

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Meloidogyne* ASOCIADAS A PLANTAS ORNAMENTALES DE ALTURA EN COSTA RICA¹

Stefany Solano-González², Alejandro Esquivel-Hernández², Ramón Molina-Bravo³, Bernal Morera-Brenes³

RESUMEN

Identificación de especies de *Meloidogyne* asociadas a plantas ornamentales de altura en Costa Rica. El objetivo del presente trabajo fue identificar especies de nematodos del género *Meloidogyne* asociadas a plantas ornamentales de altura. El estudio se realizó en el cantón de San Isidro de Heredia, Costa Rica, en un vivero comercial durante el periodo 2011-2012, en diez especies de plantas. Para la identificación se utilizaron mediciones morfométricas de la longitud del estilete, tamaño de cola y región hialina de los juveniles en segundo estado de desarrollo (J₂); también se obtuvieron diseños perineales de hembras ovígeras. Se extrajo ADN genómico de un solo individuo J₂ y se realizaron análisis mediante la amplificación del espacio intergénico entre la subunidad II del citocromo oxidasa (COII) y la subunidad larga del gen ARN ribosomal mediante la técnica PCR-RFLP. La integración de estos métodos permitió identificar cinco especies de nematodos del género *Meloidogyne* (*M. arenaria*, *M. hapla*, *M. hispanica*, *M. incognita*, *M. javanica*), y se reportaron nuevos patrones de restricción con la enzima AluI para *M. hapla* y *M. javanica*. Además se obtuvo el reporte preliminar de *M. hispanica*, descrito mediante la secuenciación de las regiones del 18S y 28S.

Palabras clave: PCR-RFLP, *Meloidogyne hispanica*, nematodos fitoparásitos.

ABSTRACT

Identification of *Meloidogyne* species associated with upland ornamentals plants in Costa Rica. The objective of this study was to identify nematodes species of the genus *Meloidogyne* associated with upland ornamental plants. We sampled ten ornamental species in a commercial nursery in San Isidro, Heredia, Costa Rica between 2011-2012. Morphometric measurements of the stylet length, the tail length, and the hyaline region of J₂s, as well as perineal patterns of egg-carrying females were used for identification. Genomic DNA was extracted from single J₂s and molecular analyses were performed by amplifying the intergenic region between cytochrome oxidase subunit II of the COII and the long subunit of the ARN ribosomal genes by PCR-RFLP. Combining these methods allowed identification of five species of nematodes of the genus *Meloidogyne* (*M. arenaria*, *M. hapla*, *M. hispanica*, *M. incognita* and *M. javanica*), and new restriction enzyme patterns were reported for *M. hapla* and *M. javanica* using AluI. Additionally, a preliminary report of *M. hispanica* was described by sequencing the 28S and 18S regions.

Keywords: PCR-RFLP, *Meloidogyne hispanica*, phytoparasitic nematodes.

¹ Recibido: 21 de octubre, 2014. Aceptado: 8 de febrero, 2015. Esta investigación forma parte del proyecto “Diagnóstico y caracterización bioquímica y molecular de nematodos noduladores (*Meloidogyne* spp.) en cultivos tropicales y hortícolas de Costa Rica” financiado por la Fundación RUSA-CSIC y corresponde a los resultados parciales de la tesis de Licenciatura en Manejo de Recursos Naturales de la primera autora.

² Universidad Nacional, Escuela de Ciencias Agrarias, Laboratorio de Nematología. 86-3000. Heredia, Costa Rica. stefany.solano.gonzalez@una.cr, alejandro.esquivel.hernandez@una.cr

³ Universidad Nacional, Escuela de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Biología Molecular y Laboratorio de Genética Evolutiva. 86-3000. Heredia, Costa Rica. ramon.molina.bravo@una.cr, bernal.morera.brenes@una.cr



INTRODUCCIÓN

Los nematodos fitoparásitos provocan, a nivel mundial, cuantiosas pérdidas económicas en la producción agrícola (Neher, 2001; Chávez-Velazco et al., 2009; Castro et al., 2011). Un grupo de gran importancia en sistemas agrícolas tropicales y subtropicales es el nematodo formador de nódulos del género *Meloidogyne* Goeldi, 1892 (Olsen, 2000; Sidiqqi, 2000; Salazar-Antón y Guzmán-Hernández, 2013a), debido a su amplia distribución geográfica, ámbito de hospederos e importancia económica como agente patógeno (Orui, 1999). El género incluye más de ochenta especies con más de 5000 plantas hospederas (Powers y Harris, 1993; Sidiqqi, 2000; Brito et al., 2004; Subbotin y Moens, 2006).

En Costa Rica, la importación y exportación de plantas ornamentales tuvo una evolución significativa en los últimos años, donde se generaron divisas de hasta 83,2 millones de dólares (Arce et al., 2009; Acuña y Barrientos, 2010; Barahona et al., 2011; SEPSA, 2011). Por lo tanto, es importante conocer las especies de nematodos asociadas a estos cultivos. Los nematodos formadores de nódulos en cultivos ornamentales, no solamente los afecta en forma directa, sino que también predisponen a la planta al ataque de otros patógenos del suelo (Richardson y Grewal, 1993); cuyo efecto en la planta hospedera se manifiesta en forma de poco crecimiento, clorosis, marchitamiento, baja productividad y en casos severos muerte de la planta. Según Ortuño y Oros (2002), pueden existir pérdidas de hasta un 100% causadas por la pobre calidad estética de la planta, lo que al final afecta su exportación. Además, la presencia de nematodos fitoparásitos puede afectar de manera directa en las relaciones de exportación con mercados exigentes como el de Estados Unidos, principal destino de estos productos (Barahona et al., 2011).

