

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“EXTRACCIÓN DE ADN DE *Meloidogyne incognita* A PARTIR DE
MUESTRAS DE SUELO PARA DETECCIÓN MOLECULAR”**

Presentada por:

Cecilia Verónica Torres Muñoz

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima - Perú

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS

“EXTRACCIÓN DE ADN DE *Meloidogyne incognita* A PARTIR DE MUESTRAS DE SUELO PARA DETECCIÓN MOLECULAR”

Presentada por:

Cecilia Verónica Torres Muñoz

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Mg. Sc. César López Bonilla
PRESIDENTE

Dra. Marta Williams Castro de León
MIEMBRO

Dr. Raúl Blas Sevillano
MIEMBRO

Mg. Sc. Roberto Mansilla Samaniego
ASESOR

Para Doris, mi principal apoyo y guía
Para Julieta, la razón de mis sonrisas
Para Janzen, por animarme siempre a avanzar

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación ha sido elaborado gracias al financiamiento de la Oficina de Investigación de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Agradezco al Área de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología y a todos sus miembros, y a los que algún día lo fueron, por su apoyo incondicional durante la realización de esta tesis. Por haberme permitido formarme académicamente dentro del laboratorio, y crecer profesionalmente y como persona.

Agradezco también a todos los miembros del laboratorio de Nematología de la Universidad Nacional Agraria La Molina por su importante apoyo y por su gran paciencia para ayudarme en las distintas etapas del estudio.

Esta investigación fue elaborada bajo la supervisión y asesoría del Mg. Sc. Roberto Mansilla, quién confió en ella desde un inicio e hizo posible su realización. Agradezco su tiempo, paciencia y dedicación.

Agradezco a mi familia. A mis padres, Lorenzo y Doris por apoyarme siempre, ser un ejemplo a seguir e impulsarme siempre a ser mejor. A mis hermanos, por ser un gran ejemplo para mí y estar siempre a mi lado. A mi hija, por alegrarme los días y ser mi norte en todo lo que hago. A Janzen, mi apoyo en todo.

Y a todos mis maestros que ayudaron a mi formación.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. IMPORTANCIA DEL GÉNERO	4
2.2. CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE	5
2.2.1. CICLO DE VIDA Y PARASITISMO	5
2.2.2. MORFOLOGÍA	7
2.2.3. SINTOMATOLOGÍA	10
2.3. DETECCIÓN DE NEMATODOS A NIVEL DE ESPECIE EN <i>Meloidogyne</i> sp. A PARTIR DE MUESTRAS DE SUELO	11
2.3.1. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE	12
2.3.2. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE USADAS EN EL PERÚ	13
2.4. EXTRACCIÓN DE NEMATODOS DEL SUELO	13
2.4.1. BANDEJA DE COBB O TAMIZADO	14
2.4.2. CENTRIFUGACIÓN FLOTACIÓN	15
2.4.3. BANDEJA DE EXTRACCIÓN O TÉCNICA DE BAERMANN MODIFICADA.....	15
2.5. DETECCIÓN MOLECULAR.....	16
2.5.1. DETECCIÓN MOLECULAR EN <i>Meloidogyne</i> sp.	16
2.5.2. DETECCIÓN MOLECULAR EN <i>M. incognita</i>	18
2.6. EXTRACCIÓN DE ADN DE NEMÁTODOS EN <i>Meloidogyne</i> sp.	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN	22
3.2. MUESTRAS DE SUELO CON <i>M. incognita</i>	22

3.2.1. ESTABLECIMIENTO DE LA POBLACIÓN.....	22
3.2.2. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA.....	23
3.2.3. MUESTRA DE SUELO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN	24
3.3. SELECCIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE NEMATODOS A PARTIR DE MUESTRAS DE SUELO	24
3.3.1. SELECCIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE NEMATODOS	24
3.3.2. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE BANDEJA DE EXTRACCIÓN DE NEMATODOS PARA DETECCIÓN MOLECULAR.....	27
3.4. SELECCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN	30
3.4.1. SUSPENSIÓN DE JUVENILES	30
3.4.2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN.....	30
3.4.3. ELIMINACIÓN DEL ARN	33
3.4.4. EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN.....	33
3.5. ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL MARCADOR SCAR PARA DETECCIÓN MOLECULAR	34
3.5.1. ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN...	34
3.5.2. VISUALIZACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DE PCR	35
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
3.6.1. SELECCIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE NEMATODOS	36
3.6.2. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE BANDEJA DE EXTRACCIÓN DE NEMATODOS PARA DETECCIÓN MOLECULAR.....	36
3.6.3. SELECCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN	36
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LA POBLACIÓN	38
4.3. SELECCIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN	42
4.3.1. ANÁLISIS DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN MINIPREPARACIÓN	43
4.3.2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN.....	45

4.4. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE NEMATODOS PARA DETECCIÓN MOLECULAR	48
4.4.2. PRUEBA DE AMPLIFICACIÓN POR PCR PARA DETECCIÓN MOLECULAR	51
4.5. ESTANDARIZACIÓN DEL LAS CONDICIONES DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL MARCADOR SCAR PARA DETECCIÓN MOLECULAR	52
V. CONCLUSIONES	54
VI. RECOMENDACIONES.....	55
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
VIII. ANEXOS.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del ciclo de vida de <i>Meloidogyne</i> sp..	6
Figura 2. Esquema de la cutícula de nematodos.	7
Figura 3. Esquema del patrón perianal de hembras de <i>Meloidogyne</i> sp	8
Figura 4. Esquema de la morfología de cabeza en machos de <i>Meloidogyne</i> spp.	10
Figura 5. Diagrama del cistron ribosomal en <i>Meloidogyne</i> sp	16
Figura 6. Población de <i>M. incognita</i> mantenida en invernadero.	23
Figura 7. Proceso de tamizado.	25
Figura 8. Metodología de bandeja de extracción.	26
Figura 9. Pasos del método minibandeja.	29
Figura 10. Patrones perineales de hembras de la población utilizada en este estudio.	39
Figura 11. Forma de cabeza de machos de la población.	40
Figura 12. Presencia de tierra en los 100cc finales obtenidos en los tres métodos de extracción de nematodos.	42
Figura 13. Electroforesis de muestras de ADN obtenido por el método de minipreparación	44
Figura 14. Electroforesis del ADN obtenido por el método lisis de detergentes.	50
Figura 15. Amplificación del ADN obtenido por el método minibandeja a distintas concentraciones de ADN por reacción.	53
Figura 16. Amplificación por PCR de los tres tratamientos de optimización.	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de distintas metodologías de extracción de ADN de <i>Meloidogyne spp.</i> usados en detección molecular.....	21
Tabla 2. Iniciadores elegidos para la identificación de la especie <i>Meloidogyne incognita</i>	34
Tabla 3. Programa de amplificación para Mi-F/Mi-R.....	35
Tabla 4. Resultados de los tres métodos de extracción de nematodos	41
Tabla 5. Evaluación del ADN obtenido por el método minipreparación	43
Tabla 6. Evaluación del ADN obtenido por el método de proteinasa K	45
Tabla 7. Evaluación del ADN obtenido por el método de lisis con detergentes	45
Tabla 8. Comparación resumida de la evaluación de los métodos de extracción de ADN usados.....	48
Tabla 9. Evaluación de ADN obtenido del tratamiento con presencia moderada de suelo (lavado con centrifugación flotación)	49
Tabla 10. Evaluación de ADN obtenido del tratamiento con ausencia de suelo (minibandeja).....	50

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Flujograma de la metodología experimental.....	65
Anexo 2. Métodos de extracción nematodos de suelo.....	66
Anexo 3. Métodos de extracción de ADN.....	68
Anexo 4. Análisis estadístico para métodos de extracción de nemátodos a partir de muestras de suelo.....	71
Anexo 5. Análisis estadístico de cada fase del método minipreparación para extracción de ADN.....	73
Anexo 6. Análisis estadístico de los métodos de extracción de ADN.....	74
Anexo 7. Análisis estadístico de cada tratamiento de optimización del método de extracción de nematodos.....	76

RESUMEN

Meloidogyne sp. es uno de los géneros de fitoparásitos de mayor importancia económica mundial por parasitar a casi todas las plantas vasculares. Para lograr su detección en campo son necesarios dos pasos: extraer los nematodos del suelo y luego realizar la identificación. En el Perú para la detección en campo se utilizan marcadores morfológicos como técnica de identificación hasta nivel de especie, pero esta técnica es inexacta, costosa y laboriosa para el procesamiento de muestras a gran escala. Frente a esto, se han desarrollado técnicas moleculares basadas en el ADN que son robustas, sensibles y fiables, pero con uso limitado para detección en el campo debido a que los protocolos usados de extracción de ADN suelen utilizar individuos purificados, lo que dificulta su aplicación para el análisis de grandes poblaciones. Para solucionar este problema, se han evaluado y optimizado métodos para la extracción de nematodos de *Meloidogyne incognita* provenientes de muestras de suelo y para la obtención de su ADN, con la finalidad de obtener protocolos que puedan ser usados para la detección molecular que sean aplicables en el campo y menos laboriosos que el método morfológico. Logrando finalmente la detección molecular de *M. incognita* con el marcador SCAR MiF/MiR a partir de poblaciones de J2 obtenidas utilizando el método de extracción de nematodos de Baermann modificado aplicado a raíces provenientes de muestras de suelo, cuyo ADN fue extraído aplicando el método de extracción de lisis por detergentes. De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede afirmar que la contaminación por suelo es el principal obstáculo para lograr la detección molecular.

Palabras clave: Detección molecular, detección específica, diagnóstico molecular, *Meloidogyne* sp., *Meloidogyne incognita*, marcador SCAR

ABSTRACT

Meloidogyne sp. is one of the most economic important phytoparasites genus around the world as it parasitizes almost all vascular plants. To achieve its detection at species level two steps are necessary: extract nematodes from soil and the identification process. In Peru morphological markers are used to achieve the identification in the field, but this technique is inaccurate, expensive, time demanding and does not allow processing large scale samples. Against this, several molecular techniques based on DNA have been developed for species identification. These techniques are robust, sensitive and reliable, but with limited use for field detection as DNA extraction protocols usually use purified individuals, a fact that makes difficult its application for large population analysis. In response to this problem, it has been evaluated isolation methods for *Meloidogyne incognita* populations from soil samples and methods to extract its DNA in aim to achieve successful molecular detection, seeking to obtain a protocol easier than the morphological method currently used. *M. incognita* molecular detection was achieved with the specific SCAR marker MiF /MiR on J2 populations separated using the modified Baermann nematode extraction method applied to roots obtained from soil samples and the detergents lysis DNA extraction method. Soil particles were the main source of contamination that hindered molecular detection.

Key words: Molecular detection, specific detection, molecular diagnosis, *Meloidogyne* sp., *Meloidogyne incognita*, SCAR marker

I. INTRODUCCIÓN

El género *Meloidogyne* contiene a los principales nematodos fitoparásitos causantes de plagas (Jones y Goto, 2011). Se caracterizan por ser endoparásitos obligados que infectan un amplio espectro de plantas vasculares. Por lo que se les considera como el grupo de parásitos de plantas de mayor importancia económica mundial (Sasser y Freckman, 1987), con una amplia distribución geográfica en el Perú. Se han descrito a más de 90 especies de *Meloidogyne* sp., de las cuales tres son extremadamente infecciosas: *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* (Karajeh *et al.*, 2010). Siendo en el Perú las especies de mayor incidencia *M. incognita* y *M. javanica*, y en menor ocurrencia *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. exigua* (Amaya de Guerra, 1982; Vera, 2014) y *M. ethiopica* (Murga-Gutierrez *et al.*, 2012).

La detección de nematodos fitoparásitos permite un diagnóstico fitopatológico preciso, brindando información importante para la toma de muchas decisiones en el proceso de producción agrícola (Qiu *et al.*, 2006). Para lograr esta detección a nivel de especie es necesario primero separar los nematodos del suelo y luego realizar la identificación respectiva, de ser posible antes que aparezca la sintomatología y su consiguiente daño a la cosecha. El primer paso es el más sencillo y no necesariamente requiere de un laboratorio o personal especializado. La identificación, por otro lado, puede llegar a ser complicada por las características variables que se presentan dentro y entre las especies. En respuesta a esto, se han desarrollado varias técnicas de identificación: morfológicas, bioquímicas y moleculares, que brindan distintos niveles de información y que se complementan entre sí para lograr la descripción de las distintas especies. Si bien esta gran cantidad de información es útil con fines taxonómicos, para lograr una detección efectiva en campo es preferible usar en lo posible una sola metodología de identificación que sea rápida, económica y fiable.

En el Perú se utiliza ampliamente el sistema morfométrico para el diagnóstico en el campo y con fines de investigación. Sin embargo, el uso de sólo este sistema presenta como falencias el alto nivel de variación de los caracteres que discriminan entre especies y entre

las razas dentro de una especie. Además, en términos prácticos, el tiempo prolongado que requiere la realización de la prueba junto con la necesidad de personal altamente especializado conlleva a que la identificación tenga un alto costo económico. Por otro lado, estos ensayos de diagnóstico además de tomar meses en su realización pueden brindar resultados sesgados, pues la identificación se realiza a partir de una infección indirecta en plantas susceptibles con la muestra de suelo, y no de un examen directo del mismo. En el país se ha realizado identificación molecular de *Meloidogyne* sp. en casos aislados (Murga-Gutierrez *et al.*, 2012; Vera, 2014) para fines de investigación, y no con un uso sistemático en campo.

Las técnicas moleculares son consideradas robustas, sensibles, específicas y fiables en detectar e identificar varias especies de *Meloidogyne* comparados con los métodos morfológicos o bioquímicos (Onkendi *et al.*, 2014). No se ve influenciada por el estadio de desarrollo del nematodo (Taylor y Sasser, 1978), por lo que pueden diagnosticar en distintas etapas de infección su presencia en campos de cultivo. No obstante, para que esto sea posible, es necesario lograr la obtención de ADN de nematodos de calidad suficiente para lograr una amplificación por PCR.

En la mayoría de trabajos realizados sobre análisis molecular por PCR para identificación de nematodos, utilizaron ADN purificado u obtenido de individuos aislados manualmente y limpios de restos de suelo (Qiu *et al.*, 2006; Blok y Powers, 2009). Esto es debido a que hay presencia de inhibidores de la ADN polimerasa que conllevan en las partículas de tierra que dificultan la amplificación (Qiu *et al.*, 2006). Sin embargo, el uso de este aislamiento manual de nematodos limita su aplicación para diagnóstico en campo por ser un procedimiento tedioso que no permite el procesamiento de gran cantidad de muestras, lo que puede llevar a obtener resultados que no este representando a la población de nematodos del campo infectado al analizar pocos individuos por muestra de suelo.

Por lo que este trabajo propone como objetivo optimizar un protocolo para la obtención de ADN de *M. incognita* que permita la amplificación en PCR, a partir de muestras de suelo. Buscando establecer un protocolo desde el pre tratamiento de la muestra de suelo hasta la obtención de ADN de los nematodos, que pueda analizar varios individuos dentro de una población, y que sea eficiente para la eliminación de inhibidores y con un costo equiparable o menor a las técnicas actualmente usadas en el Perú. Para lograrlo se eligió utilizar el estadio de vida J2 por su abundancia, la simplicidad de su obtención a partir de

muestras de suelo y su delgada cutícula, de menor grosor en relación a otros estadios de crecimiento (Lee, 2002), que facilita una lisis celular con una menor contaminación del ADN resultante por parte los componentes de cutícula. Dentro de la investigación se tomaron como objetivos específicos:

- Seleccionar y optimizar una metodología para la obtención de nematodos *M. incognita* provenientes de muestras de suelo.
- Seleccionar y optimizar un protocolo de extracción de ADN a partir de J2 de *M. incognita* aislados de muestras provenientes de suelo.
- Estandarizar las condiciones de la PCR para la amplificación de un marcador SCAR específico que identifique *M. incognita*, que permita comprobar que el ADN obtenido sea apto para detección molecular.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. IMPORTANCIA DEL GÉNERO

El género *Meloidogyne* (Goeldi, 1982) es el grupo de fitoparásitos de mayor importancia económica mundial (Sasser y Freckman, 1987) debido a su modo de vida altamente adaptable a los cambios ambientales, su amplia distribución, y al hecho de que parasita a casi todas las especies de plantas vasculares. Tiene además una alta tasa de desarrollo y reproducción, lo cual, resulta en la mayoría de casos en varias generaciones en un solo periodo de cosecha.

Meloidogyne sp. invade la raíz del hospedero alterando su fisiología, lo que puede llegar a producir un daño severo a la planta. Daño que, a pesar de ser generalmente asintomático en los productos cosechados, en la planta hospedera se puede expresar como retraso en el crecimiento en distintos grados, falta de vigor y marchitez bajo estrés hídrico. El panorama empeora si el producto económico es la raíz, como en el caso de la papa, que disminuye la calidad y el rendimiento del cultivo (Moens *et al.*, 2009). Más allá de su movimiento propio, los nematodos se dispersan con gran facilidad a través de todo lo que se mueva y pueda llevar partículas de suelo a corta distancia (como equipo agrícola, la irrigación, las patas de los animales, etc.); y a larga distancia principalmente por los productos agrícolas y las plantas de los viveros (Agrios, 2010).

La especie del nematodo y del hospedero, la rotación de cultivos, la temporada y el tipo de suelo son los principales factores que determinan el grado de daño y de pérdidas económicas. En promedio, estos efectos son mayores en las regiones tropicales que en las templadas debido a que existe una mayor diversidad del patógeno, condiciones ambientales favorables para su ciclo biológico, y falta de recursos humanos, técnicos y financieros para combatir la plaga. (Moens *et al.*, 2009).

Se han descrito más de 90 especies de *Meloidogyne*, de las cuales tres son las más agresivas en los cultivos a nivel mundial: *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*

(Karajeh *et al.*, 2010). Este género tiene una amplia distribución geográfica en el Perú, infectando principalmente arbustos y cultivos hortícolas en los terrenos arenosos y pobres de nutrientes de la costa¹. La especie de mayor incidencia es *M. incognita*, seguida por *M. javanica*, y en menor ocurrencia *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. exigua* (Amaya de Guerra, 1982; Herrera, 1982; Vera, 2014) y *M. ethiopica* (Murga-Gutierrez *et al.*, 2012). El impacto de *Meloidogyne* sp. en la agricultura nacional aún no está plenamente estudiado en parte por las dificultades para lograr una identificación de especie precisa.

2.2. CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE

2.2.1. CICLO DE VIDA Y PARASITISMO

Meloidogyne incognita (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 es un endoparásito obligado, como todos los miembros de este género, que sólo tiene movilidad en los primeros estadios de vida cuando parasita las raíces de plantas vasculares. Su ciclo vital está estrechamente relacionado a su interacción con el hospedero y a su ciclo parasitario (Figura 1). Los huevos de *Meloidogyne* sp. se encuentran encerrados en una masa gelatinosa depositada en la superficie de las raíces agalladas. Dentro del huevo tienen la primera muda, pasan del primer estadio de juveniles (J1) al segundo (J2) antes de eclosionar. La eclosión es un proceso conducido por la humedad y la temperatura, y ocurre sin requerir la estimulación de raíces de plantas. Una vez libre, el juvenil J2 es el único estadio infectivo y migratorio, esto le permite buscar a un hospedero moviéndose libremente por el suelo e infectar tanto las raíces ya infectadas cercanas como a nuevas raíces. El juvenil J2 puede sobrevivir en estado inactivo en el suelo por periodos extensos de tiempo tan solo consumiendo reservas de comida que guardan en el intestino, pero su capacidad infectiva se va reduciendo conforme estas reservas se van agotando (Karssen y Moens, 2006; Hunt y Handoo, 2009).

Cuando el juvenil J2 es atraído hacia una raíz, la penetra utilizando su estilete y libera enzimas degradadoras de las paredes celulares. Luego migra intercelularmente por entre las células corticales hacia la punta de la raíz hasta llegar al cilindro vascular de la planta, desde donde induce la rediferenciación, de cinco o siete células parenquimáticas, en células de alimentación hiperatrofiadas multinucleadas. Estas células gigantes tienen como único

¹ Canto, M. 2012. Incidencia de *M. incognita* en el Perú (entrevista). UNALM, Lima, Perú.

fin suplir de nutrientes al nematodo hasta que llegue a reproducirse (Hunt y Handoo, 2009).

Solo después de infectar el tejido vascular del hospedero pasa a su fase sedentaria endófito, pasando por cuatro mudas: J3, J4 y adulto. Los estadios juveniles y de macho adulto tienen un cuerpo filiforme y solo consumen las reservas de su intestino sin alimentarse, en cambio la hembra adulta presenta un cuerpo en forma de una pera, es de color blanco perla (Figura 1) y consume los nutrientes de la planta.

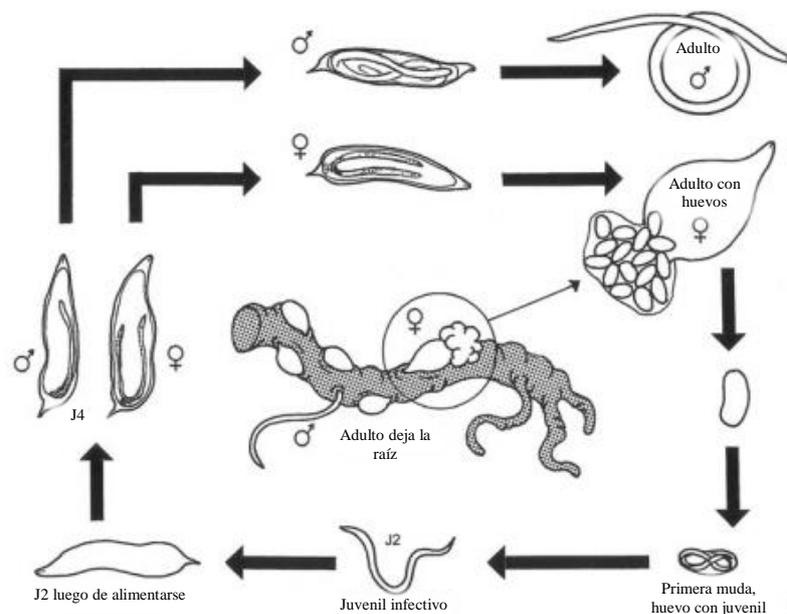


Figura 1. Esquema del ciclo de vida de *Meloidogyne* sp. No se ilustra el J3.

FUENTE: Decraemer y Hunt (2006), traducción propia.

Generalmente cuando el alimento es abundante la mayoría de las larvas se desarrollan como hembras, cuando escasea, por ejemplo cuando hay un alto índice de infección o el hospedero envejece, un gran porcentaje de larvas se vuelven machos. Incluso, muchos juveniles llegan a tener una regresión completa o parcial hacia macho bajo condiciones ambientales desfavorables, resultando en adultos con características intersexuales (Herrera, 1982). *M. incognita* se reproduce normalmente por partenogénesis mitótica (Abad *et al.*, 2008), por lo que la aparición de machos parece ser un mecanismo de sobrevivencia para asegurar diversidad genética por recombinación para producir una progenie híbrida (Jones y Goto, 2011).

