



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: NATALIA LISZETH CANTUÑA CACUANGO

TEMA: DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL NEMATODO FORMADOR
DE AGALLAS *Meloidogyne* spp. EN SUELOS AGRÍCOLAS DESTINADOS AL
CULTIVO DE *Solanum lycopersicum* MEDIANTE LA TÉCNICA PCR.

DIRECTOR: DRA. KARINA PROAÑO TUMA

CODIRECTOR: M.SC. MÓNICA JADÁN GUERRERO

SANGOLQUÍ, NOVIEMBRE 2013

H O J A D E L E G A L I Z A C I Ó N D E F I R M A S

E L A B O R A D O P O R

Natalia Lizabeth Cantuña Cacuango

C O O R D I N A D O R D E L A C A R R E R A

Dra. María Augusta Chávez

S E C R E T A R I O A C A D É M I C O

Abg. Carlos Orozco Bravo M Sc.

Lugar y fecha: Sangolquí, 4 de Noviembre de 2013

C E R T I F I C A C I Ó N

Dra. Karina Proaño

M.Sc. Mónica Jadán

Certifican:

Que el trabajo titulado “**Detección e identificación del nematodo formador de agallas *Meloidogyne spp.* en suelos agrícolas destinados al cultivo de *Solanum lycopersicum* mediante la técnica de PCR**”, realizado por la Srta. Natalia Lizabeth Cantuña Cacuango, como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple con las normas establecidas por la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE en el reglamento de estudiantes.

Debido a la relevancia científica expuesta en el presente trabajo de tesis, se recomienda su publicación.

Sangolquí, 4 de Noviembre de 2013

Dra. Karina Proaño T.

DIRECTORA

M.Sc. Mónica Jadán

CODIRECTORA

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, NATALIA LISZETH CANTUÑA CACUANGO, declaro que:

El proyecto de grado denominado “**Detección e identificación del nematodo formador de agallas *Meloidogyne* spp. en suelos agrícolas destinados al cultivo de *Solanum lycopersicum* mediante la técnica de PCR**”, ha sido desarrollado en base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan a lo largo de todo el trabajo y cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, autenticidad y alcance científico del proyecto de grado antes mencionado.

Sangolquí, 4 de Noviembre de 2013

Srta. Natalia Lizeth Cantuña Cacuango

A U T O R I Z A C I Ó N

Yo, Natalia Lizabeth Cantuña Cacuango

Autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE la publicación del trabajo “**Detección e identificación del nematodo formador de agallas *Meloidogyne spp.* en suelos agrícolas destinados al cultivo de *Solanum lycopersicum* mediante la técnica de PCR**”, en la biblioteca virtual de la institución, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad.

Sangolquí, 4 de Noviembre de 2013

Srta. Natalia Lizabeth Cantuña Cacuango

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mis padres Mariana y Luis por brindarme su apoyo incondicional, a más de su amor y comprensión durante esta etapa de mi vida, sin importar los inconvenientes que han surgido. Mami y papi, siempre han sido mis modelos a seguir, gracias por su ardua lucha y sus enseñanzas.

A mi hermano, Vladimir gracias por ser mi apoyo incondicional y por todos los consejos brindados, eres mi ejemplo y te admiro mucho.

Natalia

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a Dios, por guiar siempre mi camino y demostrarme que si estoy con él todo es posible, gracias por llenarme de bendiciones cada día durante esta etapa estudiantil que hoy finalmente culmina.

A mis padres, por su amor y apoyo incondicional en todo momento. Mami, por tu esfuerzo he conseguido todo lo que hasta ahora tengo y por ti me seguiré superando como persona por qué has sido tú quien me ha demostrado que el esfuerzo y los sacrificios tienen su recompensa. Papi, gracias por ser mi ejemplo de perseverancia, y por tus palabras de aliento en mis momentos de dificultad, gracias por todas las enseñanzas que me das cada día.

A mi hermano, gracias por escucharme, por apoyarme, por entenderme y más que nada por alentarme a seguir cuando desfallecía. Gracias por tus consejos cuando más lo necesitaba, todo lo que has aportado en mí ha sido muy valioso.

A la Escuela Politécnica del Ejército, especialmente a la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, a todos mis profesores por los conocimientos brindados a lo largo de la carrera, en especial a mi Directora la Dra. Karina Proaño a mi Codirectora la M.Sc. Mónica Jadán por su apoyo en la corrección de la tesis, las recomendaciones y consejos brindados, pero sobre todo por hacer del laboratorio nuestro segundo hogar, por siempre apoyarnos y estar dispuestas a tendernos la mano. A la Ing. Paola Párraga por ser una guía a lo largo de este trabajo y por brindarme sus conocimientos.

A mis amigas y compañeras tanto de laboratorio como de la carrera, Giss, Denisse, Pau, Diani, Rossi, Caro, Yri, Joha, Ely, Moni, Santi, Rouz, Rosita, Ferch, Javi y Cinti gracias por los momentos de alegría y tristeza compartidos. Así también como a Liz, Naty, Luis P, Fernando P. y Andrea gracias por brindarme su amistad incondicional y desinteresada.

Adicionalmente quiero mencionar un agradecimiento muy especial a Gissela E. Báez F. porque más que mi amiga, eres casi como mi hermana, y sin ti definitivamente la carrera no habría sido la misma.

A la Ing. Gabriela Miño por la capacitación y la ayuda brindada para la realización de este trabajo, fuiste una luz en la culminación de mi tesis, tus conocimientos fueron de gran ayuda.

A la Ing. Silvana Granda, por ayudarme con los reactivos cuando más lo necesitaba pero sobre todo por tu amistad.

Al Dr. Ricardo Oliva, por su tiempo y asesoría brindada al proyecto.

Al Dr. Franklin Vásquez, gracias por compartir sus conocimientos en Nematología cuando la identificación de nematodos era el principal problema.

A l Dr. Fernando Ponce, al Sr. Mario Mejía y a la Srta. Ruth Sánchez, por ayudarnos con el inóculo de nematodos para el desarrollo de la tesis, en Hilsea Finca "La Morita" en la ciudad de El Quinche.

A los pasantes que nos ayudaron con ciertas tareas de agricultura, cuando el tiempo no parecía ser suficiente.

A los señores de Pimampiro en la provincia de Imbabura que nos proporcionaron muestra desinteresadamente para la realización de este proyecto, sin su apoyo no lo hubiera conseguido.

Finalmente, también quiero agradecer a todos mis compañeros de PL - 64, y a todos a quien he conocido, gracias por su apoyo incondicional por darme fuerza y por convertirse en mi familia.

Gracias a todos... .

Natalia

ÍNDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS	II
CERTIFICACIÓN	III
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	IV
AUTORIZACIÓN	V
DEDICATORIA	VI
AGRADECIMIENTOS	VII
ÍNDICE DE CONTENIDOS	X
LISTADO DE TABLAS	XII
LISTADO DE CUADROS	XVI
LISTADO DE FIGURAS	XVII
LISTADO DE ANEXOS	XXII
LISTADO DE ABREVIATURAS	XXIII
RESUMEN	XXV
ABSTRACT	XXVI
CAPITULO 1	1
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación del problema	3
1.3 Objetivos	4
1.3.1 Objetivo general.....	4
1.3.2 Objetivo específico	4
1.4 Marco teórico	5
1.4.1 Solanum lycopersicum	5
1.4.1.1 Importancia económica	7
1.4.1.2 Taxonomía y morfología.....	12
1.4.1.3 Enfermedades y plagas.....	19
1.4.1.4 Métodos de control.....	30
1.4.2 <i>Meloidogyne</i> spp.....	33
1.4.2.1 Ciclo de vida	34
1.4.2.2 Taxonomía y morfología.....	38
1.4.2.3 Especies importantes en suelos agrícolas descritas en Ecuador	40
1.4.2.3.1 <i>Meloidogyne incognita</i>	42
1.4.2.3.2 <i>Meloidogyne javanica</i>	45
1.4.2.4 Enfermedad del nudo de la raíz.....	48
1.4.2.5 Respuesta de la planta al nematodo	52
1.4.3 Diagnóstico de <i>Meloidogyne</i> spp.....	56
1.4.3.1 Identificación tradicional	57
1.4.3.2 Detección molecular	61

1.4.3.2.1 Técnica PCR	65
1.5 Hipótesis	72
CAPÍTULO 2	73
2.1 Participantes	73
2.2 Zona de estudio	73
2.3 Periodo de duración de la investigación	74
2.4 Diseño experimental	74
2.5 Metodologías.....	74
2.5.1 Recolección de muestras de suelo en campo	75
2.5.1.1 Establecimiento del material vegetal de campo en el laboratorio	76
2.5.1.2 Inoculación de <i>Solanum lycopersicum</i> con nematodos <i>Meloidogyne</i> spp	78
2.5.2 Extracción y cuantificación de ADN genómico	84
2.5.2.1 Extracción de ADN genómico de raíz	84
2.5.2.2 Extracción de ADN genómico de suelo	85
2.5.2.3 Cuantificación de las muestras.....	86
2.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	86
2.5.3.1 Diseño de <i>primers</i>	87
2.5.3.2 Ensayos de optimización para la detección de <i>Meloidogyne</i> spp en raíz y suelo	88
2.5.3.3 Ensayos de optimización para la identificación de <i>M. incognita</i> y <i>M.</i> <i>javanica</i> en raíz y suelo	91
CAPÍTULO 3	97
3.1 Recolección de muestras de suelo en campo	97
3.2 Extracción y cuantificación de ADN genómico	99
3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	103
3.3.1 Diseño de <i>primers</i>	103
3.3.2 Ensayos de optimización para la detección de <i>Meloidogyne</i> spp.....	105
3.3.3 Ensayos de optimización para la identificación de <i>M. incognita</i> y <i>M. javanica</i> ...	108
CAPÍTULO 4	113
4.1 Extracción y cuantificación de ADN genómico	113
4.2 Ensayos de optimización para la detección de <i>Meloidogyne</i> spp.....	115
4.3 Identificación de <i>M. incognita</i> y <i>M. javanica</i>	118
CAPITULO 5	121
CAPITULO 6	123
BIBLIOGRAFIA	124
ANEXOS	135

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1	Taxonomía del tomate <i>Lycopersicon esculentum</i>	13
Tabla 2	Principales plagas que afectan al tomate riñón... ..	21
Tabla 3	Principales enfermedades que afectan al tomate riñón... ..	24
Tabla 4	Tipo de reproducción de las principales especies del género <i>Meloidogyne</i>	38
Tabla 5	Descripción de los tipos de sustratos utilizados en el estudio para el desarrollo de <i>Solanum lycopersicum</i>	77
Tabla 6	Detalle del número de accesión y la base de datos de los genes... ..	87
Tabla 7	Criterios básicos para el diseño de <i>primers</i>	88
Tabla 8	Concentraciones y volúmenes de reacción para ensamblaje de la PCR, en la detección de <i>Meloidogyne</i> spp para los <i>primers</i> 16D10F y 16D10R	89
Tabla 9	Temperaturas empleadas en la detección de <i>Meloidogyne</i> spp. planteado por Grijalva (2013) para los <i>primers</i> 16D10F y 16D10R	90

Tabla 10	Concentraciones y volúmenes de reacción para ensamble de la PCR, en la identificación de las especies <i>M. incognita</i> y <i>M. javanica</i> planteado por Devran y Ali Sôğüt (2009) para los <i>primers</i> M engincF, M engincR, ZiljavF y ZiljavR... .. .	92
Tabla 11	Temperaturas empleadas en la identificación de las especies <i>M. incognita</i> y <i>M. javanica</i> planteado por Devran y Ali Sôğüt (2009) para los <i>primers</i> M engincF, M engincR, ZiljavF y ZiljavR... .. .	93
Tabla 12	Condiciones de <i>Mastermix</i> para la estandarización de la amplificación por PCR convencional para la identificación de <i>M. incognita</i> y <i>M. javanica</i> a. Devran y Ali Sôğüt (2009), b. Grijalva (2013)... .. .	94
Tabla 13	Programas de PCR para la estandarización de la amplificación por PCR convencional para la detección de <i>M. incognita</i> y <i>M. javanica</i> por Grijalva (2013)... .. .	95
Tabla 14	Programas de PCR para la estandarización de la amplificación por PCR convencional para la detección de <i>M. incognita</i> y <i>M. javanica</i> por Devran y Ali Sôğüt (2009)... .. .	95
Tabla 15	Puntos geográficos tomados por el GPS (Garmin, ETREX20) durante la recolección de muestras de suelo y raíz en cultivos de tomate (<i>S. lycopersicum</i>) en los barrios San José y El Rosal en la ciudad San Pedro de Pimampiro, provincia de Imbabura... .. .	98

Tabla 16	Cuantificación de las muestras de raíz de tomate (<i>S. lycopersicum</i>) recolectadas en San Pedro de Pimampiro mediante el <i>NanoVue™ Spectrophotometer</i> . Donde SJ: <i>Solanum lycopersicum</i> del barrio San José, R: <i>Solanum lycopersicum</i> del barrio El Rosal y A: absorbancia... ..	101
Tabla 17	Cuantificación de las muestras de suelo con cultivares de tomate (<i>S. lycopersicum</i>) recolectadas en San Pedro de Pimampiro mediante el <i>NanoVue™ Spectrophotometer</i> . Donde SJ: <i>Solanum lycopersicum</i> del barrio San José, R: <i>Solanum lycopersicum</i> del barrio El Rosal y A: absorbancia... ..	103
Tabla 18	Secuencia de <i>primers</i> seleccionados y enviadas a sintetizar para la identificación de <i>M. incognita</i> y <i>M. javanica</i> a partir de la proteína 8D05 de la glándula esofageal y el gen del colágeno <i>Mjcol-3</i> y con sus características más relevantes... ..	105
Tabla 19	Concentración de los componentes de la <i>master mix</i> para la amplificación del gen <i>16D10</i> a partir de ADN de raíz y de suelo de las especies <i>Solanum lycopersicum</i>	106
Tabla 20	Programa de PCR para la amplificación del gen <i>16D10</i> a partir de ADN de raíz y de suelo de las especies <i>Solanum lycopersicum</i>	107

Tabla 21	Concentración de los componentes de la <i>master mix</i> para la identificación de las especies <i>M. incognita</i> y <i>M. javanica</i> a partir de ADN de raíz y de suelo de las especies <i>Solanum lycopersicum</i>	109
Tabla 22	Programa de PCR para la amplificación de los genes de <i>M. incognita</i> y <i>M. javanica</i> a partir de ADN de raíz de <i>Solanum lycopersicum</i>	110
Tabla 23	Programa de PCR para la amplificación de los genes de <i>M. incognita</i> y <i>M. javanica</i> a partir de ADN de suelo de <i>Solanum lycopersicum</i>	112

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1	Principales países productores de tomate	8
Cuadro 2	Tabla de valores nutricionales del tomate	11
Cuadro 3	Especies de nematodos y su relación con ciertos cultivos agrícolas de interés en el Ecuador	41

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1	Producción del tomate en el Ecuador... .. .	9
Figura 2	Imágenes de las flores, hojas y el fruto de la planta tomate riñón (<i>S. lycopersicum</i>)... .. .	14
Figura 3	Crecimiento de la planta de tomate riñón. A. Crecimiento determinado. B. Crecimiento indeterminado... .. .	15
Figura 4	Cuajado o fructificación del tomate riñón... .. .	18
Figura 5	Esquema de las principales plagas que afectan al cultivo de tomate según el daño que ocasionan a la planta... .. .	23
Figura 6	Principales enfermedades ocasionadas por bacterias y virus que afectan al cultivo de tomate <i>S. lycopersicum</i>	27
Figura 7	Principales enfermedades ocasionadas por hongos que afectan al cultivo de tomate <i>S. lycopersicum</i>	30
Figura 8	Ciclo de vida del nematodo del nudo, <i>Meloidogyne</i> . J2 segundo estado juvenil, J3 tercer estado juvenil; J4 cuarto estado juvenil... .. .	36
Figura 9	Desarrollo morfológico de los estadios del nematodo del nudo <i>Meloidogyne</i> spp. Escala: 40 μ m... .. .	40

Figura 10	<i>Meloidogyne incognita</i> . A: región faríngeal de la hembra; B-D: región anterior de la hembra; E: región anterior del macho; F-G: región de la cola del macho; H: campo lateral del macho; I: región anterior de J2; J: región cola de J2; K: patrones perineales... ..	44
Figura 11	<i>Meloidogyne javanica</i> . A: región faríngeal de la hembra; B: región anterior del macho; C: región anterior de J2; D: región de la cola de J2; F: variación de los patrones perineales... ..	47
Figura 12	Sistema radicular de plantas infectadas con nematodos <i>Meloidogyne</i> spp. A. Planta susceptible, B. Planta resistente....	49
Figura 13	Relación entre la planta huésped, patógenos y la reacción de la enfermedad... ..	54
Figura 14	Preparación de patrones perineales. A, B: corte del cuello de la hembra y eliminación del contenido del cuerpo; C: cuerpo posterior del patrón perineal eliminado; D: recorte de la cutícula cerca del patrón perineal; E: recortado del patrón perineal listo para el montaje... ..	58
Figura 15	Bandas mayores de estereosas en hembras de cuatro especies de <i>Meloidogyne</i> reveladas en un gel de poliacrilamida y coloreado con alfa naftil acetato... ..	61
Figura 16	Amplificación del ADN mediante la técnica de PCR... ..	67

Figura 17	Mapa de la ciudad de San Pedro de Pimampiro, Imbabura. Fuente: Google maps, 2013 75	75
Figura 18	Cultivo de plantas de especies de la familia <i>Solanaceae</i> . A. Semillas de <i>S. lycopersicum</i> , B. Germinación de semillas, C. Desarrollo de plantas a los 20 días. Fuente: Cantuña, 2013 78	78
Figura 19	Zona 1 de muestreo de inóculo de nematodos en San Pedro de Pimampiro, Imbabura A. camas en uno de los invernaderos muestreados, B. Raíz de tomate con alto índice de agallamiento. Fuente: Cantuña, 2013 79	79
Figura 20	Zona 2 de muestreo de la obtención de inóculo de nematodos en la Finca La Morita de Hilsea, El Quinche. A. Recolección de raíz, B. Recolección de suelo, C. Raíz con agallamiento. Fuente: Cantuña, 2013 80	80
Figura 21	Proceso de extracción por tamizaje selectivo. A. Corte de raíces con tijera podadora, B. Lavado, C. Aforo de la muestra con agua, D. Licuado de la muestra, E. Tamizaje Selectivo, F. Recolección de huevos. Fuente: Cantuña, 2013 81	81
Figura 22	Proceso de inoculación en plantas trampa de tomate A. Orificios cerca de la raíz de la planta, B. Inoculación de la solución de huevos, C. Plantas inoculadas. Fuente: Cantuña, 2013 82	82

