), para la síntesis de las cadenas complementarias, cofactores como el Mg^{2+} y un amortiguador de reacción que optimizan la actividad del ADN polimerasa (García, 2006). Un iniciador está formado por una pequeña secuencia de oligonucleótidos (15-30 nucleótidos), que se utiliza en la síntesis de ADN en la PCR. Esta secuencia encuentra y se une a su complemento en una de las bandas molde, lo cual permite que el ADN polimerasa encuentre un lugar en donde iniciar la extensión o elongación de la molécula de ADN. Los iniciadores pueden ser específicos a una secuencia de ADN o pueden ser universales. Los iniciadores universales son complementarios a secuencias de nucleótidos que son muy comunes en un grupo particular de moléculas de ADN, de este modo, son capaces de unirse con una variedad de ADN de diferentes especies. Los iniciadores correspondientes sólo a determinadas especies son llamados iniciadores específicos. Cuando las secuencias de las regiones del fragmento amplificado se desconocen, la técnica puede ser aplicada con iniciadores degenerados, conteniendo una serie de opciones en varias

posiciones en la secuencia que permite la amplificación de una variedad de secuencias relacionadas (Veilleux, 2004; Subbotin y Moens, 2006). El procedimiento consiste en una sucesión de tres pasos determinado por las condiciones de temperatura: (a) desnaturalización (94-96 °C durante 3-4 min.), (b) alineamiento/unión del iniciador (55-60 °C durante 1-2 min.) y (c) extensión/elongación de la cadena de ADN (70-72 °C durante 1-2 min.). Se lleva a cabo por 30-40 ciclos. Como resultado de la PCR, una molécula única de ADN se amplifica en más de un billón de copias. Los productos amplificados resultantes se separan por electroforesis según su tamaño en geles de poliacrilamida o agarosa y se visualiza con bromuro de etidio o algún otro colorante, que interactúa con el ADN de doble cadena y hace que se presenten fluorescencia bajo rayos ultravioleta (Subbotin y Moens, 2006).

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

El primer método para la identificación de *Meloidogyne* spp. basado en PCR utilizando enzimas de restricción, se reportó por Harris et al. (1990), donde se logró amplificar con éxito el ADN mitocondrial de especímenes aplastados en una gota de agua estéril y luego añadidos a la reacción de PCR. Posteriormente Powers y Harris (1993), diseñaron iniciadores para amplificar la región ITS del gen mitocondrial que codifica para citocromo oxidasa subunidad II y el gen rRNA 16S y los utilizaron para identificar *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla* y *M. chitwoodi*. Desde 1994, Powers y Harris señalaron que los métodos moleculares tendrían un impacto en la sistemática de los nematodos. En la actualidad la aplicación de la sistemática molecular ha ayudado a resolver inconsistencias en la clasificación morfológica y filogenia de estos organismos (Dorris et al., 1999). Hasta la fecha, los métodos moleculares basados en PCR, para la identificación de especies de *Meloidogyne*, incluyen en uso de regiones objetivos como: ADNmt (ADN mitocondrial) (Powers y Harris, 1993; Stanton et al., 1997; Tigano et al., 2005; Powers et al., 2005), ADNr (ADN ribosómico o ribosomal,) con perfiles de la región ITS (espaciador transcrito interno) (Zijlstra, 1997; Zijlstra et al., 1997), región IGS (espaciador intergénico) (Blok et al., 1997; Peterson et al., 1997;

Wishart *et al.*, 2002) y secuencias de genes 18S, 5.8 y 28S del ADNr. Los métodos incluyen el uso de RFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción) (Xu *et al.*, 2004), RAPD (amplificación aleatoria de ADN polimórfico) (Tigano *et al.*, 2010), AFLP (polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados) (Semblat *et al.*, 1998), sondas de ADN microsatélite y satélite (De Luca *et al.*, 2002; Castagnone-Sereno *et al.*, 1999), LAMP (Amplificación isotérmica mediada por lazo) (Niu *et al.*, 2011), multiplex PCR (Randing *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2011), iniciadores específicos SCAR (secuencias caracterizadas de la región amplificada) (Zijlstra, 2000; Zijlstra *et al.*, 2000; Randing *et al.*, 2002; Tigano *et al.*, 2010) y PCR en tiempo real (Zijlstra y van Hoof, 2006; Toyota *et al.*, 2008; Berry *et al.*, 2008; De Weerd *et al.*, 2011). La estrategia mediante RFLP, consiste en la amplificación de una región conservada del genoma (presente en todas las especies) y su posterior digestión con enzimas de restricción que revelan las diferencias entre las especies. Esto trae como resultado una serie de fragmentos de ADN que pueden ser ordenados por su tamaño y visualizados en un gel, a través de electroforesis. Se obtiene un patrón de digestión característico para cada especie. Un trabajo pionero con esta metodología fue el realizado por (Curran *et al.*, 1986), donde el ADN fue aislado a partir de un gran número de huevecillos del nematodo. Métodos más recientes basados en la PCR han utilizado iniciadores que distinguen a especies sin una etapa posterior de digestión. Los marcadores moleculares RAPDs son obtenidos tras la amplificación por PCR de segmentos al azar del ADN, utilizando secuencias arbitrarias de oligonucleótidos iniciadores. Williamson *et al.* (1997) sintetizaron iniciadores de PCR derivados de las secuencias RAPD, posteriormente esta técnica fue usada por Zijlstra (2000) y Zijlstra *et al.* (2000), quienes identificaron y secuenciaron fragmentos RAPD de *M. chitwoodi*, *M. fallax*, *M. hapla*, *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* para que a partir de éstos, diseñar iniciadores específicos SCAR. Algunas especies ya han sido sometidas a procesos de clonación y secuenciación, lo que ha permitido diseñar iniciadores específicos. Un iniciador SCAR es un marcador molecular obtenido por la conversión de un único producto del ADN polimórfico amplificado al azar en un sitio de secuencia marcada. Diversos iniciadores específicos SCAR han sido desarrollados por

diferentes investigadores (Randing *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2001; Meng *et al.*, 2004; Tigano *et al.*, 2010).

