

## Nota Técnica

# DETECCIÓN DE *Meloidogyne incognita* EN TUBÉRCULOS DE PAPA EN COSTA RICA

Zeidy Montero\*, Catalina García\*\*, Luis Salazar\*, Roberto Valverde\*\*, Luis Gómez-Alpizar<sup>1/\*\*</sup>

**Palabras clave:** Papa, *Meloidogyne*, diseño perineal, caracterización molecular, PCR.

**Keywords:** Potato, *Meloidogyne*, perineal patterns, molecular characterization, PCR

Recibido: 01/12/06

Aceptado: 27/02/07

## RESUMEN

Especies del género *Meloidogyne* causan importantes daños al cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L) alrededor del mundo. Su efecto puede ser directo al disminuir el rendimiento o indirecto al infectar los tubérculos y causar agallas o protuberancias, que les confiere una apariencia verrugosa, que afecta su calidad y reduce su valor comercial. En Capellades y Llano Grande de Cartago, Costa Rica, fueron encontrados tubérculos de papa, de la variedad Floresta y del clon Bananito, con numerosas protuberancias en su superficie. De las protuberancias se extrajeron hembras ovígeras de *Meloidogyne* spp. Estudios morfológicos (diseño perineal de las hembras) y moleculares (PCR y PCR-RFLP) mostraron que las hembras extraídas de las protuberancias pertenecen a la especie *M. incognita*. Se recomienda estudiar las causas que promueven la infección de los tubérculos en ambas localidades, ya que cerca del 90% del área cultivada de papa en el país corresponde a la variedad Floresta. En adición, se debe prestar especial atención a las zonas semilleras, ya que los tubérculos-semilla podrían servir como fuente de inóculo y contribuir a la diseminación del patógeno a otras áreas.

## ABSTRACT

**Detection of *Meloidogyne incognita* in potato tubers in Costa Rica.** *Meloidogyne* species cause severe damage in potato (*Solanum tuberosum* L) worldwide. They can incite direct yield losses or may cause indirect damage in the form of protuberances or blisters on tubers, giving them a warty appearance. These deformations make tubers unmarketable. Potato tubers of cv Floresta and Bananito clone, with numerous blisters on the tuber surface, were found on 2 localities, Capellades and Llano Grande, in Cartago Province, Costa Rica. *Meloidogyne* spp. females were extracted from the blisters. Morphological and molecular (PCR and PCR-RFLP) assays showed that the extracted females belong to *M. incognita*. It is necessary to study the causes promoting the infection of the potato tubers, particularly because the Floresta cultivar occupies 90% of the potato area in the country. Special care must be taken with seed-potato production zones, since infected seed tubers may carry the pathogen to other areas.

1/ Autor para correspondencia. Correo electrónico lgomez@cariari.ucr.ac.cr

\* Centro de Investigación en Protección de Cultivos (CIPROC), Escuela de Agronomía, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

\*\* Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA), Escuela de Agronomía, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

## INTRODUCCIÓN

El género *Meloidogyne* Goeldi, 1887 (Nemata:Heteroderidae), agrupa a los nematodos formadores de nódulos radicales y comprende al menos 80 especies (Siddiqi 2000). En el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L), especies de este género causan importantes daños alrededor del mundo. Su efecto puede ser directo al disminuir el rendimiento por el daño al sistema radical o indirecto al infectar los tubérculos y causar agallas o protuberancias que les confiere una apariencia verrugosa que afecta su calidad y reduce su valor comercial.

Seis especies del género *Meloidogyne* son consideradas de importancia global en el cultivo de la papa y podrían causar daño a los tubérculos: *Meloidogyne arenaria*, *M. chitwoodi*, *M. fallax*, *M. hapla*, *M. incognita*, y *M. javanica*. Las 3 primeras son importantes en climas templados, mientras que las otras 3 lo son en climas tropicales y subtropicales (Vovlas *et al.* 2005). De estas especies *M. chitwoodi* y *M. fallax* no han sido aún encontradas en Costa Rica (López 1984). Las otras especies han sido detectadas en diferentes hospederos y localidades del país, incluida la papa, aunque no asociadas con daños a los tubérculos de papa (López y Dickson 1977, López y Salazar 1978, González y López 1980, Salazar 1980, López y Azofoifa 1981, López 1984, López y Salazar 1978, 1988, 1990).