- Figura 23** Ensayos de infección de nematodos en suelo de *Solanum lycopersicum* en la cámara de germinación y en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la ESPE, Sangolquí. Temperatura de 24 ± 2 °C, humedad relativa del 65 % y fotoperiodo de 16 horas/luz y 8 horas/oscuridad. Fuente: Cantuña, 2013... .. 83
- Figura 24** Patrón de homogenización para las muestras de suelo a ser procesada Fuente: Cantuña, 2013... .. 83
- Figura 25** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con SYBR® Safe DNA gel stain del ADN extraído con el protocolo kit *DNeasy Plant Mini Kit* Qiagen® de las muestras de raíz recolectadas en los barrios San José y El Rosal. La corrida electroforética se realizó a 110 V, 1h. Donde SJ: San José, R: El Rosal y M: marcador de bajo peso molecular de ADN (Low DNA mass ladder, Invitrogen®)... .. 100
- Figura 26** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con SYBR® Safe DNA gel stain del ADN extraído con el protocolo del *Ultraclean™ Soil DNA Isolation kit* (MoBio Laboratories, Inc) de las muestras de suelo recolectadas en San Pedro de Pimampiro en invernaderos de tomate. La corrida electroforética se realizó a 110 V, 1h. Donde SJ: San José, R: El Rosal y M: marcador de bajo peso molecular de ADN (Low DNA mass ladder, Invitrogen®)... .. 102

- Figura 27** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % teñido con SYBR® Safe DNA gel stain del amplicón del gen *16D10* de muestras de raíz recolectadas en San Pedro de Pimampiro. Donde SJ: San José, R: El Rosal y M: marcador de peso molecular de ADN de 100 pb (TracIt™ 100bp DNA Ladder, Invitrogen®)..... 107
- Figura 28** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % teñido con SYBR® Safe DNA gel stain del amplicón del gen *16D10* de muestras de suelo recolectadas en San Pedro de Pimampiro. Donde SJ: San José, R: El Rosal y M: marcador de peso molecular de ADN de 100 pb (TracIt™ 100bp DNA Ladder, Invitrogen®)..... 108
- Figura 29** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % teñido con SYBR® Safe DNA gel stain del amplicón para el gen del colágeno *Mjcol-3* de *M. javanica* y el gen de la proteína 8D05 de la glándula esofageal para *M. incognita* de muestras de raíz recolectadas en San Pedro de Pimampiro. Donde SJ: San José, R: El Rosal y M: marcador de peso molecular de ADN de 100 pb (TracIt™ 100bp DNA Ladder, Invitrogen®)..... 111
- Figura 30** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % teñido con SYBR® Safe DNA gel stain del amplicón para el gen del colágeno *Mjcol-3* de *M. javanica* de muestras de suelo recolectadas en San Pedro de Pimampiro. Donde SJ: San José, R: El Rosal y M: marcador de peso molecular de ADN de 100 pb..... 112

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1	Composición de la solución nutritiva Hoagland... ..	135
Anexo 2	Detalle de la secuencia de los genes del colágeno <i>Mjcol-3</i> para <i>Meloidogyne javanica</i> , Gen de la proteína 8D05 de la glándula esofageal en <i>Meloidogyne incognita</i> , Proteína efectora 16D10 para las especies de <i>Meloidogyne</i> spp... ..	136
Anexo 3	Detalle de secuencias de <i>primers</i> y los fragmentos a amplificar... ..	141

LISTADO DE ABREVIATURAS

- ADN (Ácido desoxirribonucleico)
- avirulencia (Avr)
- BMP (Grupo de investigación de Biología Molecular en plantas)
- dNTPs (Desoxirribonucleótidos trifosfato).
- EDTA (Ácido Etilendiaminotetracético)
- ESPE (Escuela Politécnica del Ejército)
- g (gramos)
- Has (hectárea)
- INEC (Instituto de Estadísticas y Censos)
- Kg (kilogramos)
- L (litro)
- M (molar)
- m.s.n.m. metros sobre el nivel del mar
- mg (miligramos)
- Min (minutos)
- mL (mililitros)
- mM (milimolar)
- pb pares de bases
- PCR (*Polymerase Chain Reaction*, reacción cadena polimerasa)

RKN (*Root knot nematodes*, nematodo formador del nudo de la raíz)

rpm revoluciones por minuto

Tm (toneladas métricas)

TBE (Tris-Borato EDTA)

nm (nanómetro)

μ M (micromolar)

μ g (microgramo)

μ L (microlitros)

RESUMEN

En el Ecuador se destinan grandes extensiones de terreno para el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) debido a sus propiedades alimentarias y las ganancias en la producción que genera este cultivo. Sin embargo, la producción se ve afectado por el ataque del nematodo del nudo *Meloidogyne* spp. induce la formación de agallas en las raíces de la planta. Los ensayos realizados con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en suelos en San Pedro de Pimampiro, provincia de Imbabura permitieron la detección del género *Meloidogyne* spp. y la identificación de las principales especies que atacan a este cultivo como *M. incognita* y *M. javanica*. En campo se recolectaron muestras de suelo y raíz mediante un muestreo sistemático en invernaderos de la zona. En el laboratorio, se realizó la extracción de ADN de suelo y de raíz utilizando kits comercial. La detección del género *Meloidogyne* spp se logró utilizando el gen *16D10*, cuya región es conservada en las cuatro especies del nematodo. En las muestras de suelo y raíz recolectadas se evidenció la presencia de un sólo amplicon de 200 pb, lo que indica que el género *Meloidogyne* se encuentra en las muestras. La identificación de las especies se realizó con *primers* diseñados específicos para cada especie. En *M. javanica* se utilizó el gen del colágeno *Mjcol-3* con el cual se identifico al nematodo en raíz y suelo. La identificación de *M. incognita* se utilizó el gen de la proteína 8D5 de las glándulas esofageales, sin embargo, en las muestras analizadas no se evidenció la presencia del amplicon deseado.

- *Meloidogyne* spp.
- *Meloidogyne incognita* y *Meloidogyne javanica*
- Identificación de especies, PCR

A B S T R A C T

In Ecuador, large tracts of land devoted to tomato crops (*Solanum lycopersicum*) due to its nutritional properties and production gains generated by this crop. However, the production is affected by the attack of root-knot nematode *Meloidogyne* spp. which induces the formation of galls on the roots of the plant. The technique of polymerase chain reaction (PCR) in soils in San Pedro de Pimampiro province of Imbabura allowed detection of *Meloidogyne* spp. and identification of the main species such as *M. incognita* and *M. javanica*. In field were collected soil and root samples by a systematic sampling in greenhouses. In the laboratory, DNA was isolated from soil and roots using commercial kits. *Meloidogyne* spp. was detected with the gene *16D10*, which region is conserved in the four species from nematodes. The samples of soil and root harvested in Pimampiro showed the presence of a single amplicon of 200bp, which indicate that the genus of *Meloidogyne* is present in the samples. The identification of the species was performed by using specific primers which was designed for this species with different genes. For *M. javanica* was used collagen gene *Mjcol-3* which identify this specie in the samples collected. The identification of *M. incognita* was used the 8D5 protein gene of esophageal glands, however any of analyzed samples showed the presence of the desired amplicon.

- *Meloidogyne* spp.
- *Meloidogyne incognita* y *Meloidogyne javanica*
- PCR

CAPITULO 1

Detección e identificación del nematodo formador de agallas *Meloidogyne* spp. en suelos agrícolas destinados al cultivo de *Solanum lycopersicum* mediante la técnica PCR

1.1 Formulación del problema

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es un cultivo que tiene gran interés alimenticio a nivel mundial. En el Ecuador este cultivo se extiende en zonas ubicadas entre los 100 y 1500 m.s.n.m. (Corpeño, 2004). En el año 2011 la producción de tomate llegó a ser de 36.010 toneladas métricas (Tm) con cerca de 1.668 hectáreas (Has) sembradas y 1.583 Has cosechadas.

Lamentablemente, la producción de este cultivo ha disminuido su rendimiento en los últimos años debido al incremento en la incidencia de enfermedades, insectos y plagas (Sánchez, 2007). Según estadísticas del Instituto Nacional de Estadística y Censo (INEC), desde el 2006 al 2010, la producción presentó una disminución significativa. Se registró datos para el 2006 de 61.929 Tm, para el 2008 de 50.551 Tm, para el 2009 de 46.536 Tm y para el 2010 de 53.518 Tm (INEC, 2010).

La plaga que más afecta al sector agrícola a nivel mundial es el nematodo formador del nudo de la raíz *Meloidogyne* spp. (Bendezu y Starr, 2003). El rango de hospederos de este nematodo abarca más de 3000 especies de plantas de diferentes géneros. La infección con el nematodo ocasiona un desarrollo anormal del sistema radicular formando células gigantes que alteran el flujo de agua y otros nutrientes, ocasionando

graves efectos sobre los cultivos y fuertes impactos económicos y sociales (Perry y Moens, 2006). Anualmente, se destinan cerca de 125 billones de dólares americanos para la eliminación de este patógeno (Sasser y Freckman, 1987; Bird y Kaloshian, 2003; Chitwood, 2003).

Durante años se han utilizado varias estrategias individuales o en conjunto para controlar este nematodo en los cultivos de tomate, entre ellas: el control físico y químico, las prácticas culturales, y el control biológico. Sin embargo estas estrategias tienen sus limitaciones, sobretodo el control químico que tiene efectos negativos para la salud y el medio ambiente (Puedmag y Hernández, 2007). El control más económico utilizado por los agricultores es la siembra de variedades resistentes e híbridos por su fácil aplicación. Las variedades con mayor aceptación de tomate son: Fortuna, Sheyla, Charleston, Titán, Pietro, Fortaleza, Cherry y Chonto (Sánchez, 2007).

Es importante el control de plagas ya que se debe establecer métodos de diagnóstico rápido de patógenos en estados o fases tempranas que permitan tomar decisiones oportunas para garantizar la productividad de los cultivos. La presente investigación pretende mediante la técnica PCR la identificación rápida y eficiente de los fitopatógenos, lo cual puede hacer la diferencia entre la pérdida de un sembrío o la aplicación de un método que contrarreste al agresor (Salazar, 2004). Esta técnica al ser específica y sensible permite estudiar un número considerable de muestras en el menor tiempo posible (Dong *et al.*, 2001).

1.2 Justificación del problema

En el Ecuador se destinan grandes extensiones de terreno para el cultivo de Solanáceas. A nivel nacional, el tomate se cultiva en los valles cálidos de la serranía y el Litoral. Sin embargo, la producción de estos cultivos se ve afectada por problemas fitosanitarios. En especial por el nematodo formador de agallas *Meloidogyne* spp. el cual evita la correcta absorción de agua y nutrientes del suelo, lo que causa pérdidas en el rendimiento y reduciendo la vida útil del cultivo (Abad *et al.*, 2003; Revelo, 2003).

En algunas zonas tomateras de las provincias del Carchi e Imbabura se utilizan semillas certificadas como estrategia a la resistencia contra los nematodos. A pesar de ello los agricultores tienen problemas en las raíces debido al número elevado de nudos o agallas característico del ataque de los nematodos agalladores *Meloidogyne* spp. o *Nacobbus aberrans* (Sánchez, 2007). Por lo que, actualmente se siguen buscando nuevos métodos de control frente a este nematodo.

Es necesario por lo tanto, desarrollar técnicas de diagnóstico fitosanitario confiables y rápidas que garanticen la producción de los cultivos y contribuyan al cumplimiento de las normas fitosanitarias, en especial cuando el producto es destinado para la importación tomando en cuenta la legislación de otros países.

Esta investigación pretende identificar al nematodo *Meloidogyne* spp., en suelos agrícolas de *Solanum lycopersicum* como un método rápido y confiable de detección. El objetivo es implementar técnicas de última generación para el sector agrícola en el laboratorio de Biotecnología de la ESPE.

Adicionalmente, se debe tener en cuenta que la identificación de los patógenos es importante para el conocimiento de la diversidad biológica ya que nos proporciona información sobre la evolución de los mismos e incluso permite el entendimiento del proceso vital y el papel de cada una de las especies en el ecosistema. El conocimiento de la clasificación y evolución de cada organismo y de las nuevas especies permitirá ofrecer soluciones a los agricultores y así evitar el ataque de estos microorganismos para recomendar diferentes prácticas en el manejo para el control de plagas y enfermedades.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Detectar e identificar el nematodo formador de agallas *Meloidogyne* spp., en suelos agrícolas destinados al cultivo de *Solanum lycopersicum* mediante la técnica molecular de PCR.

1.3.2 Objetivo específico

- Extraer, cuantificar ADN de *Solanum lycopersicum* para identificar en nematodo formador de agalla *Meloidogyne* spp.
- Extraer y cuantificar ADN de suelo infectado con *Meloidogyne* spp.

- Detectar *Meloidogyne incognita* y *Meloidogyne javanica* con primers específicos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en ADN de suelo.
- Establecer el límite de detección de *Meloidogyne* spp. en suelo mediante la técnica de PCR.
- Analizar muestras de suelos agrícolas de cultivos de *Solanum lycopersicum* para detectar e identificar *Meloidogyne* spp. en Pimampiro – Imbabura.

1.4 Marco teórico

1.4.1 *Solanum lycopersicum*

El origen del género *Lycopersicum* se le atribuye a la región Andina, la cual se extiende desde el sur de Colombia hasta el norte de Chile. Al parecer fue en México donde se domesticó al cultivo, ya que de mala hierba paso a ser consumido en distintas formas, tamaños y colores según registros del siglo XVI en ese país (Ñuño, 2007).

En Europa, especialmente en España e Italia, se utilizó este cultivo para la alimentación básica humana, mientras que en otros países a más de ser un alimento, se utilizó como planta ornamental por el color amarillo de sus flores y sus bayas rojas o amarillas (Nuez, 1995). Desde el año de 1785 el tomate riñón fue calificado como hortaliza, y actualmente es la especie más cultivada en el mundo después de la papa, tanto para consumo fresco y la industria (Sánchez, 2007).

En el Ecuador hace más de una década que se cultiva tomate. Este cultivo representa el 22,16 % del total de las hortalizas sembradas, por lo que constituye un ingreso importante en la economía del país (SICA, 2001).

Las principales zonas productoras de tomate se ubican en los valles cálidos de la serranía y el Litoral. Según estadísticas del INEC (2011), la provincia de Imbabura es la principal productora de este cultivo con 401 Has, le siguen las provincias de Chimborazo con 283 Has y Carchi con 207 Has, mientras que provincias como Manabí, Santa Elena, Pichincha y Cotopaxi cuentan con 170 Has, 145 Has, 142 Has y 114 Has, respectivamente.

Se han descrito 44 variedades para consumo del fruto fresco y 24 para la industria para preparar productos como: enlatado, pulpa o puré, pasta, jugo, salsas, salsa picante y polvo de tomate para reconstituirse como jugo, dulces y encurtidos. En el Ecuador existen solamente ocho variedades con mayor acogida: Fortuna, Sheyla, Charleston, Titán, Pietro, Fortaleza, Cherry y Chonto (Sánchez, 2007; Diario El Comercio, 2011).

El descubrimiento de su notable riqueza vitamínica, junto con su agradable gusto y color, popularizó rápidamente este consumo, hasta llegar a ocupar el tercer lugar de importancia mundial entre las hortalizas después de la papa y la batata (Corpeño, 2004). Hoy en día es la hortaliza más estudiada por científicos debido a sus características básicas y agrícolas (Sanguetti, 2003).

1.4.1.1 Importancia económica

El tomate se ha convertido en la hortaliza más difundida a nivel mundial puesto que su demanda ha aumentado en los últimos años por sus cualidades alimenticias tanto en su consumo en fresco como en la industria (INFOAGRO, 2003). En el año 2007, el tomate ocupó el puesto número 20 entre los productos de mayor producción haciendo de este una de las hortalizas más importantes en cuanto a la generación de empleo y riqueza (FAOSTAT, 2011). En el Cuadro 1 se muestran los principales países productores de esta hortaliza.

En el año 2011 según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), los principales productores de tomate a nivel mundial son China, India, Estados Unidos de América, Turquía y Egipto (FAOSTAT, 2011). Estos países han producido durante los últimos 10 años cerca del 70% de la producción mundial.

Cuadro 1 Principales países productores de tomate. Fuente: FAO STAT, 2011.

Posición	Región	Producción (1000\$ Int)	Símbolo	Producción (T)	Símbolo
1	China	17952256	*	48576853	*
2	India	6218283	*	16826000	
3	Estados Unidos de América	4665634	*	12624700	
4	Turquía	3456461	*	11003400	
5	Egipto	2995412	*	8105260	
6	Irán (República Islámica del)	2522015	*	6824300	Im
7	Italia	2198987	*	5950220	
8	Brasil	1632234	*	4416650	
9	España	1356850	*	3821490	
10	Uzbekistán	955322	*	2585000	*
11	México	900180	*	2435790	
12	Federación de Rusia	813258	*	2200590	
13	Ucrania	780371	*	2111600	
14	Nigeria	556071	*	1504670	
15	Túnez	474520	*	1284000	
16	Portugal	460240	*	1245360	
17	Marruecos	456843	*	1236170	Im

18	Grecia	432352	*	1169900
19	República Árabe Siria	426842	*	1154990
20	Iraq	391567	*	1059540

* : Cifras no oficiales

[]: Datos oficiales

Im : Datos de FAO basados en una metodología de imputación.

La producción global de tomate para consumo en fresco y proceso industrial se estima en 108 millones de Tm, con un rendimiento promedio de 36 Ton / Has. Sin embargo, en los últimos años la producción mundial se ha mantenido estable, con un nivel promedio anual sobre los 100 millones de Ton principalmente debido al aumento en el rendimiento antes que al aumento de la superficie cultivada (INFOAGRO, 2003; FAOSTAT, 2011). Cabe mencionar que el consumo del tomate en fresco ha aumentado a diferencia de la pulpa y el jugo que se han mantenido en valores constantes. La pulpa de tomate es el principal producto que se obtiene del proceso agroindustrial, con una producción que asciende los 2,74 millones de Ton en 1990 a 4 millones de Ton en 2002. Los mayores productores mundiales de pasta de tomates, después de los EE.UU. son Italia, Turquía, Grecia y China (Escalona *et al.*, 2009).

En el Ecuador el cultivo de tomate ha variado significativamente desde el año 2006 hasta el año 2011 (Figura 1). La producción en campo abierto generalmente es de 11.5 Tm/Has/ciclo mientras que en ambientes protegidos los rendimientos oscilan entre 140 – 180 Tm/Has/ciclo (Tigrero y Ortega, 2002).