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

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

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

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Ubicación del experimento

La investigación se realizó en el laboratorio de Nematología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) Unidad Culiacán, situado en el km 5.5 de la carretera Culiacán-El dorado. Así mismo, se colectaron muestras de plantas de chile enfermas con el nematodo agallador de diferentes zonas de producción del estado de Sinaloa.

6.2 Colección de muestras

La colecta de muestras de plantas agalladas se realizó en diferentes zonas hortícolas del estado de Sinaloa (Cuadro 2 y Figura 1). Estas muestras consistieron recolectar raíces y suelo infestado con *Meloidogyne* spp. Para cada punto muestreados se realizó la georreferenciación, usando un equipo de GPS (eTrex H).



Figura 1. Puntos de muestreo en los Municipio que representan la zona productora de chile del Estado de Sinaloa.

Cuadro 1. Georreferenciación. Variedad de chile, municipio y coordenadas de los puntos muestreados en las zonas productoras de chile en el Estado de Sinaloa.

Población	Cultivo	Municipio	Localidad	Coordenadas
1	Poblano	Ahome	Los Mochis	25°39.000' N 108° 38.798'W
2	Jalapeño	Ahome	Los Mochis	25°35.217' N 108° 38.798' W
3	Poblano	Ahome	Juan José Ríos	25°41.879' N 108° 23.567' W
4	Poblano	Culiacán	Paredes	24°32.283' N 24°32.543' W
4	Poblano	Culiacán	Paredes	24°32.284' N 107°28.474' W
5	Bell pepper	Culiacán	El Tigre	24°40.06' N 107° 26.43' W
6	Bell pepper	Culiacán	El Tigre	24°29.33' N 107° 17.24' W
7	Poblano	Navolato	Villa Juárez	28°36.906' N 107° 27.988' W
8	Poblano	Navolato	Villa Juárez	28°36.889' N 107° 26.988' W
9	Bell pepper	Culiacán	La Flor	24°39.293' N 107° 29.025' W
10	Bell pepper	Culiacán	La Flor	24°39.291' N 107° 29.022' W
11	Poblano	Elota	Tanques	24° 03.238' N 107° 01.186' W
12	Poblano	Elota	Tanques	24° 01.039' N 106° 59.751' W
13	Bell pepper	Elota	La Paloma	24° 01.231' N 106° 59.086' W
14	Bell pepper	Elota	La Paloma	24° 01.039' N 106° 59.748' W
15	Poblano	Elota	Caimanes	23° 53.351' N 106° 54.028' W
16	Poblano	Elota	Caimanes	23° 53.323' N 106° 54.02' W
17	Bell pepper	Elota	Caimanes	23° 53.351' N 106° 54.031' W
18	Poblano	Elota	Sol y Arena	23° 57.504' N 106° 51.731' W
19	Poblano	Elota	Sol y Arena	23° 57.483' N 106° 51.642' W

20	Banano	El Rosario	L a Curva	23° 06.836' N 106° 01.924' W
21	Poblano	El Rosario	La Curva	23° 01.396' N 105° 55.211' W
22	Banano	El Rosario	El Walamo	22° 58.650' N 106° 09.348' W
23	Banano	El Rosario	El Walamo	22° 58.627' N 106° 09.349' W
24	Caribe	El Rosario	El Walamo	22° 57.619' N 106° 07.874' W
25	Poblano	El Rosario	El Walamo	22° 57.175' N 106° 07.378' W
26	Poblano	El Rosario	El Walamo	22° 57.175' N 106° 07.378' W
27	Jalapeño	El Rosario	El Walamo	22° 56.975' N 106° 07.128' W
28	Banano	El Rosario	El Walamo	22° 57.317' N 106° 06.643' W
29	Poblano	El Rosario	Agua Verde	22° 53.297' N 105° 59.293' W
30	Poblano	El Rosario	La Loma	22° 55.967' N 106° 06.518' W
31	Jalapeño	El Rosario	La Loma	22° 55.969' N 106° 06.514' W
32	Banano	Escuinapa	Isla del Bosque	22° 44.464' N 105° 50.404' W
33	Banano	Escuinapa	Isla del Bosque	22° 44.455' N 105° 50.376' W
34	Poblano	Escuinapa	Tecomatan	23° 01.117' N 105° 54.532' W

6.3 Extracción y montaje de hembras de *Meloidogyne* spp.

Las raíces fueron lavadas cuidadosamente sumergiéndolas en un depósito conteniendo agua, evitando el desprendimiento de las masas de huevecillos. Con ayuda de un microscopio estereoscópico y agujas de disección se abrió el tejido afectado tratando de no dañar las hembras maduras, las cuales fueron transferidas a tubos eppendorf con agua destilada, donde permanecieron por al menos 24 h. Se extrajeron 50 hembras maduras y se realizaron montajes de sus patrones perineales, los cuales fueron observados en microscopio óptico con 600 y 1200 aumentos. Para la realización de los montajes del patrón perineal, se ubicó el diseño perineal en la

hembra madura y se procedió a cortarlo en forma rectangular. Los cortes perineales fueron colocados en un portaobjeto conteniendo una gota de lactoglicerol; orientando la vulva del diseño hacia la parte superior del portaobjeto; así como, la parte interior de la cubierta del cuerpo hacia abajo. Se colocó un cubre objeto y se selló con esmalte de uñas, colocando las etiquetas con su código respectivo.

6.4 Extracción de especímenes juveniles de segundo estado de *Meloidogyne* spp.

La extracción de juveniles se realizó incubando 200 g de raíces infectadas con *Meloidogyne* spp., procedentes de las poblaciones aisladas; las que fueron lavadas en agua corriente y tamizadas en tamiz de 100, 325 y 500 mallas procesadas con la técnica de centrifugación (Carneiro *et al.*, 2014), los que fueron observados en microscopio óptico con 100, 400, 600 y 1200 aumentos.