En Costa Rica, la identificación de nematodos del género *Meloidogyne* y otros fitonematodos se realiza usualmente a nivel de género, principalmente por la complejidad morfológica y alta inversión de tiempo, y en algunos casos falta mayor calificación del personal (Hyman, 1990; Powers y Harris, 1993; Orui, 1999; Salazar-Antón y Guzmán-Hernández, 2013b). En vista de lo anterior, resulta necesario, que además del aislamiento de juveniles, se aisle hembras (visibles en la fase final del ciclo de infección) para análisis morfológicos y morfométricos. En respuesta

a esta problemática, se han implementado técnicas moleculares que facilitan el proceso de identificación (Hyman, 1990; Powers y Harris, 1993; Orui, 1999; Zijlstra, 2000; Powers et al., 2005; Subbotin y Moens, 2006; Flores, 2008; Powers et al., 2009). Sin embargo, cuando se busca una identificación certera, una técnica no es excluyente de la otra, sino, que son complementarias, debido a que un solo parámetro no es suficiente para determinar de forma definitiva la presencia de una especie. El traslape de medidas entre especies del género y la complejidad morfológica dificultan el diagnóstico, por ende resulta necesario implementar técnicas moleculares que, mediante el uso de otro tipo de información (ADN), permitan la separación entre especies. Una versión preliminar de esta investigación (Solano-González et al., 2011), evidenció la necesidad de evaluar varios criterios para poder distinguir nuevas especies que podrían ser identificadas en Costa Rica.

La técnica de Reacción de Cadena de la Polimerasa, mediante Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP), comprende la técnica convencional de PCR junto con el uso de enzimas de restricción posterior a la amplificación. De forma general, esta técnica amplifica un fragmento específico del genoma del individuo y utiliza enzimas de restricción para generar cortes en los fragmentos amplificados; los tamaños generados por estos cortes se comparan con aquellos reportados en la literatura y resulta un sistema altamente efectivo para el proceso de identificación (Powers y Harris, 1993; Powers et al., 2005; Flores, 2008). Una de las regiones más utilizadas para la identificación molecular de *Meloidogyne* se encuentra entre los genes mitocondriales 16S del ARNr y la subunidad II del citocromo oxidasa (COII) (Powers y Harris, 1993; Jeyaprakash et al., 2006; Humphreys et al., 2011; Maleita et al., 2012a, 2012b). Esta región ayuda a distinguir algunas de las principales especies de *Meloidogyne* de importancia agrícola (Powers, 2004).

El ADN para estas amplificaciones se puede obtener de dos formas: recolectando un grupo de hembras (usualmente cincuenta individuos) por disección de raíces infectadas, o extrayendo el material genético a partir de juveniles en segundo estado (J_2), recolectados de muestras de suelo o raíz.

La presente investigación emplea un único individuo (J_2) para llevar a cabo el objetivo de identificar especies de nematodos del género *Meloidogyne* asociadas a plantas ornamentales de altura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo y aislamiento de nematodos. Los muestreos de suelo y raíz se realizaron en el vivero de plantas ornamentales “El Zamorano”, ubicado en el cantón de San Isidro de Heredia, Costa Rica (latitud 10°01'59"N y longitud 84°02'41"W) a una altura de 1360 msnm. Este sitio presentó una temperatura máxima de 25 °C y mínima de 16 °C, con una precipitación anual de 1500 a 2000 mm durante el tiempo de estudio. Los muestreos se efectuaron entre el año 2011 y el 2012 tanto en época seca, como en época lluviosa. Se seleccionaron diez especies de plantas ornamentales susceptibles al ataque de *Meloidogyne*: *Abelia* sp., *Duranta* sp., *Allium* sp., *Begonia* sp., *Impatiens* sp., *Gardenia* sp., *Ficus pumila*, *Lantana camara*, *Calathea* sp. y *Rosa* sp. (Brito et al., 2010). Se implementó un plan sistemático de muestreo en zig-zag para cada una de las plantas ornamentales seleccionadas. Algunas de estas estaban sembradas en campo mientras que otras en macetas (*Begonia* sp., *Impatiens* sp. y *Calathea*). Se tomaron dos submuestras de suelo y raíz por cultivo a una profundidad de 30 cm, para generar una muestra compuesta (suelo y raíz individualmente) por especie de planta ornamental. Las muestras se trasladaron al Laboratorio de Nematología de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional (UNA).

El aislamiento de hembras ovígeras se realizó mediante la disección manual de raíces agalladas. La extracción de segundos estadios juveniles (J₂) se hizo con el método de centrifugación-flotación en solución azucarada para las muestras de suelo, y la técnica de macerado y centrifugación en solución azucarada para las muestras de raíz (Southey, 1965).

Análisis morfológico. Los nematodos recuperados se contaron y se identificaron empleando un microscopio invertido a 200X. Se utilizaron diez nematodos J₂ por cultivo para las mediciones morfométricas y al menos seis hembras por cultivo para la obtención de los patrones perineales. Se utilizó como referencia la clave de identificación de nematodos noduladores de Jepson (1987). Se midieron los siguientes caracteres: longitud del estilete, tamaño de la cola y de la región hialina de la cola de los J₂. Para los diseños perineales, las hembras se prepararon y depositaron en un portaobjetos para su posterior análisis. Se realizó un montaje temporal para juveniles y hembras en 16 µl de agua destilada y fueron

fotografiados a 100X, utilizando un microscopio con una cámara fotográfica integrada.