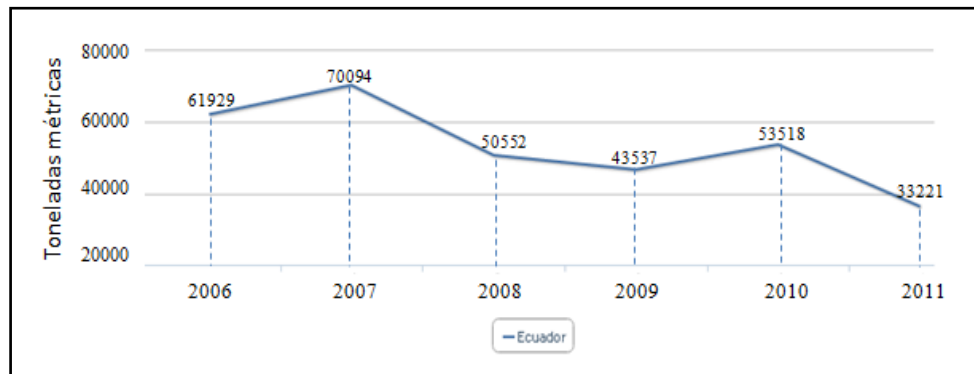


Figura 1 Producción del tomate en el Ecuador. Fuente: FAO STAT. 2011.

El valor de una caja de tomate de primera que pesa 18 kilos en el mercado cuesta cerca de 12 dólares americanos (USD) mientras que producirla cuesta 7,00 USD (Diario El Comercio, 2011). Se asigna un rubro importante de la ganancia obtenida en la producción a la compra y aplicación de insumos y agroquímicos para controlar plagas y enfermedades. Estos patógenos constituyen un factor limitante en la producción de tomate en diferentes países debido a que existen cerca de 200 enfermedades de diversas causas y etiologías que atacan este cultivo. Es por ello que para controlar estos patógenos se usan cultivares resistentes o diferentes métodos de control tanto químico como físico (Jones *et al.*, 2001). Sin embargo, el uso excesivo de éstos encarece los costos de producción y ocasiona efectos nocivos al medio ambiente y la salud humana (Jaramillo *et al.*, 2007).

La composición química del tomate depende del cultivar, las condiciones del cultivo, la época de producción, el grado de madurez y el almacenamiento (Escudero, 2004). Jaramillo, Rodríguez, Guzmán, Zapata y Rengifo (2007) reportan que el tomate es una rica fuente de vitaminas A, B1, B2, B6, C y E; de minerales como fósforo, potasio, magnesio, manganeso, zinc, cobre, sodio, hierro y calcio. Su valor nutricional aumenta debido a la presencia de proteínas, hidratos de carbono, fibra, ácido fólico, ácido

tartárico, ácido succínico y ácido salicílico. Posee apenas 25 calorías por cada 100 gramos (Cuadro 2).

Cuadro 2 Tabla de valores nutricionales del tomate. Fuente: Guevara y Estrella, 2008.

Elemento	Contenido (en 100 g de tomate)
Valor Nutritivo Medio (VNM)	2,39
VNM por 100 g de materia seca	38,50
Agua	93,50 g
Proteína	0,90 g
Grasa	0,10 g
Energía	20,00 kcal
Carbohidratos	3,30 g
Fibra	0,80 g
Cenizas	
Fosforo	19,00 mg
Calcio	7,00 mg
Hierro	0,70 mg
Vitaminas	
Vitamina A (alfa y beta caroteno)	1700 UI
Vitamina B1 (tiamina)	0,10 mg
Vitamina B2	0,02 mg

Vitamina B5	0,60 m g
Vitamina C	21,00 m g
El pH del jugo oscila entre 4 y 4,5	

El fruto constituye un magnífico depurador de la sangre y un vigorizante del organismo por su riqueza en vitaminas y sales minerales. Es un laxante natural que ayuda en casos de obesidad y trastornos del hígado. Los tomates frescos y maduros se utilizan para desinflamar los ojos, mediante la aplicación de rodajas en las partes afectadas durante unos minutos. Los médicos aseguran que el tomate es un poderoso estimulante del apetito, recomendado a niños con problemas de alimentación por falta de apetito. Algunas investigaciones han descubierto que el licopeno, pigmento rojo de los tomates, es un compuesto que previene el cáncer de pulmón, próstata y tracto digestivo ya que actúa como protector de las células ante los efectos de la oxidación (Jaramillo *et al.*, 2007).

1.4.1.2 Taxonomía y morfología

La clasificación filogenética de las Solanáceas fue revisada a finales de los años 70 por el Comité Internacional de Nomenclatura Hortícola, de manera que el anterior género *Lycopersicum*, se integró al nuevo género *Solanum* con su nueva nomenclatura. *Solanum* sección *lycopersicum* incluye el tomate cultivado (antes *Lycopersicum esculentum*) y 12 especies silvestres (Pérez, 2010). Taxonómicamente el tomate está descrito en la Tabla 1

Tabla 1 Taxonomía del tomate *Lycopersicon esculentum*. Fuente: Cantuña, 2013.

Taxón	Nombre
Super-reino	<i>Eukaryota</i>
Reino	<i>Viridiplantae</i>
Phylum	<i>Streptophyta</i>
Subreino	<i>Tracheobionta</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Solanales</i>
Familia	<i>Solanaceae</i>
Subfamilia	<i>Solanoideae</i>
Tribu	<i>Solaneae</i>
Género	<i>Solanum</i>
Subgénero	<i>Lycopersicum</i>
Descriptor	Miller
Sinónimos	<i>Lycopersicon esculentum</i> <i>Solanum esculentum</i> Dunal <i>Solanum esculentum</i> <i>Solanum lycopersicum</i> L.

Lycopersicon esculentum var. *esculentum*
 tomato
Lycopersicon lycopersicum

Etimológicamente *Lycopersicon esculentum* hace referencia a dos palabras griegas que significan:

Lycopersicon: nombre genérico que procede del griego *Lykopersokon*, que es el nombre de una planta egipcia de olor desagradable.

esculentum: epíteto latino que significa comestible, haciendo referencia a los frutos de esta planta, los tomates.

El tomate riñón es una planta dicotiledónea que pertenece a la familia de las Solanáceas, se caracteriza por tener haces bicolaterales y una estructura floral modelo (K 85) [C (5) A (5)] G (2), es decir, flores radiales con cinco estambres. En la Figura 2 se muestran ciertas partes de la planta de tomate riñón (Nuez, 1995).



Figura 2 Imágenes de las flores, hojas y el fruto de la planta de tomate riñón (*S. lycopersicum*). Fuente: UNNE, 2002.

El tomate es una planta perenne de porte arbustivo que se cultiva anualmente y puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta y erecta. El crecimiento es limitado en las variedades determinadas e ilimitado en las variedades indeterminadas pudiendo en estas últimas llegar a medir hasta 10 m de longitud en un año (Nuez, 2001).

La ramificación es generalmente simpodial con ejes sucesivos que se desarrollan a partir de la yema axilar del eje precedente mientras que la yema terminal se origina desde la inflorescencia o ramas abortivas. Por otro lado, el sistema radical desarrolla una potente raíz principal cuando la planta crece directamente de la semilla sin sufrir trasplantes lo cual le permite adaptarse a ecosistemas semidesérticos, pero cuando la raíz principal se daña, a consecuencia del trasplante, se desarrolla un sistema de raíces laterales adventicias (Nuez, 2001; Hernández *et al.*, 2003).

Generalmente la planta presenta dos hábitos de crecimiento: determinado e indeterminado (Figura 3). La primera tiene tallos con segmentos que presentan paulatinamente menos hojas por inflorescencia y siempre terminan en una inflorescencia, lo que resulta en un crecimiento limitado. La segunda es la normal y se caracteriza por tener un crecimiento extensivo, postrado, desordenado y sin límite; los tallos presentan segmentos uniformes con 3 hojas (con yemas) y una florescencia, terminando siempre con un ápice vegetativo (Ñuño, 2007; Escalona *et al.*, 2009).

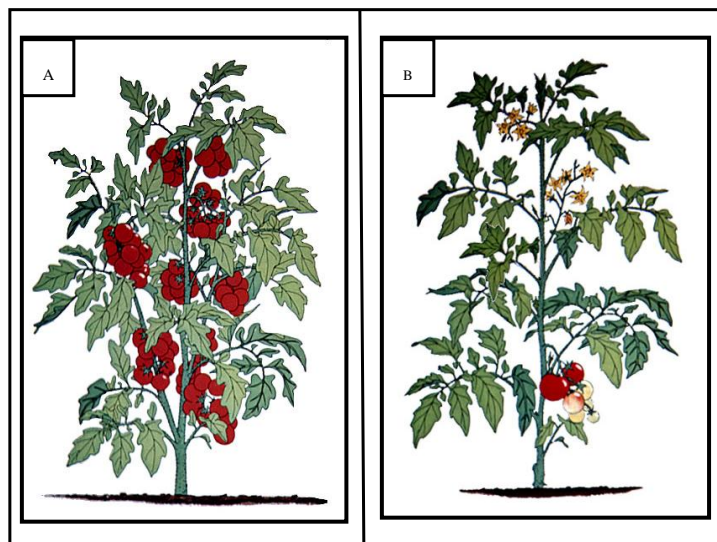


Figura 3 Crecimiento de la planta de tomate riñón. A. Crecimiento determinado. B. Crecimiento indeterminado. Fuente: Dogliotti, 2011.

El sistema radical alcanza una profundidad de hasta 2 m, con una raíz pivotante o principal y muchas raíces secundarias o adventicias. En caso de dañarse la raíz pivotante la planta desarrolla un sistema secundario fasciculado donde predominan raíces adventicias en los primeros 30 cm de perfil (Escalona *et al.*, 2009). Seccionando transversalmente la raíz pivotante de fuera hacia dentro encontramos: epidermis, donde se ubican los pelos absorbentes especializados en tomar agua y nutrientes, córtex y cilindro central, donde se sitúa el xilema para el transporte de nutrientes (INFOAGRO, 2003).

El tallo es ligeramente anguloso, semileñoso de grosor mediano entre 2 – 4 cm en su base con tricomas, simples y glandulares, sobre el que desarrollan las hojas, tallos secundarios e inflorescencias. En la parte distal se encuentra el meristemo apical, donde inician los nuevos primordios foliares y florales (Escalona *et al.*, 2009). La estructura de fuera hacia dentro consta de: epidermis, de donde parten los pelos glandulares, corteza o córtex, cuyas células más externas son fotosintéticas y las más internas son colenquimáticas, cilindro vascular y tejido medular (INFOAGRO, 2003).

Las hojas son compuestas e imparipinnadas con folíolos peciolados, lobulados y bordes dentados, recubiertos con pelos glandulares dispuestos de forma alternada en el tallo (Ñuño, 2007; Escalona *et al.*, 2009). El mesófilo o tejido parenquimático está recubierto por una epidermis superior sin cloroplastos y una epidermis inferior con un alto número de estomas. Los haces vasculares son prominentes en el envés y constan de un nervio principal (INFOAGRO, 2003).

La flor consta de 5 o más sépalos de igual número de pétalos de color amarillo dispuestos de forma helicoidal, de igual número de estambres que se alternan con los pétalos de forma perfecta. El ovario es bi o plurilocular, los estambres están junto a las anteras y forman un cono estaminal que envuelve el gineceo evitando la polinización cruzada, así también las flores se agrupan en inflorescencias denominadas racimos. La primera flor se forma en la yema apical y las otras se disponen lateralmente por debajo de la primera alrededor del eje principal de manera que las inflorescencias se desarrollan cada 2 – 3 hojas debajo de las axilas (Escalona *et al.*, 2009). La flor se une al eje floral por medio de un pedicelo articulado que contiene una zona de abscisión la cual se caracteriza por un pequeño surco originado de una reducción del espesor del córtex (INFOAGRO, 2003).

La diferenciación y desarrollo de la flor constituyen etapas previas a la fructificación, por lo tanto factores como temperatura, iluminación, competencia con otros órganos de la planta, nutrición mineral y tratamientos con reguladores de crecimiento influyen en la precocidad, rendimiento y calidad de los frutos. Otro factor que afecta es la de ramificación de la planta, continuada en cultivares de crecimiento indeterminado y específica según la época en cultivares determinados (Nuez, 1995).

La fructificación (Figura 4) depende de la cantidad y la calidad de polen además de la viabilidad de los óvulos. En definitiva, el polen es más sensible a bajas temperaturas que los óvulos mientras que a temperaturas elevadas la viabilidad de los óvulos es reducida. El número de semillas que contiene el fruto y el volumen del mismo son proporcionales al número de óvulos fecundados así como a la cantidad y calidad del polen (INFOAGRO, 2003).

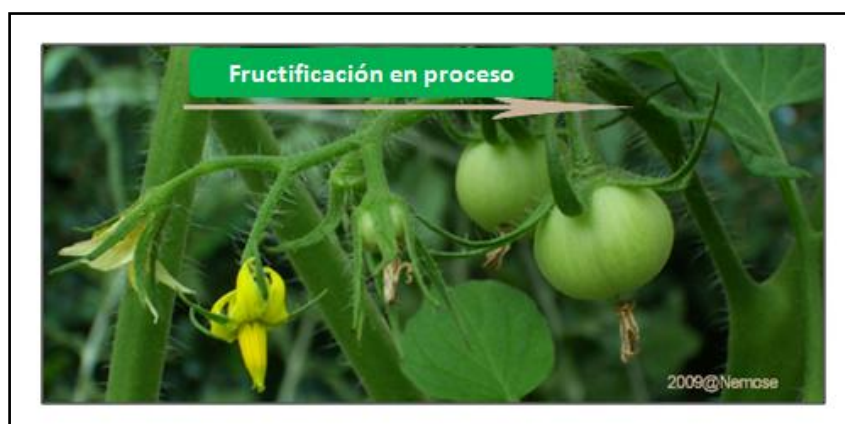


Figura 4 Cuajado o fructificación del tomate riñón. Fuente: Malaga, 2011.

El fruto es una baya bi o plurilocular que puede alcanzar un peso de hasta 600 gramos dependiendo de la variedad de tomate. Los frutos de invernadero son rojos, redondos, mediano de 2 a 5 lóculos, integrado por el pericarpio, el tejido placentario y las semillas (Ñuño, 2007). El fruto se puede recolectar separándolo por la zona de abscisión del pedicelo, o por la zona peduncular de unión al fruto (INFOAGRO, 2003).

La calidad del fruto para su comercialización debe cumplir características como buen sabor, color homogéneo (rojo, carmesí, rojo oscuro), resistir al transporte y

almacenaje. Frutos duros generalmente se logran a temperaturas inferiores a los 30 °C con un buen manejo de riego (Hernández *et al.*, 2003).

El sabor del fruto depende del contenido de ácidos y azúcares, el pH del fruto debe ser inferior a 4,4 y el contenido de azúcares totales no debe ser mayor a 4 - 4,5 % . La acidez es inferior a temperaturas sobre los 30 °C dando como resultado frutos con menos sabor que se deterioran con rapidez a temperaturas superiores a 20 °C (FAO, 2002).

La temperatura del aire es un factor importante en el crecimiento vegetativo, el desarrollo de racimos florales, y en el fruto interviene en el cuaje, desarrollo, maduración y calidad. Los rangos para el desarrollo óptimo del cultivo oscilan entre los 28 - 30 °C durante el día y 15 - 18 °C durante la noche. Temperaturas sobre los 35 °C y menores de los 10 °C durante la floración provocan la caída de flor y limitan el cuajado del fruto (Nuez, 1995; Corpeño, 2004).

La luz solar es vital en el crecimiento de la planta debido a su intervención en la fotosíntesis. Sin embargo, el fotoperiodo o largo del día no afectan a este cultivo puesto que sus necesidades de luz oscilan entre 8 y 16 horas. En general, días soleados sin nubes estimulan el crecimiento y el desarrollo normal del cultivo (Corpeño, 2004).

La humedad relativa óptima oscila entre un 65 - 70 % , dentro de este rango se la polinización se favorece, pero si la humedad es menor del 45 % la tasa de transpiración de la planta aumenta ocasionando un estrés hídrico con cierre de estomas reduciendo la fotosíntesis afectando directamente la polinización (Corpeño, 2004).

1.4.1.3 Enfermedades y plagas

Estudios de la Asociación de Agrónomos Indígenas de Cañar (AAIC) en el 2003 indican que la pérdida de rendimientos de los cultivos por plagas y enfermedades es cerca del 10 al 30 %. Sin embargo, estos valores aumentan entre un 40 - 48 % con plagas como ácaros, nematodos, malezas, pájaros y roedores. Por último, las pérdidas post cosecha son cerca del 10 - 20 % .

Existen distintas plagas y enfermedades que atacan este cultivo y su severidad depende del clima y la región. Las enfermedades se producen por organismos microscópicos como hongos, bacterias, virus y nematodos los cuales establecen un estado de anormalidad en la planta que se asocia a un deterioro en su estructura e incluso en la muerte (Escalona *et al.*, 2009). Por otra parte, el término plaga hace referencia a todos los seres vivos que causan daños a las plantas, incluyendo a vertebrados, artrópodos, moluscos, gusanos y nematodos.

La manifestación de una enfermedad se debe a tres factores principales cuya importancia depende de la susceptibilidad e interacción del patógeno. El primer factor asocia la presencia de patógenos en el medio, relacionando la dinámica ecológica de los suelos en cuanto a la diversidad y la regulación poblacional. El segundo factor corresponde a la condición del hospedero tomando en cuenta su resistencia o tolerancia frente a la interacción con un determinado patógeno. Finalmente, el tercer factor corresponde al medioambiente, es decir, las condiciones edafoclimáticas donde se establece el cultivo (Escalona *et al.*, 2009).

En la Tabla 2 se describen las principales plagas que atacan al cultivo de tomate riñón tomando en cuenta el daño que ocasiona.

Tabla 2 Principales plagas que afectan al tomate riñón. Fuente: Productores de Hortaliza, 2006.

PLAGAS	Insectos	Ácaros	Nematodos
Chupadores	Áfidos / pulgones (<i>Aphis sp.</i>) Mosca blanca (<i>Bemisia tabaci</i>)	Ácaros (<i>Aculops lycopersici</i>) Araña roja (<i>Tetranychus Urticae</i>)	
Masticadores	Orugas (<i>Agrotis ipsilon</i>) Gusanos (<i>Spodoptera sp.</i>)		
Minadores	Minador de la hoja (<i>Liriomyza sp.</i>)		Nematodo de la raíz (<i>Meloidogyne spp</i>)

Entre el grupo de los chupadores tenemos:

Áfidos o pulgones. Son insectos chupadores en forma de pera y cuerpo flexible con o sin alas y protuberancias en el abdomen (Figura 5). La ninfa y el adulto chupan la savia de hojas, brotes, tallo y flores, y a su vez inyectan saliva tóxica ocasionando que las

hojas se enrollen reduciendo el vigor de la planta, achaparramiento, marchitez e incluso la muerte. Se dispersan por el viento desde malezas, rastrojos o cultivos cercanos y pueden transmitir varias enfermedades virales (Corpeño, 2004; Productores de hortalizas, 2006).