2.2.2. MORFOLOGÍA

Su organización corporal está conformada por:

a. Cutícula

La cutícula es una capa externa que actúa como un exoesqueleto flexible conformada principalmente por carbohidratos, glicoproteínas y moléculas de colágeno (Figura 2). La cantidad y distribución de sus componentes alrededor del cuerpo van variando a lo largo de su ciclo de vida, lo que permite que la cutícula tenga una funcionalidad diferenciada según el estadio de vida del nematodo y explica la variación del grosor de la cutícula durante su ciclo de vida. (Lee, 2002).

(Eisenback y Hunt, 2009) observaron en *M. javanica* que en J1 primero aparece una capa externa de lipoproteínas a partir de la cual se forma la cutícula. Esta tiene un grosor en J2 de 0.2 a 0.4 μm y está conformada por tres capas: cortical, media y basal. La de los machos es 1.5 μm de espesor y también tienen estas tres capas. La cutícula de la hembra es de 4 a 6 μm de espesor, y es la más gruesa a pesar de solo tener capa cortical y basal.

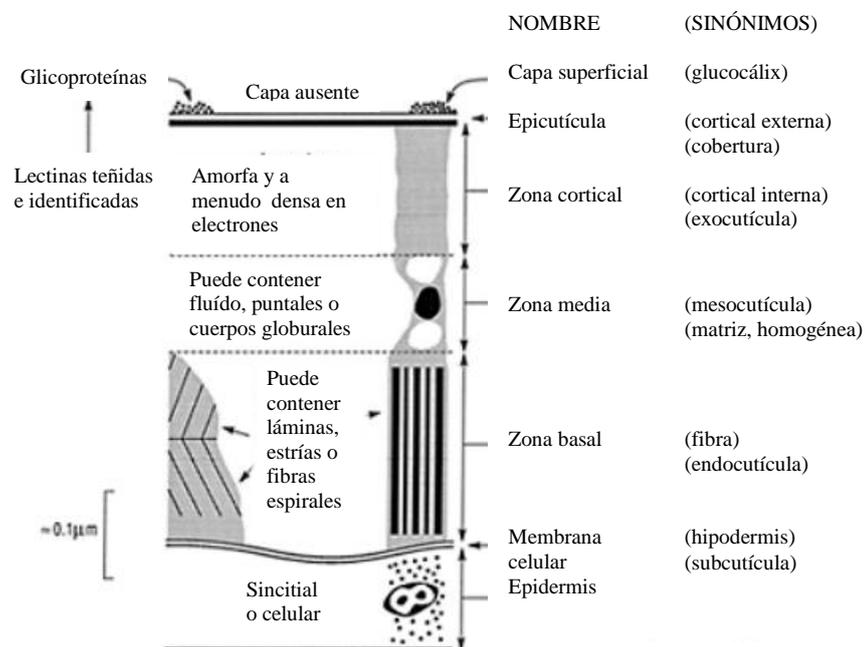


Figura 2. Esquema de la cutícula de nematodos.

FUENTE: Lee (2002), traducción propia.

En J2 la cutícula superficial está formada principalmente de carbohidratos y proteínas que cubren el cuerpo en una capa continua, en el género *Meloidogyne* sp. se han visto también

moléculas de colágeno junto con otras cadenas de polipéptidos entrecruzados. En *M. incognita* se ha encontrado una distribución diferenciada de colágeno (76 kDa) alrededor del cuerpo según el estadio de vida, en J2 y machos se distribuye en tres partes a modo de anillos alrededor del cuerpo, lo que permite movilidad, en cambio en las hembras sedentarias se distribuye uniformemente alrededor de todo su cuerpo formando una capa continua (Lee, 2002).

La capa externa de la cutícula también presenta una ornamentación diferenciada entre género y especies, la ornamentación de la región del perineo de la hembra (entre la vulva y la vagina) permite la identificación de especie al generar los denominados “patrones perineales” (Figura 3). Este patrón es considerado un marcador morfológico importante del grupo *Meloidogyne*, siendo uno de los principales pilares de la taxonomía del género sobre el cuál se ha basado la descripción de todas sus especies (Hunt y Handoo, 2009).

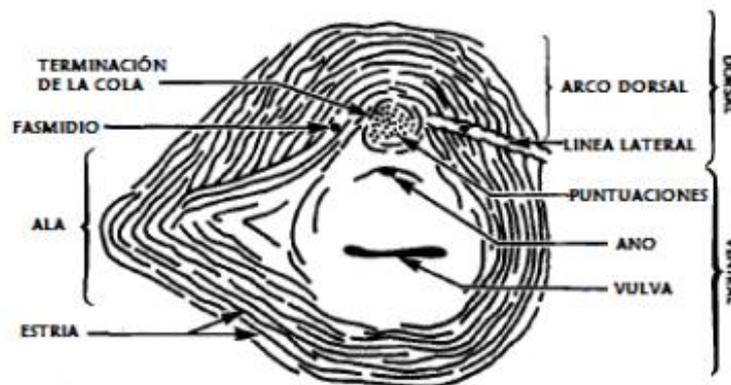


Figura 3. Esquema del patrón perianal de hembras de *Meloidogyne* sp.

FUENTE: Eisenback *et al.* (1981).

b. Epidermis

La epidermis cubre el cuerpo, y es la responsable de toda la arquitectura del nematodo a lo largo de su vida. Secreta la cutícula y tiene las funciones de protección, excreción y regulación homeostática (Lee, 2002; Eisenback y Hunt, 2009; Brusca y Brusca, 2005). Es celular, y se engrosa en los cordones longitudinales, dorsales y laterales, dentro de los cuales se alojan los cordones nerviosos longitudinales (Decraemer y Hunt, 2006).

c. Músculos

Existe tan solo una capa de musculatura somática orientada de manera oblicua y longitudinal debajo de la epidermis. El movimiento sinusoidal de los nematodos se da por una contracción alternada de la musculatura ventral y dorsal (Decraemer y Hunt, 2006; Brusca y Brusca, 2005).

d. Pseudoceloma

Esta cavidad es una estructura secundaria que carece de mesenterio, rodeada por los músculos somáticos y la lámina basal que cubre los cordones epidérmicos. Se encuentra llena de fluido, dentro del cual flotan los órganos internos que conforman el sistema digestivo y el aparato reproductor (en hembras y machos) (Decraemer y Hunt, 2006; Eisenback y Hunt 2009).

e. Cabeza

En la cabeza en machos se encuentran muchos caracteres morfométricos utilizados para la descripción e identificación de especies (Figura 4). Está compuesta por una cápsula cefálica y una región de la cabeza (o anillo post labial). La región de la cabeza puede estar parcialmente subdividida por anillos. La cápsula cefálica tiene un disco labial relativamente grande que está fusionado en cuatro labios mediales. Hay seis sensilias labiales interiores alrededor de la abertura oral y hay una sensilia cefálica en cada labio medial. Tiene dos hendiduras que permiten el paso de los anfidios, excavaciones de la cutícula que se presumen quimiorreceptores y están provistas de una glándula y de terminaciones nerviosas, que se localizan entre el disco labial y el lateral. Estos labios laterales pueden estar ausentes o reducidos en algunas especies. La cabeza cefálica y el estilete están bien desarrollados, la distancia del orificio de la glándula dorsal esofágica a la base del estilete (DGED) está localizada detrás de los lóbulos del estilete, estos lóbulos tienen la misma forma redondeada en hembras. En las hembras el estilete es más pequeño y el DGED es más corto. La cabeza no se separa tan distintivamente del cuerpo, su cabeza cefálica es más delicada pero se nota su presencia (Decraemer y Hunt, 2006).

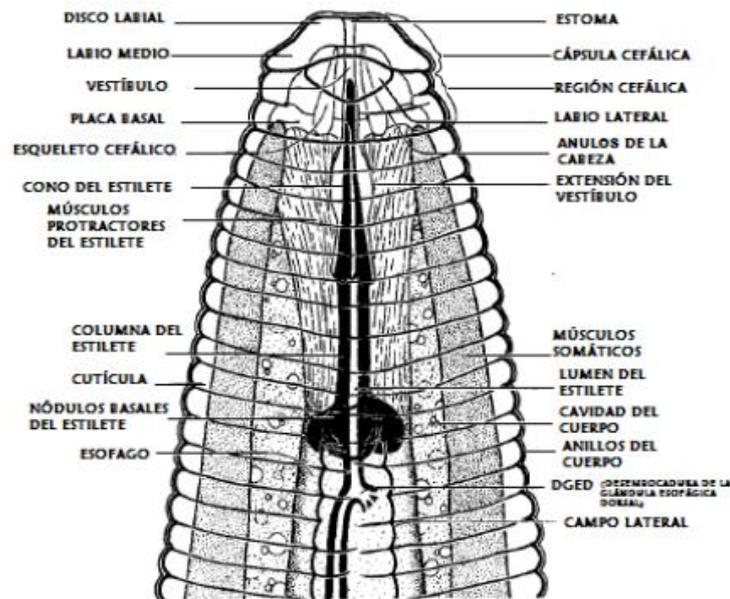


Figura 4. Esquema de la morfología de cabeza en machos de *Meloidogyne* spp.

FUENTE: Eisenback *et al.* (1981)

2.2.3. SINTOMATOLOGÍA

Meloidogyne sp. invade la raíz del hospedero alterando la fisiología de sus células para poder reproducirse y alimentarse en ellas, lo que deviene en la formación de agallas con forma de nódulos en las raíces. Esta formación de nódulos característicos es el principal síntoma, por los que se les conoce comúnmente como “nematodos noduladores” o “nematodos agalladores”.

Los síntomas en la parte aérea de la planta pueden ser similares a cualquier otro problema de raíz y puede ser asintomático en los productos cosechados. El efecto más aparente del parasitismo de nematodos sobre la planta es una reducción general del crecimiento. Los nematodos reducen el crecimiento de las plantas debido a que destruyen la estructura de las células y consumen su contenido, interfiriendo en los procesos fisiológicos normales y modificando la expresión genética en la planta hospedante. Además, los síntomas asociados al parasitismo, a menudo son marchitez temporal y aparentes deficiencias nutricionales en las hojas; manifestaciones de alteraciones en dos funciones radicales básicas como son la absorción de agua y la nutrición mineral (Vera, 2014; Moens *et al.*, 2009)

2.3. DETECCIÓN DE NEMATODOS A NIVEL DE ESPECIE EN *Meloidogyne* sp. A PARTIR DE MUESTRAS DE SUELO

La detección de nematodos fitoparásitos en muestras de suelo permite conocer la presencia de las especies que infectan un campo, al juntar esta información con el conocimiento del tamaño de población de cada una de las especies detectadas se obtiene un diagnóstico preciso importante para la toma de muchas decisiones agrícolas (Qiu *et al.*, 2006). *Para lograr esta detección son necesarios dos pasos: extraer los nematodos del suelo y realizar la identificación de especie.*

El primer paso es el más sencillo, existe numerosa bibliografía sobre el tema y no necesariamente requiere de un laboratorio o personal especializado, por lo que es fácilmente replicable. El método de obtención de nematodos puede ser directo o indirecto y dependerá del estadio de vida requerido además del tipo de muestras, que pueden ser suelo o alguna parte de la planta infectada. Entre los métodos más comunes están el tamizado, la maceración de raíces/hojas, la incubación, la centrifugación-flotación y la bandeja de extracción (Van Bezooijen, 2006; Coyne *et al.*, 2007). Para una detección más precisa es deseable procesar la mayor cantidad de muestras de suelo posible debido a que los nematodos no suelen estar distribuidos de forma uniforme en el campo, sino más bien agrupados en forma de “parches”(Coyne *et al.*, 2007).

El segundo paso en cambio requiere de material y personal especializado en técnicas de identificación. Lograr la identificación a nivel de especie del género *Meloidogyne* sp. es una tarea difícil debido a la morfología conservada, la morfométrica variable, los efectos del hospedero, la variación intraespecífica, la existencia de especies crípticas y la aparición de un abrumador número de nuevas especies descritas con relaciones dudosas entre sí, e incluso sin un método de diagnóstico claro de las mismas. Existe un problema de definición de “concepto de especie” entre las especies de este género que se reproducen predominantemente de manera partenogénica, como *M. incognita*. Por estas razones se prefiere el uso de diferentes técnicas de identificación a la vez que permitan obtener más información en el estudio de poblaciones mixtas y/o en la detección de especies raras: morfológicas, bioquímicas y moleculares (Hunt y Handoo, 2009).

2.3.1. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE

Dentro de la identificación morfológica, el patrón perianal de la hembra fue tomado inicialmente como una de las características de diagnóstico más útiles, y en él que se basa la descripción de múltiples especies. Otros caracteres morfométricos que se usan, son la forma y medidas de la región labial, morfología del estilete en hembras, machos y J2, y la longitud y forma de la cola del J2 (Hunt y Handoo, 2009). Sin embargo, la variabilidad intraespecífica de estos patrones no permitió definir claramente las especies, hasta la aparición de las metodologías bioquímicas y moleculares.

Entre los métodos bioquímicos se encuentran los de isozimas y el uso de anticuerpos. En el género se ha observado una estabilidad relativa de los fenotipos de isozimas, pero la ocurrencia de variantes intraespecíficas y la dificultad de resolver las variantes de tamaño entre especies ha hecho necesario el uso de más de un solo sistema de enzimas para la identificación de algunos individuos. Por otro lado, el uso de anticuerpos como herramientas de diagnóstico de *Meloidogyne* spp. se ha visto limitado a pocas muestras en algunas especies (*M. javanica*, *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. chitwoodi* y *M. fallax*), generalmente superado por el diagnóstico molecular ante la falta de anticuerpos altamente específicos (Blok y Powers, 2009).

Los métodos moleculares usados en nematodos para la detección y diagnóstico usualmente se basan en estudios de los ácidos nucleicos. Tienen como ventajas la relativa simplicidad de aplicación en laboratorio, la facilidad de obtención de ADN y la practicidad de almacenamiento de la solución de ADN para futuros análisis, además de su potencial aplicación en todos los estadios de vida y en poblaciones mixtas (Powers, 2004). Motivos por los cuales el análisis de ADN también ha sido ampliamente utilizado en sistemática de nematodos (Karajeh *et al.*, 2010).

Todas estas metodologías tienen ventajas y desventajas, y se consideran en realidad complementarias pues cada una brinda un nivel diferente de información para la descripción de la especie. Sin embargo, en términos prácticos, para lograr una detección efectiva en campo se busca usar en lo posible una sola metodología de identificación que sea rápida, económica y fiable.

2.3.2. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE USADAS EN EL PERÚ

En el Perú se utiliza ampliamente el sistema morfométrico para lograr la identificación de especies en campo y para fines de investigación. Sin embargo, como ya se mencionó, el uso de sólo este sistema presenta como falencias el alto nivel de variación de sus caracteres descriptivos entre especies y entre las razas dentro de una especie. En términos prácticos, el tiempo prolongado que requiere la realización de la prueba junto con la necesidad de personal altamente especializado conlleva a que la identificación tenga un alto costo económico, lo cual es un limitante para realizar nuevas investigaciones al no poder analizarse un gran número de muestras que sean representativas de una región determinada (Qiu *et al.*, 2006).

Los ensayos de diagnóstico usados actualmente en el país pueden durar entre una semana y dos meses y medio. Si la infección en campo está suficientemente avanzada para poder extraer hembras, machos y juveniles de las raíces infectadas, puede realizarse el montaje y análisis de estos especímenes bajo el estereoscopio para evaluar los caracteres morfométricos. Este proceso puede durar una semana. De no encontrarse estos especímenes en la muestra de campo, es necesario realizar un ensayo de infección en plantas susceptibles a partir de las muestras de suelo y mantenerlo hasta llegar al estado parasitario deseado. Este proceso de infección demora al menos dos meses y lleva a una identificación con resultados sesgados al provenir de un análisis indirecto del suelo.

También, se han realizado trabajos de investigación para utilizar métodos moleculares de identificación del género *Meloidogyne*: aplicando amplificación de iniciadores específicos (Vera, 2014) y secuenciación (Murga-Gutierrez *et al.*, 2012).

2.4. EXTRACCIÓN DE NEMATODOS DEL SUELO

La extracción de nematodos de suelo puede hacerse de manera directa o indirecta. La manera directa es la más simple: la muestra se sumerge en agua y luego se seleccionan los nematodos manualmente bajo el microscopio, o bien se extraen diseccionando la raíz infectada. Sin embargo, este es un trabajo tedioso para muestras grandes y numerosas, por lo que los métodos más usados son los indirectos ya que permiten obtener mayor cantidad de nematodos del suelo en un solo paso. Los métodos indirectos usan tres propiedades para separar los nematodos del medio donde se encuentra, ya sea sustrato, medio de crecimiento

o alguna parte de la planta infectada. Pueden usar una o más dependiendo del tipo de muestra y el uso que se le va a dar a los nematodos (Van Bezooijen, 2006):

- Peso o tasa de sedimentación: Se pueden separar por decantación a las partículas que se asienten más rápido que los nematodos. Es la base de métodos de elutriación y los que usan líquidos de gravedad específica mayor que los nematodos (centrifugación flotación).
- Tamaño y forma: Separan los nematodos usando tamices.
- Movilidad: Aprovechan el movimiento de los nematodos, estos se mueven de la muestra al agua y pueden ser recabados en suspensión (técnica de Baermann y los derivados de él).

La selección del método a usar depende de las condiciones y materiales disponibles, el tipo de muestra y del tipo de nematodos de la misma (Coyne *et al.*, 2007).

2.4.1. BANDEJA DE COBB O TAMIZADO

Este método indirecto usa la diferencia de tamaño, forma y tasa de sedimentación entre los nematodos y las partículas de suelo. Se mezcla la muestra vigorosamente con agua para separar los nematodos de las partículas de suelo, una vez que las partículas se han asentado la suspensión de nematodos resultante se separa por decantación y se tamiza por tamices de distinto tamaño de poro con el fin de separar los nematodos de sustrato. El tamiz final siempre es el de menor tamaño de poro para colectar a los nematodos. De ser necesario, la suspensión resultante se deja decantar o se concentra (Van Bezooijen, 2006).

Su principal ventaja es que permite la extracción de todo tipo de nematodos, por lo que es recomendable para extraer nematodos de gran tamaño y aquellos de movimiento lento. Entre sus desventajas se observa que los nematodos pueden posarse con las partículas de suelo si el suelo no está bien disperso, además, los nematodos se dañan con facilidad al pasar entre tantos tamices y requiere equipamiento más especializado (Coyne *et al.*, 2007).

2.4.2. CENTRIFUGACIÓN FLOTACIÓN

Esta metodología indirecta se basa en la diferencia de gravedad específica entre los nematodos y otras fracciones de la muestra. Cuando la muestra es suspendida en un fluido con una gravedad específica mayor a la de los nematodos, los nematodos flotan, mientras que partículas con gravedad específica mayor al fluido se hunden. Usualmente se usa para tratar muestras pre extraídas por otros métodos con la finalidad de concentrar y limpiar la suspensión de nematodos. Puede tener dos pasos: en el primero la suspensión de nematodos, es centrifugada y se rescata el precipitado que contiene nematodos y partículas de suelo; en el segundo, este sedimento se vuelve suspende en un fluido de extracción y se vuelve a centrifugar, los nematodos se encuentran en el sobrenadante, y este es pasado por un tamiz para eliminar el fluido de extracción. El primer paso es opcional, y su uso dependerá de la muestra y del objetivo por el que se obtiene la suspensión resultante (Van Bezooijen, 2006; Sarah y Boisseau, 2008).

La ventaja de este método es que extrae todo tipo de nematodos, vivos y muertos, y en cualquier estadio de crecimiento presentes en la muestra. Esta falta de selectividad puede convertirse en desventaja si solo se desea obtener nematodos vivos o una especie o estadio específico. Sus desventajas son que el fluido de extracción puede llegar a dañar la forma y vitalidad de los nematodos, además de ser una técnica que requiere equipamiento más especializado (Van Bezooijen, 2006).

2.4.3. BANDEJA DE EXTRACCIÓN O TÉCNICA DE BAERMANN MODIFICADA

Es una modificación de la técnica de embudo de Baermann y funciona bajo el mismo principio de esta: movilidad de los nematodos. La muestra de suelo se coloca sobre un papel (que actúa como filtro para las partículas de suelo) dentro de un tamiz de malla de poro medio, y se introduce dentro de un recipiente con agua a un nivel que humedezca el suelo pero no lo cubra. Luego de dos a tres días se extraen los nematodos desde la suspensión obtenida en el recipiente contenedor, ya sea por decantación o utilizando tamices.

Este método presenta como ventaja ser una técnica simple que no requiere equipamiento especial, por lo que es fácil de adaptar a cualquier circunstancia utilizando material disponible localmente. Se consigue extraer una amplia variedad de nematodos móviles, no obstante, aquellos de gran tamaño y/o con movimiento lento no son bien extraídos. Entre

sus desventajas está que las suspensiones a partir de suelo pueden salir sucias, sobre todo si el suelo es arcilloso, y que la proporción de nematodos obtenidos varía según la temperatura ambiental de trabajo. La eficiencia de extracción es mayor en muestras pequeñas, y decrece exponencialmente al aumentar el tamaño de muestra debido a la muerte de los nematodos por acumulación de metabolitos y microorganismos, y la falta de oxígeno en la parte baja de la muestra (Van Bezooijen, 2006; Coyne *et al.*, 2007).

2.5. DETECCIÓN MOLECULAR

2.5.1. DETECCIÓN MOLECULAR EN *Meloidogyne* sp.

Los métodos utilizados en diagnóstico molecular de nematodos basados en el ADN son considerados robustos, sensibles, específicos y fiables para detectar e identificar varias especies de *Meloidogyne* sp. comparados con los métodos morfológicos o bioquímicos (Onkendi *et al.*, 2014).

La amplificación del ADN es la base de la identificación molecular basada en el análisis de ADN, puede llevarse a cabo por técnicas basadas en la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y más recientemente por amplificación isotérmica mediada por lazo (LAMP). Actualmente, dentro del ADN nuclear ribosomal (ADNr) (Figura 5) se encuentran los marcadores moleculares más empleados en la sistemática de *Meloidogyne* sp., que incluyen a las sub unidades 18S y 28S, y las altamente variables regiones espaciador transcrito interno (ITS) y espaciador inter génico (IGS). Dentro de las regiones ribosomales se han buscado obtener también “códigos de barras” y también se han estudiado diferentes genes nucleares principalmente para analizar la evolución del género (Powers, 2004; Adams *et al.*, 2009).