Análisis molecular. La extracción de ADN se logró a partir de juveniles aislados individualmente, que fueron depositados en 16 µl de agua ultra pura sobre un portaobjetos y fueron macerados con una puntilla de pipeta. Cada individuo se almacenó a -20 °C para los posteriores análisis moleculares.

Se utilizaron las secuencias de dos imprimadores C2F3 (‘5-GGTCAATGTTTCAGAAATTTGTGG-3’) y 1108 (‘5-TACCTTTGACCAATCACGCT-3’) detalladas por Powers y Harris (1993). Para la PCR, se usó un volumen final de 25 µl con una concentración final de 0,8 µM de cada imprimador, buffer de PCR a 1X, MgCl₂ a 3,0 mM, 0,08 mM de cada dNTP, dos unidades de ADN polimerasa y 15 µl del ADN obtenido a partir de un J₂ de *Meloidogyne*. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador de punto final de 96 pozos en el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Ciencias Agrarias de la UNA.

Las condiciones del perfil térmico fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C durante dos minutos, seguidamente diez ciclos de: 94 °C por diez segundos, 48 °C por treinta segundos, 68 °C por dos minutos. Se continuó con veinticinco ciclos de: 94 °C de diez segundos, 48 °C por treinta segundos y 68 °C por dos minutos con un delta de +20 por cada ciclo consecutivo en el paso de extensión. Las reacciones finalizaron con una extensión final de 72 °C de dos minutos (Jeyaprakash et al., 2006).

Los productos de PCR fueron evaluados en un gel de agarosa al 1% con buffer TBE al 1X y se corrieron en una cámara de electroforesis comercial durante 90 minutos a 90V a un amperaje constante de 250-300 mA. Se utilizaron marcadores de peso molecular de 100 pb y 50 pb. Posteriormente, el gel fue teñido con un colorante comercial. Para las restricciones enzimáticas, se emplearon las enzimas DraI, HinfI y AluI. El tiempo de incubación fue de dos a cuatro horas a 37 °C, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Al finalizar la digestión, se evaluaron nuevamente los productos en geles de agarosa al 2%. Estos fueron teñidos como se mencionó anteriormente y se utilizaron marcadores de peso molecular de 100 pb y 50 pb. Las fotografías de las digestiones y productos de PCR fueron digitalizadas con un fotodocumentador para comparar los patrones de bandas generados con otros previamente reportados en la literatura.

El nematodo aislado de *F. pumila* fue analizado por medio de secuenciación capilar con colaboración del Instituto de Agricultura Sostenible, España. Se utilizaron los imprimadores D2D3 e ITS (Hugall et al., 1999; Castillo et al., 2009). El proceso de secuenciación se aplicó únicamente a este aislamiento, debido a que los patrones generados no coincidían con los reportados en la literatura.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis morfológico. Los estudios morfométricos de juveniles y diseños perineales de hembras permitió la identificación de tres de las especies encontradas

en este estudio: *M. javanica*, *M. hapla* y *M. arenaria* (Cuadro 1, Figura 1). *M. javanica* se encontró en el cultivo de *Gardenia* sp., este presentó líneas laterales definidas que separan las estrías dorsales de las ventrales. Con respecto a *M. hapla*, fue identificada en el cultivo de *Rosa* sp., y presentó una región en forma de hexágono redondeado a ovalado y la presencia de puntuaciones en el término de la cola. Para la especie *M. arenaria* aislada de *Calathea* sp., se logró identificar la presencia de un arco dorsal, presentó estrías con ondulaciones pronunciadas que se proyectaron a partir de las tenues líneas laterales. Sin embargo, la variabilidad intraespecífica en los patrones perineales de los nematodos en las muestras de *Begonia* sp., *Impatiens* sp., y *Ficus pumila*, no

Cuadro 1. Datos morfométricos del segundo estado juvenil (J_2) de *Meloidogyne* spp., aislados a partir de diez cultivos ornamentales de altura. Cada dato corresponde al valor promedio de diez repeticiones. Costa Rica. 2012.

Table 1. Morphometric values from second stage juveniles (J_2) of *Meloidogyne* spp., isolated from ten upland ornamentals. Each value corresponds to the mean of ten repetitions. Costa Rica. 2012.

Género/Especie	Planta ornamental	Longitud de estilete (μm)	Región hialina de la cola (μm)	Longitud de cola (μm)
<i>M. incognita</i>	<i>Abelia</i> sp.	15	10,6	*
	Val. Ref.		6,3-13,5	38,0-55,0
<i>Meloidogyne</i> sp.	<i>Begonia</i> sp.	13,2	13, 8	54,5
	Valor Ref.			
<i>Meloidogyne</i> sp.	<i>Impatiens</i> sp.	14,2	*	*
	Val. Ref.			
<i>M. incognita</i>	<i>Duranta</i> sp.	15,5	10	*
	Val. Ref.		6,3-13,5	38,0-55,0
<i>M. hispanica</i>	<i>Ficus pumila</i>	13	12,2	38,2
	Val. Ref.	10,4-11,9	9,2-13,0	41,1-53,4
<i>M. javanica</i>	<i>Gardenia</i> sp.	12,9	12,9	59
	Val. Ref.	15	9,0-18,0	46,8-59,8
<i>M. hapla</i>	<i>Rosa</i> sp.	12,5	12	*
	Val. Ref.	10-12	11,7-18,9	48,2-69-8
<i>M. incognita</i>	<i>Allium</i> sp.	12	10,5	43
	Val. Ref.		6,3-13,5	38,0-55,0
<i>M. javanica</i>	<i>Calatea</i> sp.	14, 3	15, 8	56,3
	Val. Ref.	14-16	10,8-19,8	52,2-59,9

* Valor morfométrico no claramente definido en el espécimen / Morphometric value not clearly defined in the specimen.