6.5 Identificación morfológica de poblaciones de *Meloidogyne* spp.

Las características empleadas para la identificación de *Meloidogyne* spp., se basaron principalmente en la morfología del patrón perineal de las hembras y la morfología de la cabeza de los especímenes machos. La interpretación de estas observaciones se realizó según las características e ilustraciones descritas por distintos autores (Eisenback *et al.*, 1983; Taylor y Sasser, 1983; Eisenback, 1985; Hunt y Handoo, 2009). Los caracteres morfológicos del patrón perineal usados en la identificación fueron: forma del diseño perineal (rectangular, circular, oval, piriforme, de reloj de arena, etcétera), arco dorsal (alto, bajo redondeado, aplanado), líneas laterales (presentes o ausentes), forma de las estrías (finas, gruesas, cortas, quebradas, lisas, onduladas, en zigzag), hombreras (presentes o ausentes), puntuaciones al término de la cola (presentes o ausentes), alas en uno o a ambos lados del diseño (presentes o ausentes). Los caracteres particulares que permitieron llegar a una identificación de especies se mencionan en el Cuadro 2. Para el caso de especímenes machos, los caracteres morfológicos y morfométricos usados en la identificación fueron: forma del contorno del disco labial, forma de la cápsula y región cefálica y distancia desde el orificio de la glándula esofágica dorsal a la base del estilete (DGED). Los caracteres

particulares de especímenes machos, que complementaron la identificación morfológica de especies, fueron los mencionados en el Cuadro 2.

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

Especie	<i>M. incognita</i>	<i>M.javanica</i>	<i>M.arenaria</i>	<i>M.hapla</i>
Patrón perineal	Arco dorsal alto y cuadrado.	Redondeado con arco dorsal bajo a moderadamente alto.	Arco dorsal de redondeado a plano.	Arco dorsal generalmente es aplanado, frecuentemente con puntuaciones en el área donde termina la cola.
Campo lateral	Sin líneas laterales claramente visibles.	Líneas laterales claramente visibles, formando doble incisuras.	Sin líneas laterales claramente visibles.	Las líneas laterales no son visibles.
Estrías	Lisas a onduladas moderadamente finas.	Lisas a onduladas moderadamente finas.	Estrías dorsales y ventrales bifurcadas, uniéndose en ángulo en los campos laterales	Lisas a onduladas, algunas estrías pueden prolongarse lateralmente y formar una o dos alas.
Región perivulvar	Frecuentemente se observan estrías que se dirigen hacia la vulva.	Frecuentemente se observan estrías que se dirigen hacia la vulva.	Algunas estrías se dirigen hacia la vulva.	Algunas estrías se dirigen hacia la vulva.

6.6 Identificación molecular mediante PCR de poblaciones de *Meloidogyne* spp.

Extracción de ADN de *Meloidogyne* spp.

Después de realizar la identificación morfológica, se extrajeron especímenes hembras del nematodo y masas de huevecillos, de las cuales se obtuvo el ADN para las pruebas moleculares.

Extracción de ADN a partir de especímenes hembras:

Método de extracción de ADN. Se llevó a cabo la metodología utilizada por Cenis (1992) y Karajeh *et al.* (2010).

Para la confirmación de la identidad de *Meloidogyne* a nivel especie, las raíces de las raíces de chile agalladas se lavaron con agua destilada para remover el suelo, se seleccionaron agallas individuales, de donde se extrajeron 50 hembras con una aguja de disección y se depositaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml, posteriormente, se añadió una alícuota de 45 µl de buffer de lisis (NaOH 50 mM) para después macerar las hembras con la ayuda de un pistilo, el contenido se sometido a lisis por calor a 95 °C por 10 min, se agregó un alícuota de TRIS HC PH 7-8 y se centrifugó a 10,000 rpm durante 3 min y se recuperó el sobrenadante.

6.6.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para realizar la PCR se utilizaron los iniciadores generales F-M y R-M (*Meloidogyne* spp.) y los iniciadores específicos F-jav y R-jav (*Meloidogyne javanica*), Me-R y Me-R (*Meloidogyne enterolobii*), Mi-F y Mi-R (*Meloidogyne incognita*), Ma-F Y Ma-R (*Meloidogyne arenaria*), Mha-F y Mha-R (*Meloidogyne hapla*), que codifican para la región 28S ARNr.Hu.

Las reacciones de la PCR se realizaron utilizando el sistema de PCR Core System 1 (Promega). El volumen de la mezcla fue de 25 µl para todas las reacciones. La amplificación del ADN se llevó a cabo en un termociclador (BIO-RAD T100).

6.6.2 Visualización de ADN amplificado, por electroforesis.

Una alícuota de 5 µl del producto de PCR se visualizó en un gel de agarosa al 1%, teñido con 2.5 µl de midori Green, se utilizaron 0.75 µl de marcador molecular de 100 pb y 1 µl de colorante blue orange loading dye, 6x promega. Las condiciones de electroforesis fueron 60 voltios y 250 amperes durante 90 min; El registro fotográfico de los productos de PCR se obtuvieron mediante un transiluminador Benchtop UV.

Se consideró como respuesta positiva una banda visible con las pb correspondientes a cada iniciador.

Cuadro 3. Iniciadores utilizados. se utilizaron seis pares de iniciadores: un iniciador general y cinco iniciadores específicos, con las cadenas correspondientes, se indica también el número de pares de bases esperado para cada iniciador.

Iniciadores	Cadena	Amplificones esperados
M-F y M-R (<i>Meloidogyne</i>)	5'-GGGGAGGAACATACTTCTCCGTCC 5'-CAGGCCCTTCAGTGGAACATAAC	500 pares de bases
Jav-F y Jav-R (<i>Meloidogyne javanica</i>)	5'-CAGGCCCTTCAGTGGAACATAAC 5'-GGTGC GCGATTGAACTGAGC	670 pares de bases
Me-F y Me-R (<i>Meloidogyne enterolobii</i>)	5'-AACTTTTGTGAAAGTGCCGCTG 5'-TCAGTTCAGGCAGGATCAACC	256 pares de bases
Mi-F y Mi-R (<i>Meloidogyne incognita</i>)	5'-GGGGAGGAACATACTTCTCCGTCC 5'-GTGAGGATTTCAGCTCCCCAG	1000 pares de bases
Ma-F y Ma-R (<i>Meloidogyne arenaria</i>)	5'-TCGAGGGCATCTAATAAAGG 5'-GGGCTGAATATTCAAAGGAA	950 pares de bases
Mha-F y Mha-R (<i>Meloidogyne hapla</i>)	5'-GGCTGAGCATAGTAGATGATGTT 5'-ACCCATTAAGAGGAGTTTTGC	960 pares de bases

Sunil K. *et al.*, 2012; Martínez-Gallardo *et al.*, 2015; García *et al.*, 2018.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Identificación morfométrica y morfológica de las poblaciones de *Meloidogyne* spp. en las zonas productoras de chile en Sinaloa.