La identificación correcta de la especie de *Meloidogyne* spp., presente en un área geográfica y responsable del daño observado en la planta o los tubérculos de papa, es indispensable para la implementación de medidas de combate, como el uso de cultivares resistentes, la rotación de cultivos y el establecimiento de medidas cuarentenarias (López y Salazar 1978, Vovlas *et al.* 2005).

Tradicionalmente, la identificación de especies de nematodos en general y del género *Meloidogyne* en particular, se basa en caracteres morfológicos y morfométricos (Taylor y Netscher 1974, Esser *et al.* 1976, Taylor y Passer 1978). En el género *Meloidogyne*, un procedimiento común para su identificación es el estudio del

diseño perineal en la región posterior del cuerpo de las hembras. Esta área comprende el término de la cola, fastidios, líneas laterales, ano y vulva, rodeados por pliegues cuticulares o estrías. Se considera que el patrón (diseño) de la región perineal es característico para cada especie (Franklin 1962, Taylor y Netscher 1974). Sin embargo, los procedimientos de determinación de especies, basados en morfología, son lentos, requieren un basto conocimiento en taxonomía, mucha experiencia, y en algunos casos no son concluyentes. En los diseños perineales, por ejemplo, se pueden presentar variaciones morfológicas que se apartan del patrón normal establecido para cada especie y algunas especies presentan diseños perineales muy parecidos (Brito *et al.* 2004).

En los últimos años, los avances en biología molecular y el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) (Mullis *et al.* 1986) han facilitado el análisis del genoma de los organismos, permitiendo una identificación y diagnóstico rápidos y precisos de los mismos (Louws *et al.* 1999). En adición, 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). Estas metodologías de diagnóstico molecular se están aplicando a nematodos, incluido el género *Meloidogyne*. Se espera que complementen los métodos tradicionales y en un futuro cercano se conviertan en métodos rutinarios de diagnóstico (Powers 2004). Para las especies de *Meloidogyne*, los análisis moleculares incluyen desde el estudio de fragmentos amplificadas al azar (RAPDs por sus siglas en inglés) hasta el empleo de imprimadores especie-específicos (Adam *et al.* 2007). Estos últimos son de mayor utilidad cuando se sospecha que una especie está asociada al daño observado en las plantas. Sin embargo, la estrategia más empleada para la determinación inicial de una especie, cuando se considera que varias especies pueden estar involucradas, 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 (PCR-RFLP). Se obtiene un patrón de digestión característico para cada especie. Alternativamente, se utilizan imprimadores que amplifican una región conservada, pero polimórfica en su longitud. Los productos de amplificación son de diferente tamaño para cada especie. Zijlstra *et al.* (1997) y Wishart *et al.* (2002) han empleado estas estrategias para una identificación rápida y precisa de las principales especies de *Meloidogyne*.

La infección de tubérculos de papa por *Meloidogyne* spp. ha sido previamente documentada en Argentina (Chaves y Torres 2001), Brazil (Charchar 1997) y Malta (Vovlas *et al.* 2005). Para Costa Rica, como se indicó anteriormente, no se cuenta con antecedentes sobre este tipo de infección en tubérculos de papa. A principios del 2006, tubérculos de papa de la variedad Floresta y del clon Bananito, provenientes de las localidades de Capellades y Llano Grande de la provincia de Cartago, mostraron deformaciones severas (protuberancias o agallamiento), típicas de las asociadas con la infección por *Meloidogyne* spp. Este hecho llamó la atención debido a que la variedad Floresta se emplea en el 90% del área cultivada de papa en Costa Rica.

En el presente trabajo se utilizó métodos morfológicos y moleculares para determinar la especie de *Meloidogyne* responsable del daño a los tubérculos de papa provenientes de la provincia de Cartago, Costa Rica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal.** En el presente estudio se utilizó tubérculos de papa de la variedad Floresta y del clon Bananito con protuberancias severas (Figura. 1), provenientes de las localidades de Capellades y Llano Grande de la provincia de Cartago, Costa Rica. Los tubérculos fueron enviados al Laboratorio de Nematología de la Universidad de Costa Rica.

**Extracción de los nematodos.** Los tubérculos fueron observados bajo un estereoscopio a 45X, y las hembras ovígeras de *Meloidogyne* fueron disectadas de las protuberancias, junto con masas de huevos.