Val. Ref.: valor de referencia, tomado de Hirschmann (1986), Jepson (1987) y Maleita et al. (2012b) / Ref.Val: reference value, taken from Hirschmann (1986), Jepson (1987) and Maleita et al. (2012b).

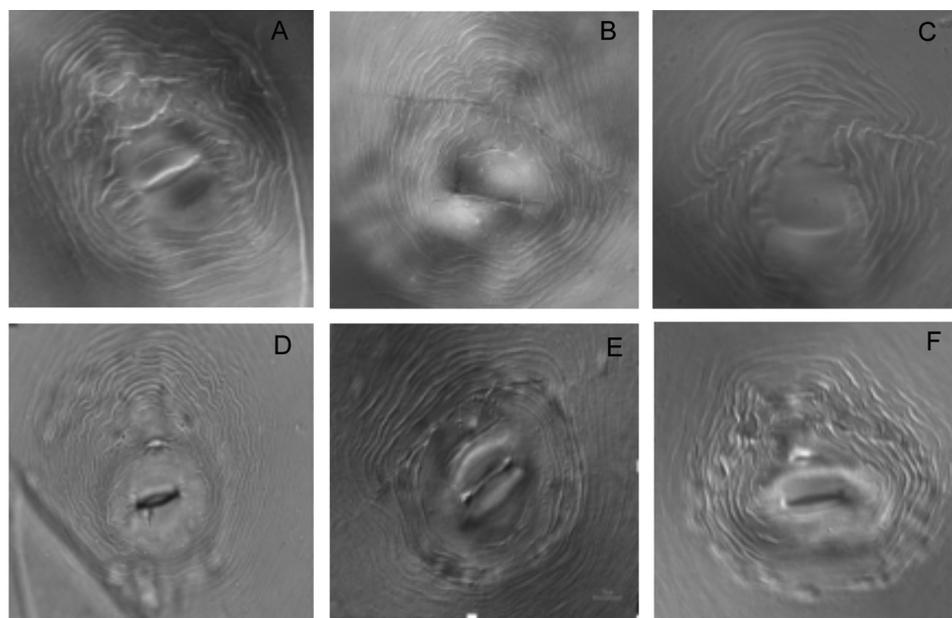


Figura 1. Diseño del patrón perineal de hembras ovígeras de nematodos presentes en plantas ornamentales provenientes de un vivero de San Isidro, Heredia. Los patrones capturados fueron determinados como: A) *Meloidogyne* sp., asociada a *Ficus pumila*, B) *M. javanica* asociada a *Gardenia* sp., C) *M. arenaria* asociada a *Calathea* sp., D) *Meloidogyne* sp., asociada a *Begonia* sp., E) *M. hapla* asociada a *Rosa* sp., y F) *Meloidogyne incognita*, asociada a *Impatiens* sp. Costa Rica. 2012.

Figure 1. Perineal patterns of egg-laying female nematodes extracted from ten ornamental plants grown in a commercial nursery in San Isidro, Heredia: A) *Meloidogyne* sp., related to *Ficcus pumila*, B) *M. javanica* associated with *Gardenia* sp., C) *M. arenaria* extracted from *Calathea* sp., D) *Meloidogyne* sp., related to *Begonia* sp., E) *M. hapla* extracted from *Rosa* sp., and F) *Meloidogyne incognita*, extracted from *Impatiens* sp. Costa Rica. 2012.

permitió una identificación certera a nivel de especie mediante el patrón perineal.

Fue notable la dificultad taxonómica para la identificación del género *Meloidogyne*, lo que ha sido denotado por otros autores (Hirschmann, 1986; Jepson, 1987; Maleita et al., 2012b). Sin embargo, aun cuando no fue posible esclarecer todas las especies asociadas a cada ornamental mediante morfología y morfometría, se logró identificar cuatro de las principales especies de este género, tomando en cuenta que solo se incluyeron tres criterios morfométricos y uno morfológico.

Análisis molecular. Los productos de PCR obtenidos en este estudio (Cuadro 2), concuerdan con otros estudios reportados (Powers y Harris, 1993;

Blok et al., 2002; Powers et al., 2005; Flores, 2008; Humphrey et al., 2011). El producto inicial de PCR de menor tamaño lo presentó el aislamiento de *Rosa* sp; mientras que los fragmentos de mayor tamaño fueron los reportados para los aislamientos de *F. pumilla*, *Gardenia* sp. y *Allium* sp. Los demás aislamientos se mantuvieron en el valor de 1,1 kb o 1,5 kb. Tras la digestión con la enzima *HinfI* se generaron fragmentos en el rango de 500 a 1250 pb; la enzima *AluI* generó fragmentos de menor tamaño, entre el rango de 200 a 900 pb, a excepción de dos fragmentos mayores a 1 kb. La enzima *DraI* fue la que generó la menor cantidad de cortes, únicamente para tres aislamientos diferentes. Este método permitió distinguir cinco especies de nematodos de forma precisa.