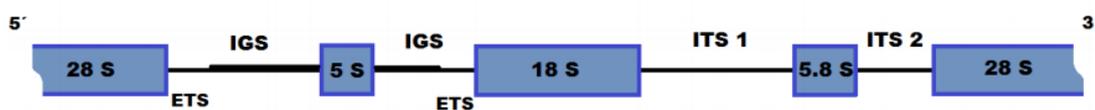


Figura 5. Diagrama del cistron ribosomal en *Meloidogyne* sp

FUENTE: Vera (2014)

PCR es el método más usado de amplificación de ADN ya que permite multiplicar exponencialmente un pequeño fragmento de ADN con el objetivo de incrementarlo hasta niveles detectables (Vera, 2014). Es un procedimiento que reproduce en el laboratorio el

proceso esencial de replicación del material genético de la célula para lo que requiere de un molde de ADN (plantilla) que contiene la región a amplificar, un par de iniciadores que flanquean esta región y una ADN polimerasa termoestable. Los métodos de identificación en *Meloidogyne* sp. basados en PCR incluyen: polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), sondas de ADN microsatélite y satélite, iniciadores específicos de secuencias caracterizadas de la región amplificada (SCAR), PCR en tiempo real y análisis de alta resolución de fusión (HRM) (Onkendi *et al.*, 2014).

Tanto AFLP y RFLP requieren una digestión enzimática, junto a los microsatélites y satélites fueron las primeras técnicas usadas. Los RAPD, al igual que los cuatro métodos antes mencionados, distinguen la especie en bases de patrones característicos vistos en un gel de electroforesis. Sin embargo se ha visto que no es un método suficientemente consistente para realizar una identificación rutinaria presumiblemente porque requiere grandes cantidades de ADN (Adam *et al.*, 2007). Los marcadores SCAR para identificar especies han sido obtenidos en *Meloidogyne* sp. por la conversión de un único producto de RAPD en un sitio de secuencia marcada. Se puede observar su polimorfismo como la presencia o ausencia de la banda de amplificación del iniciador (Agarwal *et al.*, 2008; Adams *et al.*, 2009). La PCR en tiempo real permite aumentar la sensibilidad y especificidad de la identificación, teniendo la posibilidad de identificar y cuantificar de forma simultánea varias especies a la vez en un corto periodo de tiempo (Onkendi *et al.*, 2014). Se han logrado identificar a algunas especies del género usando distintos tipos de pruebas para cada una (Oliveira *et al.*, 2011), pero no se ha aplicado aún como método de diagnóstico a gran escala. El análisis HRM aplicado al género está recién en sus pruebas iniciales, y aun no hay pruebas que puedan distinguir fiablemente las distintas especies que lo conforman (Holterman *et al.*, 2012).

Las ventajas de estos métodos son su simpleza, el no estar limitados a un solo estadio de desarrollo y poder detectar varias especies a la vez al aplicar multiplex PCR (Blok y Powers, 2009). Entre sus desventajas se ven que algunos marcadores inespecíficos tienen baja sensibilidad, pobre visibilidad de banda en algunos casos, la falta de reproducibilidad entre distintos laboratorios y la necesidad de grandes cantidades de ADN en algunos protocolos para obtener resultados (Adam *et al.*, 2007).

Otro tipo de identificación molecular que utiliza también a la PCR en sus pasos iniciales es la basada en secuenciación. Esta técnica suele secuenciar fragmentos del ADN ribosomal ya que provee una buena plantilla para el trabajo de PCR debido a la alta variabilidad dentro del género comparado con otras regiones como 28S D2/D3, permitiendo obtener secuencias diferenciadas según distintas especies. Las secuencias donde ocurre mayor variación son las que codifican 18S, 28S (26S) y 5.8S, y por eso son las más utilizadas (Onkendi *et al.*, 2014)

LAMP es un método de amplificación más reciente desarrollado en el 2000 por Eiken Chemical Company Ltd. Requiere una ADN polimerasa con actividad en desplazamiento de hebra y un set de seis iniciadores. Tiene como ventajas respecto a la PCR tradicional que no requiere un gradiente de temperaturas y que la amplificación puede usar un ADN plantilla no necesariamente pre-procesado, es decir, sin la necesidad de realizar un proceso previo de extracción. Al ser una metodología nueva existen pocos trabajos aplicativos al género, de Niu *et al.* (2011) y Niu *et al.* (2012).

2.5.2. DETECCIÓN MOLECULAR EN *M. incognita*

Los primeros intentos de identificación de la especie datan de 1993. (Powers y Harris, 1993) diseñaron iniciadores para amplificar la región entre el gen mitocondrial que codifica la subunidad II de la citocromo oxidasa y los iniciadores 16S rARN. El amplificado resultante requería una digestión enzimática posterior para lograr identificar *M. incognita* junto a otras cuatro especies al ser un marcador RFLP. Paralelamente, (Cenis, 1993) amplificó productos RAPD en dos reacciones separadas llegando a producir bandas que diagnostiquen especies en la mitad de sus pruebas.

Williamson *et al.* (1997) obtuvo el marcador SCAR MIGF/MIGR a partir de un fragmento de amplificado del iniciador RAPD OPA-01 en *M. hapla*, marcador que logró identificar al grupo de especies: *M. incognita*, *M. arenaria* y *M. javanica*. El descubrimiento fortuito de este par de iniciadores fue muy importante porque detectan a las tres principales especies del género *Meloidogyne*, grupo denominado MIG a partir de la publicación de esta investigación. En ese mismo año, Zijlstra (1997) logró obtener patrones moleculares específicos que identifican a *M. incognita*, *M. hapla*, *M. chitwoodi* y *M. fallax* a partir de secuencias del ADNr-ITS y propuso una metodología para distinguir estas cuatro especies a la vez usando multiplex PCR. Zijlstra *et al.* (2000) lograron identificar iniciadores

SCAR específicos para *M. incognita* (Finc/Rinc), *M. javanica* (Fjav/Rjav) y *M. arenaria* (Fjav/Rjav) a partir de bandas amplificadas por los marcadores RAPD OPA-12₄₂₀, OPB-06₁₂₀₀ y OPA-01₇₀₀. Al año siguiente, Dong *et al.* (2001) desarrolló también marcadores SCAR específicos para estas tres especies y uno adicional para *M. hapla*.

Pareciera ser que todos los marcadores específicos se encuentran dentro del ADNr, no obstante Tesařová *et al.* (2003) lograron obtener un marcador para *M. incognita* a partir de la secuencia SEC1 de una proteína de la glándula esofágica siendo uno de los primeros intentos exitosos de obtener un marcador en un gen no ribosomal ni mitocondrial.

Meng *et al.* (2004), diseñaron iniciadores SCAR específicos a partir de marcadores RAPD para las tres especies del grupo MIG, nombrando MiF/MiR el par de iniciadores identifican a *M. incognita*. Adam *et al.* (2007) incluyeron al marcador MiF/MiR dentro de una clave de diagnóstico molecular propuesta para distinguir distintas especies del género, y a partir de esa fecha múltiples autores han utilizado este par de iniciadores (Devran y Söğüt, 2009; Hu *et al.*, 2011; García y Sánchez-Puerta, 2012; Vera, 2014; Daramola *et al.*, 2015) hecho que demuestra la alta reproducibilidad y especificidad del marcador. MiF/MiR es un iniciador secuencia específico que identifica un locus genéticamente definido dentro del ADN ribosomal 18S del nematodo y su uso tiene como ventaja adicional, que potencialmente puede utilizarse junto a otros pares de iniciadores en reacciones multiplex para lograr la identificación de varias especies con una sola reacción de PCR (Adams *et al.*, 2009).

2.6. EXTRACCIÓN DE ADN DE NEMÁTODOS EN *Meloidogyne* sp.

Existen muchos protocolos de extracción de ADN descritos previamente, los cuales varían porque utilizan como muestra un solo individuo J2 o un conjunto de ellos; individuos machos o hembras. Para identificación molecular de nematodos se han usado generalmente protocolos de extracción de ADN a partir de individuos aislados manualmente y limpiados previamente al inicio del proceso de extracción o añadiendo un paso de purificación de ADN posterior a la extracción (Qiu *et al.*, 2006; Blok y Powers, 2009). Pocos autores han buscado establecer protocolos de extracción de ADN a partir de comunidades enteras de nematodos del suelo para detección molecular por PCR debido a que la amplificación del ADN obtenido a partir de extractos de suelo se ve dificultada por la presencia de inhibidores de la ADN polimerasa provenientes del sustrato (Qiu *et al.*, 2006). La

necesidad de eliminación de estos inhibidores hace que el pre tratamiento de muestra y los pasos de separación de contaminantes del ADN dentro del protocolo de extracción cobren importancia para poder lograr el análisis molecular de poblaciones provenientes de suelo, factores que se analizaron al comparar los distintos protocolos de extracción (Tabla 1).

Las metodologías de extracción en *Meloidogyne* sp. se pueden clasificar por el tipo de disrupción celular que utilizan: enzimática (proteinasas K), mecánica (molienda) o química (NaOH y fenol con detergentes). Todas las metodologías presentadas en la Tabla 1 tienen en común el uso de una alta concentración de reactivos que permitan la denaturalización y eliminación de proteínas por ser estas la principal fuente de contaminación proveniente del nematodo. Entre estos autores, Qiu *et al.* (2006) es el único que ha logrado una detección exitosa a partir de extractos de nematodos obtenidos directamente de suelo utilizando en conjunto una disrupción mecánica y enzimática, sin embargo el ADN resultante no fue estable pues se degrada si no es refrigerado a -80°C inmediatamente después de su obtención.

Tabla 1. Comparación de distintas metodologías de extracción de ADN de *Meloidogyne spp.* usados en detección molecular

Autor	Muestra	Disrupción celular	Amortiguador de extracción	Eliminación de contaminantes
Karajeh <i>et al.</i> (2010)	Cientos de juveniles 10-15 masas de huevos 10 hembras Extracción manual	Molienda con micropistilo en amortiguador de extracción	250 mM Tris-HCl, pH 8.0; 250 mM NaCl; 50 mM EDTA; 0.5 % SDS; 2.5 % β -mercaptoetanol	Acetato de sodio 3M, pH 5.2
McClure <i>et al.</i> (2012)	10 juveniles Extracción manual	Corte por la mitad e incubación en amortiguador de extracción a 60° durante 1 hora	10 mM Tris, pH 8.2; 2.5 mM MgCl ₂ ; 50 mM KCl; 0.45 % tween 20; 0.05 % gelatin; 60 μ g/ml proteinasa K	-
Lambshhead <i>et al.</i> (2009)	Adultos y juveniles Extracción manual	Incubación en amortiguador de extracción a 65° durante 2 horas	0.2 M NaCl, 0.2 M Tris-HCl, pH 8.0, 1 % β -mercaptoetanol y 800 μ g/ml proteinasa K	-
Floyd <i>et al.</i> (2002)	Adultos y juveniles Extracción manual	Incubación en 20 μ L de NaOH 0,25M a 95°C por 3 minutos	1M HCl, 0.5 mM Tris-HCl pH 8.0 y 2 % Triton X-100	-
Randig <i>et al.</i> (2001)	Adultos y juveniles Extracción manual	Molienda con pipeta de pasteur (punta tapada) en amortiguador de extracción	0.1 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM EDTA, 1 % SDS, 0.17M NaCl; 50 μ g/ μ l de proteinasa K	Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1)
Qiu <i>et al.</i> (2006)	Miles de juveniles Embudo de Baermann	Molienda con alfiler entomológico en amortiguador de extracción y shock de frío a -70°C	10 mM Tris HCl, pH 8.3; 50mM KCl; 15mM MgCl ₂ ; 0.1% Triton X-100; 0.01% gelatin, 90 μ g/ml proteinasa K	-
Jaramillo-Pineda <i>et al.</i> (2015)	Miles de juveniles Embudo de Baermann	Fenol: cloroformo (5:1)	100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8.0; 2 % Tritón X-100, 1 % SDS	Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

La tesis se llevó a cabo tanto en el invernadero como en el laboratorio del Área Biología Molecular del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNALM. La población fue mantenida en el invernadero del Área Biología Molecular del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNALM. Las muestras de nematodos a partir de esta población fueron extraídas de las muestras de suelo, evaluadas bajo estereoscopio y montadas para identificación en el Laboratorio de Nematología de la UNALM, la identificación morfológica bajo microscopio y el trabajo molecular se llevó a cabo en el laboratorio del Área Biología Molecular del IBT.

3.2. MUESTRAS DE SUELO CON *M. incognita*

3.2.1. ESTABLECIMIENTO DE LA POBLACIÓN

Para el estudio se estableció una población de *M. incognita* en macetas ubicadas en el invernadero del Área Biología Molecular del Instituto de Biotecnología (IBT) (Figura 6) a partir de un inóculo proveniente del Laboratorio de Nematología de la UNALM.

Con la finalidad de obtener una población numerosa que permita realizar varias pruebas se utilizó el procedimiento para multiplicación de Coyne y Ross (2014) en plantas de *Solanum lycopersicum* “tomate” var. Río Grande. Para lo cual, se sembraron semillas usando como sustrato musgo, después de aproximadamente dos semanas las plántulas resultantes fueron trasplantadas a macetas con sustrato estéril (tierra agrícola y arena, proporción 2:1) e inmediatamente fueron inoculadas con los nematodos.

Para obtener el inóculo primero fueron cortados con tijera trozos de raíces infectadas provenientes del invernadero del Laboratorio de Nematología, luego los pedazos obtenidos se suspendieron en agua potable, esta suspensión se agitó vigorosamente durante 5 minutos para liberar los huevecillos de la raíz y se usaron 5 ml para infectar cada plántula con esta

suspensión. Inicialmente se infectaron diez plántulas, estas fueron mantenidas en invernadero durante tres meses, pasado ese tiempo se extrajeron hembras y machos de manera directa para realizar la identificación morfológica de la población, individuos en estadio J2 de manera indirecta para realizar la extracción de ADN e inóculo para mantener la población en invernadero.

Para mantener la población en invernadero se continuaron utilizando plantas de *Solanum lycopersicum* “tomate” var. Río Grande. Las plántulas fueron infectadas de dos maneras:

- Por inoculación luego de ser trasplantadas a macetas con sustrato estéril (tierra agrícola y arena, proporción 2:1).
- Por trasplante a sustrato infectado proveniente de las macetas de invernadero (al menos 70 por ciento del volumen total del sustrato).

Ambos modos de infección para el mantenimiento de la población fueron igual de exitosos.



Figura 6. Población de *M. incognita* mantenida en invernadero. A. Macetas con plantas de tomate infectadas. **B.** Raíz de una planta de tomate infectado.

3.2.2. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

La identificación morfológica estuvo basada en las características observables de la región perineal para las hembras y de la cabeza para los machos (Hunt y Handoo, 2009; Jepson 1983; Eisenback *et al.*, 1981). Los nematodos utilizados para la identificación fueron tomados de tres macetas elegidas al azar entre las diez que fueron inoculadas inicialmente. Las hembras se extrajeron directamente desde las raíces infectadas con ayuda de un estereoscopio, usando pinzas y estiletes de punta fina; las cuales fueron transferidas a una solución de ácido láctico 40 por ciento donde permanecieron 48 horas, luego se cortaron

los patrones perineales con un bisturí bajo estereoscopio, finalmente se montaron en una lámina porta objetos con glicerol y se cubrieron con una lámina cubre objetos. Los machos fueron obtenidos incubando las raíces infectadas con aireación en agua potable a temperatura ambiente, luego se separaron utilizando un tamiz de 500 *mesh*, y para su observación se montaron en una lámina porta objetos con formamida 4 por ciento y se cubrieron con una lámina cubre objetos. Los montajes de macho y hembras fueron observados a un aumento de 1000X en microscopio óptico compuesto, se tomaron fotografías y a los machos se les midió la distancia que hay entre el orificio de la glándula dorsal esofágica y la base del estilete (DEGD).

3.2.3. MUESTRA DE SUELO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN

Las muestras de suelo utilizadas fueron recolectadas de las macetas mantenidas en invernadero tomando el sustrato periférico a la raíz de cada planta infectada, por lo que cada muestra estuvo compuesta por sustrato y trozos de raíz secundaria. Se buscó que la muestra fuera similar a la usada para diagnóstico en campo según lo recomendado por (Van Bezooijen, 2006). Una vez separada, la muestra fue homogeneizada manualmente antes de extraer los nematodos, eliminando las piedrecillas y otros contaminantes que pudiera contener.

3.3. SELECCIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE NEMATODOS A PARTIR DE MUESTRAS DE SUELO

3.3.1. SELECCIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE NEMATODOS

Con el objetivo de seleccionar la mejor metodología para la obtención de juveniles de nematodos móviles para ser utilizados en la extracción de ADN, se compararon tres métodos de extracción a partir de muestras de suelo: bandeja de Cobb, bandeja de extracción y centrifugación flotación. Se evaluó en cada método: (a) La cantidad de juveniles vivos obtenidos por cada 100 cc de muestra de suelo y (b) La contaminación visible en la suspensión de nematodos obtenida por muestra.

a. Métodos de extracción de nematodos

Bandeja de cobb o tamizado

Se homogeneizaron manualmente 100 cc de muestra suelo y se mezclaron con agua potable. Para separar los nematodos se utilizaron dos series de tamices a través de los cuales el suelo fue cribado (ANEXO 2, Figura 7). Primero, el suelo se tamizó a través de la primera serie de tamices de 38 y 400 *mesh* bajo un flujo abundante de agua potable, lo que logró separar los nematodos de las partículas más grandes del sustrato. Se recabaron los nematodos que permanecieron en el tamiz de 400 *mesh*. Luego, la suspensión de nematodos se tamizó nuevamente por una segunda serie de tamices de 45 y 500 *mesh* bajo un flujo abundante de agua potable, este paso permitió separarlos de las partículas más pequeñas remanentes en la muestra. Finalmente, se colectaron los nematodos que permanecieron en el tamiz de 500 *mesh* y se suspendieron en agua potable a un volumen final de 100 ml.



Figura 7. Proceso de tamizado. Una serie de tamices.

Centrifugación flotación

Se homogeneizaron manualmente 100 cc de muestra de suelo y se mezclaron con agua potable. Para separar los nematodos el suelo primero fue cribado por una serie de tamices de 80 y 500 *mesh* con abundante agua potable y se recabaron los nematodos que permanecieron en el tamiz de 500 *mesh*. Los nematodos obtenidos se suspendieron en agua potable hasta completar un volumen de 20 ml. Luego, esta suspensión de nematodos se traspasó a un tubo de 50 ml y encima se le añadieron 20 ml de una solución de sacarosa 70 por ciento. La mezcla fue homogeneizada e inmediatamente los tubos fueron

centrifugados a 3000 rpm durante 1 minuto. Finalmente, se recuperó el sobrenadante de los tubos descartando la tierra precipitada en el fondo del tubo y se llevó a un volumen de 100 ml para el posterior conteo de individuos (Van Bezooijen, 2006; ANEXO 2).

Bandeja de extracción

Fueron elaborados tamices de manera artesanal (Figura 8) que consistieron de una malla plástica sujeta a una sección de tubería de PVC de cuatro pulgadas de diámetro, de acuerdo a lo descrito por (Coyne *et al.*, 2007). Primero se homogeneizaron manualmente los 100 cc de muestra suelo y se prepararon los tamices artesanales forrándolos internamente con papel toalla. Luego, los 100 cc de sustrato se colocaron dentro de los tamices, tratando de repartirlos de forma equitativa en el fondo y se introdujeron en recipientes con agua potable. Después de 48 horas se recabó la suspensión de agua con juveniles que emergieron a partir de los huevecillos presentes en la muestra. Finalmente, la suspensión de nematodos fue lavada en un tamiz de 500 *mesh* bajo abundante agua potable y concentrada a 100 ml (ANEXO 3).

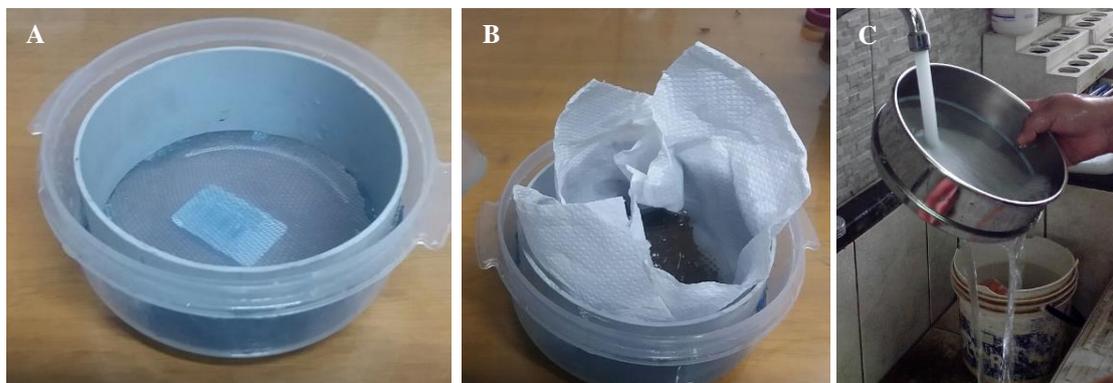


Figura 8. Metodología de bandeja de extracción. A. Bandeja artesanal. **B.** Bandeja preparada con muestra de suelo. **C.** Lavado y concentración de suspensión de juveniles.

b. Evaluación de los métodos de extracción de nematodos

Para cada método se evaluaron cuatro repeticiones provenientes de la misma muestra de suelo. En cada repetición se calculó la cantidad de juveniles vivos en 100 ml de suspensión de nematodos obtenidos por cada 100 cc suelo. Para calcularlo primero se realizó el conteo de nematodos por triplicado en 10 ml de la suspensión de nematodos usando un estereoscopio y una placa de Petri plástica cuadrículada, acondicionada para conteo. Luego, a partir de estas cifras se calculó la cantidad de nematodos juveniles vivos totales

en cada 100 cc de tierra obtenido por cada método de extracción de nematodos y se realizó el análisis estadístico (ANEXO 4).

Adicionalmente, se realizó una evaluación cualitativa de la presencia de partículas visibles de suelo en la suspensión de nematodos resultante en cada método. Se comparó la cantidad de partículas precipitadas en el fondo del recipiente donde se encuentra la suspensión, siendo la escala: fondo 50 por ciento cubierto, contaminación alta; fondo 25 por ciento cubierto, contaminación media; fondo menos de 25 por ciento cubierto, contaminación baja.

