

**DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL  
CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA**

**Área de Diagnóstico Fitosanitario  
Laboratorio de Nematología**

**Protocolo de Diagnóstico:**

***Meloidogyne chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo & Finley, 1980**

---



## I. ÍNDICE GENERAL

|                                                                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO .....</b>                                                             | <b>1</b>  |
| <b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>                                                                                 | <b>2</b>  |
| 2.1 Información sobre la plaga.....                                                                          | 2         |
| 2.2 Información taxonómica .....                                                                             | 3         |
| <b>3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN .....</b>                                                                   | <b>4</b>  |
| 3.1 Detección .....                                                                                          | 4         |
| 3.2 Procedimiento de extracción de nematodos .....                                                           | 5         |
| 3.2.1 Disección directa.....                                                                                 | 5         |
| 3.2.2 Tamizado-centrifugado y flotación .....                                                                | 6         |
| 3.3 Descripción morfológica y morfométrica .....                                                             | 7         |
| 3.4 Identificación de la plaga .....                                                                         | 8         |
| 3.4.1 Confusión con otras especies .....                                                                     | 8         |
| 3.5 Identificación morfométrica.....                                                                         | 10        |
| 3.5.1 Montaje de cortes perineales .....                                                                     | 10        |
| 3.5.2 Montaje temporal de filiformes (J2 y machos).....                                                      | 11        |
| 3.5.3 Montaje semipermanente de filiformes.....                                                              | 12        |
| 3.6 Identificación molecular .....                                                                           | 13        |
| 3.6.1 Extracción del DNA.....                                                                                | 13        |
| 3.6.1.1 A partir de especímenes individuales .....                                                           | 13        |
| 3.6.1.2 Extracción de DNA a partir de masas de huevos o hembras.....                                         | 14        |
| 3.6.2 PCR punto final .....                                                                                  | 15        |
| 3.6.2.1 Amplificación con <i>primers</i> generales del marcador molecular mitocondrial <i>COII/16S</i> ..... | 15        |
| 3.6.2.2 RFLP del marcador molecular mitocondrial <i>COII/16S</i> .....                                       | 16        |
| 3.6.2.3 Amplificación con <i>primers</i> generales del marcador molecular ribosomal <i>18S</i> .....         | 17        |
| 3.6.2.4 RFLP del marcador molecular <i>18S</i> .....                                                         | 18        |
| 3.6.3 Controles para las pruebas moleculares .....                                                           | 19        |
| 3.6.4 Interpretación de resultados para los ensayos de PCR punto final.....                                  | 20        |
| 3.7 Identificación del patógeno .....                                                                        | 20        |
| 3.8 Verificación mediante secuenciación.....                                                                 | 22        |
| <b>4. REGISTROS.....</b>                                                                                     | <b>23</b> |
| <b>5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL .....</b>                                                          | <b>23</b> |
| <b>6. RECONOCIMIENTO.....</b>                                                                                | <b>23</b> |
| <b>7. REFERENCIAS .....</b>                                                                                  | <b>24</b> |
| <b>8. ANEXOS .....</b>                                                                                       | <b>27</b> |
| 8.1 Síntomas y signos .....                                                                                  | 27        |
| 8.2 Cortes perineales.....                                                                                   | 28        |
| 8.3 Extracción de nematodos por macerado-tamizado-centrifugado-flotación .....                               | 29        |
| 8.4 Tabla de caracteres morfométricos para el diagnóstico .....                                              | 30        |
| 8.4.1. Caracteres de juveniles J2 (ejemplo) .....                                                            | 30        |
| <b>9. HISTORIAL DE CAMBIOS.....</b>                                                                          | <b>31</b> |



## II. ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Morfología del nematodo agallador de Columbia ( <i>Meloidogyne chitwoodi</i> ).....          | 9  |
| Figura 2. Amplificación de los productos de PCR con los primers C2F3/1108.....                         | 20 |
| Figura 3. Digestión enzimática de <i>COI/16S</i> de <i>Meloidogyne chitwoodi</i> con <i>DraI</i> ..... | 21 |
| Figura 4. Amplificación de los productos de PCR con los primers 18S 965/18S 1573R.....                 | 21 |
| Figura 5. Digestión enzimática de 18S de <i>Meloidogyne chitwoodi</i> con <i>AluI</i> .....            | 22 |
| Figura 6. Síntomas y signos de <i>Meloidogyne chitwoodi</i> en papa.....                               | 27 |
| Figura 7. Obtención de patrón perineal de <i>Meloidogyne</i> spp.....                                  | 28 |
| Figura 8. Procedimiento de extracción de nematodos agalladores a partir de tubérculos.....             | 29 |

## III. ÍNDICE DE CUADROS

|                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Cuadro 1. Morfometría de <i>Meloidogyne chitwoodi</i> . Valores en micrómetros excepto <i>n</i> , <i>a</i> , <i>b</i> y <i>c</i> ..... | 8  |
| Cuadro 2. Caracteres morfológicos y morfométricos de <i>Meloidogyne</i> sp. Valores numéricos en micrómetros.....                      | 10 |
| Cuadro 3. <i>Primers</i> generales para detección de <i>Meloidogyne chitwoodi</i> .....                                                | 15 |
| Cuadro 4. Preparación de la mezcla de reacción.....                                                                                    | 15 |
| Cuadro 5. Programa de termociclaje para el ensayo de PCR con los primers C2F3/1108.....                                                | 16 |
| Cuadro 6. Preparación de <i>mix</i> para RFLP de la región <i>COII/16S</i> .....                                                       | 17 |
| Cuadro 7. <i>Primers</i> generales para detección de <i>Meloidogyne chitwoodi</i> con el gen <i>18S</i> .....                          | 17 |
| Cuadro 8. Preparación de la mezcla de reacción.....                                                                                    | 18 |
| Cuadro 9. Programa del termociclador para el ensayo con los primers 18S 965/18S 1573R.....                                             | 18 |
| Cuadro 10. Preparación del <i>mix</i> para RFLP del gen <i>18S</i> .....                                                               | 19 |



## 1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO

El objetivo del presente protocolo es describir los procedimientos y las metodologías aplicadas en el Laboratorio de Nematología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) para la detección e identificación de juveniles y adultos del nematodo agallador de Columbia *Meloidogyne chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo & Finley, 1980 mediante caracterización morfológica, morfométrica y técnicas moleculares. La incorrecta implementación o variaciones en la metodología especificada en este documento de referencia pueden derivar en resultados no esperados, por lo que es responsabilidad del usuario seguir y aplicar el protocolo de forma correcta.

Este protocolo fue desarrollado en las instalaciones de la Dirección del CNRF, de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). La presente versión podrá ser mejorada o actualizada quedando el registro en el historial de cambios.

El protocolo de Diagnóstico de *M. chitwoodi* está dirigido a Terceros Especialistas de los Laboratorios Aprobados y al personal técnico de los laboratorios oficiales del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria.



## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Información sobre la plaga

El género *Meloidogyne* posee cerca de 90 especies descritas, de las cuales unas diez son consideradas plagas agrícolas. Las especies *M. arenaria*, *M. enterolobii*, *M. hapla*, *M. incognita* y *M. javanica* son catalogadas de mayor impacto y están ampliamente distribuidas en el mundo. En regiones agrícolas de clima templado, las especies *M. chitwoodi*, *M. hapla* y *M. fallax* parasitan mono y dicotiledóneas, incluyendo cultivos de gran importancia como: papa (*Solanum tuberosum* L.), jitomate (*S. lycopersicum* L.) y zanahoria (*Daucus carota* L.). Estos nematodos afectan el crecimiento, rendimiento y la calidad de sus hospedantes (Scurrah et al., 2005; EPPO, 2016).

El nematodo agallador de Columbia ha sido reportado en Alemania, Argentina, Bélgica, Bulgaria, Canadá, Dinamarca, Eslovenia, Estados Unidos de Norteamérica, Inglaterra, Francia, México, Mozambique, Países Bajos, Portugal, Suecia, Suiza, Túnez, Turquía, Reino Unido y Sudáfrica (CAB, 2019).

Los juveniles de segundo estadio (J2) son los estados infectivos del género *Meloidogyne*. El umbral de daño económico para la pérdida de calidad en papa por *M. chitwoodi* se ha determinado en: 1 J2/250 mL de suelo en los Estados Unidos y 10 J2/100 mL en los Países Bajos (Santo y O'Bannon, 1981; Norshie et al., 2011).

El ciclo de vida de *M. chitwoodi* se completa en 3-4 semanas bajo condiciones favorables. La eclosión de los juveniles ocurre en el suelo o sobre la superficie de las raíces. Debido a la secreción de sustancias en la rizósfera, los J2 son atraídos a la cofia de las raíces y penetran en las células epidérmicas no suberizadas, ingresan al tejido vascular y comienzan a alimentarse, estimulando la formación de células gigantes multinucleadas y, al mismo tiempo, las células vecinas del periciclo comienzan a dividirse formando las típicas agallas o nódulos en las raíces (CAB, 2019). Los juveniles se engrosan, adoptando una forma de salchicha; dejan de alimentarse y pasan por tres mudas sucesivas para convertirse en machos o hembras. Esta especie se reproduce por partenogénesis meiótica facultativa, sin embargo, bajo condiciones ambientales adversas, competencia o falta de alimento, se producen machos y en tal caso, la reproducción puede ocurrir por anfimixis (García et al, 2018). Las hembras son de color blanco aperlado, tienen forma de pera y están embebidas en el tejido del hospedante. Los huevos son depositados en una matriz gelatinosa, cerca de la superficie de la raíz. En tubérculos de papa, las células hospedantes modificadas forman una capa protectora o “canasta” alrededor de la masa de huevos (EPPO, 2016; CAB, 2019).

Las principales vías de diseminación de *Meloidogyne* spp. son: material propagativo infectado (tubérculos semilla), el movimiento de suelo infestado por maquinaria agrícola y el agua de riego (Scurrah et al., 2005).



La presencia de abultamientos superficiales (mezquinos) y manchas marrones debajo de la epidermis de tubérculos de papa puede ser indicativo del daño ocasionado por *M. chitwoodi* (**Anexo 8.1, Figura 6**). Estos síntomas demeritan la calidad e imposibilitan su venta para consumo en fresco o industrialización. Las pérdidas económicas ocasionadas por este nematodo pueden alcanzar los 9 900 dólares/ha (Ingham et al., 2007).

Debido a la distribución limitada de *M. chitwoodi* en el mundo, varias agencias internacionales de sanidad vegetal aplican diversas medidas de mitigación de riesgo para evitar o restringir el ingreso a sus territorios, así como para controlar y confinar a este patógeno en los lugares donde se ha establecido (Wesemael et al., 2013).