**Identificación morfológica.** Diseños perineales de 10-20 hembras de cada localidad fueron preparados de acuerdo al método descrito por Franklin (1962) y modificado por Taylor y Netzcher (1974). Los diseños fueron observados al microscopio, utilizando un objetivo de inmersión, con un aumento de 1500X. La interpretación de los diseños se basó en las descripciones e ilustraciones publicadas por varios autores (Esser *et al.* 1976, López y Dickson 1977, Taylor y Sasser 1978, Whitehead 1968).

**Identificación molecular.** Se realizó mediante 2 procedimientos basados en la técnica de la



Fig. 1. Daño ocasionado por *Meloidogyne* spp. en tubérculos de papa, tanto en su parte externa como interna.

reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés):

- 1) amplificación de la región intergénica (IGS) de los genes del ADN ribosomal (ADNr) con imprimadores que permiten la identificación de las especies de *Meloidogyne* spp. con base en el tamaño del producto de amplificación o con imprimadores especie-específicos (Wishart *et al.* 2002);
- 2) análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de la región espaciadora ITS (Internal Transcribed Spacer) de los mismos genes (PCR-RFLP). El ADN genómico total fue extraído a partir de un grupo de por lo menos 40 hembras de cada localidad según el método del bromuro de cetil-metil amonio (CTAB, siglas en inglés) (Ristaino *et al.* 1998). Para la amplificación de la región IGS del ADNr fueron utilizados los imprimadores Blo4 y Blo5, así como los imprimadores JVM1, JVM hapla y JVM tropical y las condiciones de amplificación propuestas por Wishart *et al.* (2002). Los imprimadores Blo4/Blo5 fueron empleados en un PCR simple, mientras que los JVM en un PCR multiplex. Para el análisis PCR-RFLP, la amplificación de la región ITS del ADNr fue realizada con los imprimadores ITS4 e ITS6 (White *et al.* 1990) según las condiciones descritas por Ristaino *et al.* (1998). El producto de PCR fue digerido con las enzimas de restricción *AluI*, *DraI* y *RsaI*, en forma independiente, según las indicaciones del fabricante para cada enzima. Las reacciones de amplificación fueron repetidas al menos 2 veces y siempre se incluyó un control negativo (sin ADN) para detectar cualquier contaminación. También se incluyó como controles el ADN extraído de juveniles y huevos de *Meloidogyne incognita* y de *M. hapla*, previamente caracterizadas con base en el diseño perineal.

## RESULTADOS

El diseño perineal de las hembras extraídas de los tubérculos infectados, provenientes de ambas localidades, correspondió al de *Meloidogyne incognita* (Figuras 2 y 3).

El producto de amplificación por PCR simple (Figura 4A) y por PCR multiplex (Figura 4B) fue del tamaño esperado para *M. incognita* según Wishart *et al.* (2002). En adición los productos de PCR obtenidos fueron idénticos a los del aislamiento control de *M. incognita*. Los productos de amplificación difirieron de los de *M. hapla*.

Los patrones de restricción de la región ITS del ADNr generados por la acción de las enzimas *AluI* (Figura 5A), *DraI* (Figura 5B) y *RsaI* (Figura 5C) no difirieron para las muestras provenientes de los tubérculos deformes de ambas localidades, ni con el aislamiento control de *M. incognita*. Las 3 enzimas permitieron diferenciar claramente *M. hapla* y *M. incognita*.

## DISCUSIÓN

La aparición de tubérculos de papa de la variedad Floresta y del clon Bananito con un severo agallamiento en su superficie (Figura 1), en 2 localidades de la provincia de Cartago, hizo sospechar de la infección de los mismos por *Meloidogyne* spp. Este evento no ha sido previamente documentado para el cultivo de la papa en Costa Rica. Las características morfológicas de los diseños perineales, así como los resultados obtenidos mediante análisis moleculares, identificaron a la especie asociada al daño en los tubérculos de papa en ambas zonas como *M. incognita*. La concordancia entre la determinación morfológica y la molecular garantiza un correcto diagnóstico. Esta es la primera vez que se identifica a *M. incognita* como la especie que causa daños en los tubérculos de papa en Costa Rica.