Después de realizar mediciones morfométricas de largo del cuerpo, largo de la cola y largo de la parte hialina en juveniles y hacer la comparación con las medidas descritas en el libro de "Root-Knot nematodes" de Perry y Moens (2009), se identificaron las especies *incognita* y *enterolobii*.

De las 34 muestras colectadas y procesadas, se identificaron dos especies, las cuales son de distribución cosmopolitas y poseen un amplio rango de hospedantes, según Perry y Mons (2009). En el Cuadro 4 se enlistan las mediciones obtenidas de cada una de las especies identificadas.

Cuadro 4. Características morfométricas obtenidas de cada especie de juveniles de segundo estadio y descripción de cada especie.

Especie	Largo del cuerpo μm	Descripción original μm	Largo de la cola μm	Descripción original μm	Largo de la parte hialina de la cola μm	Descripción original μm
<i>M.incognita</i>	360-435	350-450	49-65	43-65	12.5-14	6-14
<i>M.enterolobii</i>	450-470	405-472.9	44.2-61	41.5-63.4	14-22.6	5-30

Los juveniles se caracterizaron por ser vermiformes anillados (Figura 2). Los machos son ligeramente anillados hacia adelante, redondeados de la parte posterior, la cola tiene una terminación pronunciada, como punta de lápiz y mide de 44.2 a 61 μm , la región hialina mide 14 a 22.6 μm y el estilete oscila entre 21.3 y 24.9 μm para el caso de *M. enterolobii* (Figura 3). Las características observadas coinciden con lo reportado por Martínez-Gallardo *et al.*, (2015), el reporto la presencia de *M. enterolobii* parasitando tomate, que si bien no se trata del mismo cultivo, la investigación se realizó en el Estado de Sinaloa.

En la Figura 4 puede observarse una cola cónica y las medidas oscilan entre 49 y 65 μm . En la Figura 5 se observa un estilete cuya longitud es de 10 a 14 μm , los nódulos son anchos y posteriormente redondeados, las medidas de la región hialina oscilaron entre 10.5 y 14 μm estas características corresponden a *M. incognita* y coinciden con las características reportadas por Carrillo *et al.*, (2000)



Figura 3. Juvenil dos de *M. enterolobii*.



Figura 2. Estilete de *M. enterolobii*.



Figura 5. Cola de un Juvenil dos de *M. incognita*.

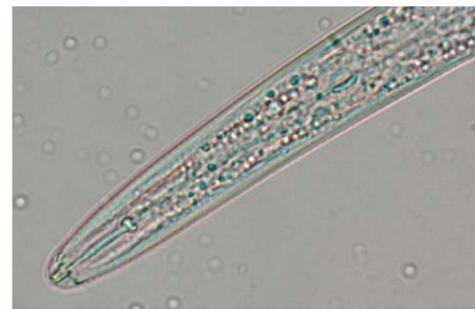


Figura 4. Estilete de *M. incognita*.

Según la metodología utilizada, únicamente sugiere la medición del largo del cuerpo, largo de la cola y largo de la parte hialina de la cola para la identificación de las especies.

7.2 Identificación de especies de hembras del género *Meloidogyne* spp.

Las hembras no están sujetas a los mismos parámetros de identificación morfométrica que los machos y juveniles, para las hembras, una de las características más importante para la identificación de las especies es el patrón perineal. Es crucial identificar las características esenciales de cada patrón, con el fin de evitar una errónea identificación.

La metodología utilizada en este estudio sugiere la descripción del patrón perineal para la identificación de las especies, pero otros autores sugieren que pueden realizarse mediciones útiles para la identificación de las especies de hembras; la medición del largo del estilete parece ser útil para la diferenciación porque exhibe una limitada variación intraespecífica y existe un amplio rango en el género que va de las 10 a las 25 μ . En el caso de las hembras, se identificadas dos especies (*M. incognita* y *M. enterolobii*), siendo *M. incognita* una de las especies más comunes a nivel mundial y la segunda es una especie que en la actualidad está ocasionando daños impactantes en varios cultivos y diversas zonas productoras (Martinez-Gallardo *et al.*, 2015). Las descripciones del patrón perineal para su comparación con las descritas en el estudio, fueron tomadas de Shurtleff y Averre III (2009), Sandoval y Lomas (2007) y Perry y Moens (2009). En las Figuras 5 y 6, se muestran los patrones correspondientes a las dos especies identificadas.

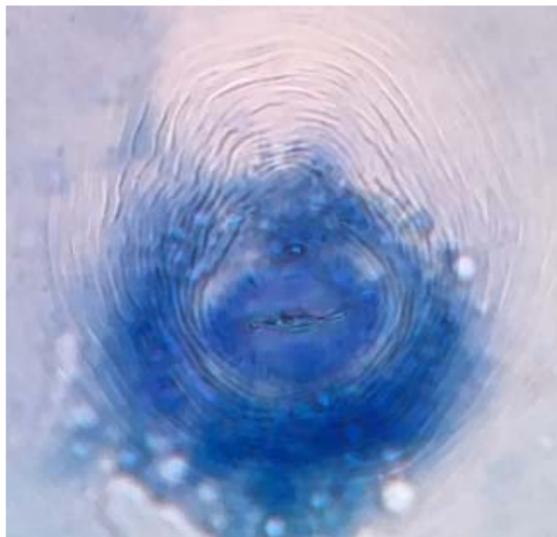


Figura 6. Corte perineal de una hembra de *M. enterolobii*.