Mosca blanca. Especie polífaga de amplia distribución considerada como una plaga primaria capaz de transmitir virus (Figura 5). Los adultos se alimentan extrayendo la savia del tejido foliar retardando el crecimiento, deteriorando la calidad de los frutos y reduciendo la capacidad fotosintética de las hojas debido a la mielecilla que las cubre (Productores de hortalizas, 2006; Nuño, 2007; Escalona, 2009).

Ácaros. Son artrópodos microscópicos con un alta capacidad reproductiva dependiendo de las condiciones ambientales su ciclo de vida es de 4 – 10 días (Figura 5). La planta presenta deformaciones en hojas, ramas tiernas y frutos pequeños ocasionando un achaparramiento general que suele confundirse con una bacteriosis o virosis (Corpeño, 2004, Productores de hortalizas, 2006).

Araña roja. Son organismos microscópicos que extraen la savia penetrando la epidermis del envés de las hojas (Figura 5). El follaje infestado adopta un aspecto blancuzco mientras que el envés se recubre de un tejido sedoso o telarañas (Corpeño, 2004; Productores de hortalizas, 2006).

Los masticadores son *orugas* y *gusanos*, considerados como una plaga primaria durante la etapa de plántula en época seca (Figura 5). El daño que ocasionan es irreversible, debido a que cortan los tallos de la planta a nivel del suelo. Algunos gusanos afectan el follaje o perforan el fruto (Corpeño, 2004).

Los principales minadores son:

Minador de la hoja considerado como una plaga secundaria de clima cálido, atraviesa por 6 estadios en 18 días. Las hembras insertan los huevos entre el haz y envés de las hojas, seguido de ello las larvas forman minas para alimentarse y desarrollarse (Figura 5). Afecta a racimos florales, frutos, brotes axiliares y terminales de la planta, sin embargo, son más susceptibles las hojas viejas (AAIC, 2003; Corpeño, 2004; Nuño, 2007).

Nematodo de la raíz. Especialmente el género *Meloidogyne* conocido como agallador de los nódulos o de las raíces, son endoparásitos sedentarios que penetran fácilmente la raíz, polívoros de amplia distribución por actividades de labranza y plantas contaminadas. Las hembras fecundadas se llenan de huevos tomando un aspecto globoso dentro de las raíces. Generalmente, el ciclo biológico es de 30 días dependiendo de las condiciones edafoclimáticas. El principal daño de esta plaga es la formación de nódulos en la raíces produciendo la obstrucción de vasos, impidiendo el paso de agua y nutrientes provocando un escaso desarrollo de la planta con un debilitamiento generalizado, deshidratación y reducción en la producción (Figura 5). Esta plaga afecta a todos los cultivos hortícolas e interactúa con otros organismos de forma activa como vectores de virus o de forma pasiva facilitando la entrada de hongos y bacterias por las heridas que provocan (INFOAGRO, 2003; Productores de hortalizas, 2006; Escalona, 2009).



Figura 5 Esquema de las principales plagas que afectan al cultivo de tomate según el daño que ocasionan a la planta.

Las principales enfermedades que atacan al tomate riñón teniendo en cuenta su origen se describen en la Tabla 3.

Tabla 3 Principales enfermedades que afectan al tomate riñón. Fuente: AAIC, 2003. Nuño, 2007. Escalona *et al.*, 2009.

ENFERMEDADES	
Bacterias	<i>Pseudomonas (Pseudomonas spp)</i> <i>Xanthomonas (Xanthomonas spp)</i> Cáncer bacteriano (<i>Clavibacter michiganensis</i>)
Virus	Virus del rizado amarillo del tomate TYLCV Virus del bronceado de Tomate TSWV Virus del mosaico del tomate ToMV Virus del enanismo arbustivo del tomate TBSV
Hongos	<i>Alternaria (Alternaria alternata)</i>

	Fusarium (<i>Fusarium</i> spp)
	Rizoctonia o tizón temprano (<i>Rhizoctonia solani</i>)
	Tizón tardío (<i>Phytophthora infestans</i>)
	Cenicilla (<i>Oidium</i> spp)
	Podredumbre gris (<i>Botrytis</i> spp)
	Erwinia (<i>Erwinia caratovora</i>)

Dentro del grupo las bacterias tenemos:

Pseudomonas. Ocasionalmente ocasionan la peca bacteriana afectando hojas, tallos, peciolo y frutos (Figura 6). En el follaje las manchas son de color café oscuro rodeadas de un halo amarillo mientras que en los frutos las lesiones son pequeñas rodeadas de una aureola verde. El desarrollo de la enfermedad se favorece en climas fríos, lluviosos (Corpeño, 2004).

Las xanthomonas. Producen la mancha bacteriana en las partes aéreas de la planta (Figura 6). Inicialmente las hojas se oscurecen y aparecen puntos circulares, luego las manchas se vuelven aceitosas y orillas negras y posteriormente éstas se resecan, se agrietan y se rodean de un halo amarillo. En los frutos aparecen puntos negros rodeados de un halo blanco. Se desarrolla a temperaturas entre 24 – 30 °C propagándose fácilmente por aspersión y lluvia (Corpeño, 2004).

El cáncer bacteriano. Ocasionalmente ocasionado por *Clavibacter michiganensis*, inicia con el decaimiento y la marchitez de las hojas basales. Internamente en el tallo las venas se revientan produciendo el cáncer tomando una coloración café o amarilla (Figura 6). En el fruto las lesiones son blancas hasta tornarse café con una aureola blanca. Se propaga por lesiones del tejido de la planta o por salpicaduras de agua, uso de herramientas y equipo contaminado usado en poda, corte o trasplante. A temperaturas entre 18 – 24 °C

con una humedad relativa sobre el 80 % esta enfermedad favorece su desarrollo (Corpeño, 2004).

Los virus que afectan este cultivo son:

Virus del rizado amarillo del tomate TYLCV. Los síntomas se presentan en el cultivo luego de dos a tres semanas de la infección ocasionando graves pérdidas. En las hojas detiene el crecimiento, los folíolos se reducen y se tornan amarillentos, mientras que los frutos reducen su tamaño (Figura 6). El virus es adquirido de plantas afectadas por la larva de la mosca blanca y transmitido por el adulto (INFOAGRO, 2003).

Virus de Bronceado de Tomate TSWV. Las hojas presentan puntos o manchas necróticas afectando a los peciolo y tallos, como consecuencia se reduce el crecimiento de la planta (Figura 6). Los frutos maduran irregularmente con manchas anormales y necrosis. Esta enfermedad se transmite por medio de Trips en campo abierto e invernadero (INFOAGRO, 2003).

Virus del mosaico del tomate ToMV. En general reduce el crecimiento de la planta. Las hojas presentan un mosaico verde claro – verde oscuro mientras que los frutos aparecen manchas pardo oscuras que se necrosan (Figura 6). La transmisión ocurre por semillas contaminadas o por interacción mecánica (INFOAGRO, 2003).

Virus del enanismo arbustivo del tomate TBSV. Este virus es el responsable de la clorosis y amarillamiento fuerte en hojas apicales formando un mosaico, igualmente

produce necrosis en las hojas, peciolo y tallo (Figura 6). Se transmite por el suelo a través de las raíces y semillas contaminadas (INFOAGRO, 2003).

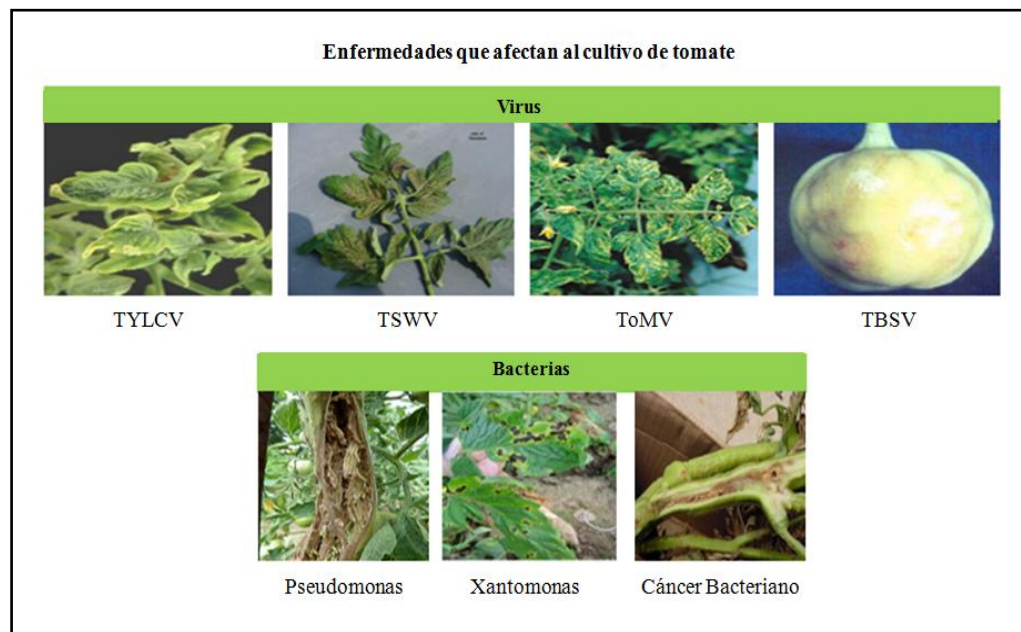


Figura 6 Principales enfermedades ocasionadas por bacterias y virus que atacan al cultivo de tomate *S. lycopersicum*. Fuente: AAIC, 2003

En el grupo de los hongos se encuentran:

Alternaria. Produce un chancro negro en el tallo a nivel del suelo, pero lesiona también hojas, tallos, frutos y peciolo (Figura 7). En las hojas, tallos y peciolo aparecen manchas circulares con anillos concéntricos, mientras que en frutos las

manchas son pardo oscuras. Las principales fuentes de dispersión son: plantas silvestres, semillas infectadas y plantas enfermas. Las conidias se dispersan a través de agua, lluvia y viento; el desarrollo se favorece a temperaturas entre 3 – 35 °C mientras que la esporulación aumenta en noches húmedas seguido de días soleados a temperaturas elevadas (INFOAGRO, 2003).

Fusarium. Afecta las raíces y el cuello de la planta ocasionando un marchitamiento en general (Figura 7). Se inicia con la caída de los peciolo de hojas superiores hasta afectar los otros órganos aéreos, internamente el tallo es color café oscuro. El hongo penetra las raíces hasta llegar al sistema vascular y puede permanecer en el suelo durante años. Se disemina mediante semillas, viento, labores de suelo, plantas enfermas o herramientas contaminadas. La temperatura óptima para el desarrollo de esta plaga es de 28 °C (AAIC, 2003; INFOAGRO, 2003).

Rizoctonia o tizón temprano. Ataca principalmente a plantas cargadas con frutos, presenta pequeñas manchas concéntricas en hojas y tallo mientras que en los frutos la mancha es marrón oscuro (Figura 7). Se propaga a través de viento, lluvia y goteras en invernaderos, su desarrollo se favorece a temperaturas entre 18 – 20 °C (AAIC, 2003).

Tizón tardío. Afecta la parte aérea de la planta en cualquier etapa de desarrollo debido a que se introduce por los estomas (Figura 7). La infección se produce desde el cáliz hasta cubrir la mitad superior del fruto, en hojas las manchas son irregulares de aspecto aceitoso que se necrosan invadiendo todo el foliolo, en el tallo en cambio las manchas son pardas. Se dispersa por lluvias, vientos, riegos por aspersión, rocíos y gotas de condensación. El desarrollo de esta plaga se favorece a humedades relativas superiores a 90 % y temperaturas entre 10 – 25 °C (AAIC, 2003; INFOAGRO, 2003).

Cenicilla. Se caracteriza por presentar pústulas de polvo blanquecino en hojas y tallos (Figura 7). En ataques severos se pierden racimos florales, hojas e incluso plantas. Se propaga a través de la lluvia, viento y las personas que trabajan en el invernadero. Las condiciones favorables para el desarrollo es humedad relativa inferior al 60 % acompañado de temperaturas de 17 – 30 °C (A A I C , 2003).

Podredumbre gris. Ataca a cultivos hortícolas ocasionando el “*damping off*” o caída de las plántulas debido a que afecta el pie de las plántulas recién nacidas ocasionando su muerte (Figura 7). En hojas y flores las lesiones son pardas, en frutos en cambio la podredumbre es blanda pudiendo observarse el micelio gris en el tejido. Las conidias se dispersan por el viento, salpicaduras de lluvia, gotas de condensación en plástico y agua de riego. La enfermedad se desarrolla a temperaturas entre 17 – 23 °C con una humedad relativa sobre el 95 % (I N F O A G R O , 2003).

Erwinia. Este hongo permanece en el suelo o sobre los restos de plantas enfermas tornando de color pardo al tallo, amarillo al follaje y marchitando la planta (Figura 7). Se propaga a través del agua de riego y las condiciones que favorecen el desarrollo de esta plaga son temperaturas entre 5 – 37 °C, hidrometrías elevadas y altas humedades en el suelo (A A I C , 2003).

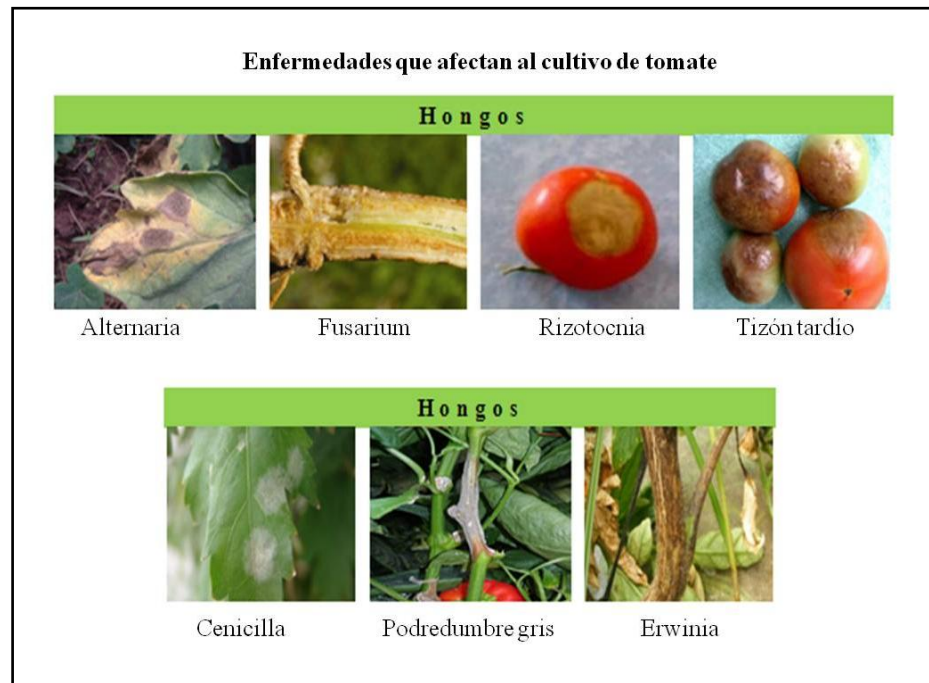


Figura 7 Principales enfermedades ocasionadas por hongos que afectan al cultivo de tomate *S. lycopersicum*. Fuente: AAIC, 2003

1.4.1.4 Métodos de control

El manejo integrado de plagas y enfermedades (MIPE) consiste en el uso de métodos de control contra plagas y enfermedades, basado en la biología y ecología (AAIC, 2003; Corpeño, 2004).

Según Escalona (2009), el MIPE se basa en: a) monitoreo de la dinámica poblacional de la plaga o enfermedad, b) integración de la mayor cantidad de medidas de control físicas, químicas o biológicas posibles de implementar durante el cultivo, y c)

reducción de niveles poblacionales de la plaga o enfermedad, bajo un determinado umbral económico.

El enfoque del M IPE es conservar en lo posible la estabilidad del agro ecosistema, manteniendo a los fitopatógenos en niveles que no causen daños económicos utilizando todas las alternativas posibles contra los mismos a fin de mantener densidades poblacionales tolerables (Corpeño, 2004).

La primera etapa del control implica el reconocimiento del agente causal con el fin de comprender su ciclo de vida, las condiciones ambientales óptimas para su desarrollo y los medios de dispersión. Para ello, se establece el monitoreo con el objetivo de determinar la presencia del patógeno a través de conteo de individuos (Escalona, 2009).

Los medios de control que implementa el M IPE, corresponden a labores culturales y manejo químico que se utilizan de forma normal durante el desarrollo del cultivo (Escalona, 2009). Sin embargo, el control químico debería ser el último paso debido a que pueden aplicarse otros métodos y técnicas antes de un agroquímico, pero por falta de información el productor moderno está educado y entrenado por la agroindustria para usar productos químicos como el único método de control (A A I C, 2003).

Según Corpeño (2004) y Escalona (2009) existen diferentes prácticas de M IPE entre las cuales podemos mencionar:

Control Cultural. Elimina rastrojos del cultivo anterior, prepara los suelos, toma en cuenta la época de siembra, rota los cultivos, elimina los hospederos, proporciona una buena fertilización, usa barreras vivas y variedades tolerantes o resistentes.

Control Mecánico. Incluye el uso de trampas de luz, cebos de afrecho con melaza, pegamentos, repelentes y atrayentes con el fin de controlar e identificar los insectos voladores. Elimina plantas enfermas.

Control Físico. Utiliza mallas protectoras e involucran los sistemas destinados a interponer barreras o trampas.

Control Biológico. Utiliza patógenos, depredadores y parásitos que sirven para controlar insectos plagas o feromonas para atraer machos adultos y evitar la reproducción.

Control Químico. Este control requiere monitorear las plantaciones por lo menos tres veces por semana para identificar las plagas y enfermedades así como la calidad de las aplicaciones y la efectividad de los productos. Se recomienda usar junto al pesticida tinta fluorescente para visualizar el sitio donde cayó, a fin de utilizar el pesticida específico y las dosificaciones adecuadas tomando en cuenta el umbral de daño económico, intensidad y fase de desarrollo de la plaga u enfermedad. La calidad del pesticida se ve afectada por el pH del agua por otro lado el uso de penetrantes, adherente o surfactantes mejoran su aplicación.

1.4.2 *Meloidogyne* spp.

Los nematodos formadores de nudos son miembros del Género *Meloidogyne*, nombre de origen griego que significa “hembra en forma de manzana”. Constituye un grupo polífago obligado el cual es económicamente importante por su alta adaptación a los cultivos y su distribución a nivel mundial ya que parasita casi todas las especies de plantas superiores. Se reproducen y se alimentan de células vivas dentro de las raíces de las plantas en los que inducen agallas pequeñas y grandes, o nudos en la raíz (Perry *et al.*, 2009).