Cuadro 2. Peso molecular de los productos de amplificación de ADN mitocondrial y patrones de restricción enzimática de nematodos aislados a partir de un individuo del género *Meloidogyne* de cultivos ornamentales en la provincia de Heredia, Costa Rica. 2012.

Table 2. Molecular weight of PCR products from mitDNA and enzymatic restriction patterns from nematodes isolated from a single individual of the genus *Meloidogyne* extracted from ornamental crops in Heredia, Costa Rica. 2012.

Cultivo	Producto PCR (kb)	Digestiones (pb)			Especie
		HinfI	AluI	DraI ^b	
<i>Abelia</i> sp.	1,5	1250 y 375	900, 400 y 200	-	<i>M. incognita</i>
<i>Begonia</i> sp.*	1,5	800 y 600	800, 250 y 150	-	<i>Meloidogyne</i> sp.
<i>Impatiens</i> sp.*	1,5	850 y 600	800, 400 y 300	500 y 350	<i>Meloidogyne</i> sp.
<i>Impatiens</i> sp.*	1,5	1500	800, 400 y 300	560 y 600	<i>M. javanica</i>
<i>Duranta</i> sp.	1,5-1,6	1150 y 350	-	-	<i>M. incognita</i>
<i>Ficus pumila</i> ^a	1,7	800	1250 y 450	-	<i>M. hispanica</i>
<i>Gardenia</i> sp.	1,5-1,7	900 y 600	1000, 400 y 300	-	<i>Meloidogyne</i> sp.
<i>Rosa</i> sp.	0,5	500	450	250 y 200	<i>M. hapla</i>
<i>Allium</i> sp.	1,5-1,7	1250 y 350	900, 400 y 200	-	<i>M. incognita</i>
<i>Calathea</i> sp.	1,1	-	700 y 400	-	<i>M. arenaria</i>

^a El patrón de bandas resultó distinto a lo reportado en la literatura para esta especie. La identificación de esta muestra se realizó mediante secuenciación Sanger / Banding pattern was different from those reported for this species. This sample was identified by Sanger sequencing.

^b (-) indica que no fue necesario utilizar *DraI* para determinar la especie / implies that *DraI* was not necessary to determine the species.

Las especies *M. javanica* y *M. incognita*, ambas con productos de PCR de 1,5 kb, se lograron diferenciar entre sí mediante las enzimas HinfI y AluI. Para *M. javanica* no hubo corte con la enzima HinfI, lo cual mantiene consistencia con lo reportado por otros autores que sugieren la ausencia del sitio de restricción en esta especie (Blok et al., 2002). Además, se obtuvieron patrones de digestión con la enzima AluI que no han sido reportados anteriormente para *M. javanica*. Para esta digestión, los fragmentos obtenidos con ambas enzimas, también mantuvieron relación con valores previamente reportados de esta especie (Blok et al., 2002; Powers et al., 2005; Flores, 2008; Peraza-Padilla et al., 2013).

Las especies denominadas como *Meloidogyne* sp. (Cuadro 2), no concordaron con valores previamente reportados tras las digestiones enzimáticas. No obstante, tras la incubación con la enzima AluI presentaron similitud a los patrones de banda generados por las especies *M. incognita* y *M. javanica*. Un único aislamiento de *Meloidogyne* sp. fue incubado con la enzima DraI y generó patrones de banda muy similares

a *M. javanica*. Debido a la amplitud del género y al poco conocimiento de esta especie en ecosistemas tropicales (Brito et al., 2007), estas diferencias podrían atribuirse a subespecies no reportadas.

El aislamiento a partir de *F. pumila* generó el producto de PCR más largo (1,7 kb), similar al reportado por Maleita et al. (2012b) y tras la digestión con la enzima HinfI, generó un fragmento de 800 pb que coincidió con los hallazgos de Cenis et al. (1992), ambos estudios referentes a la identificación de *M. hispanica*. Según los resultados de secuenciación, se obtuvo un 99% de similitud con *M. hispanica*. Maleita et al. (2012b) reportan fragmentos de 1000, 580 y 240 pb para *M. hispanica* tras digestión del producto con AluI. Sin embargo, en este estudio se obtuvieron fragmentos de 1250 y 450 pb (Figura 2). Los datos morfométricos de la longitud del estilete de este estudio concuerdan con los valores reportados por Hirschmann (1986) y Maleita et al. (2012b) pero no con los valores reportados por Jepson (1987) para *M. hispanica*. Por otra parte, las mediciones morfométricas de la región hialina y longitud de la

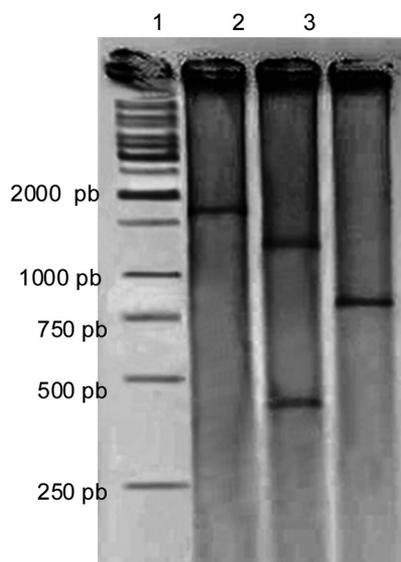


Figura 2. Amplificación de la región intergénica entre el gen de la citocromo oxidasa II (COII) y el gen 16S del ADN mitocondrial. Productos no cortados de PCR (PNC) del segundo estado juvenil (J_2) aislados de *F. pumila* (carril 1) y sus respectivas digestiones con enzima AluI (carril 2) y HinfI (carril 3). San Isidro de Heredia, Costa Rica. 2012.