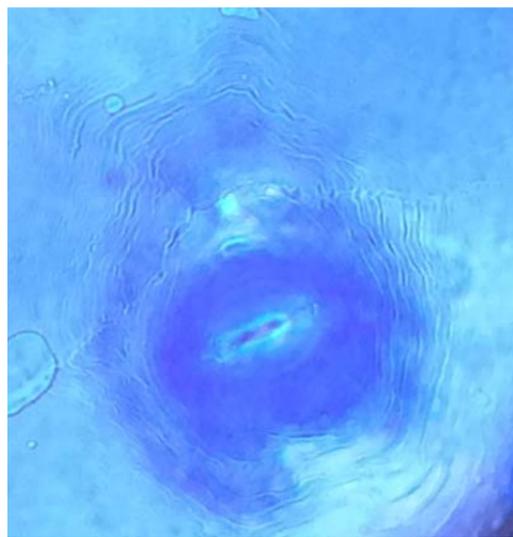


Figura 7. Corte perineal de una hembra de *M. incognita*.

En el patrón perineal de la figura 6, se puede observar ondulaciones pronunciadas de las estrías dorsales, haciendo parecer que el arco dorsal posee “hombreras”. El arco dorsal es bajo y redondeado, a excepción donde las estrías ventrales se extienden para formar “alas”, por lo tanto, pertenece a la especie *M. enterolobii*, lo que coincide con lo reportado por Martínez-Gallardo *et al.*, (2015).

El patrón perineal de la Figura 7, pertenece a la especie *M. incognita*, ya que es algo ovalado, posee un alto e irregular arco formado por líneas onduladas, la parte interna del arco dorsal presenta numerosos zigzags y estrías quebradas, la estría dorsal y ventral tiende a volverse bifurcada a lo largo de la línea lateral, lo cual coincide con lo reportado por Peraza-Padilla *at al.* (2013).

7.3 Identificación molecular de las especies de *Meloidogyne*, presentes en las zonas productoras de chile en Sinaloa.

En el primer carril se observa un marcador de 1000 pb, en el carril dos se colocó un carril negativo, mientras que en carril 3 se depositó un blanco, el carril 4 corresponde al género *Meloidogyne* con amplicón de 500 pb, en los carriles del 5 al 8 se observa un amplicón de 1000 pb correspondientes a *M. incognita*, este resultado coincide con lo reportado por Pérez-Padilla *et al.* (2013), en los carriles que van del 9 al 10 corresponden a *M. enterolobii* con un amplicón de 256 pb, estos coincide por lo reportado por Martínez-Gallardo *et al.* (2015), ya que se esperó un amplicon de 256 pb para el caso de *M. enterolobii*, tal como se muestra en la Figura 8.

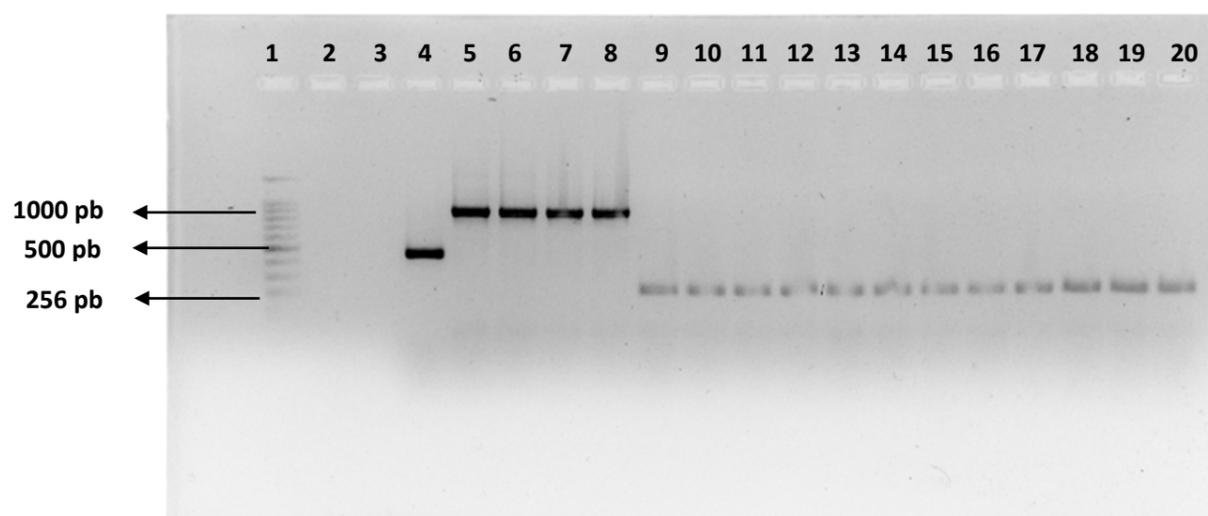


Figura 8. Identificación molecular de las especies de *Meloidogyne*, en gel de agarosa.

7.4 Determinación de las especies de *Meloidogyne* presentes en el cultivo de chile y su distribución.

De las 34 poblaciones colectadas, se encontró que 78% corresponde a la especie *M. enterolobii* y el 22% fue *M. incognita* (Cuadro 5), las especies identificadas se observó que se encontraban hospedando las variedades de chile Poblano, Jalapeño, Bell Pepper, Banano y Caribe (Cuadro 5).

Cuadro 5. Incidencia de especies de *Meloidogyne* en las zonas productoras del Estado de Sinaloa.

Especie de <i>Meloidogyne</i>	Distribución de especies	Porcentaje
<i>M. enterolobii</i>	32	78
<i>M. incognita</i>	9	22
<i>Total</i>	41	100

El Cuadro 6 y Figura 9, muestra cómo se distribuyen las especies de *Meloidogyne* en el estado de Sinaloa, en la zona Norte (Ahome), Centro Norte (Navolato) y Centro (Culiacán) se observó solo presencia de *M. enterolobii* en el cultivo de chile, en cambio la zona Centro Sur (Elota) y Sur (El Rosario y Escuinapa), se muestra la presencia de las especies de *M. enterolobii* y *M. incognita* en diversas variedades de chile.