## 2.2 Información taxonómica

**Nombre científico:** *Meloidogyne chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo & Finley, 1980

**Sinónimos:** No existen sinónimos

**Nombres comunes (CAB, 2019):** Nematodo agallador de Columbia (español)

*Columbia root-knot nematode* (inglés)

*Nématode cécidogène du Columbia* (francés)

### Posición taxonómica:

Con base en la filogenia de la subunidad pequeña (SSU-18S) del rDNA:

Animalia, Nematoda, Chromadorea, Rhabditida, Tylenchina, Tylenchomorpha,  
Meloidogynidae, *Meloidogyne*

(De Ley et al., 2006; Margullis y Chapman, 2009; Siddiqi, 2000)



### 3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

#### 3.1 Detección

Para determinar la presencia de *M. chitwoodi* es recomendable contar con material vegetal que presente los síntomas inducidos por este nematodo (**Anexo 8.1, Figura 6**). En caso de que la muestra no cumpla con las características requeridas o se encuentre en mal estado (Senasica, 2018), se registra en la bitácora y se conservan las imágenes fotográficas correspondientes para justificar el motivo por el cual no pudo ser procesada.

**Nota:** para efectos del presente protocolo el término “**muestra**” se emplea en sustitución del término “**ítem**” que se utiliza en los documentos del Sistema de Gestión de Calidad.

En los tubérculos, las hembras se ubican entre los primeros 2 mm debajo de la epidermis. La presencia de manchas necróticas u oscuras entre la superficie del tubérculo y el anillo vascular es un indicativo de la presencia de la matriz gelatinosa y la respectiva masa de huevos. La primera generación se presenta principalmente en las raíces, mientras que las generaciones subsecuentes atacan los tubérculos y pueden producirse hasta 5 generaciones sobre un hospedante susceptible bajo condiciones ambientales favorables (Scurrah et al., 2005).

En la parte aérea de plantas altamente infestadas se observan síntomas como achaparramiento y amarillamiento. En las partes subterráneas, las agallas son muy comunes en las raíces; este síntoma puede ser de utilidad para diferenciar entre *M. chitwoodi* y *M. hapla*. Las agallas producidas por *M. chitwoodi* son relativamente pequeñas y generalmente sin raíces secundarias que emergen de ellas, a diferencia de lo observado en agallas de *M. hapla*. En la superficie de los tubérculos, *M. chitwoodi* produce numerosas deformaciones (mezquinos). En algunos cultivares de papa aun con infestaciones altas, las papas pueden ser asintomáticas externamente, sin embargo, al retirar la epidermis, puede observarse tejido interno necrótico de color marrón (EPPO, 2016).

Por lo anterior, para la detección de nematodos fitopatógenos en material propagativo importado de papa, de acuerdo a lo establecido en el “Plan de trabajo para la importación de semilla de papa de Canadá a México”, firmado en octubre de 2008 entre ambos países, deben analizarse 400 tubérculos. Por otro lado, en el caso de la importación de papa de EUA para consumo en la zona fronteriza de México, con base en lo establecido en el “Módulo de consulta de requisitos fitosanitarios para la importación de mercancías de origen vegetal”, la muestra a analizar para detección de nematodos consiste de 200 tubérculos (Acuerdo SAGARPA, 2012).

Las metodologías de detección e identificación descritas en el presente Protocolo de Diagnóstico están basadas en: PM 7/41 (3): *Meloidogyne chitwoodi* and *Meloidogyne fallax* (EPPO, 2016) y NRMF 3: Movilización de papas hacia un país miembro de la NAPPO (NAPPO, 2011).



## 3.2 Procedimiento de extracción de nematodos

Los especímenes deben ser extraídos del material vegetal mediante disección directa y macerado-tamizado-centrifugación-flotación. Debe realizarse la inspección visual buscando la sintomatología descrita anteriormente y, en caso de que ésta se presente, procesar el material sintomático por separado (Carta et al., 2005).

### 3.2.1 Disección directa

Si la muestra consiste en plantas con raíces, la extracción de nematodos debe realizarse cuidadosamente para evitar el desprendimiento de las masas de huevos.

- 1) Con la ayuda de un microscopio estereoscópico, buscar las agallas (hiperplasia e hipertrofia celular), producto de la infección de *Meloidogyne* sp.
- 2) Localizar las masas de huevos mediante la presencia de zonas con coloración marrón-rojizo sobre las agallas en las raíces. Esta coloración se debe a la oxidación de fenoles en la matriz gelatinosa.
- 3) Cuando se trate de tubérculos de papa, retirar la epidermis con ayuda de un cuchillo o pelapapas (3-5 mm de profundidad) y realizar nuevamente una inspección visual. La presencia de puntuaciones púrpura o marrón puede ser un indicativo de la presencia de *Meloidogyne* spp. (Anexo 8.1, Figura 6).

**Nota:** es común localizar a las hembras en los extremos del tubérculo, sobre todo en el estolón, por lo que es recomendable hacer énfasis en esa área.

- 4) Realizar, bajo microscopio estereoscópico, una revisión minuciosa del tubérculo afectado y disectar la zona de interés con ayuda de agujas y pinzas de disección.
- 5) Extraer, de manera separada, hembras y masas de huevos.

**Nota:** la masa de huevos se debe colocar en una caja Petri con agua e incubar a  $\pm 23$  °C para la eclosión de los J2 y obtener la morfometría para complementar la identificación.

- 6) Colocar las hembras completas extraídas en una solución de Cloruro de sodio (NaCl) al 0.9 % (Jepson, 1987) para evitar su colapso o rompimiento, y de esta manera mantener la integridad del cuello.

**Nota:** en caso de no detectar hembras y/o masas de huevos en los cortes epidermales de los tubérculos, estos deberán ser procesados mediante macerado-tamizado-flotación con la finalidad de detectar otros estadios del nematodo como huevos, juveniles, hembras jóvenes y machos.





### 3.2.2. Tamizado-centrifugado y flotación

El método de tamizado, que a continuación se describe, incluye algunas modificaciones al propuesto por van Bezooijen (2006). Se fundamenta en la separación de los nematodos al pasar el material macerado a través de una serie de tamices de diferentes números 20, 60, 100, 200, 325 y 500 (850, 250, 150, 75, 45 y 32  $\mu\text{m}$  de apertura, respectivamente) (ISO, 2016). Posteriormente, se realizan dos pasos de centrifugación, primero con caolín y finalmente, una separación por densidad utilizando solución azucarada (**Anexo 8.3, Figura 8**; Hooper et al., 2005; Manzanilla-López, 2012):

- 1) Colocar la muestra (epidermis de tubérculos) en el vaso de licuadora y adicionar agua corriente hasta cubrirla.
- 2) Macerar 3 veces por lapsos de 3 a 5 s.
- 3) Verter el producto macerado a un recipiente de 10 L, agregar agua a  $\frac{3}{4}$  de capacidad, agitar hasta obtener una suspensión y dejar sedimentar durante 15-20 s.
- 4) Colocar el tamiz No. 20 sobre otro recipiente de 10 L vacío y verter la suspensión por el tamiz hacia otro recipiente de 10 L.
- 5) Repetir los pasos 3 y 4.
- 6) Descartar material retenido en tamiz No. 20.
- 7) Repetir los pasos 4 y 6 con cada uno de los siguientes tamices. Lavar, con agua a presión, el material retenido en el tamiz No. 60 y descartarlo.
- 8) Decantar lo retenido en el tamiz No. 100 sobre el No. 200.
- 9) Decantar lo retenido en el tamiz No. 200 sobre el No. 325.
- 10) Decantar lo retenido en el tamiz No. 325 sobre el No. 500.
- 11) Transferir el producto colectado en el tamiz No. 500 a tubos de centrífuga de 50 mL de (como máximo 30 mL por tubo).
- 12) Agregar 1 g de caolín por cada tubo y mezclar perfectamente.
- 13) Centrifugar por 5 min a 700 x g.
- 14) Eliminar cuidadosamente el sobrenadante de cada tubo y disolver la pastilla formada en el fondo añadiendo 30 mL de solución azucarada con una gravedad específica de 1.22 (588 g de azúcar en 1 L de agua) (**Anexo Figura 8g**). Este paso se debe realizar lo más rápido posible para evitar la deformación y plasmólisis de los nematodos.

**Nota:** debido a que la pureza del azúcar influye en el peso necesario para obtener una solución a la gravedad específica indicada, es necesario verificar este parámetro utilizando un densímetro.

- 15) Centrifugar por 4 min a 700 x g.



- 16) Verter el sobrenadante en un tamiz de No. 500 y adicionar agua corriente para enjuagar la solución azucarada de los especímenes.
- 17) Concentrar los nematodos en un tubo de centrífuga o vaso de precipitados, procurando que el volumen de agua no exceda de 20 mL.
- 18) Vaciar esta suspensión en una caja Petri.

### 3.3 Descripción morfológica y morfométrica

**Hembras:** cuando llegan a su estado de madurez, globosas a piriformes, de color blanco aperlado (**Figura 1a**). Presentan un cuello marcado en la parte anterior y, en la posterior, en ocasiones es visible una ligera protuberancia. Pequeñas vesículas generalmente presentes dentro del bulbo medio, agregadas alrededor del lumen, en la parte superior de la válvula del metacorpus. Región cefálica débil con un anillo labial. Poro excretor claramente visible y, comúnmente, localizado de 1 a 1 ½ de la longitud del estilete. Estilete pequeño y fuerte, con el cono curvado dorsalmente; presenta los nódulos redondeados y ligeramente proyectados hacia la parte posterior (**Figura 1d**). Patrón perineal, generalmente pequeño, redondeado a oval, con estrías gruesas fusionadas alrededor del área anal sin puntuaciones y con la vulva hundida (**Figura 1e**).

**Machos:** cuerpo alargado y vermiforme. Cápsula cefálica no separada del cuerpo, disco labial elevado con labios laterales presentes. Campo lateral con cuatro líneas, la banda central es más angosta que las externas. Presenta uno o dos testículos y espículas arqueadas. Con microscopía electrónica de barrido se observa aereolación en el campo lateral y que las espículas, en su región ventral, presentan puntas dentadas. Los fasmidios se localizan al nivel o anterior a la cloaca. La cola es corta y redondeada

**Juvenil segundo estadio (J2):** cuerpo pequeño, vermiforme. Cápsula cefálica débil con un disco labial y un anillo post-labial grande sin estriaciones (**Figura 1b**). Campo lateral con cuatro líneas, no aereolados. Fasmidios pequeños, difíciles de observar, localizados 1/3 de distancia de la cola. Recto no inflado. Cola cónica con extremo redondeado y con una porción hialina (**Figura 1c**).