Las muestras infectadas procedían de las localidades de Capellades y Llano Grande,

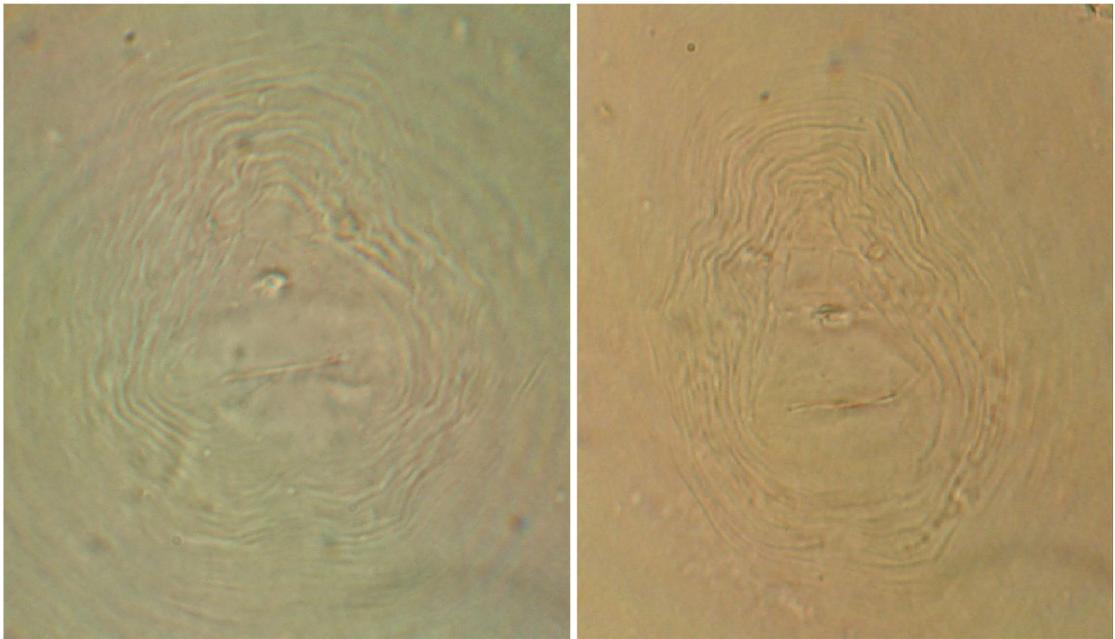


Fig. 2. Fotomicrografías de diseños perineales de hembras de *Meloidogyne incognita* provenientes de Capellades, Cartago.

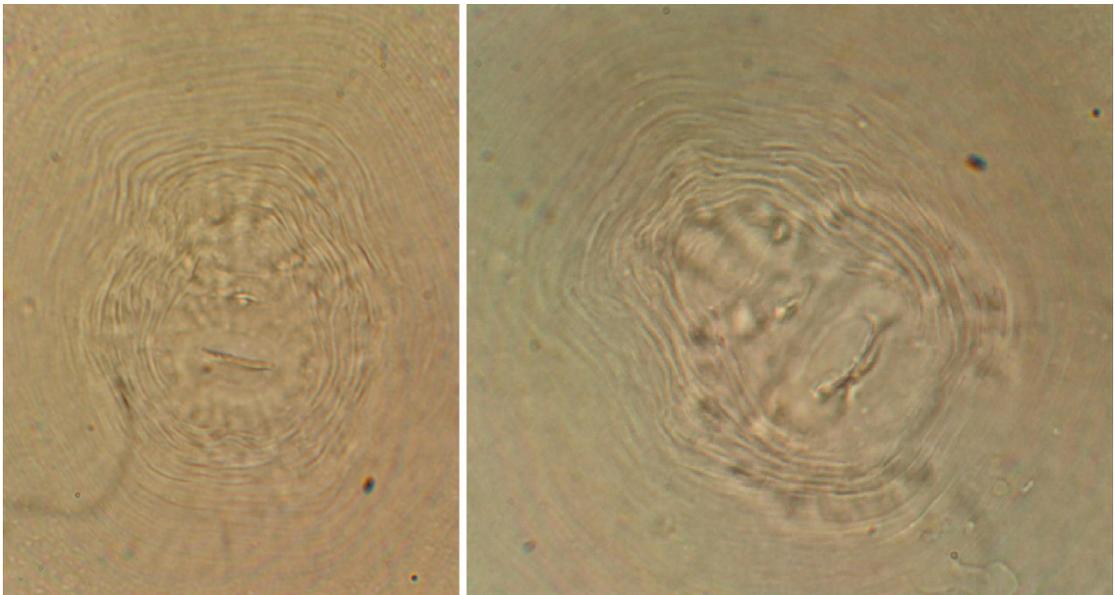


Fig. 3. Fotomicrografías de diseños perineales de hembras de *Meloidogyne incognita* provenientes de Llano Grande, Cartago.