Los nematodos son enemigos invisibles por su pequeño tamaño y porque su efecto es evidente cuando el nivel poblacional es alto. Ellos no sólo debilitan las plantas disminuyendo su rendimiento por acción directa sobre las raíces, sino que también actúan en complejos etiológicos que involucran hongos, bacterias y virus. Los huéspedes altamente infectados no muestran síntomas externos. Como consecuencia se produce el retraso del crecimiento, falta de vigor y marchitamiento bajo estrés hídrico. La infección secundaria por otros agentes patógenos ocasiona el decaimiento de la planta debido a que *Meloidogyne* afecta la absorción de agua y nutrientes, por ende la traslocación hacia arriba por el sistema radicular. Al alterar la fisiología de la planta huésped, los nematodos del nudo reducen el rendimiento del cultivo y la calidad del producto generando pérdidas económicas (Taylor y Sasser, 1983; Rodríguez *et al.*, 2005; Perry *et al.*, 2009).

Las pérdidas y el daño de los cultivos producido por los nematodos es mayor en zonas tropicales que en zonas templadas debido a las condiciones ambientales favorables para la colonización, desarrollo, reproducción y dispersión. La severidad del

daño por *Meloidogyne* depende de la especie, del huésped, de la rotación del cultivo, la temporada y el tipo de suelo. Sin embargo, se han establecido umbrales de daño para varios cultivos donde la media es de 0,5 – 2 juveniles por g de suelo o tomando en cuenta el límite inferior de detección de 1000 individuos en 500 cm³ de suelo (Perry *et al.*, 2009).

El primer reporte ilustrado de la enfermedad del nematodo del nudo apareció a mediados del siglo 19 con el clérigo Miles Joseph Berkeley cuando atribuyó las agallas de las raíces de zanahoria a los nematodos. La primera descripción del nematodo formador del nudo la realizó Cornú en 1879, basado en los nematodos encontrados en las raíces de pipirigallo (*Onobrychis viciifolia*) en Francia. Göldi en 1887 realizó una descripción breve de los nematodos del café en Brazil y los nombró como *M. exigua*. Chitwood desde 1949 retiró a los nematodos del nudo del Género *Heterodera* debido a sus diferencias con los nematodos de quiste, quedando con el nombre de *Meloidogyne* desde Göldi por su primera descripción. Sin embargo, Chitwood los nombró con *M. arenaria*, *M. exigua*, *M. incognita* y *M. javanica*, y describió por primera vez a *M. hapla*. En ese tiempo las especies fueron separadas unas de otras por los patrones perineales, forma del estilete, longitud del estilete y orificios de las glándulas dorsales de hembras, machos y juveniles de la segunda etapa (J2) (Perry *et al.*, 2009).

1.4.2.1 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. comprende: huevo, cuatro estadios juveniles y el adulto. La duración de cada estadio difiere entre las especies y depende de factores como la temperatura, la humedad y la planta hospedante. En general el ciclo dura de 3 –

4 semanas a temperaturas entre 25 – 30 °C. El rápido desarrollo y reproducción de estos nematodos en buenos hospedantes depende del alto número de generaciones en cada temporada de cultivo (Hernández-Ochandía *et al.*, 2012).

Las hembras dejan los huevos en masas gelatinosas compuestas por una matriz de glicoproteínas producida en las glándulas renales, manteniendo los huevos juntos y protegiéndolos del ambiente y predadores. La masa de huevos usualmente se encuentra en la superficie de las raíces agalladas, inicialmente es suave y pegajosa pero se hace firme y café oscura con el tiempo (Perry *et al.*, 2009). El desarrollo del huevo comienza breves horas después de la ovoposición hasta que se ve una larva completamente formada con un estilete enrollada en la membrana del huevo (Taylor y Sasser, 1983).

Dentro del huevo, la embriogénesis inicia con una primera etapa juvenil que muda a la etapa infectiva J2. La eclosión de J2 depende de la temperatura y la humedad. La habilidad de *Meoidogyne* para sobrevivir se relaciona con adaptaciones fisiológicas y bioquímicas incluyendo el retraso de la embriogénesis y la reserva de lípidos que prolongan la viabilidad de J2 hasta encontrar e invadir al huésped (Perry *et al.*, 2009). La larva del segundo estadio larval puede o no dejar la masa de huevos y moverse a través de la raíz o en el suelo en busca de una nueva raíz para alimentarse, esta búsqueda es al azar hasta que la larva se acerca a centímetros de la raíz. A partir de allí, se guía por una sustancia que emana la raíz hasta la punta radicular (Taylor y Sasser, 1983; Rahman, 2003).

El juvenil J2 empieza a alimentarse después de invadir la punta de la raíz y se mueve a través de la misma hasta encontrar un sitio permanente de alimentación. En este sitio se alimenta de células del protoxilema y protofloema e induce a las células a

diferenciarse en células gigantes, una vez ocurrido esto el nematodo se vuelve sedentario y se alarga. Bajo condiciones favorables, el estado J2 muda al tercer estado juvenil (J3) y después de 14 días pasa al cuarto estado juvenil (J4) para finalmente pasar a la etapa adulta. J3 y J4 carecen de un estilete funcional y no se alimentan al igual que los machos (Perry *et al.*, 2009). La larva se agranda a lo ancho a nivel de las glándulas esofágicas durante la formación de las células gigantes y las agallas. Las células del primordio genital se divide y éste se agranda observándose dos ramificaciones en la hembra o un cuerpo alargado en el macho (Figura 8) (Taylor y Sasser, 1983; Perry *et al.*, 2009).

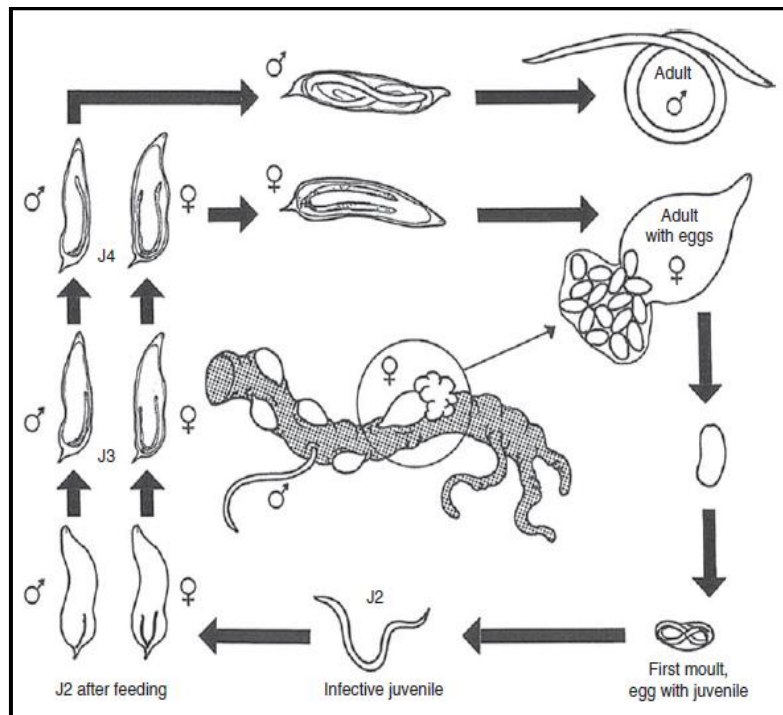


Figura 8 Ciclo de vida del nematodo del nudo, *Meloidogyne*. J2 segundo estado juvenil, J3 tercer estado juvenil; J4 cuarto estado juvenil. Fuente: Perry *et al.*, 2009.

Las células gigantes son funcionalmente similares a estructuras denominadas sincitios los cuales son inducidos por hembras sedentarias de otros nematodos parásitos de plantas, pero se diferencia en su desarrollo. Estas células no son sólo multinucleadas al contener cerca de 80 núcleos sino que cada núcleo individual es poliploide y algunos contienen hasta 8 veces más el número de cromosomas. Esto demuestra que las células gigantes inducidas por *Meloidogyne* spp. son ejemplos únicos de cómo los parásitos pueden afectar el desarrollo normal del huésped (Perry *et al.*, 2009).

Se reproducen por fertilización cruzada (amfimixis), por partenogénesis mitótica obligada, o ambas fertilización cruzada y partenogénesis meiótica facultativa. El proceso de partenogénesis se inicia en el extremo distal de las gónadas donde existen células que se dividen formando oogonios. Estas células maduran y por una nueva división mitótica se forman oocitos. Posteriormente comienza a madurar el huevo conservando el número diploide de cromosomas (Perry y Moens, 2006). El número de cromosomas varía entre especies, en especies con meiosis el número haploide de cromosomas varía entre $n = 14$ a 19 . En especies con mitosis el número de cromosomas diploides varía entre $2n = 30$ a 56 (Eisenback *et al.*, 1981).

La partenogénesis meiótica es una reproducción facultativa, en condiciones favorables la cantidad de hembras es mayor y se desarrolla con normalidad, pero cuando el alimento es menos abundante un gran porcentaje de las larvas se vuelven machos para cumplir con la partenogénesis meiótica (Sasser, 1982; Perry y Moens, 2006). La maduración de los ovocitos durante la meiosis en la partenogénesis facultativa y la fertilización cruzada implica el emparejamiento de los cromosomas homólogos, pudiendo observarse la formación de tétradas en la metafase. Las especies con partenogénesis obligada no sufren meiosis y los oocitos maduran en una división mitótica observándose las diadas o el número de cromosomas en la metafase.

Las especies que se reproducen por partenogénesis son las únicas que poseen machos en su población, su número depende de la provisión de alimentos y otros factores. La partenogénesis mitótica es el modo de reproducción de *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y algunas poblaciones de *M. hapla* (Tabla 4). Estas especies cuentan con un sistema reproductor conformado por dos ovarios con una zona germinal, una zona de crecimiento, un oviducto, una espermatoteca y un útero (Taylor y Sasser, 1983; Perry y Moens, 2006; Song, 2007).

Tabla 4 Tipo de reproducción de las principales especies del género *Meloidogyne*. Fuente: Sasser, 1982.

Especie	Modo de reproducción
<i>M. incognita</i>	Partenogénesis mitótica
<i>M. javanica</i>	Partenogénesis mitótica
<i>M. arenaria</i>	Partenogénesis mitótica
<i>M. hapla</i>	Partenogénesis meiótica facultativa Partenogénesis mitótica

1.4.2.2 Taxonomía y morfología

Las especies de *Meloidogyne* forman una pequeña parte del *Phylum* Nematoda o Nematoda que incluye parásitos del hombre y de animales, parásitos de plantas y especies que viven en el suelo, agua fresca y el mar. Pertenecen a la Clase *Secematea*, Orden *Tylenchida*, Superfamilia *Tylenchoidea*, y Familia *Meloidogynidae* (Taylor y Sasser, 1983).

Las fuentes de referencia más importantes para los nematodos de nudo de la raíz inician con la monografía de Chitwood en 1949. Sasser en 1954 y Taylor en 1955 describen la importancia de los patrones perineales en la identificación de las especies. Inicialmente estos resultados fueron útiles para el diagnóstico pero debido a la variabilidad y el número de especies estos generaron errores en la identificación. Es con el uso de isozimas y técnicas moleculares que la identificación empezó a ser específica. En 1971 se revisó el género y se incluyó 32 especies, luego de cinco años se incrementó a 54 especies y 2 sub especies. Finalmente, en el 2006 se validaron 89 especies (Perry *et al.*, 2009).

La morfología de las diferentes especies de *Meloidogyne* es similar. Sin embargo, existen ciertas distinciones que permiten la diferenciación entre ellas. Dentro de las características morfológicas se incluye los patrones perineales, la cabeza tanto de hembras, machos y segundo estadio juvenil y la morfología del estilete de hembras y machos (Perry *et al.*, 2009). Sin embargo, una población no debe ser identificada sólo con los valores de las medidas que proporcionan las características morfológicas, puesto que éstos son variables y se superponen (Eisenback *et al.*, 1981). La Figura 9 muestra el desarrollo morfológicamente de los diferentes estadios del ciclo de vida del nematodo formador de nudo de la raíz.

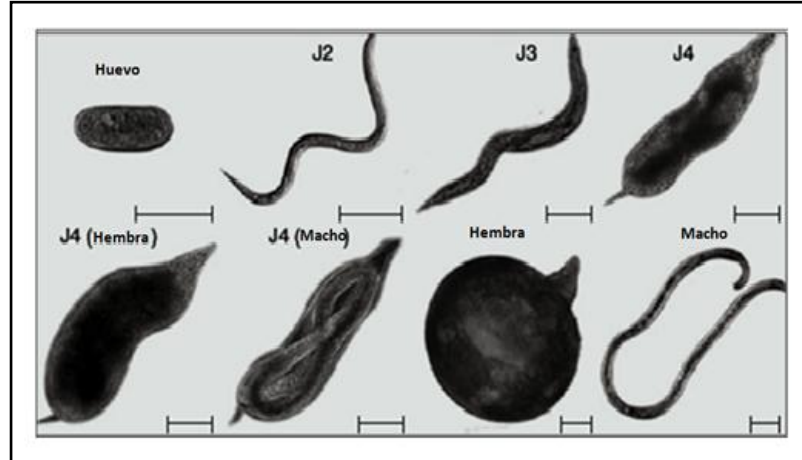


Figura 9 Desarrollo morfológico de los estadios del nematodo del nudo *Meloidogyne* spp. Escala: 40 μ m. Fuente: Perry *et al.*, 2009.

1.4.2.3 Especies importantes en suelos agrícolas descritas en Ecuador

En el Ecuador el género *Meloidogyne* ataca alrededor de 800 plantas de diferentes especies de la Costa, Sierra y Oriente. Los cultivos con mayores pérdidas económicas son las hortalizas, las leguminosas y frutales (Revelo, 2002). El Cuadro 3 muestra la relación entre de las diferentes especies de *Meloidogyne* spp. con los cultivos agrícolas que atacan en el Ecuador.

Cuadro 3 Especies de nematodos y su relación con ciertos cultivos agrícolas de interés en el Ecuador. Fuente: Revelo *et al.*, 2007.

Especie nematodo	Cultivo
<i>M. incognita</i>	Tomate riñón (<i>Solanum lycopersicum</i>)
	Tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)
	Fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i>)
	Col (<i>Brassica oleraceae</i>)
	Pimiento (<i>Capsicum annum</i>)
	A rveja (<i>Pisum sativum</i>)
	Haba (<i>Vicia faba</i>)
	Banano (<i>Musa x paradisiaca</i>)
	Máiz (<i>Zea mays</i>)
	Maní (<i>Arachis hypogaea</i>)
Naranjilla (<i>Solanum quitoense</i>)	
<i>M. javanica</i>	Caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i>)
	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)
<i>M. hapla</i>	Papa (<i>Solanum tuberosum</i>)
	Rosas en invernadero (<i>Rosa spp.</i>)
<i>M. arenaria</i>	Piretro (<i>Crysanthemum cinerariaefolium</i>)
	Fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L)

Existen más de 80 especies de *Meloidogyne* distribuidas en el mundo, sin embargo, el mayor daño económico se atribuye a las cuatro especies más comunes *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla*. En el Ecuador se encuentran presentes las cuatro especies, siendo la más abundante y diseminada *M. incognita* con un 80 % de incidencia poblacional seguido de *M. javanica* (Triviño *et al.*, 2003).

1.4.2.5.1 *Meloidogyne incognita*

M. incognita es un polífago extremo que ataca a plantas cotiledóneas y no cotiledóneas. Se distribuye a nivel mundial, pero se restringe en cultivos protegidos en regiones templadas. Esta especie a diferencia de las otras tiene una amplia área de distribución geográfica, desde los 40 °N de latitud y 33 °S de latitud, lo cual le proporciona una vasta gama de huéspedes (Eisenback *et al.*, 1981; Perry *et al.*, 2009). Se reproduce exclusivamente por partenogénesis mitótica dando dos formas cromosómicas, la primera tiene $2n = 32 - 36$ cromosomas y se considera diploide, mientras que la segunda es $2n = 40 - 46$ cromosomas y probablemente es triploide, ésta última es la más difundida alrededor del mundo (Eisenback *et al.*, 1981).

Las medidas útiles para la identificación morfológica se basa en la longitud total de J2 de 346 – 463 μm , la longitud de la cola de 42 – 62 μm , desde el final de la cabeza a la base del estilete de 14 – 16 μm , la longitud del estilete de la hembra de 15 – 17 μm y la longitud del macho de 23 – 25 μm (Eisenback *et al.*, 1981).

Morfológicamente, la hembra de *M. incognita* tiene forma de pera sin protuberancias terminales, los patrones perineales (Figura 10 K) tienen un arco dorsal compuesto de estrías lisas u onduladas, y algunas de ellas se bifurcan cerca de las líneas laterales careciendo de incisuras laterales. El estilete parte de la región faríngeal (Figura 10 A) es cónico ligeramente curvado en el dorso, cuya longitud varía entre 15 – 16 μm , la porción anterior del cono es cilíndrico mientras que la posterior es cónica con un eje ligeramente amplio. En la región anterior de la cabeza (Figura 10 B - D) el disco labial y los labios medios son en forma de pera con dos bulbos en el lado ventral del disco labial. Los labios laterales son largos y se separan del labio medio. Los machos lateralmente se

caracterizan por su cuerpo anillado (Figura 10 H). En la región anterior (Figura 10 E) el disco labial es largo y redondeado, en el centro es cóncavo y se eleva por encima de los labios medios en la cabeza marcado por 2 ó 3 anulaciones incompletas. El estilete es despuntado y amplio en la porción media del cono. La cola nace a un cuarto de la punta de la cola en la región anterior del cuerpo del macho (Figura 10 F - G). La parte anterior del segundo estadio J2 es aguzada (Figura 10 I), en la cabeza el disco labial es pequeño y redondeado ligeramente elevado sobre los labios medios con los que esta fusionado para formar el casco labial con forma de corbatín. Los labios medios son más anchos que el disco labial mientras que los labios laterales yacen en el contorno de la región de la cabeza usualmente de 2 a 3 anulaciones, la longitud es de 350 - 450 μm , la cola mide entre 43 - 65 μm con una región de hialina de 6 - 14 μm y la punta redondeada (Figura 10 J) (Eisenback *et al.*, 1981; López, Salazar y Azofoita, 1991; Perry *et al.*, 2009).