**Cuadro 1. Morfometría de *Meloidogyne chitwoodi*. Valores en micrómetros excepto n, a, b y c**

| Característica                   | ♀                       | ♂                       | J2                      |
|----------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>n</i>                         | 60                      | 30                      | 60                      |
| Longitud del cuerpo              | 591±60<br>(430-740)     | 1068±100<br>(887-1268)  | 390±16<br>(336-417)     |
| Ancho máximo del cuerpo          | 422±42<br>(344-518)     | 30±3.9<br>(22-37)       | 14.2±0.6<br>(12.5-15.5) |
| Longitud del estilete            | 11.9±0.3<br>(11.2-12.5) | 18.3±0.2<br>(18.1-18.5) | 9.9±0.3<br>(9.0-10.3)   |
| DGED                             | 4.2±0.6<br>(3.4-5.5)    | 3±0.4<br>(2.2-3.4)      | 3.2±0.2<br>(2.6-3.9)    |
| Extremo anterior a metacarpus    | 63±7<br>(52-80)         | 71±5<br>(61-77)         | 51±3<br>(43-56)         |
| Extremo anterior a poro excretor | 18±5<br>(10-27)         | -                       | -                       |
| Longitud de cola                 | -                       | 6.8±0.9<br>(4.7-9.0)    | 43±1.8<br>(39-47)       |
| Región hialina de la cola        | -                       | -                       | 11±1<br>(8.6-13.8)      |
| Espícula                         | -                       | 27±1.2<br>(26-29)       | -                       |
| Gubernáculo                      | -                       | 7.7±0.6<br>(6.5-8.2)    | -                       |
| <i>a</i>                         | 1.4±0.2<br>(1.1-1.8)    | 36±4<br>(28-46)         | 27.5±1.2<br>(24.5-29.8) |
| <i>b</i>                         | 4.4±0.4<br>(3.8-5.0)    | 7.2±1<br>(6-9)          | 3.6±0.2<br>(3.3-3.8)    |
| <i>c</i>                         | -                       | 162±20<br>(140-226)     | 8.9±0.4<br>(7.9-9.6)    |

Tomado y traducido de Golden et al. (1980)

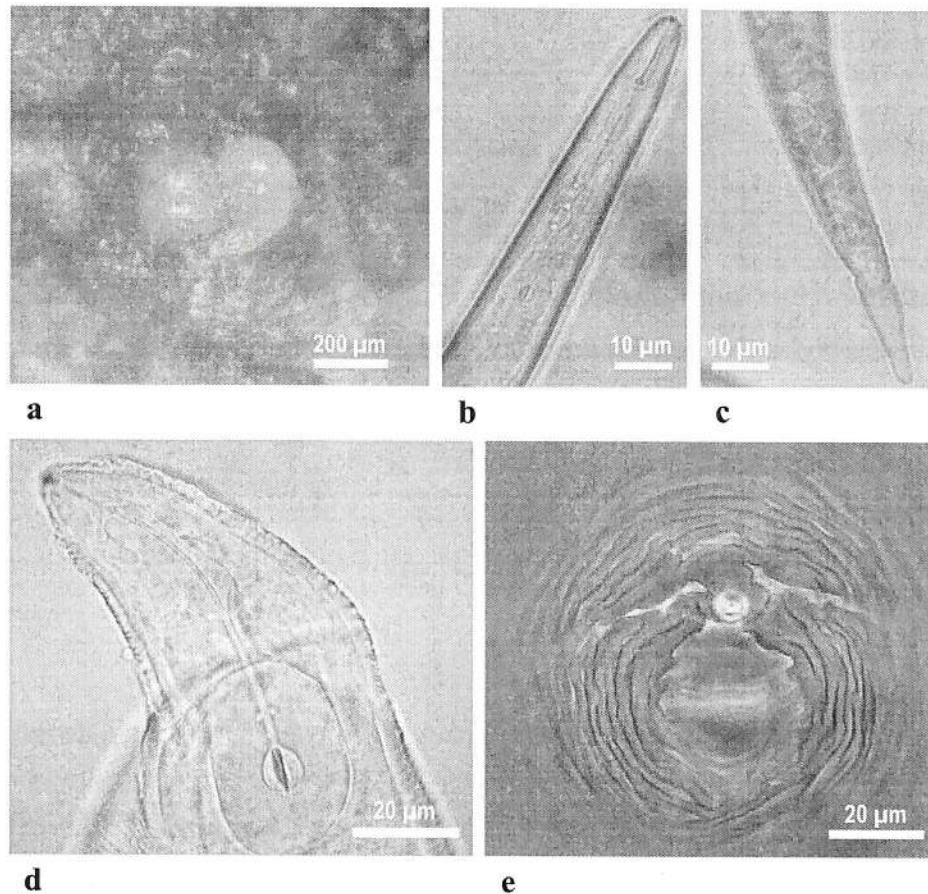
### 3.4 Identificación de la plaga

La identificación de *M. chitwoodi* consiste en la comparación morfológica de los patrones perineales de hembras extraídas, el análisis morfométrico y de los índices de Man (De Man, 1984) obtenidos de los ejemplares (J2, hembras o machos) con respecto a lo mencionado en la descripción original de esta especie por Golden et al. (1980) (**Cuadro 1**).

#### 3.4.1 Confusión con otras especies

Las especies *M. chitwoodi*, *M. fallax* y *M. hapla* son nematodos fitopatógenos de climas fríos o templados y dado que pueden afectar al mismo hospedante, existe el riesgo de confundir su identidad (Scurrah et al., 2005). En el **Cuadro 2**, se mencionan las características morfológicas y morfométricas que pueden ser utilizadas para la identificación y separación de estas especies.

El nematodo agallador de Columbia es una especie cuarentenaria para México en el cultivo de papa y su identificación debe ser verificada mediante análisis molecular. Lo anterior también es uno de los requisitos establecidos en NRMF 3 de la Organización Norteamericana de Protección a las Plantas (NAPPO, por sus siglas en inglés).



**Figura 1. Morfología del nematodo agallador de Columbia (*Meloidogyne chitwoodi*).** a) Hembras en tejido de papa. b) Parte anterior de J2. c) Cola y región hialina en J2. d) Cuello con estilete de hembra. e) Patrón perineal característico. Fuente: Senasica-DGSV-CNRF. 2021. D. R.

**Cuadro 2. Caracteres morfológicos y morfométricos para la separación de *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* y *M. hapla*. Valores numéricos en micrómetros**

| Característica                        | <i>M. chitwoodi</i>       | <i>M. fallax</i>            | <i>M. hapla</i>                       |
|---------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| ♀ forma de patrón perineal            | Redondo, ovalado          | Ovoide a oval               | Hexagonal                             |
| ♀ puntuaciones en área anal           | Ausentes                  | Ausentes                    | Presentes                             |
| ♀ arreglo y forma de estrías          | Gruesas alrededor del ano | Gruesas fuera del área anal | Delgadas y finas, fuera del área anal |
| ♀ posición abertura vulvar            | Hundida                   | Ligeramente hundida         | Superficial                           |
| ♀ estilete                            | 11.0-12.5                 | 14.0-15.0                   | 13.0-17.0                             |
| ♂ estilete                            | 18.0-19.0                 | 19.0-21.0                   | 19.0-22.0                             |
| Forma de nódulos de estilete          | Irregulares               | Redondeados                 | Redondeados                           |
| J2 longitud de cuerpo                 | 336.0-417.0               | 381.0-435.0                 | 360.0-500.0                           |
| J2 longitud de cola                   | 39.0-47.0                 | 46.0-56.0                   | 47.0-70.0                             |
| J2 longitud de región hialina de cola | 9.0-14.0                  | 12.0-16.0                   | Irregular                             |

Tomado y traducido de Hunt y Handoo (2009)

### 3.5 Identificación morfométrica

Una vez detectadas hembras, machos o J2 de *Meloidogyne* sp. se deben medir las características morfológicas y calcular los índices De Man indicados en el **Anexo 8.4**. Considerar el análisis morfométrico de, al menos, 10 hembras, 10 machos y 10 J2 para obtener una fuente de variación aceptable y elaborar las preparaciones temporales y permanentes correspondientes. En caso de detectar un número menor a 10, se debe asegurar que los ejemplares que se les realice el análisis morfológico y morfométrico sean los mismos utilizados para el análisis molecular.

#### 3.5.1 Montaje de cortes perineales

La región posterior de las hembras, conocida también como “región perineal o genital” es ampliamente utilizada para la identificación de especies de *Meloidogyne*. En esta región se encuentran estructuras como la vulva, el ano, los fasmidios y las líneas laterales. Existen una gran variedad de métodos para la obtención de la región perineal (Hunt y Handoo, 2012). Uno de ellos comprende la tinción de raíces o la epidermis de los tubérculos infestados para contrastar la coloración del tejido y la del nematodo, facilitando su manipulación. Sin embargo, este método tiene la desventaja de que la fucsina ácida es volátil y tóxica (Hooper, 1986), aunado a que el colorante puede afectar la observación de algunas características útiles para el diagnóstico. Por lo anterior, se recomienda obtener cortes perineales de hembras extraídas directamente del material vegetal, de acuerdo al procedimiento siguiente (**Anexo 8.2, Figura 7**):

- 1) Depositar, sobre un portaobjetos limpio, una gota de ácido láctico 45 %.
- 2) Colocar a la hembra, con ayuda de pinzas de disección o un pincel fino, dentro de la gota de ácido láctico para disolver el contenido interno.



- 3) Cortar cuidadosamente el cuello con un bisturí o navaja (**Figura 7a**) bajo microscopio estereoscópico.
- 4) Transferir el cuello a una gota de glicerina pura deshidratada sobre un portaobjetos.
- 5) Hacer un corte ecuatorial del cuerpo de la hembra (**Figura 7c**).
- 6) Limpiar suavemente el contenido interno de la hembra con un pescador de cerda gruesa hasta lograr visualizar la región o modelo perineal (**Figura 7d**).
- 7) Delimitar el modelo en forma de cuadrado, tanto como sea posible (**Figura 7d**).
- 8) Transferir el modelo perineal al portaobjetos donde se encuentra el cuello de la misma hembra.
- 9) Colocar el cuello y el patrón perineal en el fondo de la gota de glicerina, este último en posición convexa (cara interna) hacia la superficie del portaobjetos.

**Nota:** se debe colocar solo un cuello con estilete y su respectivo patrón perineal por laminilla.

- 10) Colocar tres secciones pequeñas (3 o 4 mm<sup>2</sup>) de parafina grado histopatología, alrededor de la gota de glicerina o en su caso, un anillo de parafina.
- 11) Colocar un cubreobjetos redondo de 18 mm de diámetro con ayuda de pinzas de disección.
- 12) Calentar la preparación en una placa térmica (85-90 °C) hasta fundir la parafina. Si se observan burbujas, calentar nuevamente.
- 13) Etiquetar y aplicar un sellado extra a la preparación con esmalte.