3.3.2. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE BANDEJA DE EXTRACCIÓN DE NEMATODOS PARA DETECCIÓN MOLECULAR

Con el objetivo de optimizar el método de bandeja de extracción de nematodos a partir de muestras de suelo para lograr la detección molecular, se planteó un experimento que permitiese evaluar la influencia de la contaminación de suelo en la detección molecular de nematodos. Fueron utilizados tres tipos de suspensiones de juveniles para la extracción de ADN, obtenidas por tres variantes del métodos de bandeja con distinto tratamiento de la muestra, previo o posterior, al método antes descrito: bandeja de extracción (para obtención de nematodos con presencia de suelo), lavado con centrifugación flotación (para obtención de nematodos con presencia moderada de suelo) y mini-bandeja de extracción (para obtención de nematodos con ausencia de suelo). Se realizó una evaluación a partir del ADN extraído de los nematodos obtenidos en cada tratamiento, comparando en el ADN obtenido: (a) Concentración, (b) Calidad, (c) Integridad y (d) Detección molecular.

a. Métodos de extracción de nematodos

Bandeja de extracción

Se utilizaron los tamices elaborados artesanalmente mencionados en el título anterior (ANEXO 2). Primero, el interior de cada tamiz se recubrió con papel toalla y dentro se pusieron 50 cc de muestra de suelo, conformada por tierra y trozos de raíz infectada (Coyne *et al.*, 2007). Luego, los tamices con muestra se sumergieron en agua potable dentro de un contenedor apenas más grande que el tamiz, después de 48 horas se colectaron los juveniles que eclosionaron en el agua a partir de los huevecillos presentes en la muestra. La suspensión de juveniles se lavó y concentró usando un tamiz de 500

mesh a un volumen de 10 ml. Finalmente, se realizó un conteo de los nematodos obtenidos usando un estereoscopio y una placa Petri plástica cuadrículada, acondicionada para conteo.

Lavado con centrifugación flotación

Los nematodos extraídos con el método de bandeja, descrito en el título anterior, se limpiaron usando el método de centrifugación flotación con sacarosa propuesto por (Qiu *et al.*, 2006) con el fin de eliminar los inhibidores de la enzima polimerasa durante la amplificación del ADN Primero, la suspensión de nematodos resultante de las bandejas se concentró usando un tamiz de 500 *mesh* hasta un volumen de 20 ml y se traspasó a un tubo de 50 ml de capacidad. Luego se adicionaron 20 ml de una solución de sacarosa 70 por ciento y se homogeneizó la mezcla, posteriormente se añadieron 2 ml de agua potable. Después, el tubo se centrifugó a 1300 rpm durante 5 minutos y se recabaron los 10 ml superiores. Estos 10 ml de suspensión se traspasaron inmediatamente a un tubo con 40 ml de agua potable y ambas fases se mezclaron suavemente hasta lograr una suspensión homogénea. Finalmente se procedió a lavar y concentrar los 50 ml de suspensión resultante de nematodos con ayuda de un tamiz de 500 *mesh*. Se realizó un conteo de los nematodos vivos resultantes usando un estereoscopio y una placa Petri plástica cuadrículada, acondicionada para conteo.

Minibandeja de extracción

Este método es una variación a la técnica de Baermann al igual que el método de bandeja de extracción. Se diferenció del método de bandeja (Figura 9) por usar tamices artesanales elaborados con malla anti-áfida sujetos a una sección de tubería de PVC de 0.5 pulgadas de diámetro. Para cada muestra de suelo primero se separaron los trozos de raíces infectadas del sustrato y se lavaron con abundante agua potable. Luego, se extrajeron de este conjunto de trozos de raíces 100 masas de huevos utilizando un estilete y se traspasaron a los tamices. Después, los tamices se sumergieron en agua potable contenida en una placa petri de plástico. Finalmente, después de dos días se recuperó la suspensión de juveniles que emergieron y se contaron los individuos en un estereoscopio.

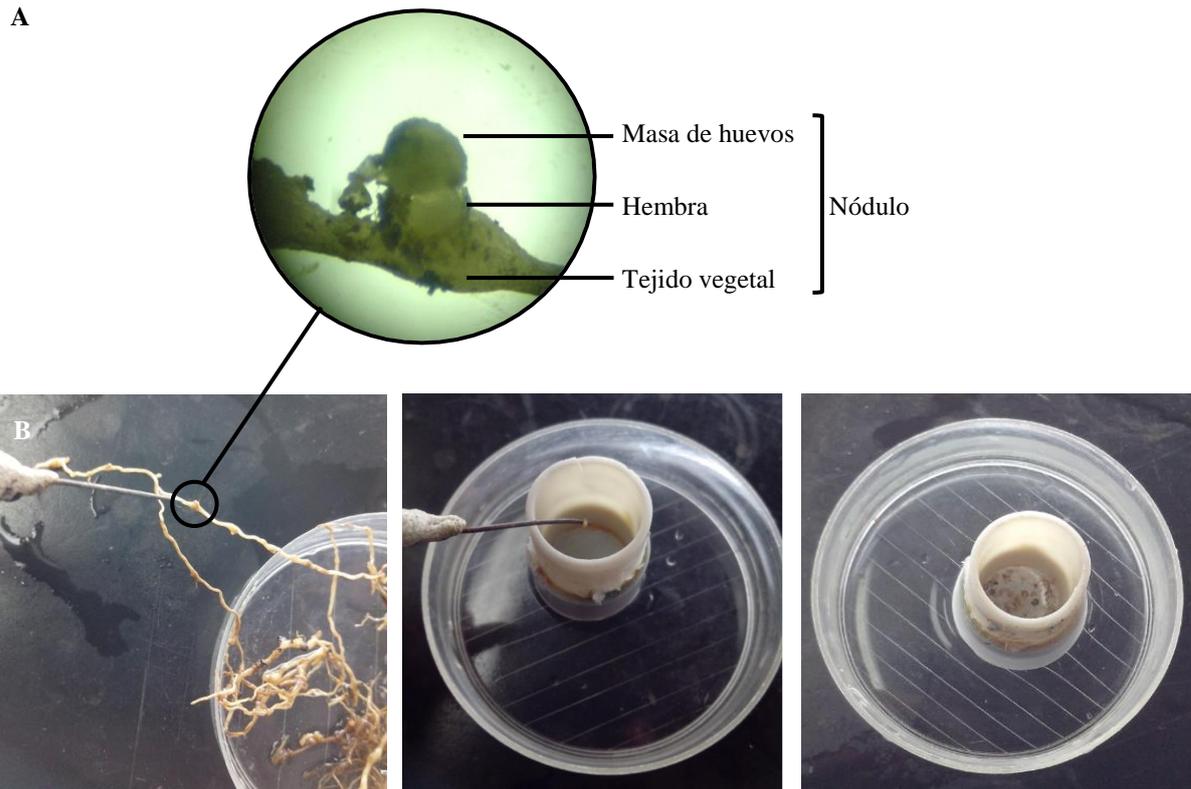


Figura 9. Pasos del método minibandeja. (A) Masa de huevos separada de nódulo de *M. incognita* (250X). (B) De izq. a der. Raíz infectada, masa de huevos separada, bandeja armada con 100 masas de huevos y agua.

b. Evaluación de la optimización del método de extracción de nematodos

Fue evaluado el ADN obtenido de alrededor de 1000 (± 100) individuos concentrados a partir de las suspensiones de nematodos de los tres tratamientos. Las suspensiones de nematodos obtenidas de los tratamientos de presencia de suelo (bandeja de extracción) y presencia moderada de suelo (lavado con centrifugación flotación) fueron concentradas utilizando un tamiz de 500 *mesh* hasta un volumen de 10 ml, y luego realizando centrifugaciones sucesivas de 5 minutos a 10000 rpm en cada microtubo de 1.5 ml. La suspensión con ausencia de suelo (mini-bandeja de extracción) se concentró directamente en los microtubos de 1.5 ml realizando centrifugaciones sucesivas de 5 minutos a 10000 rpm.

El método de extracción utilizado fue el de lisis con detergentes (página 40, ANEXO 3) con un tratamiento con ARNsas posterior. Para cada tratamiento se evaluaron las características del ADN obtenido: su integridad y calidad de manera cualitativa, y se realizó una comparación estadística de la concentración del obtenida (utilizando las

técnicas descritas en la página 37). Finalmente, se realizó una prueba de amplificación por PCR para detección molecular.

3.4. SELECCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN

Fueron evaluados tres métodos de extracción de ADN para juveniles J2 de *M. incognita* aislados de muestras de suelo con el objetivo de seleccionar el protocolo que permita obtener ADN con la calidad, integridad y concentración necesaria para lograr una amplificación de PCR exitosa. Se compararon tres métodos de extracción de ADN: minipreparación, proteinasa K y lisis de detergentes, utilizando nematodos obtenidos por el método de Bandeja.

3.4.1. SUSPENSIÓN DE JUVENILES

La suspensión de juveniles resultante de la bandeja de extracción fue concentrada a 10 ml utilizando un tamiz de 500 *mesh*. Se realizó el conteo de individuos en la suspensión utilizando un estereoscopio y una placa Petri plástica cudriculada. Una vez conocida la cantidad de individuos por mililitro de suspensión, se concentró el volumen necesario en microtubos de 1.5 ml para obtener la cantidad deseada de individuos por repetición. Los nematodos fueron concentrados realizando centrifugaciones sucesivas de 5 minutos a 10000 rpm, eliminando la fase líquida sobrenadante y conservando los nematodos precipitados. A partir de esta muestra concentrada se realizó la extracción de ADN.

3.4.2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN

a. Minipreparación

Este procedimiento fue variado a partir del propuesto por (Karajeh *et al.*, 2010) para extracción de ADN del género *Meloidogyne* añadiendo un paso de incubación a 95°C para lograr una mayor ruptura celular. El esquema de trabajo puede ser visto en el ANEXO 3.

Fueron utilizados cientos de nematodos juveniles provenientes de bandeja de extracción y concentrados por centrifugación en microtubos de 1.5 mL. Primero se agregaron 500 µl de 0.52 por ciento de hipoclorito de sodio y se llevaron a incubación por cinco minutos a temperatura ambiente, después de los cuales se centrifugaron a 8000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante de hipoclorito de sodio fue descartado y se realizaron dos lavados del pellet con agua destilada. Luego, se añadieron 50 µl del amortiguador de

extracción (250 mM Tris-HCl, pH 8.0; 250 mM NaCl; 50 mM EDTA; 0.5 por ciento SDS) al tubo junto a 1.3 µl de β-mercaptoetanol al tubo (2.5 por ciento del volumen), y se realizó la molienda de los nematodos con un micropistilo durante 5 minutos. Al finalizar la molienda mecánica, se añadieron 350 µl adicionales del amortiguador de extracción y 8.7 µl de β-mercaptoetanol al tubo (2.5 por ciento del volumen). Se llevó a incubación a 95°C durante 5 minutos, seguida inmediatamente por una molienda adicional con micropistilo por 5 minutos. Terminada la segunda molienda se adicionó el 0.5 volumen de acetato de sodio 3 M, pH 5.2 (200 µl) y se incubó el lisado a -20°C durante 20 minutos. Después, los tubos se centrifugaron a 13000 rpm durante 3 minutos para separar el precipitado y el sobrenadante. Los ácidos nucleicos presentes se precipitaron con dos volúmenes de etanol absoluto frío e incubación a -20°C durante 2 horas, seguido por una centrifugación a 14000 rpm durante 3 minutos. El pellet resultante fue lavado dos veces con etanol 70 por ciento y centrifugado a 14000 rpm durante 5 minutos. Finalmente el pellet fue secado durante 5 horas a temperatura ambiente y resuspendido en 30 µl amortiguador TE (10 mM Tris HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0).

b. Proteinasa K

Este método de extracción fue modificado a partir del propuesto por (Cristancho *et al.*, 2007) para el hongo fitopatógeno *Hemileia vastatrix*, cuyo protocolo fue previamente estandarizado en el laboratorio de biología molecular del IBT UNALM. Las modificaciones realizadas fueron: se añadió para la molienda un micropistilo, se aumentó la cantidad de proteinasa K por muestra de 5 a 20 µg y se aumentó el tiempo de incubación con proteinasa K. El esquema de trabajo puede ser visto en el ANEXO 3.

Fueron utilizados cientos de nematodos juveniles provenientes de bandeja de extracción y concentrados por centrifugación en microtubos de 1.5 ml. Antes de empezar el proceso de extracción de ADN los nematodos de cada tubo fueron lavados con agua destilada. Una vez limpios, primero se añadieron en cada tubo 50 µl de amortiguador de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 50 mM EDTA, pH 8.0; 3 por ciento SDS; 1 por ciento β-mercaptoetanol) y se realizó molienda con micropistilo. Luego, se añadieron 250 µl de amortiguador de lisis y se calentó en microondas intercalando ciclos de calor con molienda con micropistilo para evitar que ebulle: primero calor durante 20 segundos, luego por 15 segundos y por último por 10 segundos. Después, se adicionaron 100 µl de amortiguador

lisis y se llevó a incubación a 80°C durante 10 minutos, seguido de una molienda con micropistilo. Una vez terminada la molienda mecánica, se agregaron 20 µl de proteinasa K (1 mg/ml) en cada tubo. Se agitó manualmente y se incubó a 55°C durante toda la noche en una incubadora agitadora orbital (MRC) a 20 rpm. Pasado ese tiempo se agregó 700 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (25:24:1), se homogeneizó la mezcla hasta lograr una emulsión y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante de cada tubo se traspasó a otro microtubo de 1.5 ml y a cada uno se le adicionó el mismo volumen de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1), se homogeneizó hasta formar una emulsión y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante de cada tubo se traspasó, se adicionaron dos volúmenes de etanol absoluto y se incubó durante dos horas a -20°C. Al terminar el tiempo de incubación se centrifugaron los tubos a 12000 rpm durante 7 minutos, los pellets fueron lavados con 480 µl de etanol 70 por ciento y 120 µl de NaCl 5 M y se centrifugaron a 14000 rpm durante 7 minutos. Finalmente, el ADN resultante se dejó secar a temperatura ambiente durante 2 horas y fue resuspendido en 30 µl amortiguador TE (10 mM Tris HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0).

c. Lisis con detergentes

Este método fue variado a partir del propuesto por Jaramillo-Pineda *et al.* (2015) añadiendo un lavado con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) luego de la lisis celular con detergentes y fenol. El esquema de trabajo puede ser visto en el ANEXO 3.

Fueron utilizados cientos de nematodos juveniles provenientes de bandeja de extracción y concentrados por centrifugación en microtubos de 1.5 ml. Antes de empezar el proceso de extracción de ADN los nematodos de cada tubo fueron lavados con agua destilada. Luego se añadieron 200 µl de de buffer lisis TSNT (2 por ciento Tritón X-100, 1 por ciento SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl y 1 mM EDTA, pH 8.0), 500 µL de fenol saturado con Tris-HCl y 100 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Seguidamente, la suspensión se mezcló en vortex por 5 minutos y se agregaron 200 µL de amortiguador TE 1X (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8.0). Las fases se separaron por centrifugación a 14000 rpm por 10 minutos y la fase acuosa se transfirió a otro microtubo de 1.5 ml. Después se añadió 600 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y las fases se separaron por centrifugación a 14000 rpm por 10 minutos. Los ácidos nucleicos de la fase acuosa se precipitaron con dos volúmenes de etanol absoluto y se dejaron incubando toda la noche a -20°C. Pasado ese tiempo, se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet resultante con 50 µl de etanol 70 por ciento. Finalmente, se re precipitó el

ADN con etanol absoluto y el pellet se secó durante 1 hora a temperatura ambiente. Fue resuspendido en 30 μ l amortiguador TE (10mM Tris HCl, pH 8.0; 1mM EDTA, pH 8.0).

3.4.3. ELIMINACIÓN DEL ARN

Se eliminó el ARN agregando 0.3 μ l de enzima ARNsa A 10 mg/ml (Merck) a cada microtubo. Luego, se homogeneizó la mezcla y se llevó a incubar cada muestra a 37°C durante 20 minutos. Pasado este tiempo, cada muestra fue nuevamente homogeneizada a temperatura ambiente.

3.4.4. EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN

a. Concentración

La concentración de ADN (ng/ μ l) se determinó en un volumen de 30 μ l de buffer TE. Fue medida en un cuantificador de ADN EPOCH (BioTek) usando un Micro-volume plate Take3.

Primero se evaluó el método minipreparación comparando la cantidad de ADN obtenido en las dos fases formadas al agregar acetato de sodio 3M, pH 5.2. Luego se realizó la comparación de los tres métodos de extracción, analizando la cantidad de ADN obtenido a partir de grupos de entre 900 y 1000 nematodos.

b. Calidad

Se tomó la relación de absorbancias 260/280 como indicador de calidad de ADN. Esta cifra se obtuvo en un cuantificador de ADN EPOCH (BioTek) usando un Micro-volume plate Take3.

Primero se evaluó el método minipreparación comparando la calidad del ADN obtenido en las dos fases obtenidas resultantes luego de agregar acetato de sodio 3M, pH 5.2. Luego se realizó la comparación de los tres métodos de extracción, comparando todas las muestras de ADN obtenido utilizando los tres métodos, independientemente de la cantidad de juveniles a partir de los que fue extraído.

c. Integridad

Se evaluó la integridad y contaminación del ADN obtenido en los distintos métodos de extracción visualizando 200 ng del ADN resultante en una electroforesis de gel de agarosa

al 1 por ciento p/v. Para preparar el gel primero se pesó 1 gramo de agarosa grado biología molecular y se mezcló en calor con 100 ml de buffer TBE 1X (89 mM Tris; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA, pH 8.0). Luego la mezcla se pasó a una cama electroforética, preparada con un peine apropiado para formar los pocillos, y se dejó gelificar durante 20 minutos a temperatura ambiente, pasado ese tiempo se procedió retirar el peine. Finalmente se vertieron en cada pocillo una muestra ácidos nucleicos teñida con 0.1 µl de agua libre de nucleasas: GelRed (Biotium) (9:1). El marcador de peso utilizado fue el 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific) y el resultado fue visualizado bajo luz UV en un transiluminador UV solo TS Imaging System (Biometra).

Para el método minipreparación se analizaron las dos fases obtenidas luego del paso de acetato de sodio 3M, pH 5.2 No se evaluaron las muestras que tuvieron una concentración de ácidos nucleicos menor a 15 ng/µl por ser una concentración muy baja para poder ser visualizada en un gel de agarosa.

3.5. ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL MARCADOR SCAR PARA DETECCIÓN MOLECULAR

3.5.1. ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN

El marcador SCAR MiF/MiR específico seleccionado para la detección molecular de *M. incognita* fue propuesto por Meng *et al.* (2004), la descripción de los iniciadores se encuentra en la Tabla 2.

Tabla 2. Iniciadores elegidos para la identificación de la especie *Meloidogyne incognita*

Nombre	Secuencia de iniciadores de 5' - 3'	Amplificado	Fuente
Mi-F	GTGAGGATTCAGCTCCCCAG	999pb	Meng <i>et al.</i> (2004)
Mi-R	ACGAGGAACATACTTCTCCGTCC		

Primero se evaluó la concentración de ADN requerida para realizar la amplificación utilizando ácidos nucleicos de *M. incognita* obtenidos usando el método de extracción de ADN de lisis con detergentes a partir de nematodos extraídos del suelo por el método de mini-bandeja. Se probaron concentraciones de 6, 15, 30, 60 y 150 ng/µl por reacción de PCR. Como control positivo se utilizó ADN de *M. incognita* proveniente de “*The James Hutton Institute*”. Cada reacción de amplificación tuvo un volumen final de 25 µl con 2.5 µl de buffer PCR 10X (10 mM Tris-HCl, pH 8.8; 50 mM KCl; 0.8 por ciento v/v nonidet),

3 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTPs, 0.4 μM de cada iniciador y 2 U de Taq Polimerasa (Thermo Fisher Scientific).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Veriti (Applied Biosystems) utilizando el programa de amplificación PCR *touchdown* (PCR-TD) descrito en elTabla 3. La PCR-TD permitió optimizar de manera rápida la amplificación de las muestras de ADN con presencia de inhibidores, que puedan dificultar el proceso. Esta técnica utilizó un gradiente de temperaturas que permitió incrementar la especificidad, sensibilidad y rendimiento de la PCR, empleando inicialmente una temperatura de alineación mayor a la temperatura calculada de fusión (T_m) de los iniciadores usados y disminuyéndola de manera progresiva. El gradiente de temperaturas controla el error en el calculo de la T_m , ya que este cálculo no es preciso al no considerar todos los factores involucrados en la PCR (ambientales, inhibidores presentes en el ADN, etc.) (Korbie y Mattick, 2008).

Tabla 3. Programa de amplificación para Mi-F/Mi-R

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
94°C	3 minutos	
94°C	1 minuto	
58°C (-Δ1°C por ciclo)	1 minuto	10 ciclos
72°C	1 minuto	
94°C	1 minuto	
48°C	1 minuto	30 ciclos
72°C	1 minuto	
72°C	8 minutos	
10°C	∞	

3.5.2. VISUALIZACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DE PCR

Los productos de la amplificación fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5 por ciento p/v. Para preparar el gel primero se pesó 1.5 gramos de agarosa grado biología molecular y se mezcló en calor con 100 ml de buffer TBE 1X (89 mM Tris; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA, pH 8.0). Luego la mezcla se pasó a una cama electroforética, preparada con un peine apropiado para formar los pocillos, y se dejó gelificar durante 20 minutos a temperatura ambiente, pasado ese tiempo se procedió retirar el peine. Finalmente

se vertieron en cada pocillo una muestra ácidos nucleicos teñida con 0.1 µl de agua libre de nucleasas: GelRed (Biotium) (9:1).

El marcador de peso utilizado fue el 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific) y la tinción de los ácidos nucleicos fue realizada con GelRed (Biotium). El resultado fue visualizado bajo luz UV en un transiluminador UV solo TS Imaging System (Biometra).

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.6.1. SELECCIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE NEMATODOS

Los datos obtenidos de cantidad de nematodos juveniles vivos totales en cada 100 cc de tierra, fueron analizados estadísticamente en el *software* R studio con el paquete R commander (Fox, 2005). Primero se realizó un análisis exploratorio elaborando un diagrama de cajas, luego se utilizaron las pruebas de Shapiro-Wilk y Barlett para comprobar la normalidad de su distribución y homocedasticidad, y finalmente se realizó la prueba de ANOVA (ANEXO 4) para comparar la cantidad de juveniles vivos obtenidos a partir de los tres métodos utilizados.

3.6.2. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE BANDEJA DE EXTRACCIÓN DE NEMÁTODOS PARA DETECCIÓN MOLECULAR

a. Concentración

La concentración de ADN obtenido (ng/µl) por cada 1000 (± 100) nematodos en cada tratamiento fue medida en un cuantificador de ADN EPOCH (BioTek) usando un Micro-volume plate Take3. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente en el *software* R studio con el paquete R commander (Fox, 2005). Primero se realizó un análisis exploratorio elaborando un diagrama de cajas, luego se utilizaron las pruebas de Shapiro-Wilk y Barlett para comprobar la normalidad de su distribución y la homocedasticidad, y finalmente se realizó la comparación mediante una prueba de ANOVA (ANEXO 7).

b. Calidad

No se consideró necesaria la evaluación estadística de los resultados ya que el indicador estuvo dentro del rango deseado (1.8-2.0) en los tres tratamientos.

3.6.3. SELECCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN

a. Concentración

Para el análisis del método minipreparación se comparó la concentración de ADN obtenido a partir de grupos de aproximadamente 400 nematodos en las dos fases obtenidas luego de agregar acetato de sodio 3M, pH 5.2. Para realizar la comparación se utilizó el *software* R Studio, con el paquete R commander (Fox, 2005). Primero se realizó un análisis exploratorio elaborando un diagrama de cajas, luego se utilizaron las pruebas de Shapiro-Wilk y de Barlett para comprobar la normalidad y homocedasticidad de los datos, y finalmente se realizó la comparación de medias mediante una prueba T (ANEXO 5).