Cuadro 6. Distribución de *Meloidogyne* spp., variedades de chile afectadas, en las zonas productoras de chile en el Estado de Sinaloa.

Zonas	Municipios	Variedades de chile	Especie de <i>Meloidogyne</i>	Puntos muestreados	Distribución por zona	Porcentaje por zona
Norte	Ahome	Jalapeño y Poblano	<i>M. enterolobii</i>	3	3	100
			<i>M. incognita</i>		0	0
Centro Norte	Navolato	Poblano	<i>M. enterolobii</i>	2	2	100
			<i>M. incognita</i>		0	0
Centro	Culiacán	Poblano, Bell Pepper	<i>M. enterolobii</i>	5	5	100
			<i>M. incognita</i>		0	0
Centro sur	Elota	Poblano, Bell Pepper	<i>M. enterolobii</i>	9	9	75
			<i>M. incognita</i>		3	25
Sur	El Rosario y Escuinapa	Banano, Poblano, Jalapeño y Caribe	<i>M. enterolobii</i>	15	13	68
			<i>M. incognita</i>		6	32
<i>Total</i>				34	41	

La distribución de *M. enterolobii* en todas las zona del estado de Sinaloa fue mayor en relación a *M. incognita*, debe de ser un punto de alerta para el método de control, ya que lo reportado por Melo *et al.* (2011), donde evaluaron 25 genotipos de chile (*C. annuum*) y tomate, observaron poca resistencia moderada en algunos materiales de

chile, donde los genotipos de *C. chinense* fueron susceptibles a *M. enterolobii*, con factores de reproducción de 2.74 a 12.62, menores que los obtenidos en *C. annuum*, en el mismo experimento, en el cual solamente el genotipo de *C. frutescens* fue considerado resistente.

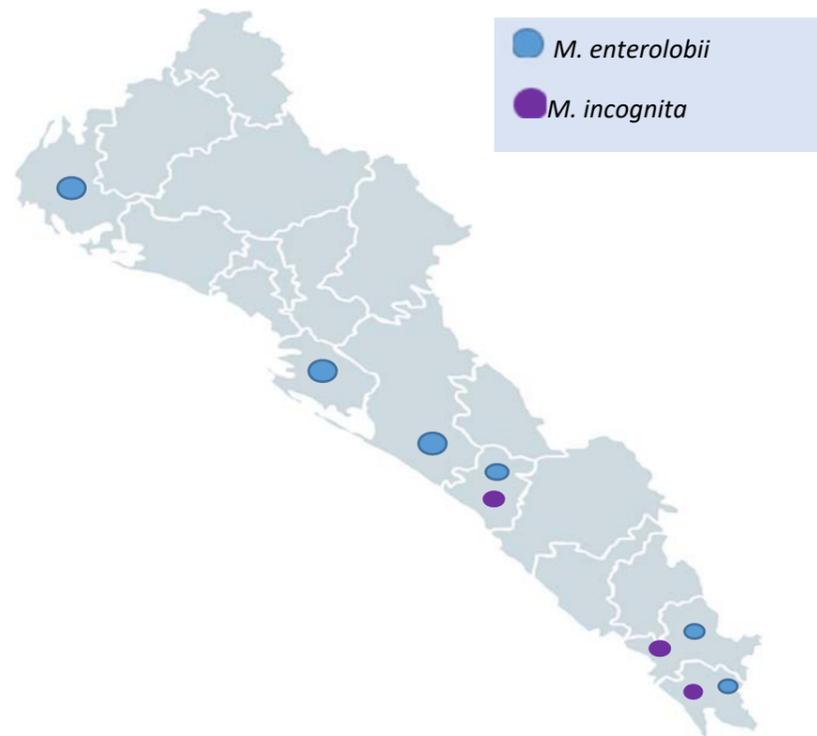


Figura 9. Mapa de distribución de especies de *Meloidogyne* presentes en las zonas productoras de chile en el Estado de Sinaloa.

VIII. CONCLUSIONES

El estudio morfológicamente y morfométricamente mostró la identificación de *M. incognita* y *M. enterolobii*, siendo ratificado con el estudio molecular. *M. enterolobii* mostró su presencia en todas las zonas productora de chile muestreadas, en cambio *M. incognita* solo se observó su presencia en la zona centro-sur y sur del estado de Sinaloa.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, GN. 1996. Fitopatología. D.F, México. 2^{ed}. Limusa. 838 p.
- Canto-Sáenz, M. 2010. Separatas del Curso de Nematología. Lima, Perú. Escuela de Posgrado. Especialidad de Fitopatología. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Carneiro, R.M.D.G., Almeida, M.R.A; and Quénhervé, P. 2000. Enzyme phenotype of *Meloidogyne* spp. populations. *Nematology* 2:645-654.
- Carrillo, F. J.A., García E.R.S., Allende M. R., Márquez Z, I., y Cruz O. J.E. 2000. Identificación y distribución de especies del nematodo nodulador (*Meloidogyne* spp) en hortalizas en el Estado de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 18 (2): 115-119.
- Castagnone-Sereno, P., Leroy, F., Bongiovanni, M; Zijlstra, C; and Abad, P. 1999. Specific diagnosis of two root-knot nematodes, *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*, with satellite DNA probes. *Phytopathology* 89:380-384.
- Cenis, J.L. 1992. Identification of four major *Meloidogyne* spp. by Random Amplified Polimorphic DNA (RAPD-PCR). *Phytopathology* 83:76-78.
- Curran, J., McClure, M.A., and Webster, J.M. 1986. Genotypic differentiation of *Meloidogyne* populations by detection of restriction fragment length difference in total AND. *Journal of Nematology* 18:83-86.
- De Luca, F., Reyes, A., Veronico, P., Di Vito, M., L., Mberti, F., and De Giorgi, C. 2002. Characterization of the (GAAA) microsatellite region in the plant parasitic nematode *Meloidogyne artiellia*. *Gene* 293, 191-198.
- Eisenback, J.D., and Hirschmann, H. 1991. Root-knot nematode: *Meloidogyne* spp. and races. In Nickle, WR. *Manual of Agricultural Nematology*. New York. USA. Marcel Dekker. p. 191-274.