### 3.5.2 Montaje temporal de filiformes (J2 y machos)

Se sugiere realizar el montaje del doble o triple del número de ejemplares mencionados anteriormente debido a que algunos especímenes, al adoptar una posición incorrecta, resulta imposible obtener la medición de las características específicas para la obtención de los índices De Man:

- 1) Transferir los nematodos, con un pescador, a una gota de agua sobre un portaobjetos preferentemente cóncavo.
- 2) Relajar los nematodos en calor a través de un mechero con alcohol hasta que ya no presenten movimiento.

**Nota:** revisar constantemente el movimiento de los especímenes para evitar matarlos.

- 3) Transferir los nematodos ya relajados sobre una sección de medio de montaje agua-agar 2 % en un portaobjetos.



**Nota:** se sugiere colocarlos en una posición sinuosa para observar de manera clara las características de diagnóstico.

- 4) Colocar cuidadosamente un cubreobjetos, con ayuda de pinzas de disección, evitando la formación de burbujas debido a que éstas dificultan la observación y medición.
- 5) Observar los ejemplares en el microscopio compuesto y obtener la morfometría requerida (**Anexos 8.4.1 y 8.4.2**).
- 6) Recuperar, cuando sea posible, los especímenes medidos para continuar con su análisis molecular respectivo.

**Nota:** en caso de detección positiva a *M. chitwoodi* debe conservarse toda la evidencia: micrografías, mediciones y preparaciones.

### 3.5.3 Montaje semipermanente de filiformes

Esta es una alternativa recomendable para conservar especímenes por periodos de tiempo relativamente largos (hasta 3 meses, aproximadamente) en un agente fijador:

- 1) Colocar los nematodos en una caja Petri o vidrio de reloj pequeño.
- 2) Homogenizar la suspensión de nematodos y transferirlos, con ayuda de una micropipeta, a un volumen mínimo de agua (1-2 mL) sobre otro vidrio de reloj o caja Petri.
- 3) Agregar un volumen igual de solución fijadora TAF caliente ( $70\pm 5$  °C).

**Nota:** para preparar 100 mL de TAF mezclar: 7 mL de formaldehído 40 %, 2 mL de trietanolamina y 91 mL de agua destilada.

- 4) Dejar reposar los nematodos en TAF por 30 min y asegurarse que los ejemplares no presenten movimiento.
- 5) Colocar una gota de TAF (a  $23\pm 2$  °C) en el centro de un portaobjetos limpio.
- 6) Transferir de 5 a 10 nematodos a la gota de TAF.
- 7) Colocar tres secciones pequeñas (3 o 4 mm<sup>2</sup>) de parafina grado histopatología o en su caso, un anillo de parafina, alrededor de la gota del fijador TAF.
- 8) Colocar un cubreobjetos redondo de 18 mm de diámetro sobre la parafina.
- 9) Llevar la preparación a una placa térmica ( $85\pm 5$  °C) para fundir la parafina.
- 10) Retirar, de ser necesario, el exceso de parafina con ayuda de un bisturí.
- 11) Realizar un sellado extra colocando esmalte transparente.
- 12) Etiquetar y observar en microscopio compuesto.



### 3.6 Identificación molecular

Actualmente, el diagnóstico molecular de *M. chitwoodi* se ha convertido en una metodología rutinaria; sin embargo, es necesario recalcar que es imprescindible realizar, en primera instancia, la identificación morfológica-morfométrica y confirmar este resultado con el análisis genético.

En esta sección se establecen las metodologías **que deben** emplearse para la extracción de DNA y la amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa punto final (PCR, por sus siglas en inglés) de los marcadores moleculares del DNA mitocondrial *COII/16S* y el fragmento del gen *18S* del rDNA, así como el análisis de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de ambos marcadores.

#### 3.6.1 Extracción del DNA

La extracción del DNA puede llevarse a cabo a partir de especímenes individuales J2, de una a varias masas de huevos o hembras.

**Nota:** se recomienda separar la hembra de su respectiva masa de huevos y una vez obtenida la identificación morfológica, la masa de huevos puede ser utilizada para la extracción del DNA.

##### 3.6.1.1 A partir de especímenes individuales

En el caso de filiformes, se recomienda recuperar los ejemplares después de haber realizado el análisis morfométrico. El método de extracción de DNA (extracto crudo) empleado en este protocolo fue originalmente propuesto por Williams et al. (1992):

- 1) Colocar un espécimen en 13  $\mu$ L de *buffer* de extracción (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.45 % Tween 20, 0.05 % gelatina y 60  $\mu$ g/mL de proteinasa K) sobre un cubreobjetos limpio.
- 2) Macerar el nematodo, con una punta transparente de micropipeta o aguja de insulina, observando bajo el microscopio estereoscópico.
- 3) Mezclar por pipeteo (4-6 veces) y transferir la solución a un tubo de PCR de 200  $\mu$ L y mantenerlo en hielo.
- 4) Congelar a -40 °C por 30 min.
- 5) Transcurrido el tiempo de congelación, incubar inmediatamente los tubos a 65 °C por 1 hora y mezclar con vórtex, al menos, una vez en el intermedio de este periodo.
- 6) Posteriormente, para inactivar la proteinasa K, incubar a 95 °C por 15 min.
- 7) Dar un golpe de minicentrífuga, por 5 segundos, para concentrar el producto.





8) Conservar en congelación o a 4 °C hasta su uso.

### 3.6.1.2 Extracción de DNA a partir de masas de huevos o hembras

El procedimiento, de acuerdo con Yu et al. (2011) con algunas modificaciones, se describe a continuación:

- 1) Colocar las masas de huevos o hembras dentro de tubos de microcentrífuga estériles de 1.5 mL.
- 2) Adicionar 150  $\mu$ L de *buffer* de extracción (200 mM Tris-HCl, pH 8.0, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS) y centrifugar por a 3000 x g por 5 s.
- 3) Macerar con un pistilo estéril, 3 o 4 pulsaciones de 6 s con un taladro manual.
- 4) Congelar a  $-40\pm 2$  °C por 10 min.
- 5) Volver a macerar con otro pistilo estéril antes de que la solución se descongele.
- 6) Agregar 0.5 vol. de Acetato de Sodio pH 5.8 3 M.
- 7) Mezclar por inversión.
- 8) Incubar a  $-20\pm 2$  °C por 10 min
- 9) Descongelar y dar vortex.
- 10) Centrifugar a 18 539 x g por 5 min.
- 11) Transferir el sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 mL.
- 12) Adicionar 1 vol. de isopropanol frío ( $4\pm 2$  °C).
- 13) Mezclar por inversión.
- 14) Incubar a  $-20\pm 2$  °C por 20 min.
- 15) Centrifugar a 18 539 x g por 15 min para precipitar el DNA.
- 16) Eliminar el sobrenadante teniendo cuidado de no perder la pastilla del DNA.
- 17) Lavar la pastilla con 200  $\mu$ L de etanol al 70 % a  $-20\pm 2$  °C.
- 18) Centrifugar a 18 539 x g por 5 min.
- 19) Eliminar el sobrenadante teniendo cuidado de no eliminar la pastilla del DNA.
- 20) Lavar la pastilla con 200  $\mu$ L de etanol al 70 % a  $-20\pm 2$  °C.
- 21) Centrifugar a 18 539 x g por 5 min.
- 22) Eliminar el sobrenadante teniendo cuidado de no eliminar la pastilla del DNA.
- 23) Lavar la pastilla con 200  $\mu$ L de etanol al 100 % a  $-20\pm 2$  °C.



- 24) Centrifugar a 18 539 x g por 5 min.
- 25) Eliminar el sobrenadante teniendo cuidado de no eliminar la pastilla del DNA.
- 26) Dejar secar la pastilla a temperatura ambiente (23±2 °C).
- 27) Resuspender el DNA en 20 µL en agua estéril libre de nucleasas y conservar a -20±2 °C hasta su uso.

**Nota:** se transformaron 13 200 revoluciones por minuto (rpm) a fuerzas x g (RCF) descritos en Yu et al. (2011) para una centrifuga Eppendorf 5417c, rotor F 45-30-11 con radio 9.5 cm.

### 3.6.2 PCR punto final

#### 3.6.2.1 Amplificación con *primers* generales del marcador molecular mitocondrial *COII/16S*

El DNA (extracto crudo o genómico) es utilizado como templado para amplificar un fragmento de los genes mitocondriales *COII* y *16S* utilizando los *primers* generales C2F3/1108 (Powers y Harris, 1993). Esta región ha sido analizada en diversas especies de *Meloidogyne* y se han observado cuatro tamaños diferentes de fragmentos: 0.52-0.54, 0.75, 1.1-1.2 y 1.5-1.6 kb (Powers et al., 2005; Blok y Powers, 2009).

**Cuadro 3.** *Primers* generales para detección de *Meloidogyne chitwoodi*

| Tipo        | Nombre del <i>primer</i> | Secuencia (5' - 3')      | Tamaño (pb) |
|-------------|--------------------------|--------------------------|-------------|
| Sentido     | C2F3                     | GGTCAATGTTTCAGAAATTTGTGG | 520         |
| Antisentido | 1108                     | TACCTTTGACCAATCACGCT     |             |

Se debe utilizar *Taq* DNA Polymerase (marca Invitrogen, cat. 10342020). De utilizar otra enzima no se garantiza la reproducibilidad del ensayo. Se sugiere utilizar el control positivo (CP) a una concentración de 3-150 ng por reacción de 25 µL.

- 1) Preparar la mezcla de reacción de PCR punto final para el par de *primers* C2F3/1108 de acuerdo con lo descrito en el **Cuadro 4**. Considerar las muestras, controles positivos y negativos por triplicado.

**Cuadro 4.** Preparación de la mezcla de reacción

| Reactivos          | Concentración inicial | Concentración final | Volumen (µL) |
|--------------------|-----------------------|---------------------|--------------|
| <i>Buffer</i> PCR  | 10X                   | 1X                  | 2.5          |
| MgCl <sub>2</sub>  | 50 mM                 | 1.5 mM              | 0.75         |
| dNTP               | 10 mM                 | 0.2 mM              | 0.5          |
| <i>Primer</i> C2F3 | 10 µM                 | 0.08 µM             | 0.2          |



|                                      |        |                      |      |
|--------------------------------------|--------|----------------------|------|
| <b>Primer 1108</b>                   | 10 µM  | 0.08 µM              | 0.2  |
| <b>Taq DNA Pol</b>                   | 5 U/µL | 0.05 U/µL            | 0.25 |
| <b>DNA</b>                           | -      | -                    | 3.0  |
| <b>Agua grado biología molecular</b> | -      | -                    | 17.6 |
|                                      |        | <b>Volumen final</b> | 25   |

- 2) Utilizar el termociclador de acuerdo al programa térmico descrito en el **Cuadro 5**.