Para la comparación de los tres métodos de extracción se comparó la cantidad de ADN obtenido a partir de grupos de entre 900 y 1000 nematodos. La comparación se hizo se utilizó el *software* R Studio, con el paquete R commander (Fox, 2005). Primero se realizó un análisis exploratorio elaborando un diagrama de cajas, luego se utilizaron las pruebas de Shapiro-Wilk y de Barlett para comprobar la normalidad y homocedasticidad de los datos, y finalmente se realizó la comparación de medias mediante una prueba ANOVA mediante una prueba de ANOVA (ANEXO 5).

b. Calidad

Para la evaluación de las dos fases obtenidas luego de agregar acetato de sodio 3M, pH 5.2 en el método minipreparación se utilizó el *software* R Studio, con el paquete R commander (Fox 2005). Primero se realizó un análisis exploratorio elaborando un diagrama de cajas, luego se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para verificar la distribución normal de los datos y la prueba de Barlett para comparar las varianzas. Se compararon las varianzas de todas las muestras de ADN obtenido independientemente de la cantidad de juveniles a partir de los que fue extraído.

Para la evaluación estadística de los resultados de los tres métodos se utilizó el *software* R Studio, con el paquete R commander (Fox, 2005). Primero se realizó un análisis exploratorio elaborando un diagrama de cajas, luego se realizaron las pruebas Shapiro-Wilk y Barlett para comprobar la normalidad y homocedasticidad de los datos, y finalmente se realizó la comparación de medias mediante una prueba Welch ANOVA (ANEXO 6) ya que los tratamientos mostraron una distribución normal con varianzas heterogéneas (Liu, 2015). Se compararon todas las muestras de ADN obtenido en los tres métodos, independientemente de la cantidad de juveniles a partir de los que fue extraído.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LA POBLACIÓN

Los patrones perineales que fueron observados en las hembras de la población (Figura 10) presentaron todas las características de la especie *M. incognita*, según la descripción de la especie realizada por Eisenback *et al.* (1981) y Hunt y Handoo (2009). Presentaron arcos dorsales altos y cuadrados, con ausencia de líneas laterales claramente visibles, además de estrías finas - entre lisas y onduladas - que se dirigen hacia la vulva. En el caso de los machos (Figura 11), la morfología de la cabeza de todos los individuos observados bajo el microscopio también presentaron los rasgos característicos de esta misma especie acorde con lo descrito por Eisenback *et al.* (1981), Hunt y Handoo (2009) y Jepson (1983): se pudo observar la forma entre plana y cóncava de la cápsula cefálica, un disco labial que sobresale a los labios medios, y la región cefálica no separada. Los estiletes fueron largos y de punta redondeada, con una columna angosta cerca a los nódulos. Los nódulos presentaron también una forma redondeada y con una distancia de la glándula dorsal esofágica a la base del estilete (DGED) corta, entre 2.18 y 4.08 μm . Por lo tanto, la población utilizada en el estudio corresponde a la especie *M. incognita*.

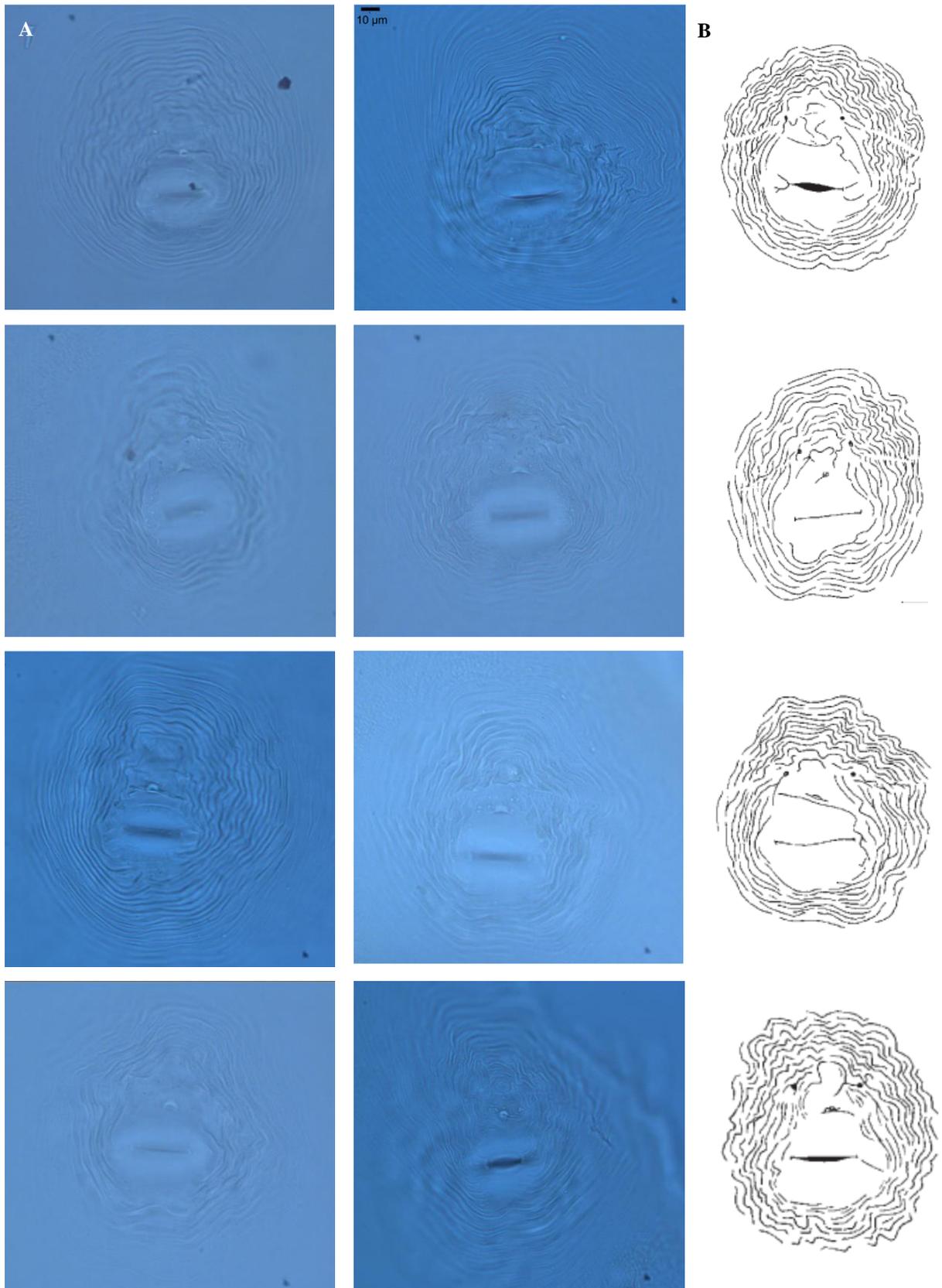


Figura 10. Patrones perineales de hembras observadas en la población utilizada. (A) Imágenes tomadas a través del microscopio compuesto (aumento de 1000X). **(B)** Figuras de la representación de patrones perianales de *M. incognita*, tomadas de: Hunt y Handoo (2009).

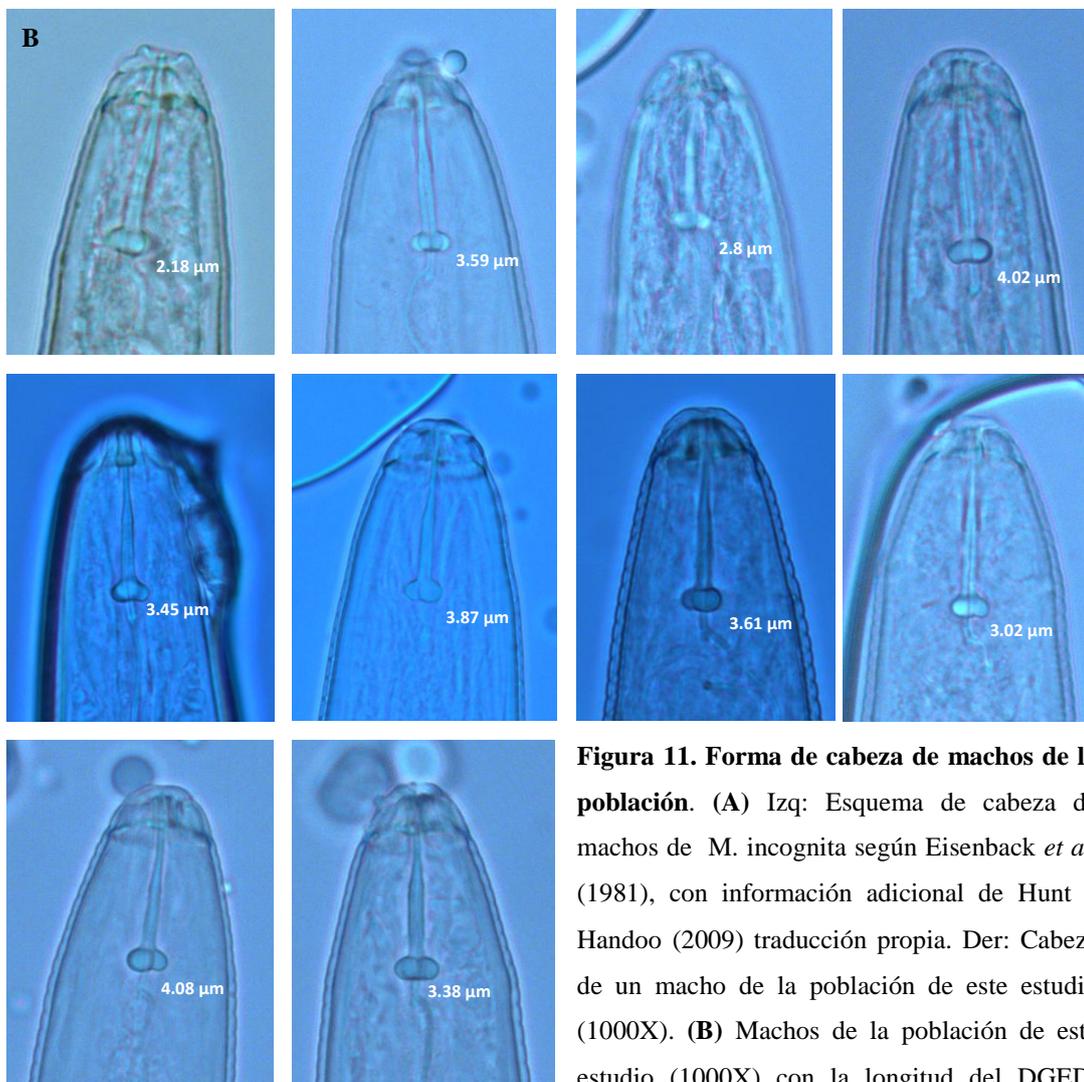
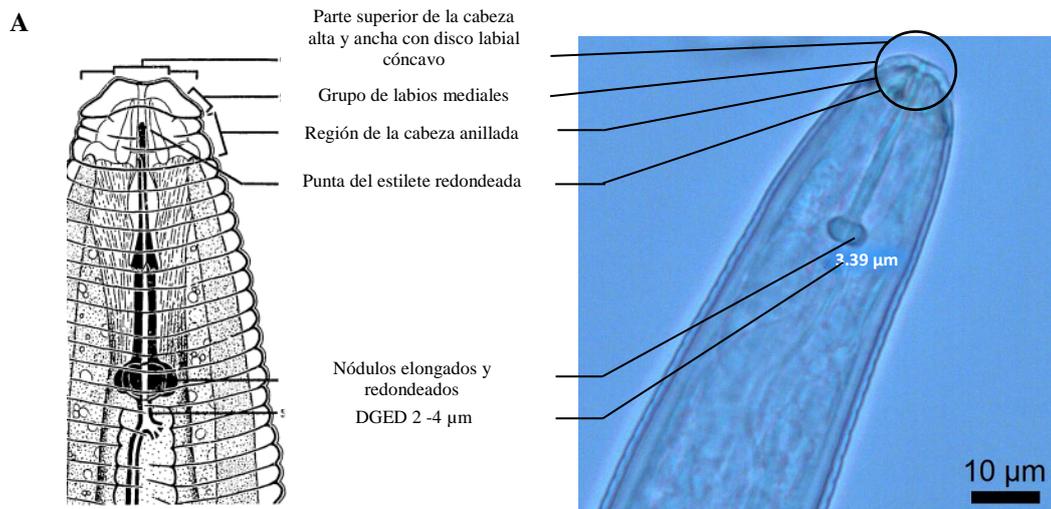


Figura 11. Forma de cabeza de machos de la población. (A) Izq: Esquema de cabeza de machos de *M. incognita* según Eisenback *et al.* (1981), con información adicional de Hunt y Handoo (2009) traducción propia. Der: Cabeza de un macho de la población de este estudio (1000X). (B) Machos de la población de este estudio (1000X) con la longitud del DGED.

4.2. COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE NEMATODOS

M. incognita es un endoparásito sedentario en su fase adulta y móvil en su fase juvenil, se utilizó para el trabajo a los juveniles móviles porque presentan menos contaminantes de cutícula, al ser el estadio donde presenta menor grosor, y por su mayor abundancia en muestras de suelo (Eisenback y Hunt, 2009). Los métodos utilizados fueron los de menor costo y complejidad, destacando por su fácil uso para extraer nematodos móviles dentro de las condiciones de laboratorio: bandeja de extracción (método de Baermann modificado), tamizado y centrifugación flotación (Coyne *et al.*, 2007; Van Bezooijen, 2006). El promedio de juveniles obtenidos con cada método utilizado se detallan en elTabla 4. Del ANOVA (ANEXO 4) realizado podemos concluir que a un nivel de significancia de 0.001, los tres métodos analizados tienen un efecto diferencial en el número de juveniles obtenidos.

Tabla 4. Cantidad de juveniles obtenidos con los tres métodos de extracción de nematodo a partir de muestras de suelo contaminado con nematodos

Método	Cantidad de juveniles* $\bar{X} \pm DS$	Presencia de tierra
Bandeja de Cobb	374 \pm 18.35	Media
Centrifugacion – flotación	56 \pm 4.99	Baja
Bandeja de extracción	281 \pm 7.77	Baja

*En 100 cc de suelo

El método de bandeja de extracción permitió obtener una alta cantidad de juveniles y un bajo nivel de contaminación por tierra (Figura 12), motivos por los que fue considerado como el mejor método de trabajo para este estudio. Además, pudo separar los nematodos móviles del suelo, eliminando de la suspensión a los muertos, y otras especies de nematodos y organismos no móviles que pudieran contaminar la muestra. Contrariamente, tanto la bandeja de Cobb como la centrifugación flotación, separan los nematodos solo por las características físicas, tamaño y densidad respectivamente, no siendo posible la separación de contaminantes de similares características.

El método de bandeja de extracción es un método indirecto de extracción de nematodos con el que se consiguió extraer gran cantidad de juveniles a partir de muestras de suelo comparado con los otros dos métodos probados. Esta característica permite examinar a la vez una mayor cantidad de individuos de la población presente en el suelo, a diferencia del método directo (extracción manual), por lo tanto, la muestra es más representativa.



Figura 12. Presencia de tierra en los 100cc finales obtenidos en los tres métodos de extracción de nematodos. Izq. a Der.: Bandeja de cobb, Centrifugación flotación y Bandeja de extracción.

4.3. SELECCIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN

Para poder seleccionar el método de extracción de ADN más apropiado para la detección molecular de *M. incognita* a partir de nematodos obtenidos del suelo, se evaluaron tres factores: la calidad, la concentración y la integridad del ADN obtenido.

La calidad del ADN fue evaluada mediante la relación de absorbancias 260/280 como indicador de su pureza. Para lograr una amplificación por PCR es deseable tener un ADN de gran pureza, es decir, que tenga mayor concentración de ADN respecto a los contaminantes que puedan inhibir el proceso. Si la relación 260/280 está dentro del rango 1.8-2.0, es probable que la absorción sea causada solo por los ácidos nucleicos, una relación inferior a 1.8 indica que pueden existir proteínas y una relación superior a 2.0 indica que las muestras pueden estar contaminadas con cloroformo o fenol (CIMMYT 2006).

La concentración midió la cantidad de ADN obtenido, resuspendido en 30 μ l de amortiguador TE, en determinada cantidad de juveniles en la muestra. Para poder analizar poblaciones de nematodos es necesario maximizar la cantidad de ADN de buena calidad que se obtenga de cada individuo, ya que al muestrear el suelo se encuentra una cantidad limitada de nematodos pertenecientes a cada especie. Por lo que una mayor concentración obtenida puede potencialmente aumentar la sensibilidad de la detección molecular. Finalmente, la integridad del ADN fue evaluada mediante la observación del amplificado en una electroforesis horizontal de agarosa. Esto, con el fin de evitar el uso de un ADN degradado que dificulte la amplificación del marcador molecular.

4.3.1. ANÁLISIS DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN MINIPREPARACIÓN

Con el método de minipreparación se requirió un análisis adicional previo a la comparación con los otros dos métodos, ya que se observó que tanto el precipitado como el sobrenadante resultantes luego del paso de incubación a -20°C con acetato de sodio 3M pH 5.2 (ANEXO 3) mostraron presencia de ADN al terminar el proceso de extracción. Este resultado fue inconsistente respecto a los presentados por otros autores (Cenis, 1993; Swain *et al.*, 1995; Karajeh *et al.*, 2010; Vera, 2014), por lo que se evaluó la calidad, concentración e integridad del ADN resultante de ambas fases (Tabla 5).

Tabla 5. Evaluación del ADN obtenido por el método minipreparación

MUESTRA	SOBRENADANTE			PRECIPITADO		
	Nro. aprox. Juveniles	260/280	ng/ μL *	Nro. aprox. Juveniles	260/280	ng/ μL *
M1	400	1.759	5.693	400	1.773	14.945
M2	400	2.102	14.451	400	1.583	10.974
M3	400	1.585	1.7785	400	1.551	20.3475
M4	400	3.232	3.085	400	1.343	14.7055
M5	400	1.537	17.5285	400	1.708	25.4205
M6	900	1.8	1.892	800	2.255	24.979
M7	900	4.125	3.443	800	1.893	33.278
M8	900	10	6.281	800	1.99	21.221

*Concentración al resuspender el ADN en 30 μl de amortiguador TE

FUENTE: Elaboración propia.

La concentración de ADN se obtuvo de ≈ 400 nematodos, se observó que el precipitado obtuvo un mayor concentración de ADN (ng/ μl) respecto al sobrenadante a un nivel de significancia 0.1 (ANEXO 5). El precipitado tuvo un promedio de la relación 260/280 cercano al rango deseado 1.8-2.0 ($\bar{X}_{260/280}=1.762$) con una menor varianza ($\alpha=0.05$) que el sobrenadante (ANEXO 5). Al visualizar el ADN en un gel de agarosa en ambas fases se vio un ADN sin degradación, además se observó en las dos una sombra oscura alrededor del pocillo y a lo largo del carril que parece denotar contaminación por alguna proteína asociada al ADN (Novogene, 2015). Esta sombra es de mayor tamaño en el ADN resultante de la fase sobrenadante, con una menor intensidad en el resultante de la fase precipitado (Figura 13).

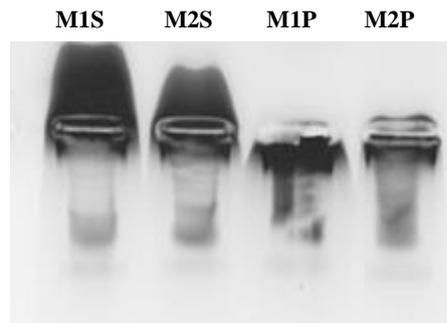


Figura 13. Electroforesis de muestras de ADN obtenido por el método de minipreparación luego del paso de incubación a -20°C con acetato de sodio 3M, pH 5.2. M1S y M2S, sobrenadantes; M1P y M2P, precipitados.

El valor promedio 260/280 en el ADN resultante del precipitado es ligeramente inferior a 1.8 lo que parece indicar una contaminación principalmente por proteínas, afirmación corroborada con la sombra oscura vista en la electroforesis. El valor promedio 260/280 del ADN resultante del sobrenadante no es fiable por la gran variabilidad entre las repeticiones, pero parece estar más contaminado que el resultante de la otra fase por el mayor tamaño de la sombra del pocillo en la electroforesis. Estas proteínas contaminantes pueden ser glicoproteínas, colágeno u otros polipéptidos de la cutícula de los nematodos (Lin y McClure, 1996; Lee, 2002).

Otros autores que han utilizado el método minipreparación (Cenis, 1993; Swain *et al.*, 1995; Karajeh *et al.*, 2010; Vera, 2014) tomaron el ADN del sobrenadante y no analizaron el precipitado, logrando amplificar por PCR. No obstante, los nematodos utilizados por estos autores fueron separados manualmente de la muestra de suelo y luego limpiados antes de iniciar el proceso de extracción de ADN, a diferencia de los nematodos usados de la presente tesis, que fueron obtenidos de manera indirecta por el método de bandeja en una suspensión mezclada con agua y partículas de suelo. Parece ser que los contaminantes provenientes del suelo interfieren en el paso de acetato de sodio 3M, pH 5.2, paso que tiene como fin precipitar las proteínas y otros contaminantes para separarlos del ADN.

Estos resultados indican que el precipitado es la fase donde se encuentra el ADN más apropiado para usar en pruebas de PCR: con mayor rendimiento de ADN, menor contaminación y buena integridad. Por lo que el ADN de esta fase es el que se tomó como ADN resultante de la metodología de extracción de ADN minipreparación y se comparó con las otras usadas en este estudio.

4.3.2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN

En esta tesis se compararon tres métodos de extracción de ADN: minipreparación (Tabla 5, columna precipitado), proteinasa K (Tabla 6) y lisis con detergentes (Tabla 7). Para evaluarlos se observó el rendimiento, la calidad y la integridad del ADN obtenido.

Al evaluar la calidad en los tres métodos se concluyó que los valores del índice 260/280 no difieren entre ellos a un nivel de significancia de 0.05. Los métodos proteinasa K y lisis con detergentes tuvieron valores dentro del rango 1.8-2.0, mientras que los valores del método minipreparación tienen alta variabilidad fluctuando entre 1.3-2.2, lo que denota la falta de reproductibilidad del método (ANEXO 6).

Tabla 6. Evaluación del ADN obtenido por el método de proteinasa K

Muestra	Nro. aprox. juveniles	260/280	ng/ μ L*
P1	1000	1.866	14.008
P2	1000	1.875	8.596
P3	900	1.767	7.956
P4	1000	1.786	5.232
P5	1000	2.059	3.878
P6	1000	1.909	4.381

* Concentración al resuspender el ADN en 30 μ l de amortiguador TE

FUENTE: Elaboración propia.