Figure 2. Amplification of the intergenic region between cytochrome oxidase subunit II gene (COII) and 16S mitochondrial DNA gene. Undigested PCR products of J_2 s extracted from *F. pumilla* (row 1) and their respective digestions with AluI enzyme (row 2) and HinfI (row 3). San Isidro de Heredia, Costa Rica. 2012.

cola sí se encuentran dentro del rango reportado de variación de la especie indicado por Jepson (1987).

La presencia de *M. hispanica* asociada al cultivo de *F. pumila* es un dato preliminar que no ha sido reportado anteriormente para Costa Rica. No obstante, es necesario efectuar más estudios al respect, puesto que no hay concordancia con algunos de los fragmentos generados por el PCR-RFLP. Este nematodo también ha sido asociado al género *Ficus* en Brasil (Maleita et al., 2012a, 2012b), donde predominan condiciones climáticas similares a las de Costa Rica.

Identificación de especies. No fue posible identificar, a nivel de especie, los aislamientos de *Meloidogyne* sp. provenientes de los cultivos de *Begonia* sp., *Impatiens* sp. y *Gardenia* sp., debido

al vacío de información existente. Aun cuando se generaron patrones de restricción, no existe en la literatura otros aislamientos con los cuales comparar, lo que denota la necesidad de generar más estudios que ayuden a correlacionar este tipo de análisis e información. Ejemplo de esto fue el aislamiento de *Gardenia* sp. que mediante análisis molecular no fue posible determinar la especie asociada y se determina como *Meloidogyne* sp., en el Cuadro 2, pero mediante el patrón perineal se asoció a *M. javanica*.

Además de la metodología de Power y Harris (1993), se han diseñado imprimadores específicos para las principales especies representantes del género *Meloidogyne* (Zijlstra, 2000; Zijlstra et al., 2000), mediante la técnica RAPD y SCAR. Estos fueron probados en este estudio, pero en ninguno de los casos se obtuvieron resultados. Amplificaciones fallidas al utilizar los imprimadores específicos para *M. incognita* fueron obtenidas por Adam et al. (2007), lo que demuestra que no en todos los casos los imprimadores específicos de especie resultan una herramienta consistente de diagnóstico.

En este estudio se utilizó un único individuo para la extracción y amplificación de ADN, ya que es de mayor utilidad en términos prácticos. Aunque, esta práctica no es común debido a la dificultad de repetir los resultados, se generaron productos de PCR distinguibles a partir de un único individuo (J_2). Además, los resultados fueron repetibles en todos los casos. En la gran mayoría de los estudios se utiliza un pool de hembras (usualmente cincuenta), para asegurar el procedimiento de PCR (Powers y Harris, 1993; Orui, 1999; Zijlstra, 2000; Powers et al., 2005; Subbotin y Moens, 2006; Flores, 2008; Powers et al., 2009; Humphreys et al., 2011).

El diagnóstico molecular del ADN mitocondrial de J_2 aislados de *Allium* sp. permitió determinar la identidad de *M. incognita*, también reportado en otros estudios (Quénéhervé et al., 2011). Un caso particular fue el cultivo de *Begonia* sp., en el cual no fue posible determinar la especie de nematodo asociada mediante ninguno de los dos métodos utilizados. Otros estudios confirman la presencia de *M. incognita* y *M. arenaria* como nematodos noduladores asociados (Brito et al., 2010). La integración de los métodos de diagnóstico taxonómico y molecular (ADN mit) permitieron confirmar la identidad de *M. hapla* en *Rosa* sp.; estos resultados concuerdan con lo informado por otros investigadores (Ortuño y Oros, 2002; Gandarilla,

2005; Levin, 2005). Para el caso de *Gardenia* sp., se determinó la especie *M. javanica* como nematodo asociado, aunque también existen reportes de otras especies del género relacionadas a este cultivo (Richardson y Grewal, 1993; Gandarilla, 2005; Brito et al., 2010). Otro caso en el que los métodos de identificación taxonómica y molecular permitieron llegar al mismo resultado fue para el cultivo *Calathea* sp., en el cual se encontró la especie *M. arenaria*.

Además de lograr identificar la gran mayoría de individuos encontrados en diez plantas ornamentales, se reportaron los patrones de restricción con la enzima AluI para *M. hapla* y *M. javanica* que no habían sido indicados anteriormente. Aunado a esto, se obtuvo el primer reporte de la presencia de *M. hispanica* en Costa Rica.

Se logró identificar un total de cinco especies de nematodos del género *Meloidogyne* mediante la técnica de PCR-RFLP y se generó un total de veintitrés bandas entre todos los J₂ aislados de los diez cultivos seleccionados. También se determinó que la enzima más informativa fue AluI ya que produjo la mayor cantidad de patrones de bandas para todas las muestras evaluadas, para un total de once; la enzima DraI produjo solo cuatro bandas. Sin embargo, esta última endonucleasa no se utilizó en todos los casos porque los patrones de interés para esta investigación resultaron exclusivos para determinar la especie *M. hapla*. No obstante, también se utilizó en varias *Meloidogyne* spp.