**Cuadro 5. Programa de termociclaje para el ensayo de PCR con los primers C2F3/1108**

| <b>Etapa</b>                     | <b>Temperatura</b>       | <b>Tiempo</b> | <b>Ciclos</b> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------|---------------|
| <b>Desnaturalización inicial</b> | 94 °C                    | 3 min         | 1             |
| <b>Desnaturalización</b>         | 94 °C                    | 45 s          | 35            |
| <b>Anillamiento</b>              | 55 °C                    | 45 s          |               |
| <b>Extensión</b>                 | 72 °C<br>Rampeo 0.5 °C/s | 1 min         |               |
| <b>Extensión final</b>           | 72 °C                    | 10 min        | 1             |
| <b>Conservación</b>              | 4°C                      | ∞             |               |

- 3) Los productos de PCR se deben analizar mediante electroforesis horizontal por 80 min a 90 V en un gel de agarosa al 1.4 % en *buffer* TAE 1X teñido con 0.7X de GelRed (marca Biotium) u otro colorante que permita la interpretación de los resultados (**Figura 2**).

### 3.6.2.2 RFLP del marcador molecular mitocondrial *COII/16S*

Las especies *M. fallax*, *M. graminicola*, *M. graminis*, *M. hapla*, *M. mali*, *M. marylandi*, *M. microtyla*, *M. nassi*, *M. oryzae*, *M. suginamiensis* y *M. trifolliophila* también presentan un producto amplificado de 520-540 pb de esta región (Powers et al., 2005; Blok y Powers, 2009). Sin embargo, mediante digestión enzimática con *DraI*, la especie *M. chitwoodi* presenta un patrón de restricción distintivo de cuatro fragmentos: 270, 120, 90 y 40 pb (Powers et al., 2005). Por lo anterior, se debe realizar la digestión enzimática con ANZA 77 (*DraI*, marca Invitrogen, cat. IVGN077-6) como se describe a continuación:

- 1) Descongelar los reactivos, realizar la mezcla considerando las concentraciones y volúmenes descritos en el **Cuadro 6**.



**Cuadro 6. Preparación de la mezcla para RFLP de la región COII/16S**

| Reactivos                     | Concentración final  | Volumen (μL) |
|-------------------------------|----------------------|--------------|
| Anza 10X Red Buffer           | 1X                   | 2            |
| Enzima (10 U/μL)              | 0.5 U/μL             | 1            |
| DNA (0.1-0.15 μg/μL)          | 0.7-1.05 μg          | 7            |
| Agua grado biología molecular | -                    | 10           |
|                               | <b>Volumen final</b> | <b>20</b>    |

- 2) Digerir el producto de PCR de muestra y el producto de PCR de CP.
- 3) Incubar a 37 °C por 30 min.
- 4) Realizar la electroforesis horizontal a 75 V por 90-120 min en geles de agarosa ultrapura al 2.5 % teñido con 0.7X de GelRed (marca Biotium), utilizando 10 μL de producto de digestión e incluir adicionalmente productos de PCR de CP y de muestra sin digerir (5 μL) (Figura 3).

### 3.6.2.3 Amplificación con *primers* generales del marcador molecular ribosomal 18S

Una vez obtenido el patrón de digestión específico de *M. chitwoodi* del marcador molecular mitocondrial, se debe realizar una segunda amplificación del DNA original utilizando los *primers* 18S 965/18S 1573R (Mullin et al., 2005). En esta amplificación se obtiene un fragmento de 640 pb aproximadamente. Powers et al. (2005) encontraron que este mismo tamaño de fragmento lo presentan también otras especies de *Meloidogyne*; sin embargo, esta región presenta una gran variabilidad entre especies y puede realizarse el análisis RFLP para la diferenciación entre ellas.

**Cuadro 7. *Primers* generales para detección de *Meloidogyne chitwoodi* con el gen 18S**

| Tipo        | Nombre del <i>primer</i> | Secuencia (5'-3')       | Tamaño (pb) |
|-------------|--------------------------|-------------------------|-------------|
| Sentido     | 18S 965                  | GGCGATCAGATACCGCCCTAGTT | 640         |
| Antisentido | 18S 1573R                | TACAAAGGGCAGGGACGTAAT   |             |

Se debe utilizar *Taq* DNA Polymerase (marca Invitrogen, cat. 10342020). De utilizar otra enzima no se garantiza la reproducibilidad del ensayo. Se sugiere utilizar el control positivo (CP) a una concentración de 0.24-24 ng por reacción de 25 μL.

- 1) Preparar la mezcla de reacción de PCR punto final para el par de *primers* 18S 965/18S 1573R de acuerdo con lo descrito en el **Cuadro 8**:



**Cuadro 8. Preparación de la mezcla de reacción**

| Reactivos                     | Concentración inicial | Concentración final  | Volumen (µL) |
|-------------------------------|-----------------------|----------------------|--------------|
| <i>Buffer</i> PCR             | 10X                   | 1X                   | 2.5          |
| MgCl <sub>2</sub>             | 50 mM                 | 1.5 mM               | 0.75         |
| dNTP                          | 10 mM                 | 0.2 mM               | 0.5          |
| <i>Primer</i> 18S965          | 10 µM                 | 0.08 µM              | 0.2          |
| <i>Primer</i> 18S1573R        | 10 µM                 | 0.08 µM              | 0.2          |
| <i>Taq</i> DNA Pol            | 5 U/µL                | 0.012 U/µL           | 0.06         |
| DNA                           | -                     | -                    | 3.0          |
| Agua grado biología molecular | -                     | -                    | 17.79        |
|                               |                       | <b>Volumen final</b> | <b>25</b>    |

2) Programar el termociclador de acuerdo con lo descrito en el **Cuadro 9**.

**Cuadro 9. Programa del termociclador para el ensayo con los *primers* 18S 965/18S 1573R**

| Etapas                    | Temperatura     | Tiempo | Ciclos |
|---------------------------|-----------------|--------|--------|
| Desnaturalización inicial | 95 °C           | 3 min  | 1      |
| Desnaturalización         | 95 °C           | 45 s   | 30     |
| Anillamiento              | 58 °C           | 45 s   |        |
| Extensión                 | 72 °C           | 1 min  |        |
|                           | Rampeo 0.5 °C/s |        |        |
| Extensión final           | 72 °C           | 5 min  | 1      |
| Conservación              | 4 °C            | ∞      |        |

3) Los productos de PCR se deben analizar por electroforesis horizontal durante 80 min a 90 V en un gel de agarosa al 1.4 % en *buffer* TAE 1X, teñido con 0.7X de GelRed (marca Biotium) u otro colorante que permita la interpretación de los resultados (**Figura 4**).

### 3.6.2.4 RFLP del marcador molecular *18S*

La digestión enzimática con *AluI* del fragmento parcial del gen *18S* permite verificar la identidad del nematodo agallador de Columbia *M. chitwoodi*. El patrón de digestión presenta cuatro fragmentos: 360, 120, 85 y 50 pb. Por lo anterior, se debe realizar la digestión enzimática con ANZA 44 (*AluI*, marca Invitrogen, cat. IVGN044-6) de acuerdo al procedimiento siguiente:

1) Descongelar los reactivos y mezclar los componentes considerando las concentraciones y volúmenes descritos en el **Cuadro 10**:



**Cuadro 10. Preparación del *mix* para RFLP del gen *18S***

| Reactivos                     | Concentración final  | Volumen (μL) |
|-------------------------------|----------------------|--------------|
| Anza 10X Red Buffer           | 0.5X                 | 1            |
| Enzima (20 U/μL)              | 0.5 U/μL             | 0.5          |
| DNA (0.11-0.125 μg/μL)        | 0.55-0.625 μg        | 5            |
| Agua grado biología molecular | -                    | 13.5         |
|                               | <b>Volumen final</b> | <b>20</b>    |

- 2) Digerir el producto de PCR de la muestra y el producto de PCR de CP.
- 3) Incubar a 37 °C por 120 min.
- 4) Inactivar a 80 °C por 20 min.
- 5) Visualizar el producto de la digestión en geles de agarosa ultrapura al 2.5 % teñido con 0.7X de GelRed (marca Biotium) u otro colorante que permita la interpretación de los resultados.
- 6) Utilizar 10 μL de producto de la digestión e incluir producto de PCR de CP sin digerir y Producto de PCR de muestra sin digerir (cargar 5 μL en ambos casos) y realizar la electroforesis horizontal a 75 V por 90-120 min (**Figura 5**).

### 3.6.3 Controles para las pruebas moleculares

En todos los ensayos de PCR punto final descritos en este protocolo es necesario incluir, por duplicado, los siguientes controles:

- **Control negativo:** descarta falsos positivos originados por contaminación durante la preparación de la mezcla de reacción. El volumen que ocuparía el DNA se reemplaza por agua grado biología molecular.
- **Control positivo:** es utilizado para monitorear la eficiencia de la amplificación y provee un patrón de referencia con el cual comparar los resultados positivos en las muestras. Utilizar DNA plasmídico de *M. chitwoodi*, el cual será proporcionado por el CNRF, previa solicitud de los laboratorios o personas interesadas.

Al realizar el ensayo de RFLP se debe incluir:

- **Digestión del producto de PCR del control positivo:** permite tener un patrón de referencia para verificar el proceso de digestión, el tamaño y el número de fragmentos obtenidos. Digerir el producto de PCR del control positivo.
- **Producto de PCR del control positivo en la electroforesis de la digestión:** permite la comparación del fragmento obtenido y la eficiencia de la enzima de restricción sobre los productos de PCR. Utilizar el control positivo amplificado.

### 3.6.4 Interpretación de resultados para los ensayos de PCR punto final

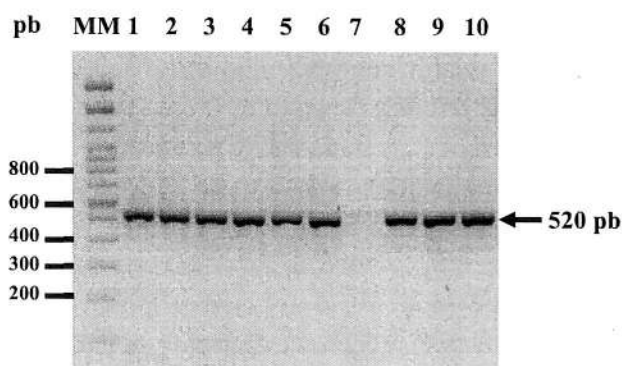
Los resultados son válidos solamente bajo los siguientes criterios:

- Los controles negativos no deben generar productos amplificados en ningún ensayo.
- Los controles positivos en el ensayo de PCR con el par de *primers* C2F3/1108 deben generar un fragmento de 520-540 pb (**Figura 2**) y con el par de *primers* 18S 965/18S 1573R un fragmento de 640 pb (**Figura 4**).
- Se considera como resultado positivo aquellas muestras que amplifiquen el fragmento de 520-540 y 640 pb con los *primers* C2F3/1108 y 18S 965/18S 1573R, respectivamente, así como los perfiles de restricción correspondiente a cada marcador molecular (**Figura 3** y **Figura 5**).
- El resultado se considera negativo si no existe amplificación del fragmento de 520-540 pb con los *primers* C2F3/1108.