Tabla 7. Evaluación del ADN obtenido por el método de lisis con detergentes

Muestra	Nro. aprox. juveniles	260/280	ng/ μ L*
L1	1000	1.921	20.101
L2	1000	1.843	17.685
L3	1000	1.863	16.827
L4	1000	1.89	20.393
L5	900	1.836	28.341
L6	900	1.826	35.155

*Concentración al resuspender el ADN en 30 μ l de amortiguador TE

FUENTE: Elaboración propia.

La concentración se midió en los tres métodos a partir de ≈ 1000 individuos. Se observó que con los tres métodos se obtuvieron diferentes concentraciones de ADN a un nivel de significancia de 0.001 (ANEXO 6). Los métodos minipreparación y lisis de detergentes son los que tuvieron una mayor concentración de ADN sin tener una diferencia estadísticamente significativa entre ellos, con un promedio de 26.49 y 23.08 ng/ μ l respectivamente, mientras que el método proteinasa K obtuvo la menor concentración ($\bar{X}=7.341$ ng/ μ l).

La integridad del ADN no pudo ser evaluada en el método de proteinasa K debido a que la baja concentración de nucleótidos obtenidos no permitió su visualización en electroforesis. Para el método minipreparación (Figura 13, M1P y M2P) se observó un ADN integro, con una mancha alrededor del pocillo que denota contaminación por proteínas. Al evaluar el método de lisis con detergentes (Figura 14) se observa que este no presenta ningún contaminante aparente pero se encuentra parcialmente degradado.

La menor concentración de ADN obtenido por el método proteinasa K puede ser explicado por el uso de una menor concentración de proteinasa K en cada muestra comparada con la concentración de enzima utilizada por otros autores (Castagnone-Sereno *et al.*, 1999; Randig *et al.*, 2001; Qiu *et al.*, 2006; Adam *et al.*, 2007; Lambshead *et al.*, 2009; Karajeh *et al.*, 2010; McClure *et al.*, 2012). Este método de extracción fue adaptado a partir un protocolo de extracción de nucleótidos de esporas de hongos filamentosos porque se ha visto que algunos protocolos utilizados para hongos funcionan también en nematodos por la similitud estructural entre las células de ambos organismos (Cenis, 1993). Sin embargo, la abundante cantidad de proteínas y su inapropiada separación del ADN parece haber afectado el rendimiento. La cantidad de proteinasa K se aumentó progresivamente a lo largo de distintas pruebas durante esta investigación hasta llegar a la cantidad final de 20 μ g de enzima por muestra, no se incrementó más su concentración porque se consideró que el costo de procesamiento de cada muestra resultaría muy alto y no sería económicamente viable en una aplicación en campo. Se trató de compensar la baja cantidad de enzima con la adición de pasos al protocolo que mejoren la lisis celular y desnaturalización de proteínas, se añadió y un mayor el tiempo de incubación con proteinasa K. Sin embargo, estas variaciones solo incrementaron ligeramente la concentración del ADN y volvieron más complejo al protocolo (ANEXO 3). A pesar que se obtuvo una baja cantidad de nucleótidos este parece ser gran pureza, con un índice de calidad 1.8-2.0, por lo que puede

usarse en PCR. Lamentablemente, la limitada cantidad de ADN no permitió la evaluación de su integridad.

El método minipreparación presentó una alta variabilidad respecto a la calidad del ADN obtenido. Esto puede ser debido a que el método no es efectivo para eliminar los contaminantes de suelo, por lo que es altamente sensible a las ligeras variaciones de presencia de suelo entre muestras. El suelo presente en la muestra parece interferir en la separación del ADN de los contaminantes celulares, pues al evaluar los nucleótidos en electroforesis se ve contaminación de proteínas (Figura 13, M1P y M2P), corroborada por un valor 260/280 ligeramente inferior a 1.8 (CIMMYT, 2006). Si bien este método obtuvo altas concentraciones de ADN, la falta de repetibilidad no permite que sea una técnica fiable para ser usada en PCR ya que los resultados no serían repetibles.

El método de lisis con detergentes propuesto por (Jaramillo-Pineda *et al.*, 2015), como su nombre lo indica, utiliza varios detergentes para lograr la lisis celular y favorecer la denaturalización de las abundantes proteínas presentes en los juveniles. Además, se utiliza fenol: cloroformo (5:1) para conseguir mayor lisis de estas proteínas y disociarlas del ADN (ANEXO 3). Ambos reactivos combinados llevaron a una mayor contracción del ADN obtenido y valores 260/280 dentro del rango 1.8-2.0. Por otro lado, al evaluar el ADN en electroforesis (Figura 14, presencia de suelo) se observó que hubo una degradación parcial. La inestabilidad del ADN obtenido puede haberse debido a las nucleasas del suelo presentes en la suspensión de juveniles, provenientes de la actividad extracelular, de los mismos nematodos o de microorganismos presentes en el sustrato (Nielsen *et al.*, 2006). Esta degradación puede dificultar su uso con marcadores moleculares, sin embargo, se observó que hay gran cantidad de nucleótidos de alto peso molecular que pueden ser probados en amplificación por PCR.

Tras evaluar las tres metodologías de extracción de ADN, se pueden proponer dos fuentes de contaminación en las suspensiones de nematodos obtenidos indirectamente de suelo que dificultan el proceso de extracción de ADN y que pueden potencialmente inhibir la amplificación por PCR: la cutícula del nematodo, conformada por una abundante cantidad de proteínas y carbohidratos (Lin y McClure, 1996; Lee, 2002), y el suelo remanente. Las macromoléculas que conforman la cutícula fueron consideradas la principal barrera física para poder acceder al ADN, y podrían dificultar la extracción de los ácidos nucleicos si se asocian a ellos luego de la lisis celular. Por otro lado, los contaminantes del suelo parecen

dificultar la separación de las proteínas y carbohidratos del ADN, además de poder llevar nucleasas u otros contaminantes como los como los ácidos húmicos o fúlvicos (Barrio-Caballero, 2013).

Para ser considerada una metodología de extracción de ADN apta para la detección molecular, esta debería de eliminar las dos fuentes de contaminación planteadas. El método minipreparación fue descartado para su uso en marcadores moleculares por la alta variabilidad del ADN resultante, que no es apropiada para obtener resultados fiables. Los métodos de proteinasa K y lisis con detergentes fueron los que obtuvieron ADN de mayor pureza y repetibilidad en sus resultados. Sin embargo se descartó el uso del primer método por su alta complejidad y baja concentración de ADN obtenida. El método lisis de detergentes se eligió por presentar menor laboriosidad y menor tiempo estimado de ejecución (Tabla 8).

Tabla 8. Comparación resumida de la evaluación de los métodos de extracción de ADN usados

Método	Concentración de ADN obtenido	Tiempo estimado (horas)	Presencia esperada de inhibidores*
Minipreparación	Alto	9	Alta
Proteinasa K	Bajo	18	Baja
Lisis con detergentes	Alto	15	Baja

*De acuerdo a los niveles de contaminación observados en la electroforesis y al evaluar el índice 260/280.

FUENTE: Elaboración propia.

4.4. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE NEMATODOS PARA DETECCIÓN MOLECULAR

Para lograr la optimización del rendimiento de ADN se buscó variar la presencia de suelo en la suspensión de nematodos proveniente del método de bandeja de extracción, a partir de la cual se realizó la extracción de ADN de *M. incognita*. El suelo fue considerado en el título anterior como una de las principales fuentes de contaminación en la extracción de ADN, por lo que se planteó la hipótesis que la disminución de su concentración en la suspensión mejoraría la concentración del ADN obtenido. Para comprobarlo se realizaron tres tratamientos en base al método de bandeja, también llamado método modificado de Baermann, que variaron la concentración de suelo obtenida en la suspensión de nematodos: bandeja de extracción (Tabla 7), que obtuvo nematodos con presencia de suelo; lavado con

centrifugación flotación (Tabla 9), que obtuvo nematodos con presencia moderada de suelo y mini-bandeja de extracción (Tabla 10), que obtuvo nematodos con ausencia de suelo. Los tres tratamientos fueron comparados evaluando tres características del ADN extraído con el método de lisis con detergentes: calidad, rendimiento e integridad. Además de probarse la detección molecular de *M. incognita* mediante la amplificación por PCR del marcador MiF/MiR.

4.4.1. CARACTERÍSTICAS DEL ADN OBTENIDO

La concentración de ADN aumentó en el tratamiento de ausencia de suelo respecto a los otros dos tratamientos que tienen presencia de suelo (ANEXO 7). A partir de la suspensión de nematodos sin suelo se obtuvo una cantidad de ADN diferente que de los otros dos tratamientos a un nivel de significancia de 0.001, con un promedio de 95.5 ng/μl por cada ≈1000 juveniles frente a los 25.081 ng/μl obtenidos de la suspensión con presencia moderada de suelo y los 23.083 ng/μl obtenidos de la suspensión con presencia de suelo. No se vio una diferencia significativa entre la cantidad de ADN obtenido a partir de la suspensión con presencia de suelo y con presencia de suelo moderado (ANEXO 7). Respecto a la calidad de ADN, los tres tratamientos estuvieron dentro del rango deseado de 1.8-2.0 de la relación de absorbancias 260/280.

Tabla 9. Evaluación de ADN obtenido del tratamiento con presencia moderada de suelo (lavado con centrifugación flotación)

MUESTRA	Nro. aprox. juveniles	260/280	ng/μL*
C1	1000	1.925	17.144
C2	1100	1.922	19.291
C3	1100	1.957	38.809

*Concentración al resuspender el ADN en 30 μl de amortiguador TE

FUENTE: Elaboración propia.

Tabla 10. Evaluación de ADN obtenido del tratamiento con ausencia de suelo (minibandeja)

MUESTRA	Nro. aprox. Juveniles	260/280	ng/ μ L*
D1	1000	1.791	103.6
D2	2500	1.829	206.9
D3	1000	1.826	101.3
D4	600	1.779	40.2
D5	900	1.842	81.5
D6	400	1.885	25.5

*Concentración al resuspender el ADN en 30 μ l de amortiguador TE

FUENTE: Elaboración propia.

Al evaluar la integridad del ADN mediante electroforesis (Figura 14) se observa que la presencia de suelo en la suspensión de nematodos influye en la estabilidad del ADN obtenido, habiendo una relación directamente proporcional entre la degradación de los ácidos nucleicos con la cantidad de suelo en las muestras.

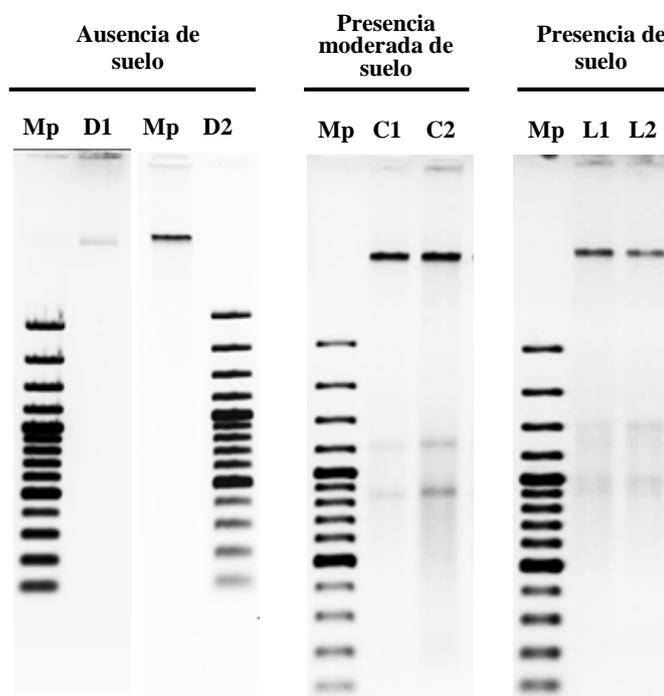


Figura 14. Electroforesis del ADN obtenido por el método lisis de detergentes a partir de los tres tratamientos de optimización. Mp, marcador de peso; D1 y D2, mini-bandeja de extracción; L1 y L2, bandeja de extracción; C1 y C2, lavado con centrifugación.

El aumento en la concentración y estabilidad del ADN a menor cantidad de suelo en la suspensión de nematodos puede haberse debido a la influencia de los contaminantes que no se eliminaron en el paso final de lavado en tamiz del método de extracción de bandeja (ANEXO 2). La variación de la concentración puede explicarse por compuestos tanto orgánicos como inorgánicos del suelo que se asocian al ADN y que disminuyen el rendimiento al ser eliminada la asociación nucleótidos: contaminante durante el lavado con cloroformo: alcohol isoamílico y la limpieza del ADN (ANEXO 3). Las diferencias en la estabilidad del ADN puede tener como explicación la actividad de las nucleasas provenientes del suelo presentes en la suspensión de nematodos utilizada, que no es totalmente inhibida por el fenol dentro del proceso de extracción de lisis con detergentes (ANEXO 3). Esta alta concentración de nucleasas pueden provenir de la actividad extracelular, de los mismos nematodos o de microorganismos presentes en el sustrato (Nielsen *et al.*, 2006), y se ven disminuídas conforme la concentración del mismo disminuye en la muestra.

Considerando estos factores, el ADN de los juveniles obtenidos por el tratamiento mini-bandeja (sin presencia de suelo) parece ser el más apropiado para ser utilizado en marcadores moleculares. Se obtiene nucleótidos de buena estabilidad, pureza y con un buen rendimiento.

4.4.2. PRUEBA DE AMPLIFICACIÓN POR PCR PARA DETECCIÓN MOLECULAR

Al probar el protocolo de amplificación estandarizado del marcador MiF/MiR (Página 60) con el ADN resultante de los tres tratamientos de optimización de extracción de nematodos solo amplificó el proveniente del tratamiento de ausencia de suelo (método de mini-bandeja, Figura 9). El ADN obtenido de este tratamiento fue el que presentó una mejor integridad respecto a los otros dos métodos de optimización aplicados, y al tener menor concentración de suelo también debió haber tenido también una menor concentración de inhibidores de la PCR provenientes del sustrato.

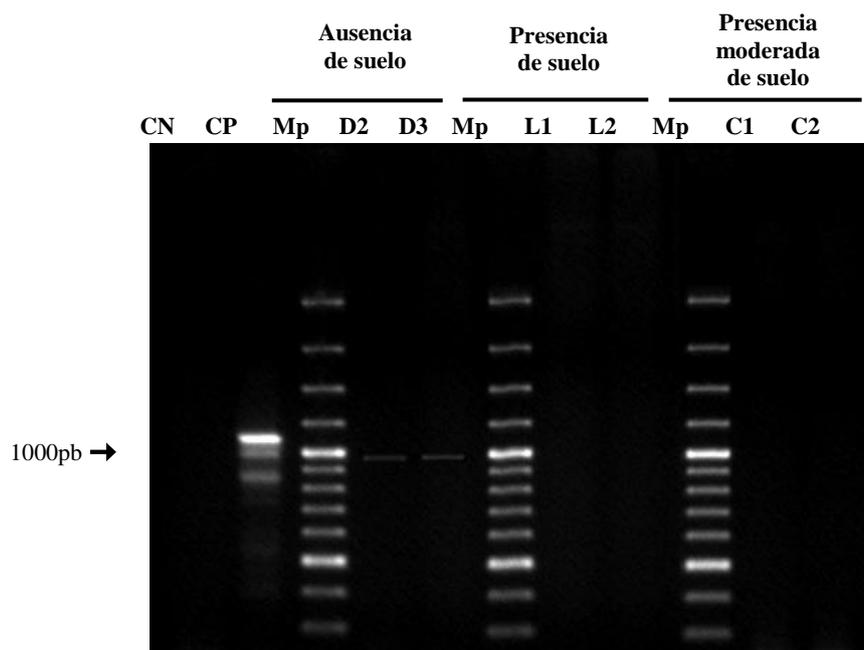


Figura 15. Amplificación por PCR de los tres tratamientos de optimización. Mp, marcador de peso, CN, control negativo; CP, control positivo externo; D2 y D3, minibandeja de extracción; L1 y L2, bandeja de extracción; C1 y C2, lavado con centrifugación.

Por lo que se puede concluir que hay dos factores provenientes del suelo que inhiben la PCR a partir del ADN obtenido por el método de extracción de lisis por detergentes: la degradación de los nucleótidos debida a las nucleasas y la presencia de inhibidores de la amplificación.

4.5. ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL MARCADOR SCAR PARA DETECCIÓN MOLECULAR

Para la estandarización de las condiciones de la PCR para lograr la amplificación del marcador MiF/MiR, se optimizó la concentración de ADN necesaria en la mezcla de reacción. Se utilizaron los ácidos nucleicos extraídos a partir de la suspensión de nematodos sin partículas de suelo (minibandeja), debido que este ADN presentó una mayor concentración, y una menor contaminación y degradación respecto a los otros tratamientos.

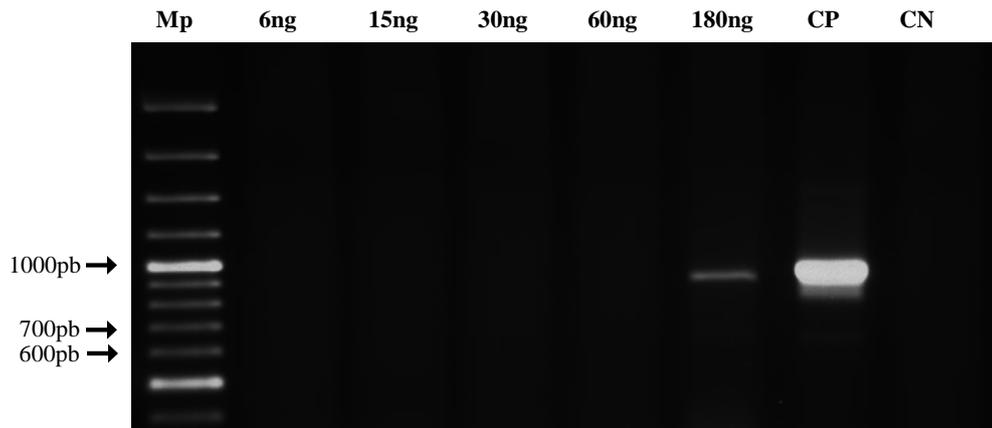


Figura 16. Amplificación del ADN obtenido por el método minibandeja a distintas concentraciones de ADN por reacción. Mp, Marcador de peso; CP, Control positivo; CN, control negativo.

La concentración óptima obtenida fue de 180 ng de ADN por 25 μ l de volumen de mezcla de reacción, cantidad que concordó con la utilizada para amplificación de ADN de nematodos por Jaramillo-Pineda *et al.* (2015), a partir de ácidos nucleicos obtenidos con una metodología similar de extracción. El control positivo, proveniente de “*The James Hutton Institute*”, requirió una menor concentración de ADN por reacción, ya que solo con 20 ng por 25 μ l de mezcla de reacción se pudo obtener mayor cantidad de amplificado junto a bandas inespecíficas (Figura 16, carril CP). Por lo tanto, se puede inferir que el ADN obtenido por el método de lisis de detergentes tiene mayor concentración de inhibidores de la PCR que el control positivo, a pesar de haber eliminado en su totalidad la presencia visible de partículas suelo. Es posible que los inhibidores presentes en el ADN sean de naturaleza orgánica como los ácidos húmicos, fúlvicos, residuos derivados de la porfirina o sus productos de degradación; o inorgánicos como los minerales presentes en el suelo (Barrio-Caballero, 2013).

V. CONCLUSIONES

- La técnica de bandeja de extracción, también llamada de Baermann modificada, aplicada a raíces sin suelo es un método óptimo para la extracción indirecta de nematodos de muestras de suelo para la detección molecular. Y permite obtener una suspensión de nematodos con baja contaminación y gran cantidad de juveniles vivos de *M. incognita*.
- El método de extracción de ADN de lisis con detergentes es apropiado para obtener ADN de *M. incognita* apto para su detección molecular porque obtuvo ADN de elevada calidad y concentración, además de ser un método poco laborioso.
- Para poder amplificar el marcador molecular se requieren 180 ng de ADN por reacción de PCR, obtenido al utilizar el método de separación de nematodos de bandeja de extracción en conjunto con la extracción de ADN de lisis con detergentes.
- Para la detección molecular de *M. incognita* es necesario eliminar la mayor cantidad de contaminación proveniente del suelo. Porque los contaminantes disminuyen la concentración del ADN obtenido e incrementando la presencia de inhibidores de la PCR.

VI. RECOMENDACIONES

- El método de proteinasa K puede ser mejorado incrementando la concentración de la enzima para obtener un mayor rendimiento de ADN.
- La metodología propuesta para extracción de ADN para detección molecular de *M. incognita* debe de ser evaluada en campo, estudiando su sensibilidad y repetibilidad frente a distintos tipos de muestra.
- Debe evaluarse el uso de las metodologías propuestas para lograr la identificación de otras especies del género *Meloidogyne*.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abad, P.; Gouzy, J.; Aury, J.M.; Castagnone-Sereno, P.; Danchin, E.G.J.; Deleury, E.; Perfus-Barbeoch, L.; Anthouard, V.; Artiguenave, F.; Blok, V.C.; Caillaud, M.C.; Coutinho, P.M.; Dasilva, C.; De Luca, F.; Deau, F.; Esquibet, M.; Flutre, T.; Goldstone, J.V.; Hamamouch, N.; Hewezi, T.; Jaillon, O.; Jubin, C.; Leonetti, P.; Magliano, M.; Maier, T.R.; Markov, G.V.; McVeigh, P.; Pesole, G.; Poulain, J.; Robinson-Rechavi, M.; Sallet, E.; Ségurens, B.; Steinbach, D.; Tytgat, T.; Ugarte, E.; van Ghelder, C.; Veronico, P.; Baum, T.J.; Blaxter, M.; Bleve-Zacheo, T.; Davis, E.L.; Ewbank, J.J.; Favery, B.; Grenier, E.; Henrissat, B.; Jones, J.T.; Laudet, V.; Maule, A.G.; Quesneville, H.; Rosso, M.N.; Schiex, T.; Smant, G.; Weissenbach, J. y Wincker, P. 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology* 26(8): 909-915.
2. Adam, M.A.M.; Phillips, M.S. y Blok, V.C. 2007. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). *Plant Pathology* 56(1): 190-197.
3. Adams, B.A.; Dillman, A.R. y Finlinson, C. 2009. Molecular Taxonomy and phylogeny. In *Root-knot nematodes*. Perry, RN; Moens, M. y Starr, JL. eds. Países Bajos, Wallingford, CABI. p. 119-138.
4. Agarwal, M.; Shrivastava, N. y Padh, H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports* 27(4): 617-631.
5. Agrios, G.N. 2010. *Fitopatología*. Segunda edición. México, Limusa. 838 p.
6. Amaya de Guerra, J. El “Nematodo del Nudo de la Raíz” en la Costa Norte del Perú. In *Proceedings of the Third Research y Plannig Conference on RootKnot Nematodes, Meloidogyne spp.* North Carolina State University. 40 - 45 p.