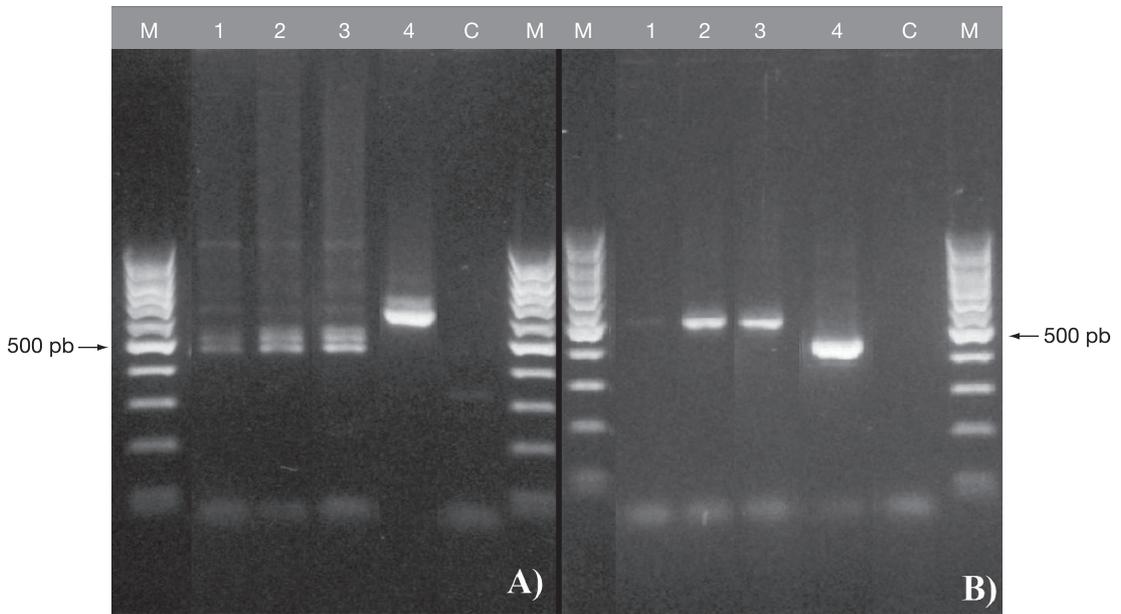


Fig 4. Productos de PCR obtenidos con los imprimadores: A) Blo4/Blo5 (PCR-Simple) y B) JVM, JVM1 y JVM Tropical (PCR-Multiplex). Líneas 1 y 2 *Meloidogyne* spp. extraído de tubérculos de papa con protuberancias; 3 *M. incognita*, 4 *M. hapla* y C: control negativo (sin ADN). M: marcador molecular 50 pb.