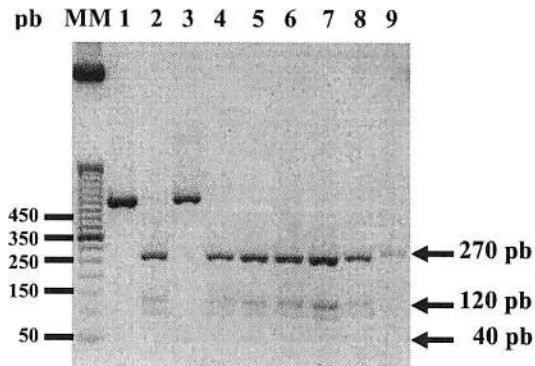
### 3.7 Identificación del patógeno

Un reporte positivo a *M. chitwoodi*, independientemente del origen de la muestra analizada (nacional o importación), debe contener la información siguiente:

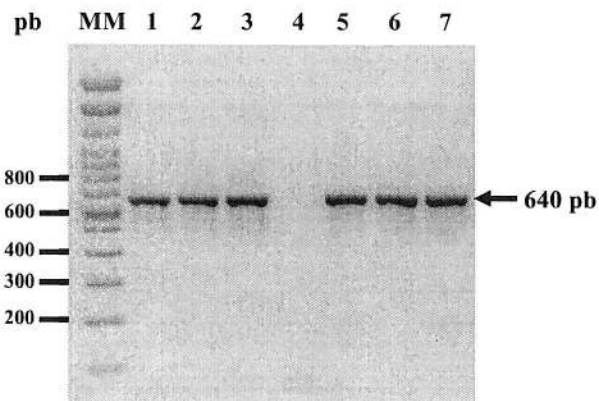
- Especímenes preservados en laminillas permanentes, cuadros de la caracterización morfológica-morfométrica (**Anexo 8.4**) y las micrografías correspondientes.
- DNA genómico extraído y evidencia fotográfica de la amplificación positiva por PCR punto final con los *primers* C2F3/1108 y 18S 965/18S 1573R.
- Fotografías del análisis RFLP de los marcadores moleculares *COII/16S* y *18S*.



**Figura 2. Amplificación de los productos de PCR con los *primers* C2F3/1108.** 1), 2), 3), 4), 5) y 6) Muestras. 7) Control negativo de reactivos. 8), 9) y 10) DNA plasmídico 50 ng/ $\mu$ L. Marcador molecular (MM) 100 pb (marca Invitrogen). Amplicón esperado de 520 pb. Fuente: Senasica-DGSV-CNRF. 2021. D. R.

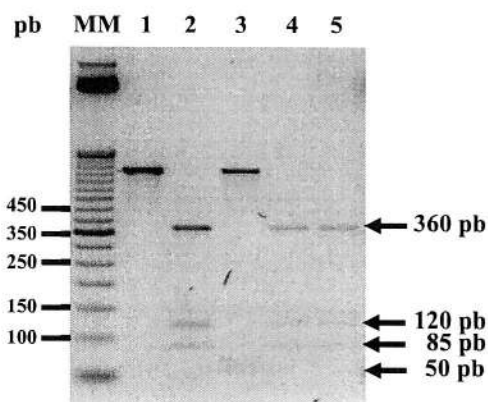


**Figura 3.** Digestión enzimática de *COI/16S* de *Meloidogyne chitwoodi* con *DraI*. 1) Producto de PCR de muestra sin digerir. 4), 5), 6), 7), 8) y 9) Digestión del producto de PCR de muestra. Marcador molecular (MM) 50 pb (marca Invitrogen). Patrón de restricción esperado: 270, 120, 90 y 40 pb. Fuente: Senasica-DGSV-CNRF. 2021. D. R.



**Figura 4.** Amplificación de los productos de PCR con los *primers* 18S 965/18S 1573R. 1), 2) y 3) Muestras. 4) Control negativo de reactivos. 5), 6) y 7) CP DNA plasmídico 5 ng/ $\mu$ L. Marcador molecular (MM) 100 pb (marca Invitrogen). Amplificación esperada de 640 pb. Fuente: Senasica-DGSV-CNRF. 2021. D. R.





**Figura 5. Digestión enzimática de 18S de *Meloidogyne chitwoodi* con *AluI*.** 1) Producto de PCR de CP sin digerir. 2) Digestión del producto de PCR de CP. 3) Producto de PCR de DNA genómico sin digerir. 4) y 5) Digestión del producto de PCR de DNA genómico. Marcador molecular (MM) 50 pb (marca Invitrogen). Patrón de restricción esperado: 360, 120, 85 y 50 pb. Fuente: Senasica-DGSV-CNRF. 2021. D. R.

Los casos en los que se debe verificar por secuenciación son:

- Detecciones en zonas reconocidas como libres del patógeno.
- Primeras detecciones en nuevos hospedantes.
- Cuando se requiera un sustento fitosanitario de mayor relevancia para la movilización del material vegetal.

### 3.8 Verificación mediante secuenciación

El análisis molecular de nematodos fitopatógenos con, al menos, dos marcadores provee de un diagnóstico molecular robusto (Subbotin et al., 2005; Vovlas et al., 2011). Por lo anterior, se recomienda secuenciar los fragmentos amplificados de los marcadores moleculares *COII/16S* y *18S*.

- 1) Enviar los productos de PCR a secuenciar, atendiendo las especificaciones para el envío de muestras de la institución a la que se solicite el servicio.
- 2) Obtenida la secuencia, ingresar a la herramienta de alineamiento Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).
- 3) Insertar la secuencia de interés y realizar el alineamiento con los parámetros predeterminados.



- 4) Revisar cuidadosamente las especies que aparecen en la parte superior de la tabla. El porcentaje de cobertura e identidad (debe tender hacia el 100 %), el valor de E (debe tender a cero) (Benson et al., 2013) y verificar la información de la secuencia depositada en la base de datos debido a que existen muchas que han sido incorrectamente identificadas, por lo que en ocasiones el resultado obtenido, aún con 100 % de cobertura e identidad, no resulta totalmente concluyente.

#### 4. REGISTROS

En caso de obtener un resultado positivo a *M. chitwoodi* los registros y las evidencias se deben conservar de acuerdo con lo descrito en la CIPF (2016). Las preparaciones permanentes con ejemplares preservados deben ser resguardados por un periodo de 30 días posterior al diagnóstico, debidamente etiquetadas. Lo anterior también aplica en el caso de los archivos digitales generados (microfotografías y cuadros de morfometría). En el caso del DNA extraído, debe conservarse a -40 °C. El material vegetal positivo que no fue utilizado se debe resguardar, en su empaque original y conservarlo en refrigeración a 4 °C, correctamente etiquetado por 3 meses, posteriores al diagnóstico.

Cuando el resultado del análisis sea negativo, inactivar el material vegetal a 121 °C (15 lb/in<sup>2</sup>) por 20 min y desechar.

#### 5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL

**Correo:** lab.nematologia@senasica.gob.mx

**Teléfono:** 011 (52) 55 5905 1000, Exts. 51420 y 51429

#### 6. RECONOCIMIENTO

Al Dr. Angel Ramírez Surárez (Subdirección de Diagnóstico Fitosanitario), M. en C. Leonel Rosas Hernández (Laboratorio de Nematología) y a la Biól. Salomé Alcasio Rangel (Área de Microscopía Electrónica) por la versión inicial del protocolo. Al M. en C. Leonel Rosas Hernández por la revisión, actualización y redacción de la versión V1.0, por las fotografías de morfología general del nematodo y del proceso extracción por macerado-tamizado-centrifugado-flotación así como la estandarización de los métodos de PCR y RFLP. Al Dr. Angel Ramírez Suárez y a la M. en C. María del Rocío Hernández Hernández (Jefatura del Departamento de Fitopatología) por las revisiones técnicas. A la Ing. Lizeth Guadalupe Durán Espinosa y a la M. en C. Ariana Guadalupe Robles Zárate (Grupo DiaFi) por la revisión y edición del documento. Al Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario (CONACOFI) por la coordinación



de la consulta técnica. Al Dr.----- y al Dr.--  
----- por su revisión técnica.

## 7. REFERENCIAS

- Acuerdo SAGARPA. ACUERDO por el que se establece el módulo de consulta de requisitos fitosanitarios para la importación de mercancías reguladas por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, en materia de sanidad vegetal. *Diario Oficial de la Federación [DOF]*, del 7 de febrero de 2012. México. Recuperado de [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5232760&fecha=07/02/2012](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5232760&fecha=07/02/2012). Fecha de consulta: 10 de septiembre de 2019.
- Benson, A. D., Mark, C. K. C., Karsch-Mizrachi I., Lipman, J. D., Ostell, J. and Sayers, W. E. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41, 36-42.
- Blok, V. C. and Powers, T. O. (2009). Biochemical and molecular identification. En R. N. Perry, M. Moens y J. L. Starr. (Eds.). *Root-knot nematodes*. (pp: 99-118). CAB International.
- CAB. CAB International. (2019). Invasive species compendium. Datasheet: *Meloidogyne chitwoodi* (Columbia root-knot nematode). Recuperado de <https://www.cabi.org/isc/datasheet/33235>. Fecha de consulta: 01 de noviembre de 2019.
- Carta, L. K., Handoo, Z. A., Powers, T. O., Miller, S. A., Pérez-Zubiri, R. and Ramírez-Suárez, A. (2005). Guidelines for isolation and identification of regulated nematodes of potato (*Solanum tuberosum* L.) in North America. *Rev. Mex. Fitopatol.*, 23 (2), 211-222.
- CIPF. Convención Internacional de Protección Fitosanitaria. (2016). NIMF 27. Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas. Recuperado de <https://www.ippc.int/es/core-activities/standards-setting/ispms/>. Fecha de consulta: 02 de agosto de 2021.
- De Ley, P., Decraemer, W. and Eyualem-Abebe. (2006). Introduction: Summary of present knowledge and research addressing the ecology and taxonomy of freshwater nematodes. En Eyualem-Abebe, I. Andrassy and W. Traunspurger (Eds.), *Freshwater nematodes ecology and taxonomy*. (pp. 3-30). CABI Publishing.
- De Man, J. G. (1984). *Die frei in der reinen Erde und im süßen Wasser lebenden Nematoden der niederländischen Fauna*. (pp. 1-206).
- EPPO. European and Mediterranean Plant Protection Organization. (2016). PM 7/41 (3) *Meloidogyne chitwoodi* and *Meloidogyne fallax*. EPPO Bulletin 46 (2): 171-189.
- García, N., Grenier, E., Sarniguet, C., Buisson, A., Olliver, F. and Folcher, L. (2018). Impact of native plant-parasitic nematode communities on the establishment of *Meloidogyne chitwoodi*. *Plant pathology*, 67: 2019-2028. <https://doi.org/10.1111/ppa.12914>
- Golden, A. M., J. H., O'Bannon, G. S., Santos and Finley, A. M. (1980). Description and SEM observations of *Meloidogyne chitwoodi* n. sp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode on potato in the Pacific Northwest. *Journal of Nematology*, 12: 319-327.
- Hartman, K. M. and Sasser, J. N. (1985). Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. En: K. R. Barker, C.C. Carter y J.