7. Barrio-Caballero, P.A. 2013. Revisión de métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos en el laboratorio forense. *Revista Española de Medicina Legal* 39(2): 54-62.
8. Blok, V.C. y Powers, T.O. 2009. Biochemical and molecular identification. In *Root-knot nematodes*. Perry, RN; Moens, M y Starr, JL. eds.. Países Bajos, Wallingford, CABI. p. 98–118.
9. Brusca, R.C. y Brusca, G.J. 2005. *Invertebrados*. Segunda Edición. España, McGraw-Hill Interamericana. 1005 p.
10. Castagnone-Sereno, P.; Leroy, F.; Bongiovanni, M.; Zijlstra, C. y Abad, P. 1999. Specific diagnosis of two root-knot nematodes, *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*, with satellite DNA probes. *Phytopathology* 89(5): 380–384.
11. Cenis, J.L. 1993. Identification of Four *Meloidogyne* spp. by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR). *Phytopathology* 83: 76-78.
12. CIMMYT. 2006. *Protocolos de laboratorio: Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT*. Tercera edición. México, CIMMYT. 92 p.
13. Coyne, D.L.; Nicol, J.L. y Claudius-Cole, B. 2007. *Nematología práctica: Una guía de campo y laboratorio*. Cotonou, Benin, SP-IPM Secretariat, IITA. 82 p.
14. Coyne, D.L. y Ross, J.L. 2014. Protocol for Nematode Resistance Screening Root-Knot Nematodes, *Meloidogyne* spp. Ibadan, Nigeria, International Institute of Tropical Agriculture (IITA). 27 p.
15. Cristancho, M.A.; Escobar, C.; Ocampo, J.D. 2007. Evolución de razas de *Hemileia vastatrix* en Colombia. *Cenicafé* 58(4): 340-359.
16. Daramola, F.Y.; Popoola, J.O.; Eni, A.O. y Sulaiman, O. 2015. Characterization of Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.) Associated with *Abelmoschus esculentus*, *Celosia argentea* and *Corchorus olitorius*. *Asian Journal of Biological Sciences* 8(1): 42-50.
17. Decraemer, W. y Hunt, D.J. 2006. Structure and Classification. In *Plant nematology*. Perry, R.N.; Moens, M. eds. Países Bajos, Wallingford, CABI.

18. Devran, Z. y Söğüt, M.A. 2009. Distribution and identification of root-knot nematodes from Turkey. *Journal of nematology* 41(2): 128-133.
19. Dong, K.; Dean, R.A.; Fortnum, B.A. y Lewis, S.A. 2001. Development of PCR primers to identify species of root-knot nematodes: *Meloidogyne arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* and *M. javanica*. *Nematropica* 31(2): 271–280.
20. Eisenback, J.D.; Hirschmann, H.; Sasser, J.N. y Triantaphyllou, A.C. 1981. A Guide to the Four Most Common Species of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* Spp.). With a Pictorial Key. Estados Unidos, Raleigh, North Carolina State University Graphic. 52 p.
21. Eisenback, J.D. y Hunt, D.J. 2009. General Morphology. In Root-knot nematodes. Perry, RN; Moens, M; Starr, JL. eds. Países Bajos, Wallingford, CABI. p. 18-54.
22. Floyd, R.; Abebe, E.; Papert, A. y Blaxter, M. 2002. Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular ecology* 11(4): 839-850.
23. Fox, J. 2005. Getting started with the R commander: a basic-statistics graphical user interface to R. *J Stat Softw* 14(9):1-42.
24. García, L.E. y Sánchez-Puerta, M.V. 2012. Characterization of a Root-Knot Nematode Population of *Meloidogyne arenaria* from Tupungato (Mendoza, Argentina). *Journal of Nematology* 44(3): 291-301.
25. Herrera, E. 1982. Informe Perú: 3ra Conferencia del Proyecto Internacional *Meloidogyne*. In Proceedings of the third research and planning conference on Rootknot nematodes *Meloidogyne* spp. Sasser, J. N. eds. North Carolina State University Graphics. p. 36 - 37.
26. Holterman, M.H.M.; Oggenfuss, M.; Frey, J.E. y Kiewnick, S. 2012. Evaluation of High-resolution Melting Curve Analysis as a New Tool for Root-knot Nematode Diagnostics. *Journal of Phytopathology* 160(2): 59-66.
27. Hu, M.X.; Zhuo, K. y Liao, J.L. 2011. Multiplex PCR for the simultaneous identification and detection of *Meloidogyne incognita*, *M. enterolobii*, and *M. javanica* using DNA extracted directly from individual galls. *Phytopathology* 101(11): 1270–1277.

28. Hunt, D.J y Handoo, Z.A. 2009. Taxonomy, identification and principal species. In Root-knot nematodes. Perry, RN; Moens, M; Starr, JL. eds. Países Bajos, Wallingford, CABI. p. 55–88.
29. Jaramillo-Pineda, J.; Guerrero-Olazarán, M.; Fuentes-Garibay, J.A.; Viader-Salvadó, J.M.; Meza-García, J.L. y Morales-Ramos, L.H. 2015. Identificación de especies de *Meloidogyne* utilizando la secuenciación de regiones espaciadoras transcritas internas de ADN ribosomal de estadios juveniles. Revista Mexicana de Fitopatología 33(1): 1–11.
30. Jepson, S.B. 1983. Identification of *Meloidogyne*: a general assessment and a comparison of male morphology using light microscopy, with a key to 24 species. Revue Nématol 6(2): 291–309.
31. Jones, M.G.K. y Goto, D.B. 2011. Root-knot Nematodes and Giant Cells. In Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions. Jones, J.; Gheysen, G.; Fenoll, C. eds. Países bajos, Dordrecht, Springer. p. 83-100.
32. Karajeh, M.R.; Abu-Gharbieh, W.I. y Masoud, S.A. 2010. DNA Extraction and PCR-Based Diagnosis of the Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* Species and Races) of Jordan. Jordan Journal of Agricultural Sciences 6(3): 342-352.
33. Karssen, G. y Moens, M. 2006. Root-knot Nematodes. In Plant Nematology. Perry, R.N.; Moens, M. eds. Países Bajos, Wallingford, CABI. p. 59-90.
34. Korbie, D.J. y Mattick, J.S. 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. Nature Protocols 3(9):1452-1456.
35. Lamshead, J.; Bik, H.; Hughes, J.A. y Hawkins, L. 2009. Rapid decline of PCR amplification from genomic extracts of DESS-preserved, slide-mounted nematodes. Nematology 11(6): 827-834.
36. Lee, D.L. 2002. Cuticle, Moulting and Exsheathment. In The Biology of nematodes. Lee, D.L. ed. U. K., CRC Press. p. 338-413.
37. Lin, H-J. y McClure, M.A. 1996. Surface coat of *Meloidogyne incognita*. Journal of Nematology 28(2): 216.

38. Liu, H. 2015. Comparing Welch ANOVA, a Kruskal-Wallis test, and traditional ANOVA in case of heterogeneity of variance. Tesis Mag. Sc. Richmond, Virginia, Virginia Commonwealth University. 48 p.
39. McClure, M.A.; Nischwitz, C.; Skantar, A.M.; Schmitt, M.E. y Subbotin, S.A. 2012. Root-knot nematodes in golf course greens of the western United States. *Plant disease* 96(5): 635–647.
40. Meng, Q-P.; Long, H. y Xu, J.H. 2004. PCR Assays for Rapid and Sensitive Identification of Three Major Root-Knot Nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. *Acta Phytopathologica Sinica* 34: 204-210.
41. Perry, R.N.; Moens, M. y Starr, J.L. 2009. *Meloidogyne* Species - a Diverse group of Novel and Important Plant Parasites. In *Root-knot nematodes*. Perry, RN; Moens, M; Starr, JL. eds. Países Bajos, Wallingford, CABI. p 1-17.
42. Murga-Gutierrez, S.N; Colagiero, M.; Rosso, L.C.; Finneti Sialer, M.M. y Ciancio, A. 2012. Root-knot nematodes from asparagus and associated biological antagonists in Peru. *Nematropica* 42(1): 57-62.
43. Nielsen, K.M.; Calamai, L. y Pietramellara, G. 2006. Stabilization of Extracellular DNA and Proteins by Transient Binding to Various Soil Components. In *Nucleic Acids and Proteins in Soil*. Nannipieri, P. y Smalla, K. eds. Alemania, Springer. p 141-153.
44. Niu, J.; Guo, Q.; Jian, H.; Chen, C.; Yang, D.; Liu, Q. y Guo, Y. 2011. Rapid detection of *Meloidogyne* spp. by LAMP assay in soil and roots. *Crop Protection* 30(8): 1063-1069.
45. Niu, J.H.; Jian, H.; Guo, Q.X.; Chen, C.L.; Wang, X.Y.; Liu, Q. y Guo, Y.D. 2012. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays based on 5S rDNA-IGS2 regions for detecting *Meloidogyne enterolobii*: LAMP assays for detecting *Meloidogyne enterolobii*. *Plant Pathology* 61(4): 809-819.
46. Novogene. 2015. Sample Preparation & Shipping (en línea). Estados Unidos, Novogene. Consultado 4 oct. 2016. Disponible en <https://en.novogene.com/support/sample-preparation/>.

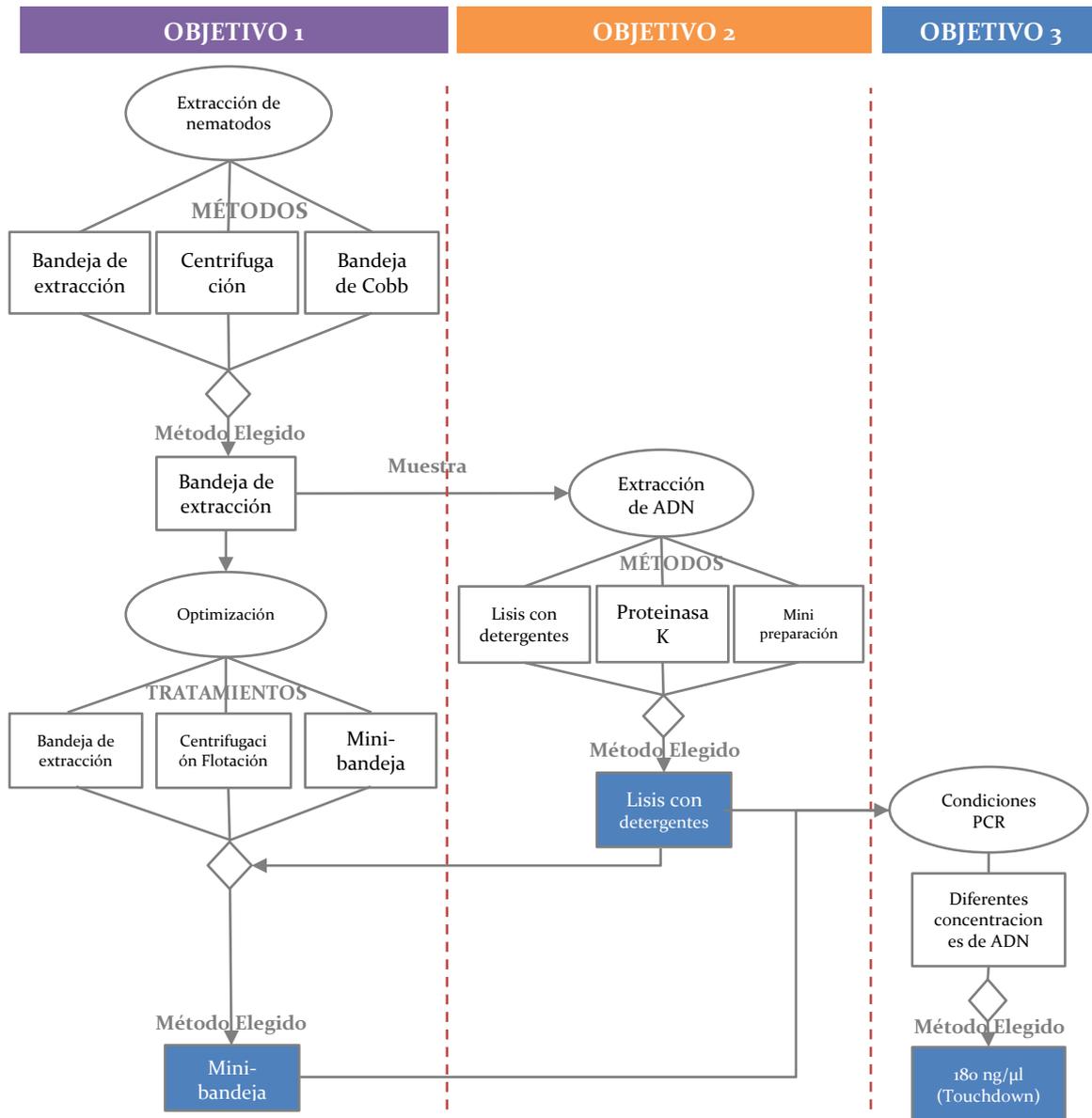
47. Oliveira, C.M.G.; Monteiro, A.R. y Blok, VC. 2011. Morphological and molecular diagnostics for plant-parasitic nematodes: working together to get the identification done. *Tropical Plant Pathology* 36(2): 65–73.
48. Onkendi, E.M.; Kariuki, G.M.; Marais, M. y Moleleki, L.N. 2014. The threat of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Africa: a review. *Plant Pathology* 63(4): 727-737.
49. Powers, T. 2004. Nematode molecular diagnostics: From Bands to Barcodes. *Annual Review of Phytopathology* 42(1): 367-383.
50. Powers, T.O. y Harris, T.S. 1993. A Polymerase Chain Reaction Method for Identification of Five Major *Meloidogyne* Species. *Journal of Nematology* 25(1): 1-6.
51. Qiu, J.J.; Westerdahl, B.B.; Anderson, C. y Williamson, V.M. 2006. Sensitive PCR Detection of *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*, and *M. javanica* Extracted from Soil. *Journal of nematology* 38(4): 434–441.
52. Randig, O.; Leroy, F. y Castagnone-Sereno, P. 2001. RAPD Characterization of Single Females of the Root-knot Nematodes, *Meloidogyne* Spp. *European Journal of Plant Pathology* 107(6): 639-643.
53. Sasser, J. y Freckman, D. 1987. A world perspective on nematology: the role of the society. In *Vistas on Nematology*. Veech, J. and Dickson, D. eds. Society of Nematologists. Estados Unidos, Maryland. 509 pp.
54. Sarah, J.L. y Boisseau, M. 2008. Nematode extraction from banana roots by the centrifugal-flotation technique. *Fruits* 63(4): 249-251.
55. Swain, S.C.; Sahoo, P.; Mohapatra, T.; Ganguly, A.K.; Kaushal, K.K. 1995. A simple and easy method for rapid extraction of nematodes DNA for RAPD analysis. *Indian Journal of Nematology* 25(2): 225-227.
56. Tesařová, B.; Zouhar, M. y Ryšánek, P. 2003. Development of PCR for specific determination of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Plant Protection Science* 39(1): 23-28.

57. Van Bezooijen, J. 2006. Methods and techniques for nematology. Países bajos, Wageningen, University Wageningen. 112 p.
58. Vera, N.Y. 2014. Técnica molecular de PCR para identificar las principales especies de *Meloidogyne* spp. en poblaciones provenientes de Perú. Tesis Mag. Sc. Lima, Perú. 109 p.
59. Williamson, V.M.; Caswell-Chen, E.P.; Wu, F.F. y Caryl, G. 1997. A PCR Assay to Identify and Distinguish Single Juveniles of *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. *Journal of Nematology* 29(1): 9-15.
60. Zijlstra, C. 1997. A fast PCR assay to identify *Meloidogyne hapla*, *M. chitwoodi* and *M. fallax* and to sensitively differentiate them from each other and from *M. incognita* mixtures. *Fundamental and Applied Nematology* 20(5): 505-511.
61. Zijlstra, C.; Donkers-Venne, D.T. y Fargette, M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterised amplified region (SCAR) based PCR assays. *Nematology* 2(8): 847–853.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1

FLUJOGRAMA DE LA METODOLOGÍA EXPERIMENTAL



LEYENDA

◇ Evaluación

OBJETIVO 1: Selección y optimización de una metodología para la obtención de nematodos *M. incognita* provenientes de muestras de suelo

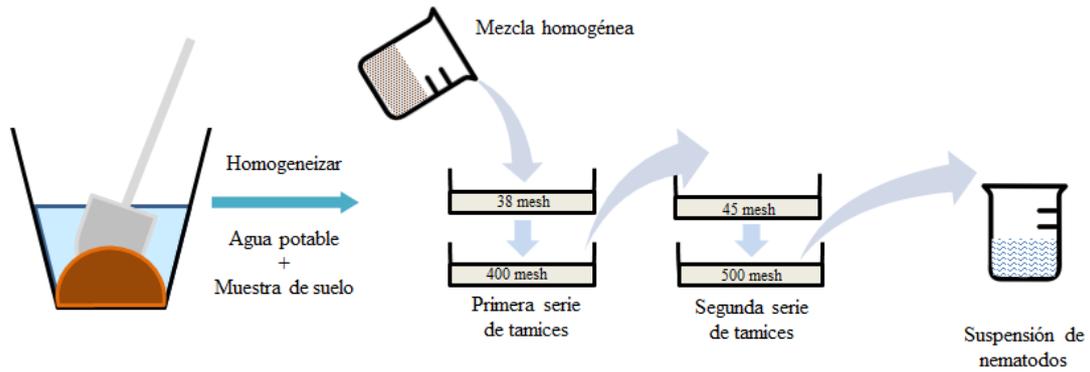
OBJETIVO 2: Selección y optimización un protocolo de extracción de ADN a partir de *M. incognita* obtenidos a partir de muestras de suelo

OBJETIVO 3: Estandarización de las condiciones de PCR para detección molecular

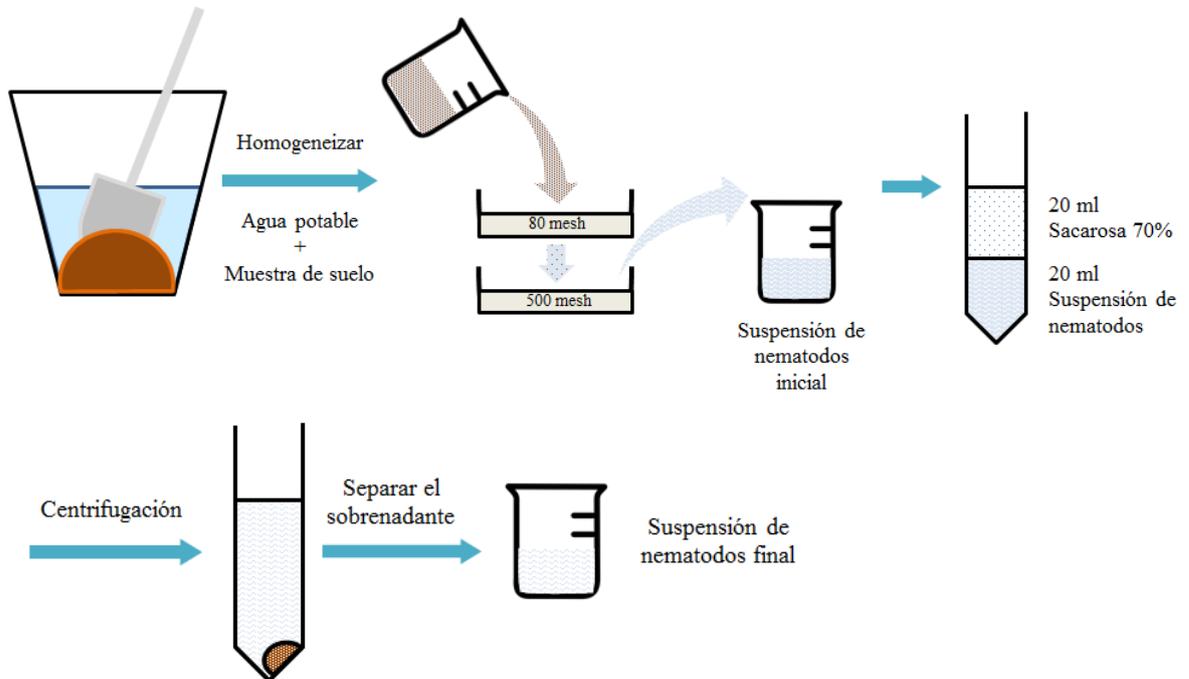
ANEXO 2

MÉTODOS DE EXTRACCIÓN NEMATODOS DE SUELO

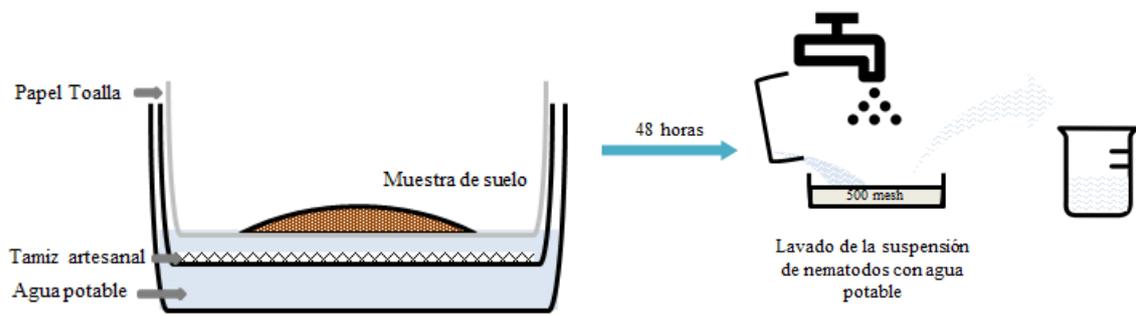
Esquema del método de Bandeja de Cobb



Esquema del método de Centrifugación Flotación



Esquema del método de Bandeja de extracción

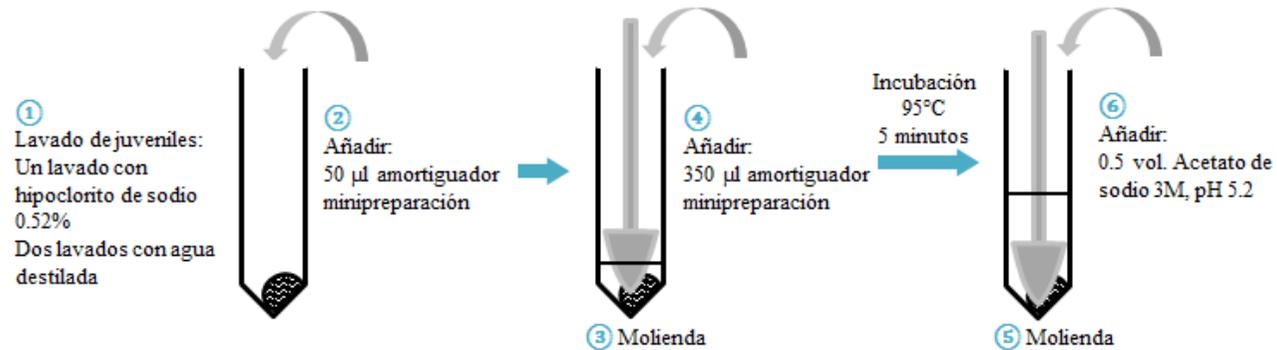


ANEXO 3

MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN

Esquema del método “Minipreparación”