Este estudio establece los precedentes para la incorporación de esta metodología en análisis de diagnóstico molecular; así como el reporte preliminar de la presencia de una especie nueva para Costa Rica, *M. hispanica*. Este tipo de datos brindan una alerta al Sistema Fitosanitario Nacional (SFN) sobre las regulaciones de ingreso de organismos vegetales al país; así como la gran necesidad de generar más estudios en el área, debido al vacío existente en ecosistemas tropicales y a la existencia de una gran variedad de especies de nematodos nodulares.

En Costa Rica, el documento oficial emitido por el SFN declara la ausencia de *Meloidogyne* como plagas reglamentarias en el país; no obstante, es importante revisar constantemente este estatus (MAG, 2012), debido a la importación y exportación de diversos productos, entre estos las plantas ornamentales, lo que favorece a la transferencia de plagas de un sitio

a otro. Posiblemente, este pudo ser el mecanismo de entrada de *M. hispanica* en Costa Rica; por ende tal información resulta de gran provecho para los productores nacionales, pues se les facilita el acceso a pruebas de diagnóstico y se les da la posibilidad de corregir a tiempo cualquier posible infección de sus cultivos por *Meloidogyne*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a Walter Peraza por la gran ayuda con las fotografías y la revisión del manuscrito, y a Irena Hilje por su colaboración en los ensayos de laboratorio. A Pablo Castillo del CSIC, España por los análisis de secuenciación. La Fundación CRUSA-CSIC que financió el proyecto “Diagnóstico y caracterización bioquímica y molecular de nematodos noduladores (*Meloidogyne* spp.) en cultivos tropicales y hortícolas de Costa Rica”.

LITERATURA CITADA

- Adam, M., M. Phillips, and C. Blok. 2007. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). *Plant Pathol.* 56:190-197.
- Acuña, I., y O. Barrientos. 2010. Sector agropecuario informe de gestión 2006-2010. Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), CRC.
- Arce, R., E. Chacón, G. Chaves, y A. Tristán. 2009. Estadísticas de Comercio Exterior de Costa Rica. <http://www.procomer.com/contenido/descargables/anuarios-estadisticos/anuario-estadistico-2008.pdf> (consultado 7 mayo 2010).
- Barahona, L., J. Calderón, K. López, A. Tristán, y J.M. Vargas. 2011. Estadísticas de Comercio Exterior de Costa Rica, 2010. PROCOMER (Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica), San José, CRC.
- Blok, V., J. Wishart, F. Mireille, K. Berthier, and M. Phillips. 2002. Mitochondrial DNA differences distinguishing *Meloidogyne mayaguensis* from the major species of tropical root-knot nematodes. *Nematology* 4:773-781.
- Brito, J., J.D. Stanley, R. Kaur, R. Cetintas, M. Di Vito, J.A. Thies, and D.W. Dickson. 2007. Effects of the Mi-1,