- N Sasser. (Eds.). *An Advanced Treatise on Meloidogyne. Volume II: Methodology*. (pp. 69-77). Department of Plant Pathology and the United States Agency for International Development, North Carolina State University Graphics.
- Hooper, D. J. (1986). Preserving and staining nematodes in plant tissues. En J. F. Southey (Ed.). *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes* (6<sup>th</sup> ed.). (pp. 81-85). Her Majesty's Stationery Office.
- Hooper, D. J., Hallman, J. and Subbotin, S. (2005). Methods for extraction, processing and detection of plant and soil nematodes. M. Luc, R. A. Sikora y J. Bridge (Eds.), *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agricultura* (2a ed.). (pp. 53-86). CAB International.
- Hunt, D. J. and Handoo, Z. A. (2009). Taxonomy, identification and principal species. En: R. N. Perry, M. Moens y J. L. Starr (Eds.). *Root-knot nematodes*. (pp: 55-97). CAB International.
- Hunt, D. J. and Handoo, Z. A. (2012). Root-knot nematodes. En N. Marbán-Mendoza y R. H. Manzanilla-López (Eds.). *Practical plant nematology*. (pp: 359-409). Biblioteca Básica de Agricultura.
- Ingham, R. E., Ham, P. B., Baune, M., David, N. L. and Wade, N. M. (2007). Control of *Meloidogyne chitwoodi* in potato with shank-injected metam sodium and other nematicidas. *Journal of nematology*, 39 (2): 161-168.
- ISO. (2016). *ISO 3310-1: 2016. Technical requirements and testing – Part 1: Test sieves of metal wire cloth*. En *iso.org*. Recuperado de <https://www.sis.se/api/document/preview/920744/>. Fecha de consulta: el 02 de diciembre de 2019.
- Jepson, S. B. (1987). Identification of root-knot Nematodes (*Meloidogyne* species). CAB International. 265 pp.
- Manzanilla-López, R. H. (2012). Methodology and syntomatology. En N. Marbán-Mendoza y R. H. Manzanilla-López (Eds.). *Practical plant nematology*. (pp: 89-129). Biblioteca Básica de Agricultura.
- Margullis, L. and Chapman, J. (2009). *Kingdoms and domains. An illustrated guide to the phyla of life on earth*. Academic Press.
- Mullin, P. G., Harris, T. S. and Powers, T. O. (2005). Phylogenetic of relationships Nygolaimina and Dorylaimina (Nematoda: Dorylaimida) inferred from small subunit ribosomal DNA sequences. *Nematology*, 7 (1): 59-79.
- NAPPO. North American Plant Protection Organization. (2011). NRMF 3: Movilización de papas hacia un país miembro de la NAPPO. Recuperado de [https://www.napponet.org/files/9915/2520/6140/RSPM3Rev30-07-13-s\\_-\\_without\\_Annex\\_6\\_and\\_with\\_a\\_few\\_editorial\\_corrections.pdf](https://www.napponet.org/files/9915/2520/6140/RSPM3Rev30-07-13-s_-_without_Annex_6_and_with_a_few_editorial_corrections.pdf). Fecha de consulta: 12 de diciembre de 2019.
- Norshie, P. M., Been, T. H. and Schomaker, C. H. (2011). Estimation of partial resistance in potato genotypes against *Meloidogyne chitwoodi*. *Nematology*, 13 (4): 477-489.



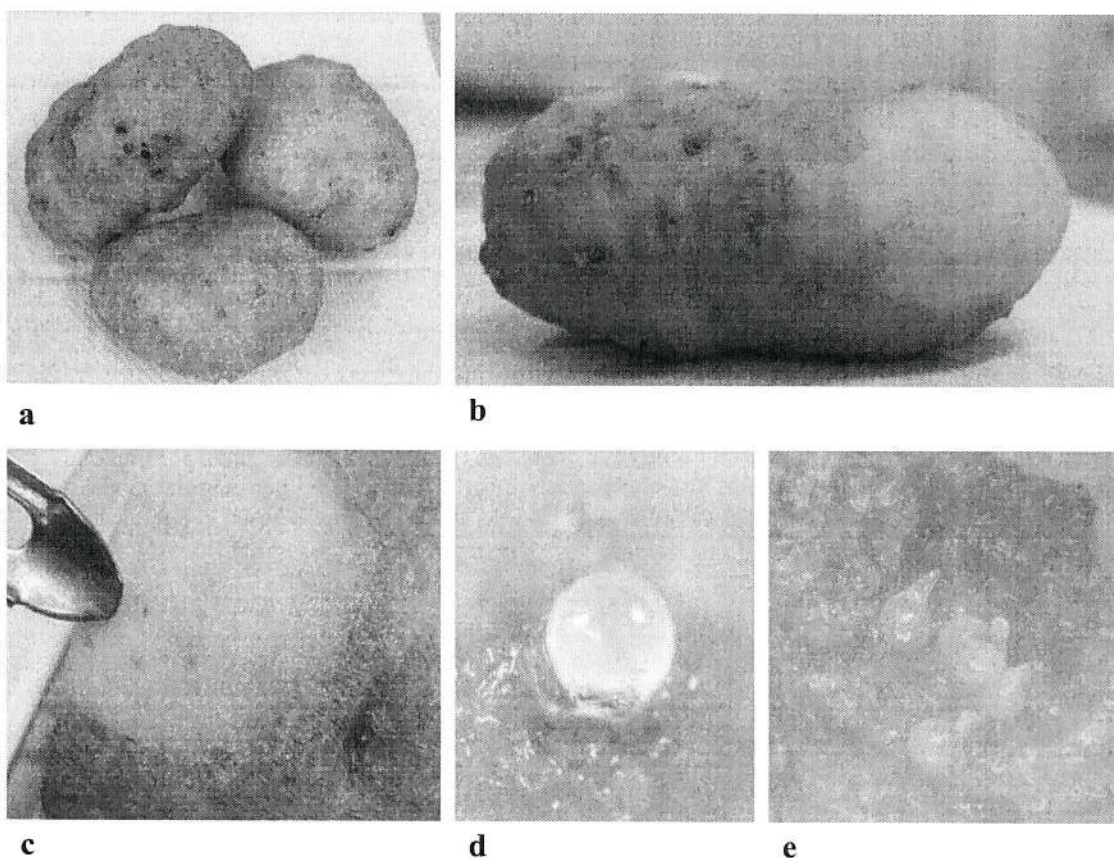
- Powers, T. O. and Harris, T. S. (1993). A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology*, 25:1-6.
- Powers, T. O., Mullin P. G., Harris T. S., Sutton L. A. and Higgins, R. S. (2005). Incorporating molecular identification of *Meloidogyne* spp. into a large-scale regional nematode survey. *Journal Nematology*, 37 (2): 226-235.
- Santo, G. S. and O'Bannon, J. H. (1981). Pathogenicity of the Columbia root-knot nematode (*Meloidogyne chitwoodi*) on wheat, corn, oat and barley. *Journal of Nematology* 13, 548-550.
- Scurrah, M. I., Niere, B., and Bridge, J. (2005). Nematodes parasites of *Solanum* and sweet potatoes. En M. Luc, R. A. Sikora y J. Bridge (Eds.), *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture* (2a ed.). (pp. 193-219). CAB International.
- Senasica. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2018). *Manual de toma, manejo y envío de muestras*. Tecámac, México: Autor.
- Siddiqi, M. R. (2000). *Tylenchida: Parasites of plants and insects* (2a ed.). CABI Publishing.
- 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 (11):1308-1315.
- van Bezooijen, J. (2006). Methods and techniques for nematology. En *Wageningen University and Research-Product or service*. Recuperado de [https://www.wur.nl/upload\\_mm/f/9/3/10aac0cb-8289-400a-a6e5-c4687461d138\\_MethodsandTechniquesforNematology.pdf](https://www.wur.nl/upload_mm/f/9/3/10aac0cb-8289-400a-a6e5-c4687461d138_MethodsandTechniquesforNematology.pdf). Fecha de consulta: el 02 de diciembre de 2019.
- Vovlas, N., Troccoli, A., Palomares-Rius, J. E., De Luca, F., Liébanas, G., Landa, B. B., Subbotin, S. A. and Castillo, P. (2011). *Ditylenchus gigas* n. sp. parasitizing broad bean: a new stem nematode singled out from the *Ditylenchus dipsaci* species complex using a polyphasic approach with molecular phylogeny. *Plant Pathology*, 60: 762-775.
- Wesemael, W. M. L., Taning, L. M., Viaene, N. and Moens, M. (2013). Life cycle and damage of the root-knot nematode *Meloidogyne minor* on potato, *Solanum tuberosum*. *Nematology*, 16: 185-192.
- Williams, B. D., Schrank, B., Huynh, C., Shownkeen, R. and Waterston, R. H. (1992). A genetic mapping system in *Caenorhabditis elegans* based on polymorphic sequence-tagged sites. *Genetics*, 131: 609-624.
- Yu, H., Chronis D., Lu, S. and Wang, X. (2011). Chorismate mutase: an alternatively spliced parasitism gene and a diagnostic marker for three important *Globodera* nematode species. *European Journal of Plant Pathology*, 129: 89-102.

### Forma recomendada de citar:

Senasica. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2020). Protocolo de Diagnóstico: *Meloidogyne chitwoodi* [Versión 1.0]. Tecámac, México. Autor.