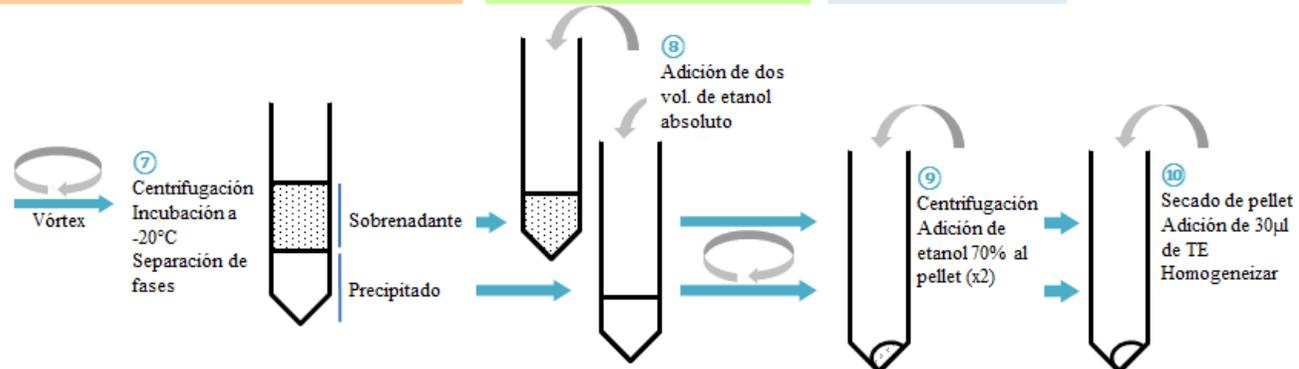
DISRUPCIÓN CELULAR



ELIMINACIÓN DE CONTAMINANTES

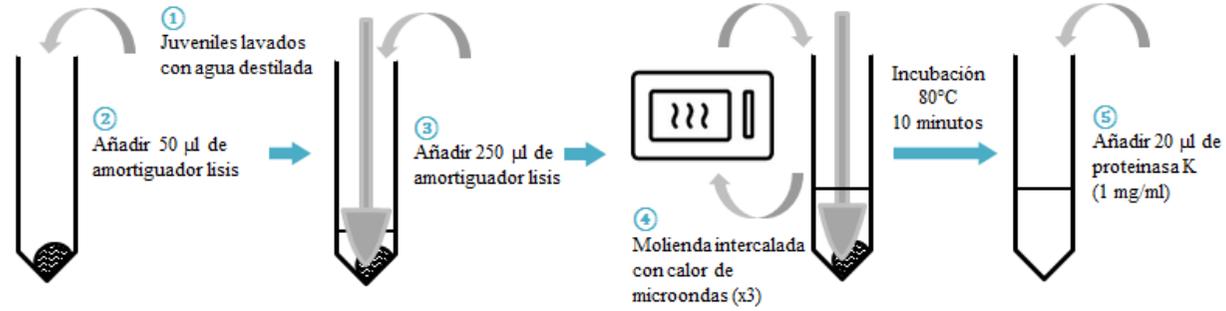
PRECIPITACIÓN

LAVADO DEL ADN

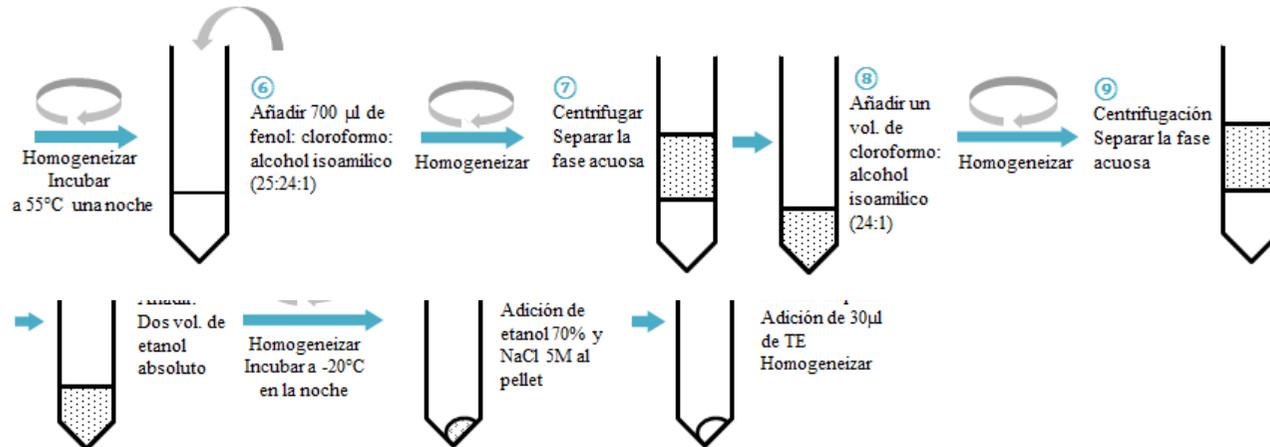


Esquema del método "Proteinasa K"

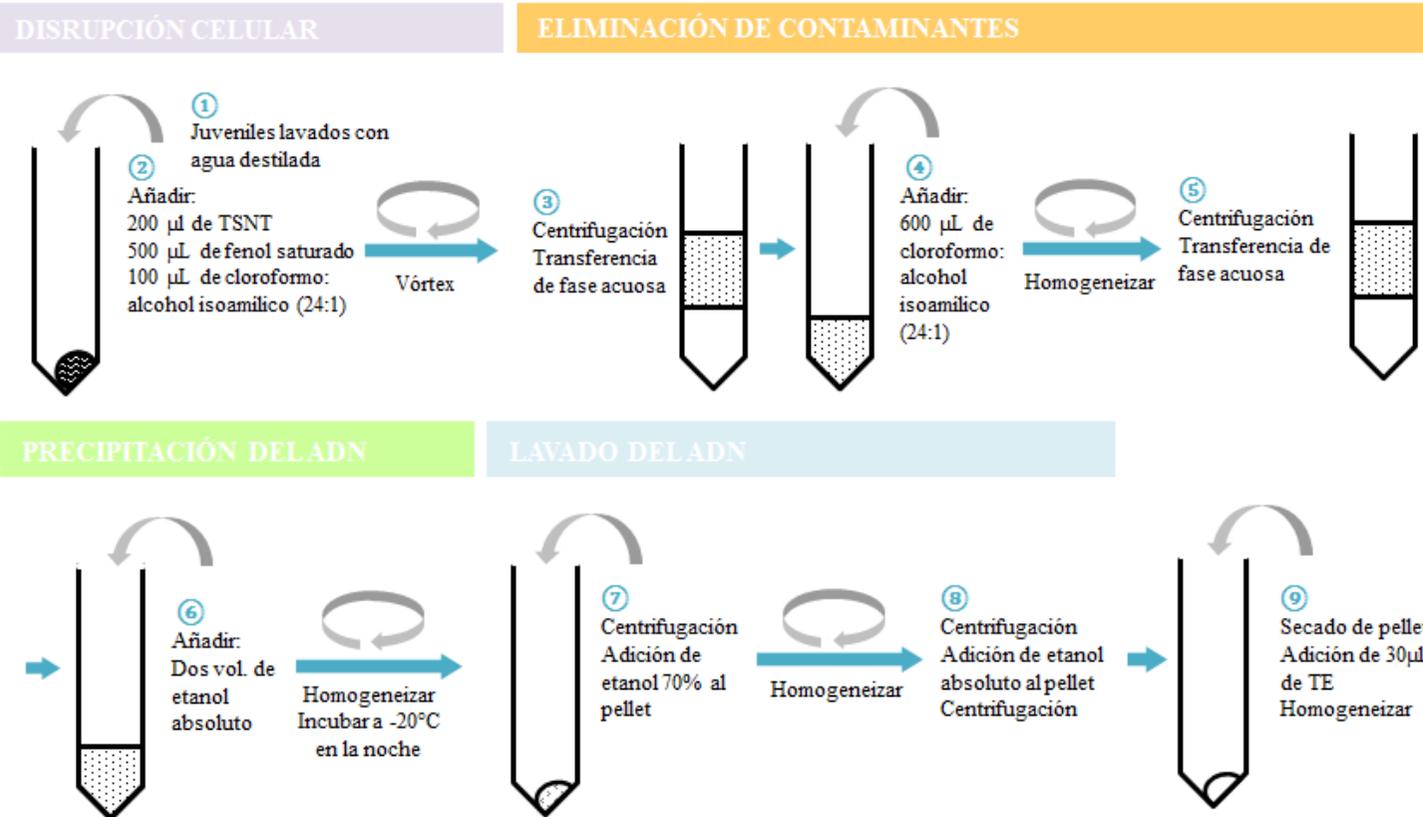
DISRUPCIÓN CELULAR



ELIMINACIÓN DE CONTAMINANTES



Esquema del método "Lisis de detergentes"



ANEXO 4

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE NEMATODOS A PARTIR DE MUESTRAS DE SUELO

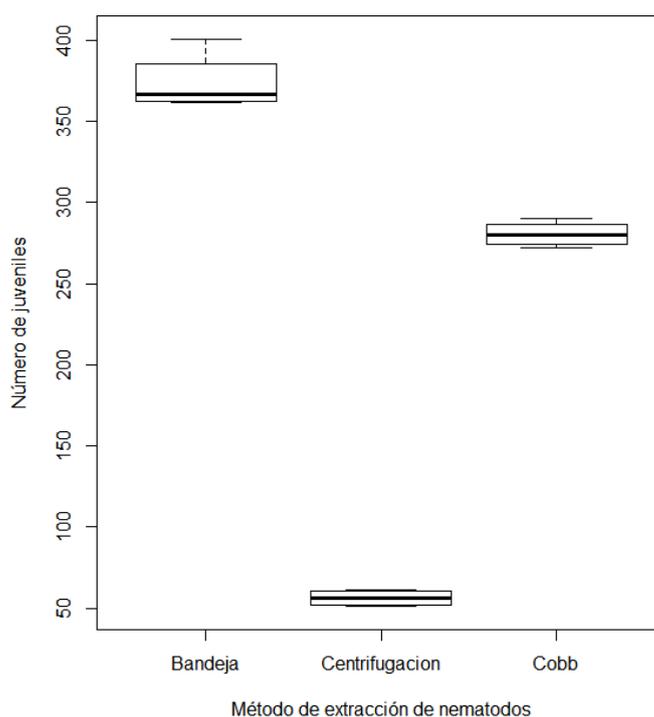


Diagrama de cajas del número de juveniles obtenido por método de extracción de nematodos de muestras de suelo.

Análisis de normalidad y homocedasticidad para métodos de extracción de nematodos a partir de muestras de suelo

Método	Shapiro-Wilk	Barlett
Bandeja de extracción	0.06373*	
Centrifugación	0.2753*	0.1079**
Bandeja de Cobb	0.9439*	

*Distribución normal, $p > 0.05$

**Homogeneidad de varianzas para los cuatro métodos, $p > 0.05$

Pruebas ANOVA y Tukey para métodos de extracción de nematodos de muestras de suelo

	ANOVA					Tukey		
	g.l.	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Sig.	Grupos	Q	Sig.
Inter grupos	2	213327	106664	758.4	9.3 e ⁻¹¹ *	Centrifugacion Bandeja	-37.89	<0.00001**
Intra grupos	9	1266	141			Cobb Bandeja	-11.15	<0.00001**
Total	11	214593				Cobb Centrifugacion	26.74	<0.00001

g.l., grados de libertad; F., estadístico F; Sig., significancia; q, estadístico Tukey

*Existe una diferencia significativa entre el número de juveniles obtenidos en cada método, p<0.001

**Existen diferencias significativas entre el número de juveniles obtenidos en cada grupo de métodos, p<0.001

ANEXO 5

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE CADA FASE DEL MÉTODO MINIPREPARACIÓN PARA EXTRACCIÓN DE ADN

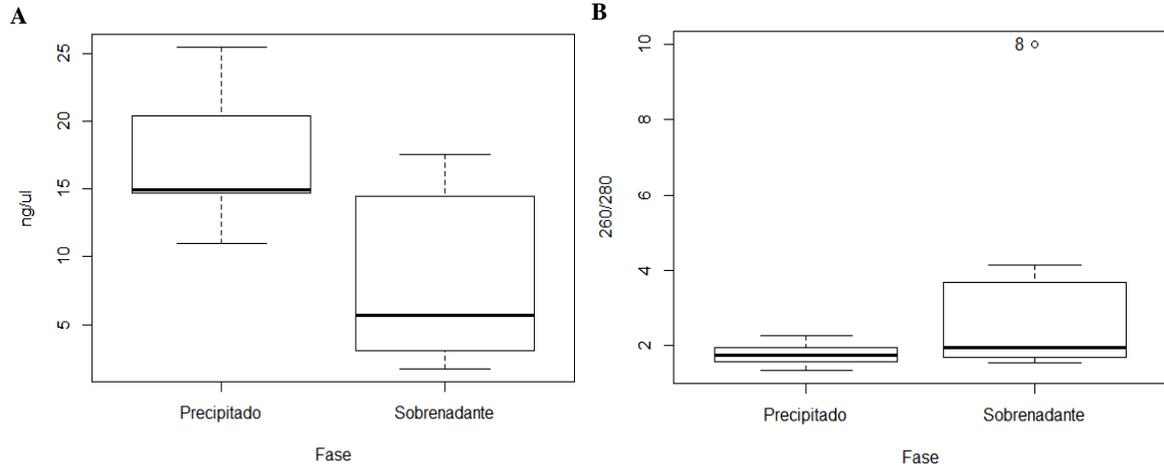


Diagrama de cajas de los resultados obtenidos en cada fase del método minipreparación para extracción de ADN a partir de nematodos juveniles (A) Concentración de ADN (ng/μl). (B) Índice de calidad de ADN (260/280).

Análisis de normalidad y homocedasticidad de los resultados obtenidos en cada fase del método minipreparación para extracción de ADN a partir de nematodos juveniles

Fase	Cantidad de ADN (ng/μl)		Calidad de ADN (260/280)	
	Shapiro-Wilk	Barlett	Shapiro-Wilk	Barlett
Precipitado	0.684*		0.991*	
Sobrenadante	0.2904*	0.675 ^a	0.000932**	0.000004 ^b

*Distribución normal, $p > 0.05$

**Distribución no normal, $p < 0.05$

^a Homogeneidad de varianzas para las dos fases, $p > 0.05$

^b No homogeneidad de varianzas para las dos fases, $p < 0.05$

Prueba T de diferencia de medias de la concentración de ADN (ng/μl) obtenido en cada fase del método minipreparación para extracción de ADN a partir de nematodos juveniles

Prueba T				
g.l.	t	Sig. (bilateral)	90% intervalo de confianza para la diferencia	
			Inferior	Superior
8	2.1698	0.06184*	1.254134	16.288466

* Existe una diferencia significativa de la cantidad de ADN obtenido en cada fase, $p < 0.1$

ANEXO 6

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN

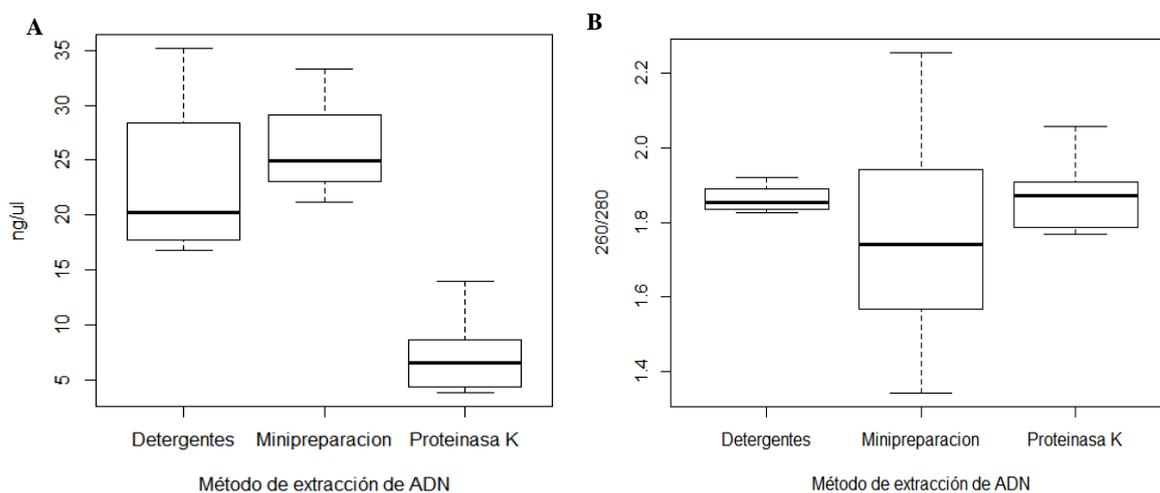


Diagrama de cajas de los resultados obtenidos en tres métodos de extracción de ADN a partir de nematodos juveniles (A) Concentración de ADN (ng/μl). (B) Índice de calidad de ADN (260/280).

Análisis de normalidad y homocedasticidad de los resultados obtenidos en tres métodos de extracción de ADN a partir de nematodos juveniles

Método	Cantidad de ADN (ng/μl)		Calidad de ADN (260/280)	
	Shapiro-Wilk Sig.	Barlett Sig.	Shapiro-Wilk Sig.	Barlett Sig.
Lisis con detergentes	0.157*		0.529*	
Minipreparación	0.591*	0.425 ^a	0.991*	0.0003 ^b
Proteínasa K	0.268*		0.439*	

*Distribución normal, $p > 0.05$

^a Homogeneidad de varianzas para los tres métodos, $p > 0.05$

^b No homogeneidad de varianzas para los tres métodos, $p < 0.05$

**Pruebas ANOVA y Tukey para la cantidad de ADN (ng/μl) obtenido a partir de nematodos juveniles
utilizando tres métodos de extracción de ADN**

	ANOVA				Tukey			
	g.l.	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Sig.	Grupos	Q	Sig.
Inter grupos	2	1048.8	524.4	15.52	0.0005*	Minipreparación Lisis de detergentes	0.829	0.691 ^a
Intra grupos	12	405.5	33.8			Proteinasa K Lisis de Detergentes	-4.690	0.002 ^b
Total	14					Proteinasa K Minipreparación	-4.659	0.002 ^b

g.l., grados de libertad; F., estadístico F; Sig., significancia; q, estadístico Tukey

*Existe una diferencia significativa de la concentración de ADN (ng/μl) obtenida en los métodos de extracción de ADN, p<0.001

^a No existen diferencias significativas de la concentración de ADN (ng/μl) obtenida en cada grupo de métodos de extracción de ADN, p>0.001

^b Existen diferencias significativas de la concentración de ADN (ng/μl) obtenida en cada grupo de métodos de extracción de ADN, p<0.001

**Prueba Welch ANOVA para la calidad del ADN (260/280) obtenido a partir de nematodos juveniles
utilizando tres métodos de extracción de ADN**

F	g.l. 1	g.l. 2	Sig.
0.518	2	8.871	0.613*

F., estadístico F; g.l., grados de libertad; Sig., significancia.

* No existe una diferencia significativa en la calidad del ADN (260/280) obtenido en los métodos de extracción de ADN, p>0.05

ANEXO 7

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE CADA TRATAMIENTO DE OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE NEMATODOS

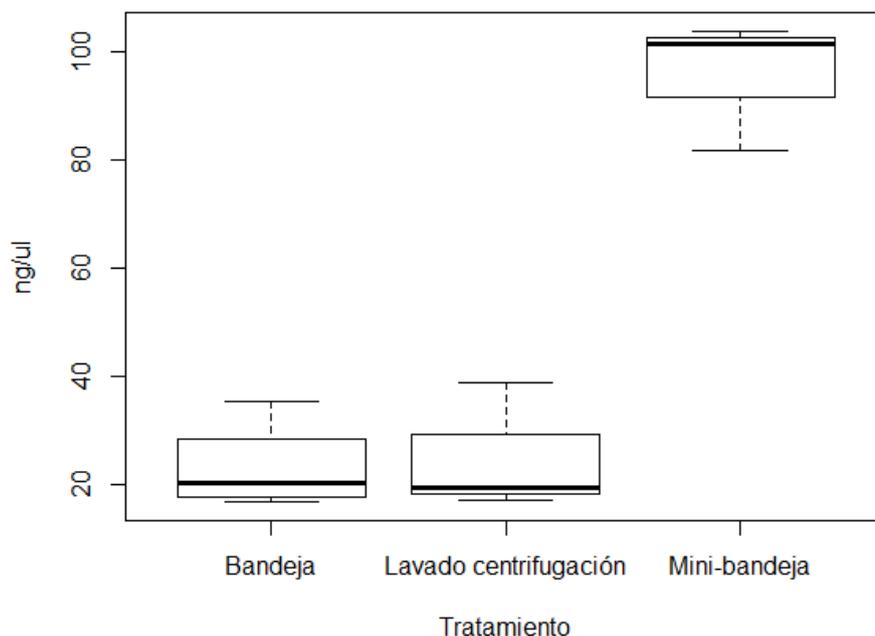


Diagrama de cajas de la concentración de ADN (ng/μl) obtenido por cada tratamiento de optimización del método de extracción de nematodos a partir de muestras de suelo.

Análisis de normalidad y homocedasticidad para la cantidad de ADN (ng/μl) obtenido por cada tratamiento de optimización del método de extracción de nematodos a partir de muestras de suelo

Tratamiento	Shapiro-Wilk Sig.	Barlett Sig.
Bandeja de extracción	0.157*	
Lavado Centrifugación	0.172*	0.606**
Mini-bandeja	0.181*	

Sig., Significancia.

*Distribución normal, $p > 0.05$

**Homogeneidad de varianzas para los cuatro métodos, $p > 0.05$

Pruebas ANOVA y Tukey para la concentración de ADN (ng/ μ l) obtenido por cada tratamiento de optimización del método de extracción de nematodos a partir de muestras de suelo

	ANOVA				Tukey			
	g.l.	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Sig.	Grupos	q	Sig.
Inter grupos	2	11581	5790	62.19	0.000005*	Lavado Bandeja	0.293	0.954 ^a
Intra grupos	9	838	93			Mini-bandeja Bandeja	10.608	<0.0001 ^b
Total	11	214593				Mini-bandeja Lavado	8.934	<0.0001 ^b

g.l., grados de libertad; F., estadístico F; Sig., significancia; q, estadístico Tukey.

*Existen diferencias entre la concentración de ADN obtenida en cada método, $p < 0.05$

^a No existen diferencias entre la concentración de ADN obtenida en cada grupo de métodos, $p > 0.05$

^b Existen diferencias entre la concentración de ADN obtenida en cada grupo de métodos, $p < 0.05$