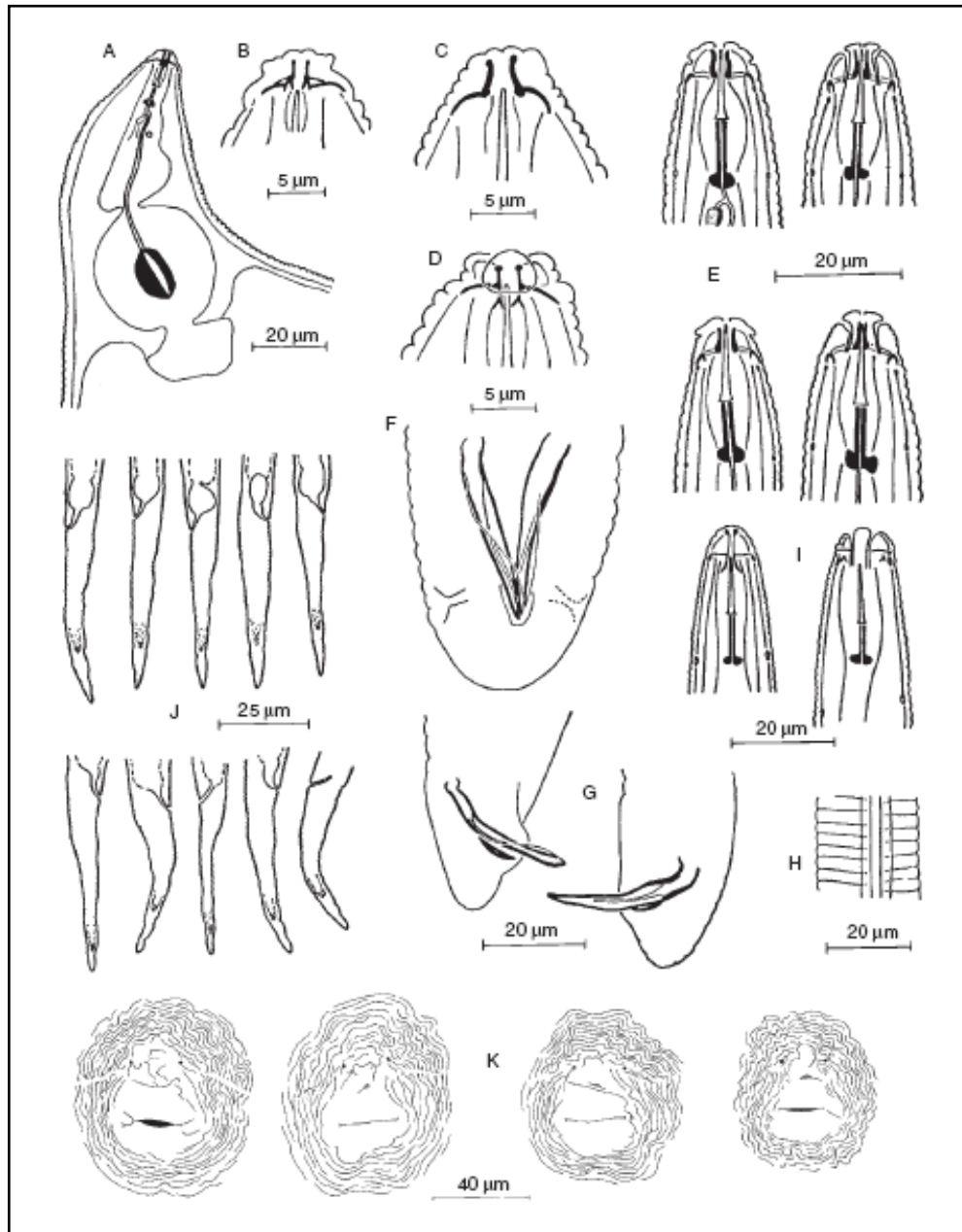


Figura 10 *Meloidogyne incognita*. A: región faríngeal de la hembra; B-D: región anterior de la hembra; E: región anterior del macho; F-G: región de la cola del macho; H: campo lateral del macho; I: región anterior de J2; J: región cola de J2; K: patrones perineales. Fuente: Perry *et al.*, 2009.

Otra técnica utilizada en la identificación es la “Prueba de anfitrión diferencial de Carolina del Norte” donde todas las razas de *M. incognita* se reproducen en pimiento, melón y tomate; pero varía en tabaco y algodón por la resistencia de la planta (Eisenback *et al.*, 1981).

La prueba con isozimas generalmente muestra una sola banda correspondiente a la esterase tipo II, sin embargo puede existir otra banda perteneciente a la malato deshidrogenasa N1. La variabilidad de la esterase es mínima, y sólo una población no tiene este fenotipo. En cambio la malato deshidrogenasa N1 es parecida en *M. javanica*, *M. exigua* y algunas poblaciones de *M. arenaria* en cuanto al fenotipo (Eisenback *et al.*, 1981; Perry *et al.*, 2009).

1.4.2.5.2 *Meloidogyne javanica*

M. javanica es un polífago que ataca a plantas mono y dicotiledóneas (Perry *et al.*, 2009). Se distribuye alrededor del mundo y se restringe en cultivos protegidos en regiones templadas (Perry *et al.*, 2009). Se reproduce exclusivamente por partenogénesis mitótica y el número de cromosomas varía entre $2n = 43$ a 48 . Todas las poblaciones tienen la misma forma cromosómica, es decir, son triploides (Eisenback *et al.*, 1981).

Las medidas útiles para la identificación morfológica se basa en la longitud total de J2 de $402 - 560 \mu\text{m}$, la longitud de la cola de $51 - 63 \mu\text{m}$, desde el final de la cabeza a la base del estilete de $14 - 16 \mu\text{m}$, la longitud del estilete de la hembra de $14 - 18 \mu\text{m}$ y la longitud del macho de $18 - 22 \mu\text{m}$ (Eisenback *et al.*, 1981).

M orfológicamente las hembras son en forma de pera, sin protuberancias terminales. Los patrones perineales (Figura 11 F) pasan de redondos a planos en el arco dorsal, este patrón se caracteriza por las incisuras laterales que separan el patrón de la región dorsal de la región ventral mediante líneas paralelas y por la falta de estrías que crucen estas incisuras con la excepción de que algunas estrías doblan hacia la vulva. El estilete es similar a *M. incognita*, mide de 14 – 18 μm , con la diferencia de que el cono no se curva dorsalmente sin embargo aumenta su grosor en la parte posterior al igual que el eje; las protuberancias basales son cortas y gruesas. En la región faringeal en la cabeza (Figura 11 A) el disco y el labio medio son en forma de pesa, el disco labial posee dos bulbos prominentes en la zona ventral, en general los labios medios son mellados lo que sugiere que el labio se dividió en pares formando el labio medio, los labios laterales son largos y parten del labio medio a la región de la cabeza marcada por anulaciones incompletas. En los machos la cabeza posee un largo y difuminado disco labial, el capuchón de la cabeza es grande y grueso, se ha visto que algunas poblaciones no tienen anulaciones mientras que otras tienen de 2 a 3 anulaciones (Figura 11 B). El estilete es cónico, mide entre 19 – 24 μm de longitud. El eje es cilíndrico y generalmente se estrecha cerca de las protuberancias del estilete las cuales son cortas y gruesas y parten desde el eje. El segundo estadio J2 tiene una longitud de 400 – 560 μm , la longitud de la cola varía entre 47 – 67 μm con una región de hialina de 9 - 18 μm y punta finamente redonda (Figura 11 D). En la cabeza los labios medios y el disco labial son en forma de pajarita y los labios laterales son triangulares y están por debajo los mismos (Figura 11 C) (Eisenback *et al.*, 1981; Perry *et al.*, 2009).

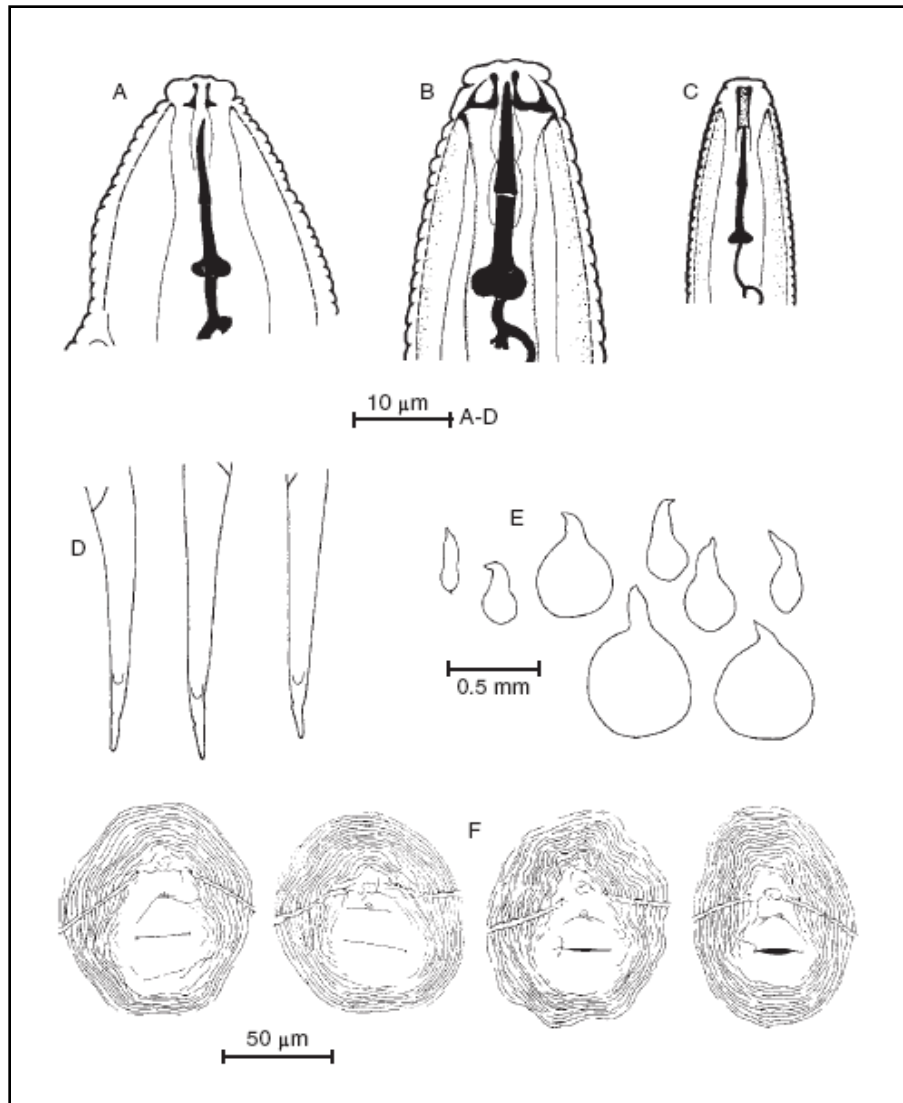


Figura 11 *Meloidogyne javanica*. A: región faríngeal de la hembra; B: región anterior del macho; C: región anterior de J2; D: región de la cola de J2; E: variación de los patrones perineales. Fuente: Perry *et al.*, 2009.1

La “Prueba de anfitrión diferencial de Carolina del Norte” aplicada en *M. javanica* muestra que esta especie se reproduce en plantas de tabaco, sandía y tomate pero no en algodón, pimienta y maní (Eisenback *et al.*, 1981).

La prueba con isozimas utiliza la estereasa de fenotipo J3, J2 o J2a, y la malato deshidrogenasa de tipo N1. La mayoría de las poblaciones de *M. javanica* poseen el fenotipo N1 para la malato deshidrogenasa, similar a *M. incognita*, *M. exigua* y algunas poblaciones de *M. arenaria*. Solo una población de *M. javanica* en Bangladesh y Corea tienen el fenotipo N3, similar al de algunas poblaciones de *M. arenaria* (Perry *et al.*, 2009).

1.4.2.4 Enfermedad del nudo de la raíz

Esta enfermedad es ocasionada por los nematodos del género *Meloidogyne* en la mayoría de cultivos. Los síntomas por encima del suelo son similares a muchas enfermedades de la raíz o factores ambientales que limitan la absorción de nutrientes y agua. Sin embargo, los síntomas más representativos se producen en las partes subterráneas de la planta donde las raíces infectadas se hinchan en el punto de infección y forman nudos o agallas a lo largo de la raíz o en la misma área (Rahman, 2003; Starr, 2011).

Estudios realizados para comprender la dinámica del desarrollo de síntomas típicos asociados a *Meloidogyne* spp. en raíces de tomate mostró que de 4 – 7 días posteriores a la inoculación, las plántulas exhiben zonas hinchadas y engrosamiento en los extremos de la raíz principal y las raíces laterales casi imperceptibles a simple vista. Sin embargo,

hacia el decimoquinto día, pequeñas agallas fueron evidentes en el sistema radical aumentando su tamaño entre 20 y 27 días después. Se ha visto que entre los primeros 7 - 10 días posteriores a la entrada de las raíces, la presencia de *Meloidogyne* puede pasar inadvertida (Hernández *et al.*, 2012). En la Figura 12 se observa las diferencias en el sistema radical de una planta no infectada con una planta infectada con nematodos *Meloidogyne* spp.

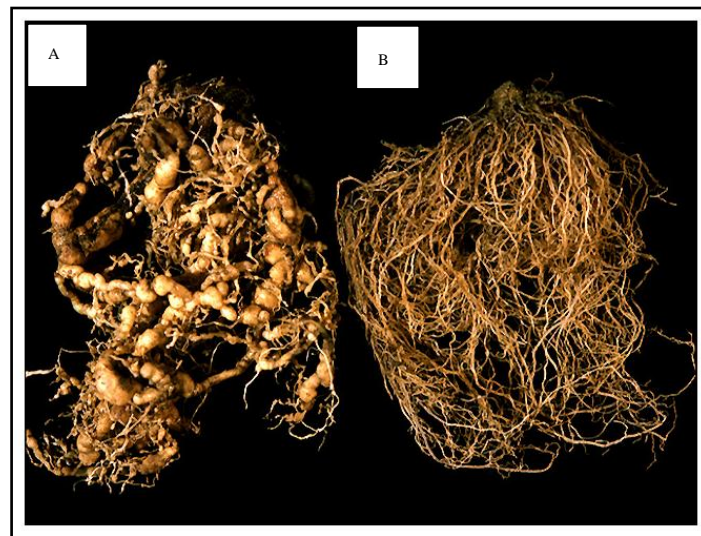


Figura 12 Sistema radical de plantas infectadas con nematodos *Meloidogyne* spp. A. Planta susceptible, B. Planta resistente. Fuente: Saradnelli, 2010.

En infecciones graves, se produce una disminución del rendimiento en los cultivos ocasionando significativas pérdidas para el agricultor. El grado de agallamiento depende de tres factores: la densidad de población de nematodos, las especies de *Meloidogyne* y la "raza", las especies de plantas huéspedes e incluso el cultivo (Mitkowski Abawi, 2003).

Esta enfermedad difiere de las otras por la naturaleza del patógeno gracias al complejo sistema nervioso del nematodo cuya capacidad desencadena reacciones definidas y localizadas en la planta huésped logrando un mayor contacto e infección. Además, el sistema sensorial le proporciona al nematodo la capacidad de seleccionar de forma activa y directa las plantas idóneas para su alimentación y nutrición (Arias *et al.*, 2009).

En el sitio de alimentación, los nematodos inducen un proceso de re diferenciación que conlleva la formación de células de alimentación multinucleadas como resultado de divisiones nucleares repetidas de la célula nodriza inicial sin citocinesis. Además, se desarrolla el decrecimiento típico de la pared celular, las células de la corteza, el periciclo y el parénquima vascular aumentan de tamaño y se dividen, formando la agalla que puede ser vista bajo el microscopio entre las 12 y 24 horas posteriores a la inoculación. Las zonas hinchadas en las raíces desde los 4 días luego de la inoculación demuestran el establecimiento exitoso de los nematodos J2 en el sitio de alimentación en las regiones de diferenciación celular (Arias *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2012).

Los nematodos no solo cuentan con enzimas y mecanismos para la degradación de las paredes celulares del hospedante y la formación de las células gigantes. Sino que también disponen de mecanismos adecuados para poner a trabajar a su favor el metabolismo de la planta infectada. Por ello, la identificación de los genes de la planta representa el mayor reto para entender como los nematodos alteran el desarrollo de la raíz para producir y mantener las células gigantes (Arias *et al.*, 2009).

Las secreciones del nematodo del nudo contienen efectores las cuales constituyen la señalización primaria en la interacción planta – nematodo. Esta interacción empieza

cuando J2 modifica su superficie en respuesta a las sustancias difusas de la raíz. Una vez el nematodo encuentra la señal empieza el trabajo de los diferentes órganos secretores como los de la cutícula que forman una pared sobre la superficie del mismo, con el fin de esconder al nematodo de los mecanismos de defensa de la planta y comenzar la infección. Adicionalmente secreta enzimas antioxidantes que lo protegen de los antioxidantes del huésped (Perry *et al.*, 2009).

Las anfidias perciben el ambiente, son dos órganos quimio sensoriales localizados en la cabeza del nematodo, las secreciones que se liberan a partir de ellas actúan como moléculas señal durante la interacción ocasionando la producción de elicitores en respuesta de defensa de las plantas. Las proteínas que se producen y se secretan desde las glándulas faríngeas a las células del huésped a través del estilete, son moléculas señal que suprimen la defensa del huésped e inducen la formación de células gigantes. Se conocen cerca de 60 proteínas con diferentes funciones de las cuales las más estudiadas son aquellas que degradan la pared celular, modulan la defensa de la plantas e inducen las células gigantes (Perry *et al.*, 2009).

Los juveniles J2 secreta enzimas degradadores y otras enzimas que participan en el suavizamiento y degradación de la pared celular durante la penetración y migración en los tejidos de la raíz. En el caso de las 1,4-endoglucanasas se activa con celulosa, las pectato liasas y poligalactunorasas se activan con pectinas y las xilanasas se activan con hemicelulosa. Adicionalmente, se han identificado proteínas homologas cuya función debilita los lazos intermoleculares entre los polisacáridos de la pared celular (Perry *et al.*, 2009). La glutatión S-transferasa (GST) secretada desde las glándulas faríngeas participan en la detoxificación de los componentes citotóxicos generados por la respuesta oxidativa de la planta (Perry *et al.*, 2009).

Durante el parasitismo se ha observado una baja regulación de los genes de defensa lo que sugiere una modulación activa de la planta por el nematodo lo cual puede evidenciarse con la corismato mutasa secretada por las glándulas faríngeas que juegan un papel importante en la supresión de defensa de las plantas, debido a que esta enzima participa en la síntesis de metabolitos secundarios como auxinas, flavonoides, ácido salicílico y fitoalexinas (Perry *et al.*, 2009).

Junto a la supresión de defensa de las plantas, el establecimiento exitoso de los nematodos depende de la diferenciación de las células del parénquima de la raíz en células gigantes especializadas, que proveen al nematodo los nutrientes necesarios para su desarrollo durante las 3 - 8 semanas antes de producir su progenie. El péptido 13-aminoácido 16D10, secretado por las glándulas faríngeas de J2, estimula el crecimiento de raíces laterales y participa conjuntamente con dos factores de transcripción durante el desarrollo de la planta. Además, tiene dominios CLE similares a los de la planta cuya función es controlar la diferenciación de las células del tallo con las del haz vascular y de la raíz con los meristemas apicales. De igual manera la inyección del péptido 16D10 en el citoplasma tiene la habilidad de inhibir los factores de transcripción (Perry *et al.*, 2009).