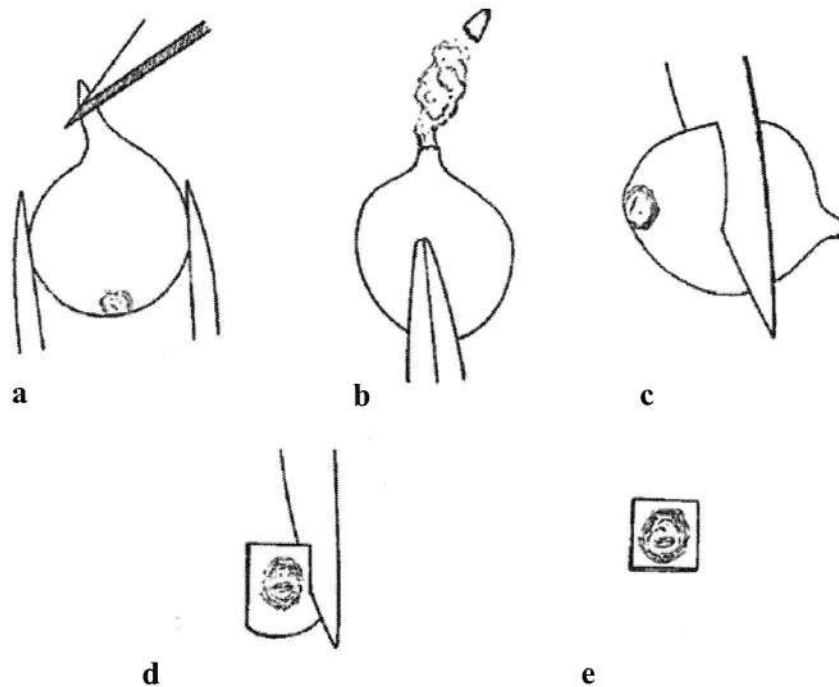
## 8. ANEXOS

### 8.1 Síntomas y signos



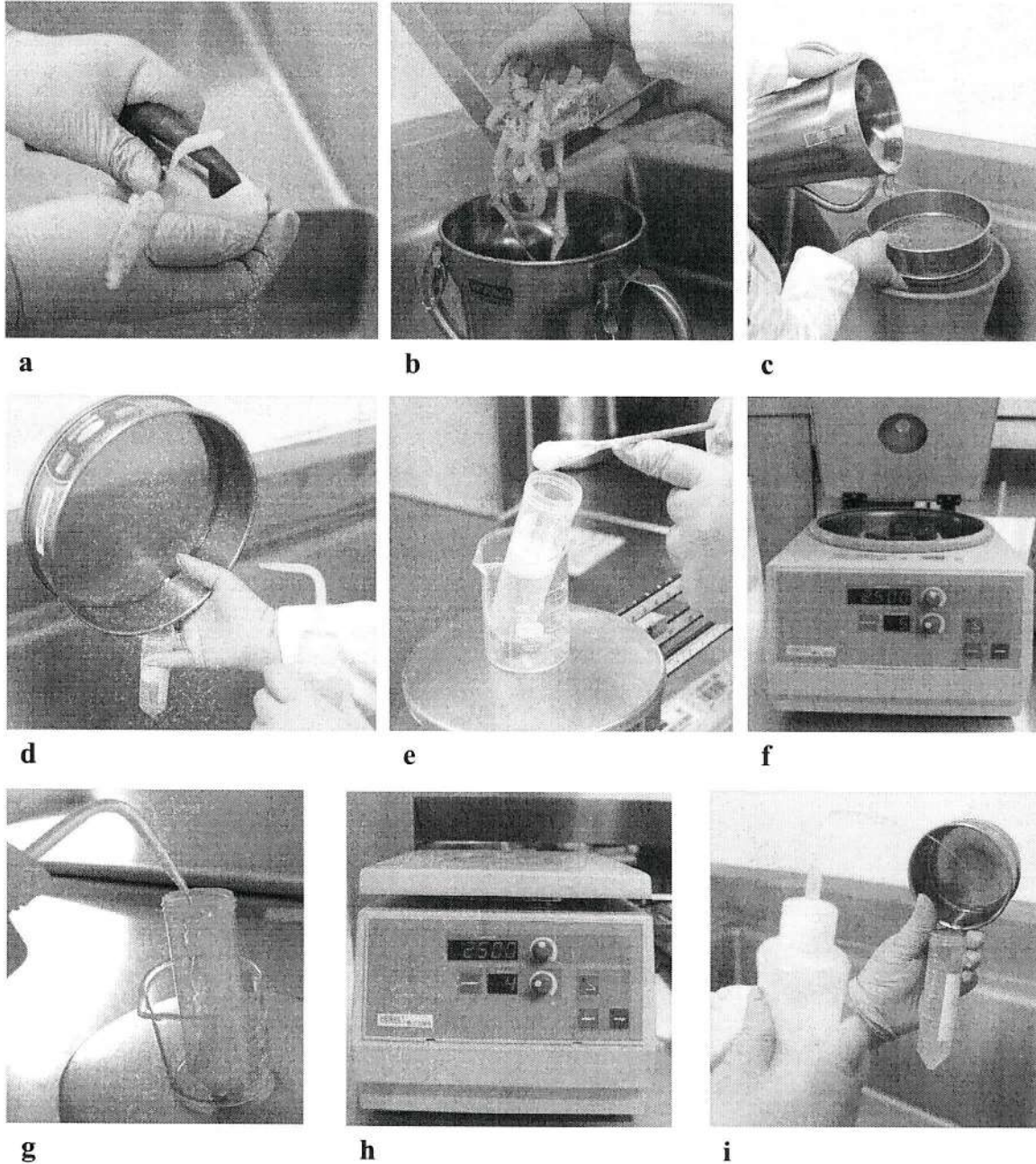
**Figura 6. Síntomas y signos de *Meloidogyne chitwoodi* en papa.** a) Tubérculos con superficie irregular y áspera (“mezquinos”). b) Tubérculo sin epidermis con presencia de puntos marrón-rojizos y necróticos. c) Acercamiento de puntuaciones necróticas. d) y e) Disección de zona necrótica y obtención de hembras globosas. Fuente: Senasica-DGSV-CNRF. 2021. D. R.

## 8.2 Cortes perineales



**Figura 7. Obtención de patrón perineal de *Meloidogyne* spp.** a) Corte de cuello. b) Limpieza y remoción de tejidos internos. c) Corte ecuatorial. d) Ubicación y delimitación del modelo perineal. e) Corte perineal listo para montaje. Tomado, traducido y modificado de Hartman y Sasser (1985).

### 8.3 Extracción de nematodos por macerado-tamizado-centrifugado-flotación



**Figura 8. Procedimiento de extracción de nematodos agalladores a partir de tubérculos.** a) Pelado de papas e inspección. b) Macerado de muestra en licuadora. c) Tamizado. d) Colecta de tamizado en tubo de centrifuga. e) Mezcla de tamizado con caolín. f) Centrifugación con caolín. g) Adición de solución azucarada. h) Centrifugación con solución azucarada. i) Decantado y lavado de extracto de nematodos. Fuente: Senasica-DGSV-CNRF. 2021. D. R.





## 8.4 Tabla de caracteres morfométricos para el diagnóstico

### 8.4.1. Caracteres de juveniles J2 (ejemplo)

| Característica                   | 1 | 2 | 3.. | ..10 | Prom. | Rango | Des. est |
|----------------------------------|---|---|-----|------|-------|-------|----------|
| Longitud del cuerpo              |   |   |     |      |       |       |          |
| Ancho máximo del cuerpo          |   |   |     |      |       |       |          |
| Longitud del estilete            |   |   |     |      |       |       |          |
| DGED                             |   |   |     |      |       |       |          |
| Extremo anterior a metacarpus    |   |   |     |      |       |       |          |
| Extremo anterior a poro excretor |   |   |     |      |       |       |          |
| Ancho del cuerpo a nivel del ano |   |   |     |      |       |       |          |
| Longitud de cola                 |   |   |     |      |       |       |          |
| Región hialina de la cola        |   |   |     |      |       |       |          |
| a                                |   |   |     |      |       |       |          |
| b                                |   |   |     |      |       |       |          |
| c                                |   |   |     |      |       |       |          |
| c'                               |   |   |     |      |       |       |          |

**Nota:** Elaborar también cuadros de análisis morfométricos de hembras y machos (cuando sean detectados) de acuerdo con las características descritas en los **Cuadros 1 y 2** de este protocolo de diagnóstico.



## 9. HISTORIAL DE CAMBIOS

**Protocolo de Diagnóstico: *Meloidogyne chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo & Finley, 1980**

| Revisión | Versión | Fecha      | Resumen de la Modificación                                                                                               | Páginas Afectadas | Responsable                                                            |
|----------|---------|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|------------------------------------------------------------------------|
| 01       | 01      | 13.12.2019 | Creación de documento, estandarización de la PCR punto final (primers C2F3/1108 y 18S 965/18S 1573R) y del análisis RFLP | Todo el documento | M. en C. Leonel Rosas Hernández                                        |
| 02       | 01      | 18.12.2019 | Revisión y edición de documento                                                                                          | Todo el documento | M. en C. Ariana G. Robles Zárate                                       |
| 03       | 01      | 13.02.2020 | Revisión técnica del protocolo                                                                                           | Todo el documento | Dr. Angel Ramírez Suárez                                               |
| 04       | 01      | 02.04.2020 | Edición técnica                                                                                                          | Todo el documento | M. en C. Leonel Rosas Hernández                                        |
| 05       | 01      | 04.11.2020 | Revisión y edición                                                                                                       | Todo el documento | Ing. Lizeth Guadalupe Durán Espinosa, M. en C. Ariana G. Robles Zárate |
| 06       | 01      | 03.08.2021 | Edición y armonización con estructura de protocolos de IPPC                                                              | Todo el documento | M. en C. Leonel Rosas Hernández                                        |



## DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

**PROTOCOLO DE DIAGNOSTICO:** *Meloidogyne chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo & Finley, 1980,  
*Versión 1.0*

### AUTORIZÓ

**Ing. Francisco Ramírez y Ramírez**  
Director General de Sanidad Vegetal

### APROBÓ

**M. en C. Guillermo Santiago Martínez**  
Director del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

### VALIDÓ

**Dr. Angel Ramírez Surárez**  
Subdirector Técnico de Diagnóstico Fitosanitario

### REVISARON

**Ing. Lizeth G. Durán Espinosa**  
Grupo DiaFi

**M. en C. María del Rocío Hernández  
Hernández**  
Departamento de Fitopatología

**M. en C. José G. Torres Martínez**  
Subdirector de Diagnóstico  
Fitosanitario

### ELABORÓ

**M. en C. Leonel Rosas Hernández**  
Laboratorio de Nematología