- N and Tabasco genes on infection and reproduction of *Meloidogyne mayaguensis* on tomato and pepper genotypes. *J. Nematol.* 39:327-332.
- Brito, J., R. Kaur, R. Cetintas, J.D. Stanley, J.M. Mendes, T.O. Powers, and D.W. Dickson. 2010. *Meloidogyne* spp. Infecting ornamental plants in Florida. *Nematropica* 40:87-103.
- Brito, J., T. Powers, P. Mullin, P. Inserra, and D.W. Dickson. 2004. Morphological and molecular characterization of *Meloidogyne mayaguensis* Isolates from Florida. *J. Nematol.* 36:232-240.
- Castillo, P., N. Vovlas, N. Troccoli, G. Liébanas, J.E. Palomares-Rius, and B.B. Ianda. 2009. A new root-knot nematode, *Meloidogyne silvestris* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), parasitizing European holly in northern Spain. *Plant Pathol.* 58:606-619.
- Castro, L., L. Flores, y L. Uribe. 2011. Efecto del vermicompost y quitina sobre el control de *Meloidogyne incognita* en tomate a nivel de invernadero. *Agron. Costarricense* 35(2):21-32.
- Cenis, J.L., C.H. Opperman, and A.C. Triantaphyltous. 1992. Cytogenetic, enzymatic, and restriction fragment length polymorphism variation of *Meloidogyne* spp. from Spain. *Phytopathol.* 82:527-531.
- Chávez-Velazco, C., F. Solórzano-Figueroa, y M. Araya-Vargas. 2009. Relación entre nematodos y la productividad del banano (*Musa AAA*) en Ecuador. *Agron. Mesoam.* 20:351-360.
- Flores, L. 2008. Identificación de especies de *Meloidogyne* descritas en Costa Rica con base en la variabilidad del ADN mitocondrial. Tesis M.Sc., Universidad de Costa Rica, CRC.
- Gandarilla, H. 2005. Algunos aspectos sobre las principales especies de fitonemátodos asociadas a los cultivos de plantas ornamentales. *Fitosanidad* 9:49-57.
- Hirschmann, H. 1986. *Meloidogyne hispanica* sp. (Nematoda: Meloidogynidae), the "Seville Root-Knot Nematode". *J. Nematol.* 18:520-532.
- Hugall, A., J. Stanton, and C. Moritz. 1999. Reticulate evolution and the origins of ribosomal internal Transcribed Spacer diversity in apomictic *Meloidogyne*. *Mol. Biol. Evol.* 16:157-164.
- Humphreys, D., V. Williamson, L. Salazar, L. Flores, y L. Gómez. 2011. Presence of *Meloidogyne enterolobii* Yang & Eisenback (*M. mayaguensis*) in guava and acerola from Costa Rica. *Nematol.* 14:199-207.
- Hyman, B. 1990. Molecular diagnosis of *Meloidogyne* species. *J. Nematol.* 22:24-30.
- Jepson, S. 1987. Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). C.A.B. International, WI, USA.
- Jeyaprasath, A., M.S. Tigano, J. Brito, R. Carneiro, and D. Dickson. 2006. Differentiation of *Meloidogyne floridensis* from *M. arenaria* using high-fidelity PCR amplified mitochondrial AT-rich sequences. *Nematropica* 36:1-12.
- Levin, R. 2005. Reproduction and identification of root-knot nematodes on perennial ornamental plants in Florida. Tesis M.Sc., Universidad de Florida, USA.
- MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería). 2012. NR-ARP-L-01. Lista de plagas reglamentadas. Servicio Fitosanitario del Estado, CRC. https://www.sfe.go.cr/tramites/Plagas_reglamentadas.pdf (consultado 10 feb. 2012).
- Maleita, M., R. Hazelmann, C. Curtis, T.O. Powers, and I. Abrantes. 2012a. Host status of cultivated plants to *Meloidogyne hispanica*. *Eur. J. Plant Pathol.* 133:449-460.
- Maleita, M., M.J. Simões, C. Egas, R. Curtis, and I. Abrantes de O. 2012b. Biometrical, biochemical, and molecular diagnosis of Portuguese *Meloidogyne hispanica* isolates. *Plant Dis.* 96:865-874.
- Neher, D. 2001. Role of nematodes in soil health and their use as indicators. *J. Nematol.* 33:161-168.
- Olsen, M. 2000. Root-knot nematode. <http://ag.arizona.edu/pubs/diseases/az1187> (consultado 8 mayo 2010).
- Ortuño, N., y R. Oros. 2002. Nematodos que atacan cultivos ornamentales. *Manejo Integrado Plagas y Agroecología* 66:76-81.
- Orui, Y. 1999. Species identification of *Meloidogyne* spp. (Nematoda: Meloidogynidae) in Japan by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR). *Jpn. J. Nematol.* 29:7-15.
- Peraza-Padilla, W., J. Rosales-Flores, A. Esquivel-Hernández, I. Hilje-Rodríguez, R. Molina-Bravo, y P. Castillo-Castillo. 2013. Identificación morfológica, morfométrica y molecular de *Meloidogyne incognita* en higuera (*Ficus carica*) en Costa Rica. *Agron. Mesoam.* 24:337-346.
- Powers, T. 2004. Nematode molecular diagnostics: From bands to barcodes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:367-385.
- Powers, T., and T. Harris. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. *J. Nematol.* 23:1-6.
- Powers, T., P. Mullin, T. Harris, L. Sutton, and R. Higgins. 2005. Incorporating molecular identification of

- Meloidogyne* spp. into a large-scale regional nematode survey. *J. Nematol.* 37:226-235.
- Powers, T., D. Neher, P. Mullin, A. Esquivel, R. Giblin-Davis, N. Kanzaki, S. Stock, M. Mora, and L. Uribe. 2009. Tropical nematode diversity: vertical stratification of nematode communities in a Costa Rican humid lowland rainforest. *Mol. Ecol.* 18:985-996.
- Quénéhervé, P., M. Godefroid, P. Mège, and S. Marie-Luce. 2011. Diversity of *Meloidogyne* spp. parasitizing plants in Martinique Island, French West Indies. *Nematropica* 41:191-199.
- Richardson, P.N., and P.S. Grewal. 1993. Nematode pest of glasshouse crops and mushrooms. In: K. Evans, D.L. Trudgill et al., editors, *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*. CAB International, Cambridge, GBR. p. 501-544.
- Salazar-Antón, W., y T.J. Guzmán-Hernández. 2013a. Efecto de poblaciones de *Meloidogyne* sp. en el desarrollo y rendimiento del tomate. *Agron. Mesoam.* 24:419-426.
- Salazar-Antón, W., y T.J. Guzmán-Hernández. 2013b. Nematodos fitoparásitos asociados al tomate en la zona occidental de Nicaragua. *Agron. Mesoam.* 24:27-36.
- SEPSA. (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria). 2011. Indicadores macroeconómicos, comerciales y productivos del Sector Agropecuario. Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), CRC.
- Sidiqqi, M.R. 2000. *Tylenchida parasites of plants and insects*. 2nd ed. Beatles, London, GBR.
- Solano-González, S., A. Esquivel-Hernández, R. Molina-Bravo, y B. Morera-Brenes. 2011. Identificación molecular de especies de nematodos noduladores (*Meloidogyne* spp.) asociadas a plantas ornamentales de altura. En: 2do Congreso Latinoamericano de Genética Humana, 6to Congreso Nacional de Biología, 2do Congreso Costarricense de Biotecnología, mayo 2011. San José, CRC.
- Southey, J. 1965. *Plant nematology*. Tech. Bull. N°7. Ministry of Agriculture Fisheries and Foods, London, England.
- Subbotin, S., and M. Moens. 2006. Morphology and anatomy of plant-parasitic nematodes. In: R. Perry, and M. Moens, editors, *Plant nematology*. CAB International, GBR. p. 34-60.
- 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., D. Donkers, and M. Farget. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterized amplified region (SCAR) based PCR assays. *Nematol.* 2:847-853.