- Eisenback, J.D., and Hunt D.J. 2009. General Morphology. Root-knot nematodes, UK. CAB International, p. 18-50.
- Eisenback, J.D., Hirschmann, H., Sasser, J.N. y Triantaphyllou, A.C. 1983. Guía para la identificación de las cuatro especies más comunes del nematodo agallador (*Meloidogyne* spp.), con una clave pictórica. North Carolina. USA. Dept. Plant Pathology and Genetics North Carolina State University and United State Agency for International Development. North Carolina State University Graphics. 48 p.
- Eisenback, J.D. 1985. Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). In Sasser, JN; Carter, CC. eds. An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. v 1: Biology and Control. North Carolina. USA. Dept. Plant Pathology and United State Agency for International Development. North Carolina State University Graphics. p. 95-112.
- Esbenshade, P.R., and Triantaphyllou, A.C. 1985. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 17, 6-20.
- Evans, A.A.F., and Perry, R.N. 2009. Survival mechanisms. Root-knot nematodes. London, UK. CAB International. p. 201-219.
- García, A. 2006. Identificación de especies de nematodos fitopatógenos de los géneros *Globodera* spp. y *Meloidogyne* spp. por medio de dos técnicas moleculares. Informe de Práctica de Especialidad en Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 47 p.
- García, C.T., Evangelista V.L., Lopes E.A., Goncalves O.C.M., and Vieira I.P 2018. Diagnostic methods for identification of root-knot nematodes species from Brazil. *Ciencia Rural* 48(02).
- Handoo, Z.A., Nyczepir, A.P., Esmenjaud, D., Van der Beek, J.G., Castagnone Sereno, P., Carta, L.K., Skantar, A.M., and Higgins, J.A. 2004. Morphological,

molecular, and differential-host characterization of *Meloidogyne floridensis* n. sp. (Nematoda: *Meloidogynidae*), a root-knot nematode parasitizing peach in Florida. *Journal of Nematology* 36:20–35

Harris, T.S., Sandall, L.J., and Powers T.O. 1990. Identification of single *Meloidogyne* juveniles by Polymerase Chain Reaction Amplification of Mitochondrial DNA. *Journal of Nematology* 22(4):518-524.

He, B., Magill, C., and Starr, J.L. 2005. Laser capture microdissection and real-time PCR for measuring mRNA in giant cells induced by *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology* 37, 308–312.

Hirschmann, H. 1985. The genus *Meloidogyne* and morphological characters differentiating its species. In Sasser, JN; Carter, CC. eds. *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. v. 1: Biology and Control. North Carolina. USA. Dept. Plant Pathology and United State Agency for International Development. North Carolina State University Graphics. p. 79-93.

Hirschmann, H. 1986. *Meloidogyne hispanica* n. sp. (Nematoda: *Meloidogynidae*), the “Seville Root-Knot Nematode”. *Journal of Nematology*. 18(4): 520-532.

Hu, M.X., Zhuo, K., and Liao, J.L. 2011. Multiplex PCR for the simultaneous identification and detection of *Meloidogyne incognita*, *M. enterolobii*, and *M. javanica* using DNA extracted directly from individual galls. *Phytopathology* 101 (11):1270-1277.

Hunt, D.J, and Handoo, Z.A. 2009. Taxonomy, identification and principal species. Root-knot nematodes. London, UK. CAB International. p. 55-88.

Hunt, D.J., and Perry, R.N. 2009. Reproduction, Physiology and Biochemistry. Root-knot nematodes. London, UK. CAB International. p. 182-194.

Hussey, R.S. 1979. Biochemical systematics of nematodes: a review. *Helminthological abstracts (series B)* 48: 141-148.

- Jaraba, J.D., Lozano, Z., y Suarez, I.E 2003. *Meloidogyne incognita* (Kafoid and White 1919) Chiwood 1949 y *Meloidogyne arenaria* (Neal 1989) Chitwood 1949: nematodos de las nudosidades radiculares en guayaba (*Psidium guajava* L.) C.V manzana en Monteria, Córdoba. Temas agrarios 8(2): 15-21.
- Jeyaprakash, A., Tigano, M.S., Brito, J., Carneiro, G.D.M.R., and Dickson, W.D. 2006. Differentiation of *Meloidogyne floridensis* from *M. arenaria* using high-fidelity PCR amplified mitochondrial at-rich sequences. Nematropica 36(1): 1-12.
- Karsen, G, and Moens, M. 2006. Root-knot nematodes. In Perry, RN., Moens, M. eds. Plant Nematology. London, UK. CAB International. p. 59-88.
- Landa, B.B., Palomares, R, J.E., Vovlas, N., Carneiro, R.M.D.G., Maleita, C.M.N., and Abrantes, I.M de O. 2008. Molecular characterization of *Meloidogyne hispanica* (Nematoda, *Meloidogynidae*) by phylogenetic analysis of genes within the rDNA in *Meloidogyne* spp. Plant Disease 92, 1104–1110.
- Louws, F.J., Rademake, r, J.L.W., and De Bruijin, F.J. 1999. The three Ds of PCR-Based Genomic Analysis of Phytobacteria: Diversity, Detection, Disease Diagnose. Annual Review Phytopathology 37:81- 125.
- Luc, M., Sikora, R.A, and Bridge, J. 1990. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Wallingford, UK. CAB International, 629 p.
- Lunt, D.H., Whipple, L.E., and Hyman, B.C. 1998. Mitochondrial DNA variable number tandem repeats (VNTRs): Utility and problems in molecular ecology. Molecular Ecology 7:1441–1455. 84
- Magunacelaya, J, and Dagnino, E. 1999. Nematología agrícola en Chile. Chile. Serie Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas. 253 p.
- Martínez-Gallardo, J.A., Díaz, V.T., Allende, M.R., García, E.R.S., y Carrillo, F.J.A. 2015. Primer reporte de *Meloidogyne enterolobii* parasitando tomate en

Culiacán, Sinaloa México, Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 11, 2165-2168.