1.4.2.5 Respuesta de la planta al nematodo

En general, las plantas son atacadas por un sin número de plagas y enfermedades, y a pesar de ello la mayoría sobrevive. Esta habilidad de supervivencia se debe a las defensas que posee conjuntamente con la actividad de compensar tejido perdido o dañado. Dentro de estas defensas tenemos mecanismos estructurales y respuestas

bioquímicas que involucran mecanismos simples o complejos dependiendo del patógeno. Es importante diferenciar entre defensa y resistencia, el primero se refiere a una característica particular que ha evolucionado o se ha mantenido en la planta como resultado de una selección ejercida por el patógeno mientras que el segundo describe la capacidad de la planta para evadir o reducir el daño causado por sus atacantes (W alters, 2011).

En la naturaleza gran parte de las plantas son resistentes a agentes patógenos con los que entran en contacto. Por lo tanto existen plantas inmunes capaces de prevenir la penetración del patógeno, pero cuando un patógeno afecta a una determinada especie y no a otra se denomina resistencia del no huésped (W alters, 2011).

Cada planta puede ser huésped de diferentes patógenos y desplegar diferentes mecanismos de defensa según el atacante. En una misma planta puede existir más de un patógeno donde uno de ellos puede causar daños graves a la planta y otro en cambio no ocasiona ningún daño. Esta variación se describe como susceptibilidad donde una alta resistencia equivale a una baja susceptibilidad y viceversa como se muestra en la Figura 13 (W alters, 2011).

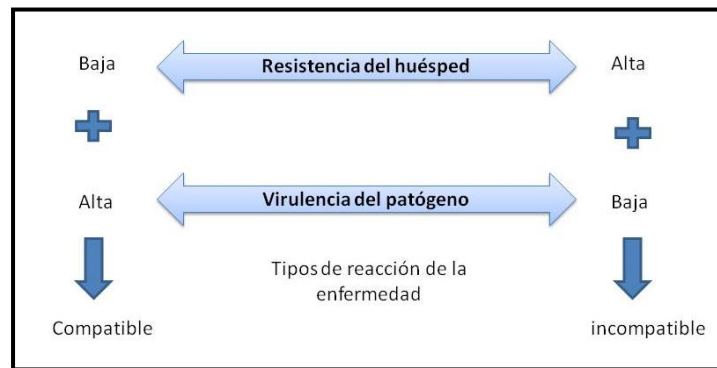


Figura 13 Relación entre la planta huésped, patógenos y la reacción de la enfermedad. Fuente: Walters, 2011.

Los nematodos parásitos tienen características que los distinguen de otros organismos, principalmente al alto nivel de desarrollo de los sistemas trófico, reproductivo, excretor y nervioso, así como al alto grado de motilidad, sistema sensorial sensitivo y la capacidad de seleccionar de forma activa las plantas necesarias para su alimentación y reproducción (Arias *et al.*, 2009).

Se conoce poco sobre los cambios moleculares que ocurren en la raíz durante la infección temprana, la inducción de las células gigantes o de la respuesta hipersensible. Los genes inducidos después de la infección son relevantes en la defensa contra nematodos u otros patógenos de las raíces aunque los mecanismos de defensa en las raíces son poco conocidos comparados con los de la parte aérea de la planta (Arias *et al.*, 2009).

Los complejos cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren durante el establecimiento de los sitios de alimentación se reflejan en la alteración de la expresión de los genes del hospedante, entre ellas tenemos heridas o estrés provocadas por el

nematodo, perturbaciones dirigidas hacia la iniciación y mantenimiento del sitio de alimentación. Debido a que muchos de los genes identificados al ser miembros de familias de genes con regulación compleja su respuesta es difícil de interpretar (Arias *et al.*, 2009).

Las defensas de las plantas contra los nematodos involucran mecanismos específicos y no específicos. El sistema de resistencia vertical, tanto en la planta como en el patógeno, se basa en la presencia en ambos de genes particulares y metabolitos específicos que codifican y tienen relevancia en las cascadas de la respuesta inmune la cual es preferencialmente inducida en plantas con un genotipo específico (Arias *et al.*, 2009).

En el sistema de resistencia horizontal la interacción se determina por mecanismos de defensa constitutivos que operan en la planta, esto fue evidenciado cuando se encontró genes de resistencia en la interacción tomate - *M. incognita*. Algunos genes de resistencia dominantes han sido identificados y mapeados por ejemplo en tomate *Mi*, *Mi-3* y *Mi-9*, en pimiento *Me3* o en maní *Ma*e y *Ma*g. El gen *Mi* ha sido clonado y pertenece a la clase de genes NBS-LRR la cual también incluye genes que dan resistencia a virus, bacterias y hongos (Arias *et al.*, 2009).

En plantas resistentes o con resistencia parcial en cambio se observa un desarrollo incompleto del nematodo con la formación de agallas seguida de una necrosis de las células. En estas plantas las células gigantes pueden no formarse o son defectuosas razón por la cual las larvas no completan su desarrollo como adultos y/o producir pocos huevos viables o ninguno. Una resistencia moderada también puede dar como resultado

la evolución del ciclo de desarrollo hacia la formación de machos la que requiere menos energía que la de una hembra (Arias *et al.*, 2009).

1.4.3 Diagnóstico de *Meloidogyne* spp.

La identificación precisa de los nematodos del nódulo de la raíz es crucial para el control eficaz de esta plaga y depende de la clasificación rápida y exacta de los patógenos involucrados. No obstante, la identificación a nivel de especie es compleja. Factores como la morfología conservada, la morfometría variable, los efectos de acogida, la variación intra específica, el modo de reproducción partenogenética, la existencia de especies críticas y aumento de las especies descritas dificultan esta tarea. La verificación de poblaciones así como la detección de nuevas especies requiere técnicas más exhaustivas que incluya morfología de patrones perineales en hembras adultas, forma del labio de J2 y hembras, morfología del estilete y en algunos casos pruebas bioquímicas y métodos moleculares (Perry *et al.*, 2009).

Por muchos años los patrones perineales de la hembra madura y varias características morfométricas y morfológicas de J2 fueron utilizados en la determinación de las especies. A estas metodologías se le agregaron las características del macho como la forma de la región labial, la forma del estilete y los nódulos basales (Perry *et al.*, 2009).

1.4.3.1 Identificación tradicional

La identificación tradicional requiere la observación morfológica tanto de juveniles J2 como de hembras y machos recolectados de muestras de raíces, de masas de huevos incubados o mediante la técnica Baermann (Perry *et al.*, 2009).

Perry y sus colaboradores en el 2009 describen ciertas características para identificar *Meloidogyne* spp tomando como referencia sus características morfológicas. Las hembras se caracterizan por la forma del cuerpo, región labial, longitud del estilete, forma del cono del estilete, eje y protuberancias basales, forma del arco dorsal, campo lateral, estrías y terminaciones de la cola y la relación de longitud entre el poro excretor y el estilete. Para los machos se mide el tamaño, forma y peso del capuchón labial, número de anulaciones, diámetro de la región labial, longitud del estilete, la forma del cono del estilete, eje y protuberancias basales, distancia del orificio (OGD) de la glándula dorsal desde la base del estilete, y longitud y forma de la espícula. En los juveniles J2 las características miden la longitud del cuerpo y del estilete, forma de la región labial, perfil de las protuberancias del estilete, distancia del OGD desde la base del estilete, número de líneas del campo lateral, y forma y longitud de la cola terminal.

Otra característica morfológica para identificar *Meloidogyne* son los patrones perineales que se localizan en la región posterior de la hembra adulta. Esta área comprende el perineo, cola terminal, líneas laterales y estrías cuticulares. La Figura 14 muestra la preparación para observar los patrones perineales de la hembra (Perry *et al.*, 2009).

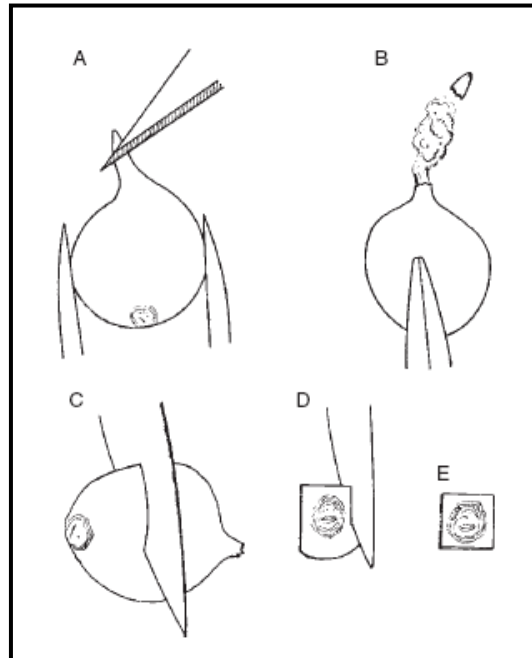


Figura 14 Preparación de las hembras para la observación de los patrones perineales. A, B: corte del cuello de la hembra y eliminación del contenido del cuerpo; C: cuerpo posterior del patrón perineal eliminado; D: recorte de la cutícula cerca del patrón perineal; E: recortado del patrón perineal listo para el montaje. Fuente: Perry *et al.*, 2009.

A nivel de la planta se pueden aplicar varias técnicas. La raíz puede teñirse con fucsina acida lactofenol o lactoglicerol para clarificar la infección del nematodo en el tejido radicular (Perry *et al.*, 2009). La forma de agallamiento con *Meloidogyne* generalmente ocasiona agallas en las raíces u otros órganos subterráneos aunque también puede parasitar tallos, hojas o flores e incitar la formación de agallas en estos tejidos. La apariencia física y la posición de las agallas permiten en algunos casos la identificación como en *M. javanica* y *M. incognita* tienden a formar agallas grandes e irregulares lejos de la punta de la raíz, mientras que *M. hapla* sólo agalla en raíces laterales (Perry *et al.*, 2009).

Al cultivo se le puede aplicar el “Test diferencial de huésped” propuesto por Sanger en 1954, esta técnica se basa en la respuesta de diferentes huéspedes y la cantidad de agallas que inducen para identificar las cinco especies de *Meloidogyne* descritas por Chitwood (1949) mediante la “Prueba de anfitrión diferencial de Carolina del Norte”. El proyecto Internacional de *Meloidogyne* (IMP) resume la respuesta de aproximadamente 1000 poblaciones de las cuatro especies de *Meloidogyne* (Perry *et al.*, 2009).

Los especímenes de *Meloidogyne* se pueden observar con el Microscopio electrónico de barrido, esta técnica requiere que los nematodos estén vivos y sean fijados con una solución buffer de 3 % de glutaraldehído con 0.05M fosfato. Las muestras se deshidratan con varios lavados de etanol, se secan con CO₂ líquido y se recubren con capas de una mezcla de oro – paladio aproximadamente de 20 – 30 nm de grosor (Perry *et al.*, 2009).

Adicionalmente existen otros procedimientos que se utilizan para la identificación. La información obtenida de la citogenética y citológica se utiliza como información suplementaria para la identificación de las especies. Las características citogenéticas más importantes son el modo de reproducción, el proceso de maduración de los oocitos y número de cromosomas (Eisenback *et al.*, 1981). Los anticuerpos mono y policlonales se produjeron principalmente para identificar *Meloidogyne* pero también se utilizan en investigaciones de la superficie del nematodo y las secreciones, interacciones con el huésped y otros parásitos, estudios de localización, desarrollo de anticuerpos en plantas y estudios de comportamiento. Los anticuerpos policlonales son altamente sensitivos y se utilizan para diagnosticar proteínas, por otro lado los anticuerpos monoclonales (Mabs) son altamente específicos con mejor reproductibilidad, sin embargo, su producción es cara e inestable (Perry *et al.*, 2009). La cuantificación de los nematodos

del nudo directamente del suelo usando anticuerpos no es exitosa por lo que algunas veces se requiere de la extracción de nematodos (Perry *et al.*, 2009).

El uso de las isozimas permite el análisis de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida lo cual proporciona información adicional para distinguir las especies, las isozimas más utilizadas son las estereasas, la malato deshidrogenasa y la α -glicerofosfato deshidrogenasa (Eisenback *et al.*, 1981; Perry *et al.*, 2009). Esta técnica aun es ampliamente utilizada a pesar de haber algunas limitaciones en el fenotipo de varias especies. Sin embargo, existen varios sistemas de isozimas utilizados como la estereasa/carboxilestereasa EST (EC 3.1.1.1) que provee la mejor discriminación de las especies, la malato deshidrogenasa MDH (1.1.1.37), dismutasa superoxidasa SOD (1.15.1.1) y la glutamato-oxaloacetato transaminasa GOT (EC 2.6.1.1) son isozimas usadas para confirmar la especie (Perry *et al.*, 2009).

Los patrones de estereasa para identificar las 4 especies más comunes de *Meloidogynese* pueden observar en la Figura 15. La movilidad electroforética relativa (Rf) de las estereasas principales se estandarizó a una banda de 50 para *M. hapla* ajustando el Rf para las otras especies. Solamente las bandas mayores de la estereasa aparentan tener un valor taxonómico, ya que las bandas menores son variables entre las especies (Eisenback *et al.*, 1981; Perry *et al.*, 2009).

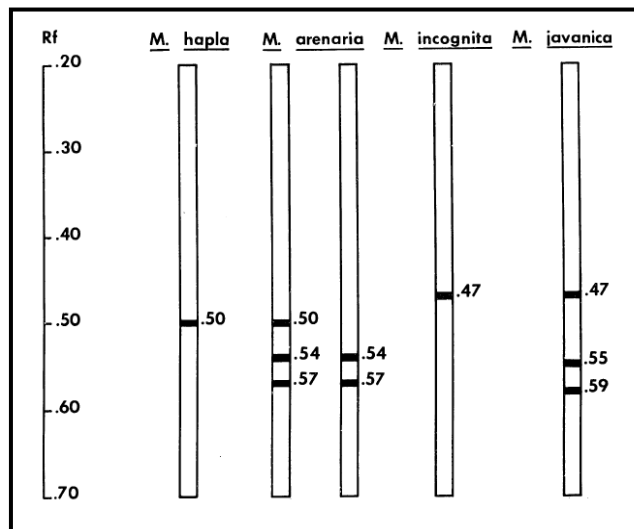


Figura 15 Patrones de estereasas en hembras de las cuatro especies de *Meloidogyne* reveladas en un gel de poliacrilamida y coloreado con alfa naftil acetato. Fuente: Eisenback *et al.*, 1981

1.4.3.2 Detección molecular

Las técnicas moleculares permiten adquirir un conocimiento profundo de la estructura del ácido nucleído, genética molecular, bioquímica de la transcripción y síntesis de proteínas. La correcta ejecución de estas técnicas determina la calidad de los resultados obtenidos en una investigación, por lo que cada técnica molecular debe ser realizada bajo un estricto orden y manejo de extrema precaución (Klug y Cummings, 1999; Douglas *et al.*, 2009).

La aplicación de las diferentes técnicas empleadas en biología molecular para el análisis del genoma, depende en gran medida de la habilidad para extraer el ADN. Por

esta razón, se utilizan diversos métodos de extracción dependiendo del tipo de tejido a emplear (Velasco, 2005).

Las fases de extracción de ADN tiene dos etapas fundamentales, la primera consiste en la desintegración del tejido, homogenización de los componentes celulares, y la segunda etapa comprende la separación, precipitación de los ácidos nucleicos y la dilución en una buffer adecuada (Zarate *et al.*, 2009).

La homogenización de la muestra depende de la técnica de desintegración tomando en cuenta el volumen y el tipo de muestra. Dentro de los métodos físicos podemos mencionar la sonicación, hervido, congelación-descongelación y choque osmótico mientras que entre los métodos químicos se encuentran los detergentes (SDS) o enzimas (lisozima, proteinasa K)(Bioquímica, 2009; Zarate *et al.*, 2009).

Luego de la ruptura de la pared celular y para facilitar la solubilización de los componentes celulares y complejos proteicos se utilizan soluciones de extracción o de lisis de alta o baja fuerza iónica en presencia de agentes quelantes y altas concentraciones de cloruro de calcio (NaCl). Estos reactivos se utilizan para proteger el ADN de la acción de las DNAsas sin afectar el material genético al capturar iones de magnesio evitando que actúen como cofactores de las nucleasas, para prevenir la contaminación de la muestra con polisacáridos que afecten la pureza del ADN y a su vez inhiban la actividad de enzimas como polimerasas, ligasas y endonucleasas de restricción, o para solubilizar proteínas, tejidos y membranas, evitando que una cantidad de ADN quede atrapada en los desechos o restos celulares (Velasco, 2005; Bioquímica, 2009; Zarate *et al.*, 2009).

La base para la separación de los polisacáridos y los ácidos nucleicos, es su solubilidad diferencial en presencia de altas concentraciones de NaCl mediante la precipitación. Los ácidos nucleicos son solubles en agua por el carácter hidrofílico de los grupos fosfato, de esta forma en una mezcla de solventes no miscibles luego de una incubación y centrifugación los ácidos nucleicos tienden a permanecer en la fase acuosa mientras que los lípidos y gran parte de las proteínas desnaturalizadas se encuentran en la fase orgánica. Los reactivos más usados para la separación son el fenol y el cloroformo ya sea por separado o en conjunto. El primero se utiliza para desnaturalizar y solubilizar proteínas y componentes celulares; el segundo permite la separación de las fases durante la centrifugación además de actuar como desnaturalizante (Velasco, 2005; Zarate *et al.*, 2009).

La precipitación de ácidos nucleicos de la fase acuosa permiten la purificación y concentración de ADN, usando alcoholes como etanol o isopropanol los cuales simultáneamente neutralizan las cargas negativas con sales y deshidratan la molécula para su posterior dilución (Velasco, 2005; Zarate *et al.*, 2009).

Se han descrito muchos métodos para extraer ADN puro de hembras, machos, de varios juveniles J2 o de uno solo mediante el método de tamizado de Baermann o la extracción de raíz o suelo de cada uno de los estadios requeridos. En algunos casos la extracción de ADN de un sólo J2 incluye aplastar al nematodo en un porta objetos con la punta de una micropipeta, tratarlo con hidróxido de sodio (NaOH) y con proteinasa K seguido de una buffer de lisis. Muestras grandes de nematodos juveniles o masas de huevos se realizan mediante fenol:cloroformo o usando kits comerciales (Perry *et al.*, 2009).