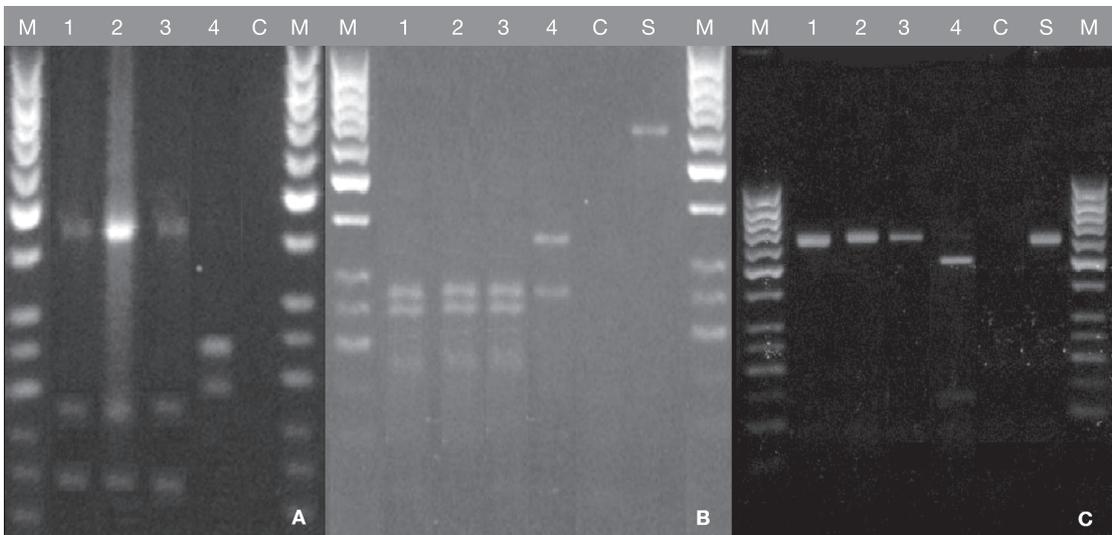


Fig. 5. Patrones de restricción de la región ITS del ADN<sub>r</sub> generados por las enzimas A) *AluI* B) *DraI* y C) *RsaI*: líneas 1 y 2 *Meloidogyne* spp. extraído de tubérculos de papa con protuberancias; 3 *M. incognita*, 4 *M. hapla*, C: control (sin ADN) y S: Producto de PCR sin digerir. M: marcador molecular 50 pb.

Cartago. En ambas localidades se ha descrito la presencia de *M. hapla* y *M. incognita*, asociadas a diferentes cultivos hortícolas, incluida la papa, aunque como se indicó anteriormente, ninguna de estas especies ha sido descrita causando daño a los tubérculos de papa (López y Azofeifa 1981). En Llano Grande, ambas especies han sido encontradas infectando una misma planta de arveja (López y Azofeifa 1981). También han sido reportadas juntas en plantas de zanahoria en Cartago y en repollo y lechuga en San Luis de Santo Domingo de Heredia (López y Azofeifa 1981). En el presente estudio, no se encontró evidencia de la participación de *M. hapla* en el daño a los tubérculos de papa. Los métodos moleculares permitieron diferenciar claramente ambas especies y son lo suficientemente sensibles para detectar mezcla de especies (Zijlstra *et al.* 1997).

El hecho de que los tubérculos afectados fueran de la variedad Floresta, que ocupa el 90% del área cultivada de papa en Costa Rica, indica la susceptibilidad de esta variedad y representa una alerta para la producción de papa en el país. Se desconoce la extensión del problema, por lo que es necesario realizar un muestreo en las zonas productoras de papa del país, para determinar la magnitud del daño a los tubérculos y la especie de *Meloidogyne* presente. La identificación molecular ofrece una alternativa para un diagnóstico rápido y preciso de las especies de *Meloidogyne* predominantes en dichas zonas, tanto en tubérculos sintomáticos como asintomáticos. Además de los análisis descritos en el presente trabajo se puede incluir el uso de imprimadores específicos para confirmar los resultados aquí presentados (Adam *et al.* 2007). En adición, se debe estudiar los factores que están propiciando la infección de los tubérculos de papa en las localidades muestreadas y determinar la agresividad de *M. incognita* en las variedades actualmente cultivadas en el país. Finalmente, debe prestarse atención a la infección de los tubérculos-semilla para evitar la diseminación del nematodo a otras zonas productoras.