Michailides, T.J., Morgan, D.P., Ma, Z., Luo, Y., Felts, D., Doster, M.A., and Reyes, H. 2005. Conventional and molecular assays aid diagnosis of crop diseases and fungicide resistance. *California Agriculture* 59:115-123.

Moens, M., Perry, R.N., and Starr, J.L. 2009. *Meloidogyne* species - a diverse group of novel and important plant parasites. In Perry, RN; Moens, M; Starr, JL. eds. Rootknot nematodes. London, UK. CAB International, p. 1-13.

Niu, J., Guo, Q., Jian, H., Chen, C., Yang, D., and Liu, Q. 2011. Rapid detection of *Meloidogyne* spp, by LAMP assay in soil and roots. *Crop Protection* 30, 1063-1069.

Papadopoulou, J, and Triantaphyllou, C. 1982. Sex differentiation in *Meloidogyne incognita* and anatomical evidence of sex reversal. *Journal of Nematology* 14(4):549-566.

Pereza-Padilla, W., Rosales F.J., Esquivel H.A., Hilje R.I., Molina B.R., y Castillo C.P 2013. Identificación morfológica, morfométrica y molecular de *Meloidogyne incognita* en higuera (*Ficus caria* L.) en Costa rica. *Agrónoma Mesoamericana* 24 (2): 337-446.

Perry, R., Moens, M., and Starr, J. 2009. Biochemical and molecular identification. Root-knot nematodes. London, UK. CAB nternational, p. 98-112.

Powers, T.O, and Harris, T.S. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* spp. *Journal of Nematology* 25, 1-6.

Powers, T.O., Mullin, P.G., Harris, T.S., Sutton, L.A., and Higgins R.S. 2005. Incorporating molecular identification of *Meloidogyne* spp. into a large-scale regional nematode survey. *Journal of Nematology* 37, 226–35.

- Rammah, A, and Hirschmann, H. 1990. *Meloidogyne morocciensis* n. sp. (*Meloidogyninae*), a root-knot nematode from Morocco. *Journal of Nematology*. 22(3): 279-291
- Randing, O., Bongiovanni, M., Carneiro, R.M.D.G., and Castagnone-Sereno, P. 2002. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. *Genome* 45, 862-870.
- Rodríguez, M. 2000. Identificación y caracterización de *Meloidogyne mayaguensis* (Nemata: *Meloidogynidae*) en el cafeto en Cuba. Tesis Grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. Cuba. Universidad Agraria de la Habana Fructuoso Rodríguez Pérez, 145 p.
- Sasser, J.N., Eisenback, J.D., Carter, C.C., and Triantaphyllou, A.C. 1983. The International *Meloidogyne* Project-Its Goals and Accomplishments. *Annual Review of Phytopathology* 21: 271-288.
- Stanton, J., Hugall, A., and Moritz, C. 1997. Nucleotide polymorphisms and an improved PCR-based mtDNA diagnostic for parthenogenetic root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Fundam. Appl. Nematol.* 20:261-268.
- Subbotin, S.A., Madani, M., Krall, E., Sturhan, D., and 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.
- Sumil, K, S., Huma, R.K., and Lockhart P. 2012 Distribution and diversity of root-knot nematodes in agricultural areas of Fiji. *Nematropica* 42 (1): 16-25.
- Taylor, A, y Sasser, J. 1983. Biología, identificación y control de los nemátodos del nódulo de la raíz. North Carolina. EE.UU. Proyecto Internacional de *Meloidogyne*. Publicación Cooperativa entre el Departamento de Fitopatología de la Universidad del Estado de Carolina del Norte y la Agencia de EEUU para el desarrollo Internacional. 111 p.

- Tigano, M.S., Carneiro, R.M.D.G., Jeyaprakash, A., Dickson, D.W.D., and Adams, B.J.A. 2005. Phylogeny of *Meloidogyne* spp. based on 18S rDNA and the intergenic region of mitochondrial DNA sequences. *Nematology* 7, 851-862.
- Tigano, M.S., Siqueira, K.D., Castagnone-Sereno, P., Mulet, K., and Queiroz, P. 2010. Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* and development of a SCAR marker for this guava-damaging species. *Plant Pathology* 59, 1054-1061.
- Tokue, Y., Shoji, S., Satoh, K., Watanabe, A., and Motomiya, M. 1992. Comparison of a polymerase chain reaction assay and a conventional microbiologic method for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36(1):6.
- Xu, J., Liu, P., Meng, Q., and Long, H. 2004. Characterisation of *Meloidogyne* species from China using isozyme phenotypes and amplified mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism. *European Journal of Plant Pathology* 110, 309–315.
- Zijlstra, C, and Van Hoof, R.A. 2006. A multiplex real-time polymerase chain reaction (TaqMan) assay for the simultaneous detection of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*. *Phytopathology* 96, 1255–1262.
- Zijlstra, C. 1997. A fast PCR assay to identify *Meloidogyne hapla*, *M. chitwoodi* and *M. fallax* and to sensitively differentiate them from each other and from *M. incognita* in mixtures. *Fundam. Appl. Nematol.* 20:505-511.
- Zijlstra, C. 2000. Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* based on SCAR-PCR: A powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits. *Eur. J. Plant Pathol.* 106:283- 290.
- Zijlstra, C., Donkers-Venne, D.T.H.M., and Fargette, M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using Sequence 90

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

Zijlstra, C., Lever, A.E.M., Uenk, B.J., and Van Silfhout, C.H. 1995. Differences between ITS regions of isolates of root-knot nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. *Phytopathology* 85:1231-1237.

Zijlstra, C., Uenk, B.J., and Van Silfhout, CH. 1997. A reliable, precise method to differentiate species of root-knot nematodes in mixtures on the basis of ITS-RFLPs. *Fundam. Appl. Nematol.* 20:59-63.