

Diagnóstico integrativo para nematodos fitoparásitos

María Gabriela Medina-Canales, Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Departamento de Parasitología, México, D.F., CP 11720, México. Correspondencia: magameca@yahoo.com.mx

Resumen. Los nematodos fitoparásitos pertenecientes al género *Meloidogyne* se encuentran ampliamente distribuidos en el mundo y México no es la excepción, se asocian a pérdidas económicas en cultivos, entre los que destacan los de hortalizas, razón por la cual es necesario implementar nuevas estrategias en el manejo y control de cultivos afectados por estos nematodos. La identificación apropiada de las especies de *Meloidogyne* es importante, precisamente para poder implementar estrategias no químicas en el control de este nematodo como son la rotación de cultivos, uso de agentes de control biológico y variedades resistentes, además de la aplicación de programas de cuarentena. La determinación de los fenotipos isoenzimáticos en geles de poliacrilamida, principalmente de esterasa y malato deshidrogenasa, han resultado ser efectivos, rápidos y confiables en la identificación de las especies más comunes de *Meloidogyne*, lo cual en conjunción con la determinación de caracteres morfométricos y la caracterización molecular nos proporciona la certeza de haber identificado la especie correcta.

Palabras clave adicionales: polimorfismo, isoenzimas, nematodo agallador.

Existen diversos métodos para la identificación del nematodo agallador *Meloidogyne* como: morfología y morfometría, determinación de hospedantes preferenciales, identificación molecular y enzimática. Con el tiempo estas técnicas han ido mejorando y han sido más sensibles al grado de que con una sola hembra se puede determinar la especie correspondiente de nematodo agallador presente en un cultivo (1, 2).

Métodos de identificación del nematodo agallador *Meloidogyne* spp.

Método morfológico y morfométrico. La identificación de especies de *Meloidogyne* en un principio se basó en caracteres morfológicos y morfométricos de hembras, machos y juveniles. Entre los caracteres más utilizados tenemos los patrones perineales; sin embargo, estos son variables aun entre especies o pueden haber nematodos aberrantes, por tanto aun cuando se contara con personal adiestrado en la identificación por este método, sería difícil determinar con exactitud la especie (2).

Hospedantes diferenciales. La prueba de los hospedantes diferenciales consiste en la inoculación de seis plantas hospedantes estándar: Algodón “Deltapine 61”, tabaco “NC 95”, pimienta “California Wonder”, sandía “Charleston Gray”, cacahuate “Florunner” y tomate

“Rutgers”. Esta prueba se basa en de la susceptibilidad o resistencia de la planta, además es posible distinguir las cuatro especies de *Meloidogyne* más frecuentes, cuatro razas de *M. incognita* y dos razas de *M. arenaria* (3).

Caracterización molecular. El diagnóstico molecular se puede aplicar a huevos, juveniles, hembras y machos, pero tiene algunas limitaciones, ya que con esta técnica no se puede diferenciar entre los diferentes haplotipos, además la amplificación se basa en fragmentos relativamente grandes, lo que limita su aplicación en extractos de DNA degradados o contaminados. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) proporciona un método altamente sensible para la amplificación de DNA y la posterior identificación. Además esta técnica permite hacer la correcta identificación de tres de las especies de *Meloidogyne* más distribuidas *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* (3).

Caracterización enzimática. Es un método descrito para identificar a las hembras de diversas especies de *Meloidogyne* mediante electroforesis en geles de poliacrilamida de las isoenzimas estereras (EST) y malato deshidrogenasa (MDH). Después de realizada la electroforesis, la EST o MDH se presentan como bandas de color las cuales son especie-específicas (1, 2). Dicho método es muy sensible, ya que se necesita sólo una hembra para hacer la identificación, por lo tanto, es útil para la detección temprana de mezclas de especies (2). La estabilidad relativa de los fenotipos isoenzimáticos en *Meloidogyne* spp. representa una herramienta útil para la identificación del nematodo, entre los sistemas de isoenzimas, la EST tiene el valor diagnóstico más alto ya que es el fenotipo que más se ha descrito (1, 2).

Es importante señalar que en la determinación de la EST hay variación intraespecífica, lo cual en algunas ocasiones dificulta la identificación, por ello para resolver estas variantes que se presentan entre especies es necesario determinar otros fenotipos isoenzimáticos como: MDH o SOD (1, 2).

Extracción de proteínas. Se extraen las hembras de las raíces agalladas con ayuda de jeringas de insulina. Para determinar el fenotipo EST la hembra se coloca en un tubo eppendorf que contiene 20 µl del regulador de extracción (1), estas se lisan con ayuda de una punta de micropipeta de 10 µL. Los tubos se centrifugan a 13000 rpm durante 2 minutos y se guardan a 4°C hasta su uso. Para determinar el fenotipo MDH se utiliza un buffer diferente (1) y se procesa de la misma forma que el fenotipo EST (1).

Formación del gel de poliacrilamida. La electroforesis se realizara en geles de poliacrilamida, los cuales estan formados por dos geles un gel separador que

tiene una concentración de %T de 12.5 y un gel concentrador con un %T 18. El gel se monta y se le coloca el regulador de corrimiento (1). A la extracción de proteínas obtenidas previamente se le colocan 5 µL de azul de bromofenol al 0.02%, la mezcla se coloca en el pozo y el gel se corre durante 30 minutos a 80 volts y después 70 min a 250 volts. El gel se lava con agua bidestilada y se realiza una tinción a 37°C durante 1 h con la solución para teñir correspondiente a la isoenzima a determinar (1). A partir del número de bandas y la movilidad electroforética calculada para cada muestra se identifica a la especie de *Meloidogyne* correspondiente (2).

Referencias Bibliográficas

- Esbenshade PR and Triantaphyllou AC. 1985. Electrophoretic methods for the study of root-knot nematode enzymes. pp. 115-123. *In*: Sasser JN and Carter CC (eds.). An Advanced Treatise on *Meloidogyne*, Vol. I. Department of Plant Pathology y United States Agency for International Development, USA.
- Brito, J. A, Kaur, R., Cetintas, R., Stanley, J. D, Mendes ML, Powers TO and Dickson DW. 2010. *Meloidogyne* spp. infecting ornamental plants in Florida. *Nematropica* 40: 87-103.
- Powers TO, Mullin PG, Harris TS, Sutton LA, and Higgins RS. 2005. Incorporating molecular identification of *Meloidogyne* spp. into a large-scale regional nematode survey. *Journal of Nematology* 37: 226-235.