## LITERATURA CITADA

- ADAM M.A.M., PHILLIPS M.S., BLOCK V.C. 2007. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Plant Pathology* 56:190-197.
- BRITO J., POWERS T O., MULLIN P.G., INSERRA R.N., DICKSON D.W. 2004. Morphological and molecular characterization of *Meloidogyne mayaguensis* isolates from Florida. *Journal of Nematology* 36: 232-240.
- CHAVES E., TORRES M.S. 2001. Nematodos parásitos de la papa en regiones productoras de papa semilla en la Argentina. *Revista Facultad de Agronomía* 21: 245-259.
- CHARCHAR J.M. 1997. Nematoides asociados a cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.) nas principais áreas in Brazil. *Nematologia Brasileira* 21: 49-60.
- ESSER R.P., PERRY V.G., TAYLOR A.L. 1976. A diagnostic compendium of the genus *Meloidogyne* Nematoda:Heteroderidae. *In: Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 43:138-150.
- FRANKLIN M.T. 1962. Preparation of posterior cuticular patterns of *Meloidogyne* spp. for identification. *Nematologica* 7:336-337.
- GONZÁLEZ L., LÓPEZ R. 1980. Efecto de densidades de inóculo y características del suelo sobre la patogenicidad de *Meloidogyne incognita* en lechuga. *Agronomía Costarricense* 4(2):155-163.
- LÓPEZ R. 1984. Differential plant responses and morphometrics of some *Meloidogyne* spp. from Costa Rica. *Turrialba* 34(4): 445-458.
- LÓPEZ R., AZOFEIFA J. 1981. Reconocimiento de nematodos fitoparásitos asociados con hortalizas en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 5(1/2):29-35.
- LÓPEZ R., DICKSON D.W. 1977. Morfometría y respuesta de hospedantes diferenciales a tres poblaciones de *Meloidogyne incognita* y una de *M. javanica*. *Agronomía Costarricense* 1(1):119-127.
- LÓPEZ R., SALAZAR L. 1978. Morfometría y algunos hospedantes de *Meloidogyne hapla* en la Cordillera

- Volcánica Central de Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 2(1):29-38.
- LÓPEZ R., SALAZAR L. 1988. Nuevos huéspedes de *Meloidogyne javanica* (NEMATODA: Heteroderidae) en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 12(2):241-244.
- LÓPEZ R., SALAZAR L. 1990. Microscopía electrónica de rastreo de varias poblaciones de *Meloidogyne javanica* (NEMATODA: Heteroderidae). *Agronomía Costarricense* 14(1):45-54.
- LOUWS F.J., RADEMAKER J.L.W., DE BRUIJN F.J. 1999. The three Ds of PCR-Based Genomic Analysis of Phytopathogens: Diversity, Detection, Disease Diagnose. *Annual Review Phytopathology* 37:81-125.
- MICHAILIDES T.J., MORGAN D.P., MA Z., LUO Y., FELTS D., DOSTER M.A., REYES H. 2005. Conventional and molecular assays aid diagnosis of crop diseases and fungicide resistance. *California Agriculture* 59:115-123.
- MULLIS K., FALOONA F., SCHARF S., SAIKI R., HORN G., ERLICH H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology* 51:263-73.
- RISTAINO J.B., MADRITCH M., TROUT C.L., PARRA G. 1998. PCR amplification of ribosomal DNA species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:948-954.
- POWERS T. 2004. Nematode molecular diagnostics: from bands to bar-codes. *Annual Review of Phytopathology* 42: 367-383.
- SALAZAR L. 1980. Variaciones morfológicas y respuesta de nueve hospedantes diferenciales a tres poblaciones de *Meloidogyne javanica* de Costa Rica. *Turrialba* 30(3):344- 351.
- TAYLOR D.P., NETSCHER C. 1974. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. *Nematologica* 20:268-269.
- TAYLOR A. L., SASSER J.M. 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Raleigh, North Carolina. North Carolina State University Graphics. 111 p.
- SIDDIQI M.R. 2000. *Tylenchida: Parasites of plants and insects*. CAB International, UK. 833 p.
- VOVLAS N., MIFSUD D., LANDA B.B., CASTILLO P. 2005. Pathogenicity of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on potato. *Plant Pathology* 54: 657-664.
- WHITEHEAD A.G. 1968. Taxonomy of *Meloidogyne* (Nematodea: Heteroderidae) with descriptions of four new species. *Transactions of the Zoological Society of London* 31:263-401.
- WHITE T.J., BRUNS T., LEE S., TAYLOR J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR protocols. A guide to methods and applications*. Innis M.A.; Gelfand D.H.; Sninsky J.J.; White T.J (eds). Academic. San Diego, USA. p. 315-322.
- WISHART J., PHILLIPS M.S., BLOK V.C. 2002. Ribosomal intergenic spacer: A polymerase chain reaction diagnostic for *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax*, and *M. hapla*. *Phytopathology* 92:884-892.
- ZIJLSTRA C., UENK B.J., VAN SILFHOUT C.H. 1997. A reliable, precise method differentiate species of root-knot nematodes in mixture on the basis of ITS-RFLPs. *Fundamental and Applied Nematology* 20:59-63.