Se puede extraer ADN de agallas de plantas infectadas con *Meloidogyne* de muestras de suelo donde se encuentre el nematodo con kits comerciales o mediante soluciones preparadas (Perry *et al.*, 2009). Los métodos tradicionales se caracterizan por no requerir en ningún momento del uso de paquetes comerciales, las soluciones requeridas son elaboradas en el laboratorio y pueden ser modificadas según los requerimientos particulares. La extracción de ADN por estos métodos combina procesos químicos, físicos y mecánicos e incluye básicamente las mismas etapas para cualquier extracción de ADN (Falcón y Valera, 2007).

La extracción de ADN directamente del suelo se puede realizar mediante kits comerciales o métodos tradicionales siguiendo los mismos pasos homogenización, separación, precipitación y purificación. Sin embargo, estos métodos para detectar *Meloidogyne* spp. no han sido reportados debido a que la aplicación de diagnósticos molecular usando ADN total de suelo es limitado (Perry *et al.*, 2009).

Se ha descrito que la extracción de ADN de suelo sin kits comerciales recupera grandes cantidad de ADN pero con una baja pureza debido a que la remoción de ácidos húmicos no es tan eficaz como en los kits, y como consecuencia de ello se puede inhibir la reacción de PCR. Finalmente, el éxito de los protocolos es limitado, depende del organismo a ser estudiado, los genes y el tipo de suelo (Lars y Åflsa, 2006; María Rosa, Tauk y Ceccato-Antonini, 2010).

Generalmente los kits comerciales se utilizan cuando se requiere ADN de alta calidad o bien se trata de organismos de cierto grado de complejidad entre los cuales mencionamos PURIGEN, QUIAGEN, MILIPORE, GENTRA y MoBio. En general,

cada protocolo es modificado con el fin de ajustarlos a los requerimientos de los organismos en estudio o para mejorar los resultados obtenidos (Falcón y Valera, 2007).

Es importante la cuantificación de ADN para estimar la cantidad y la calidad de la muestra ya sea observando la intensidad de la banda en geles de agarosa donde el ADN es teñido o mediante técnicas de espectrofotometría de luz ultravioleta (Zarate *et al.*, 2009).

En las preparaciones de ácidos nucleicos, son frecuentes las impurezas de naturaleza proteica. Dado que los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) absorben luz UV, se puede estimar el grado de impurezas de origen proteico a partir del cociente de absorbancias A_{260}/A_{280} . La presencia de proteínas hará que este cociente sea menor que el esperado para un ADN puro. En general, muestras consideradas de alta pureza para ADN de doble hebra el coeficiente A_{260}/A_{280} es mayor o igual a 1.8 (Zarate *et al.*, 2009).

1.4.3.2.1 Técnica PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR), fue descrita por Kari Mullis en 1985 y 1988, considerada como una revolución de las técnicas moleculares se le otorgó el premio Nobel de Química en 1993. El eje focal de esta técnica radica en la capacidad de producir *in vitro* cantidades exponenciales de un fragmento definido de ADN a partir de una única copia y reacción, permitiendo con ello trabajar, manipular y estudiar a profundidad dicho fragmento. Esta técnica surge como una herramienta de estudio que brinda la posibilidad de trabajar con poco material

inicial, siendo un muestreo no invasivo o poco destructivo de organismos vivos y optimizando recursos cuando se cuenta con poca cantidad de muestra (Espinoza, 1998; Pérez, 2000; Sánchez y Saldaña, 2004; Rodríguez y Barrios, 2011).

La PCR se realiza en el termociclador, equipo que aumenta o disminuye la temperatura en ciclos que se repiten una y otra vez. La amplificación *in vitro* del DNA ocurre en tres pasos. A) Desnaturalización del ADN a copiar, mediante el aumento de temperatura 95 °C para separar la doble hélice del ADN en cadenas sencillas, luego el termociclador ajusta la temperatura entre 40 – 60 °C dando lugar al segundo proceso. B) Hibridación o apareamiento de los *primers* al ADN molde, estas secuencias pequeñas se unen a una de las cadenas del ADN molde de forma que sus extremos 3' – OH apuntan el uno hacia el otro delimitando la secuencia a amplificar. Posteriormente la polimerasa se une a la doble cadena de ADN recién formada y empieza a copiar en sentido 5'–3', agregando unas bases más los puentes de hidrógeno formados entre las bases estabilizan la unión y el oligonucleótido permanece en ese sitio para el siguiente paso. Ocurrido esto la temperatura sube a 72 °C donde la polimerasa alcanza su máxima actividad e inicia el tercer paso. C) Copia de las cadenas delimitadas por los *primers*, cada uno de los extremos 3' – OH de los *primers* apareados a la cadena molde son extendidos generando las cadenas hijas correspondientes (Espinoza, 1998; Pérez, 2000; Laboratorio de investigación ambiental, 2004; Sánchez y Saldaña, 2004; Rodríguez y Barrios, 2011). El proceso que realiza la PCR se muestra en la Figura 16.

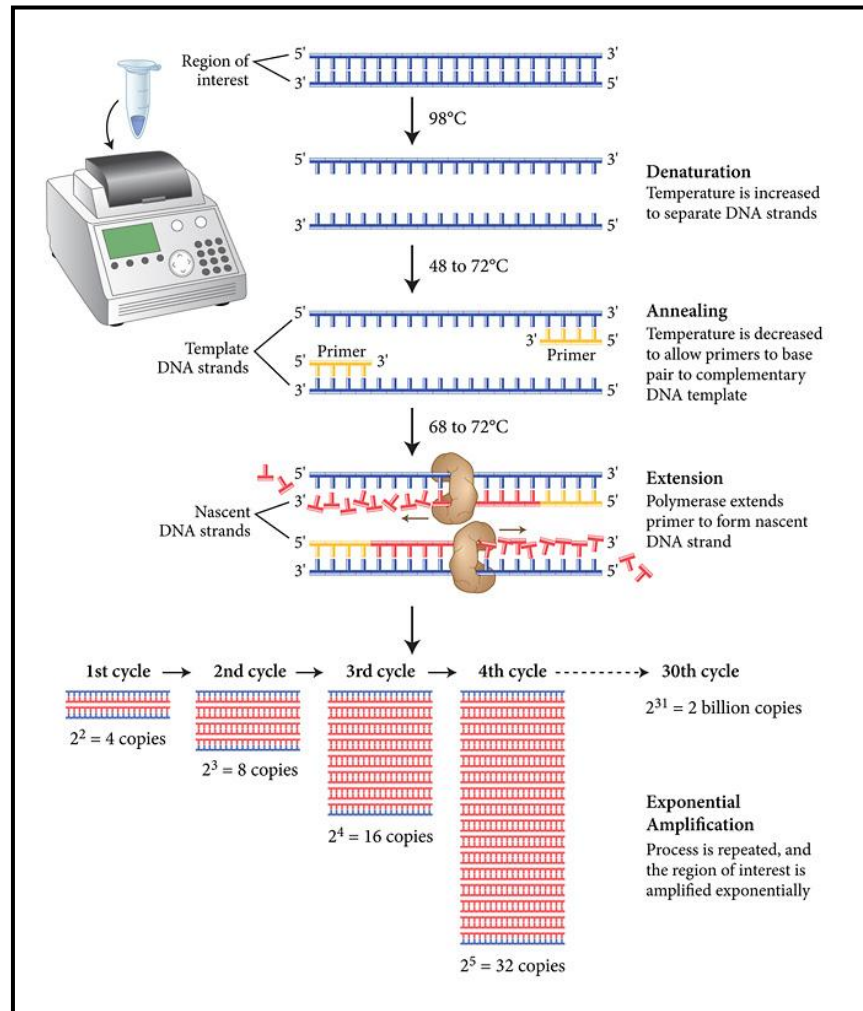


Figura 16 Amplificación del ADN mediante la técnica de PCR. Fuente: New England Biolabs, 2013.

La desnaturalización, hibridación y polimerización se repiten "n" veces, duplicándose en cada ciclo el número de cadenas delimitadas por los oligos. Este proceso se considera como una amplificación exponencial o logarítmica, donde las cadenas previamente sintetizadas sirven de molde para las futuras amplificaciones (Pérez, 2000).

Los principales componentes de la PCR son:

El ADN molde constituye la región que se quiere amplificar y su concentración en la PCR depende de cada laboratorio, sin embargo, altas concentraciones del mismo aumenta el porcentaje de productos no específicos, por ello delimitar las cantidades así como el número de ciclos es crucial en la fidelidad de la reacción. Por otra parte, la utilización de reactivos en la extracción y purificación de ADN como fenol, EDTA y proteinasa K pueden inhibir la acción de la *Taq* ADN polimerasa.

La *Buffer* PCR crea las condiciones óptimas para la actividad de la *Taq* ADN polimerasa. La mayoría contienen Tris-HCl, cloruro de potasio (KCl) o cloruro de magnesio (MgCl₂); generalmente se encuentran a una concentración de 10X pero se recomienda una concentración final de 1X ya que altas concentraciones incrementa el porcentaje de productos inespecíficos en la PCR.

Los *primers* son fragmentos cortos de una sola cadena de ADN, de 15 - 30 nucleótidos de longitud, complementarios con la cadena molde y flanquean la región de interés. Los *primers* proveen un grupo libre 3'-OH donde la ADN polimerasa añade dNTPs. El porcentaje de citocinas (C) y guanidinas (G) debe ser entre un 40 - 60 % del total de las bases por lo que deben distribuirse uniformemente en toda la secuencia, se debe evitar más de tres C o G al final porque puede ocasionar un cebado inespecífico, y no deben ser auto complementarios o complementarios con otros *primers* con el fin de evitar formar dímeros o horquillas entre ellos en la PCR.

La temperatura de *annealing* de la PCR (T_A) debe ser aproximadamente 5 °C menor que la temperatura de *melting*, mientras que la T_m entre los *primers* no debe diferir más de 5 °C. La temperatura de *melting* para *primers* de 25 nucleótidos se calcula con la siguiente fórmula:

$$T_m = 4 (G + C) + 2 (A + T), \text{ donde}$$

G, C, A y T corresponde al número total de nucleótidos en el *primer*.

El cloruro de magnesio ($MgCl_2$) influye en la rigurosidad de la interacción entre los *primers* y el ADN molde. El rango recomendado varía entre 0,5 – 4 mM en aumentos progresivos de 0,5 mM de concentración, siendo el recomendado 1,5 mM. Concentraciones bajas de $MgCl_2$ eliminan cebados y productos no específicos de PCR cuando la fidelidad de la amplificación síntesis de ADN es crítica. No obstante, pocos iones magnesio resultan en un bajo rendimiento de producto de PCR. Altas concentraciones en cambio estabilizan la interacción entre los *primers* y el ADN molde aunque también pueden ocasionar productos no específicos de PCR.

Los nucleótidos fosfatados (*dNTPs*) se adhieren a la cadena creciente de ADN por acción de la ADN polimerasa. La concentración de cada dNTP es 200 μM en la mezcla. La concentración de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) debe ser igual, caso contrario la falta de exactitud en la concentración de un dNTP aumenta el apareamiento erróneo.

La *Taq* ADN polimerasa es una enzima de la bacteria *Thermus aquaticus*, que vive en ambientes calientes y requiere biomoléculas termo estables para su supervivencia. Esta enzima puede sintetizar eficientemente ADN bajo condiciones intensivas de

calentamiento como la PCR. Usualmente se utiliza 0.02 unidades de *Taq* ADN polimerasa por μL de mix de reacción. Altas concentraciones de *Taq* pueden ocasionar la síntesis de productos no específicos. Cuando existen inhibidores en la reacción se requiere utilizar altas concentraciones (0.04 – 0.06 unidades) con el propósito de obtener un mejor campo de productos amplificados.

El suero albumino bovino (BSA) es un aditivo opcional de la PCR que tiene la capacidad de aumentar el rendimiento de los productos obtenidos. Se cree que el BSA atrapa los inhibidores que pueden hacer la reacción ineficiente.

Las técnicas moleculares basadas en PCR son de gran importancia en el diagnóstico de especies y filogenia dentro del género *Meloidogyne* (Perry *et al.*, 2009). Durante las últimas dos décadas se han venido desarrollando diferentes métodos para la identificación, la comparación de generos, especies y niveles de población de *Meloidogyne*. Como consecuencia de ello, se han descrito varias técnicas entre las cuales podemos mencionar el uso de ADN mitocondrial, regiones espaciadoras internas transcritas (ITS), genes del ADN ribosomal 18S y *primers* específicos. Adicionalmente, se ha demostrado que la técnica de PCR es lo suficientemente sensible para identificar los nematodos a nivel de especies (Zouhar *et al.*, 2007; McCuiston *et al.*, 2007; Sayed *et al.*, 2010).

En general, los procedimientos de identificación a nivel molecular se llevan a cabo mediante el uso de ADN purificado de individuos aislados de suelo o de raíces de plantas infectadas (Hübschen *et al.*, 2004; Powers *et al.*, 2005; Qiu *et al.*, 2006). Se ha detectado nematodos en tejidos de tallo y hoja, sin embargo no existe un sistema de detección comparable en raíz o suelo (Hirsch *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2006). A pesar de

ello, existen trabajos de detección molecular en planta de patógenos como hongos nematófagos en raíces de tomate, raíces de papa y hongos transmitidos por el suelo en las raíces de sandía (Lovic *et al.*, 1995; Hirsch *et al.*, 2000; Atkins *et al.*, 2005).

La visualización de los resultados como productos de PCR y la observación de la concentración e integridad del ADN se realizan con electroforesis en geles agarosa, debido a que no es tóxica, teñido con bromuro de etidio, nitrato de plata, SYBER SAFE, Gel Red, Syber Green, Syber Gold, entre otros. En este procedimiento las moléculas migran según su tamaño, es decir, los de menor tamaño migran más rápido hacia el ánodo que aquellos de mayor tamaño mediante la aplicación de un campo eléctrico a una solución de moléculas tamponada con carga neta que funciona como un filtro (Galván *et al.*, 2001.; Posso, 2009; Zarate *et al.*, 2009).

En general, los componentes necesarios para la electroforesis son A) agarosa, coloide natural para separar moléculas de más de 200KDa que permite una electroforesis rápida pero con una resolución limitada, B) el tampón de electroforesis afecta la movilidad puesto que en ausencia de iones la movilidad es lenta pero en tampones de elevada fuerza iónica la conductancia eléctrica es alta pudiendo ocasionar la fundición del gel o desnaturalización del ADN. Los principales tampones son EDTA (pH 8,0) y tris-acetato (TAE), tris-borato (TBE) o trisfosfato (TPE) a 50 mM (pH 7,5 – 7,8). C) el marcador se utiliza para determinar el peso molecular de la muestra. D) el tampón de carga debe contener agua, sacarosa y un colorante. El propósito de este es aumentar la densidad de las muestras para que las gotas de ADN caigan uniformemente en el pocillo, añadir color a la muestra e incorporar un colorante a la muestra que, en un campo eléctrico, se desplace hacia el ánodo a una velocidad previsible (Somma y Querci, 2007).

La velocidad de migración depende de varios parámetros, entre los cuales podemos destacar el tamaño del ADN, la concentración de agarosa, la corriente aplicada, la dirección del campo eléctrico, la composición de bases de los fragmentos a analizar, la temperatura y la composición del buffer de electroforesis (Zarate *et al.*, 2009). Segmentos como ADN total se trabaja a concentraciones de 0,8% a 60V para evitar la fragmentación del mismo. Segmentos de 500 – 1500pb en geles al 1,5 – 2% mientras que segmentos de 100 – 500pb en geles del 4 – 6% , con voltajes entre 20 – 120V dependiendo de la velocidad que migre el ADN (Posso, 2009).

1.5 Hipótesis

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa, PCR, permite la detección e identificación de *Meloidogyne incognita* y *Meloidogyne javanica* en suelos agrícolas destinados al cultivo de *Solanum lycopersicum*.

CAPÍTULO 2

Detección e identificación del nematodo formador de agallas *Meloidogyne* spp. en suelos agrícolas destinados al cultivo de *Solanum lycopersicum* mediante la técnica PCR

2.1 Participantes

La presente investigación involucró la participación de la Escuela Politécnica del Ejército (ESPE), a través del laboratorio de Biotecnología Vegetal de la carrera de Ingeniería en Biotecnología y el Grupo de investigación de Biología Molecular en plantas (BMP).

Este proyecto fue realizado por la señorita Natalia Lizabeth Cantuña Cacuango, bajo la dirección de la Dra. Karina Proaño y co-dirección de la M. Sc Mónica Jadán.

2.2 Zona de estudio

El estudio a nivel de laboratorio fue ejecutado en las instalaciones de la ESPE, en los laboratorios de Biotecnología Vegetal de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, ubicados a una latitud S 0°20' / S 0°10' y longitud W 78°30' / W 78° 15' a 2280 msnm (Instituto Geográfico Militar, 2013), en el campus Politécnico de Sangolquí, cantón Rumihahui, provincia de Pichincha. En el laboratorio las condiciones ambientales van de 13 – 20°C, con una humedad relativa del 70 al 80% .

2.3 Periodo de duración de la investigación

La presente investigación tuvo una duración de 12 meses. Se inició en el mes de junio del 2013 y culminó en junio del 2013.

2.4 Diseño experimental

Los resultados de las estandarizaciones de las técnicas de detección molecular se analizaron mediante estadística descriptiva. Con este fin se hicieron pruebas de ensayo-error en donde cada una se realizó por duplicado. Se verificó la presencia o ausencia del patógeno teniendo en cuenta el peso en pares de bases del amplicón obtenido. Adicionalmente, se determinó el límite de detección para cada sistema y se probó si los protocolos estandarizados son reproducibles.

2.5 Metodologías

La presente investigación consta de dos etapas, una de campo y otra de laboratorio. La fase de campo incluye la toma de muestras de suelo en la ciudad de Pimampiro provincia de Imbabura. La otra fase se estableció para la estandarización de la técnica de diagnóstico e identificación que incluye el crecimiento de *Solanum lycopersicum* en suelos infectados con nematodos.

2.5.1 Recolección de muestras de suelo en campo

El muestreo se llevó a cabo en la ciudad de San Pedro de Pimampiro, cantón Pimampiro, provincia de Imbabura, donde se recolectaron muestras de suelo en invernaderos con cultivares de tomate en diferentes etapas de desarrollo en los barrios San José y El Rosal. En la Figura 17 se muestran los invernaderos donde se realizó la recolección de las muestras de suelo.



Figura 17 Mapa de la ciudad de San Pedro de Pimampiro, Imbabura. Fuente: Google maps, 2013.

La recolección de muestras de suelo se basó en un muestreo sistemático debido a que este sugiere un modo más estructurado de tomar muestras en intervalos regulares. El muestreo sistemático se caracteriza por tomar varias sub muestras que conforman una muestra compuesta considerando la naturaleza del campo y la distribución del nematodo lo que permite evaluar mejor la variabilidad del suelo (Romero, 2010).

Se recolecto aproximadamente 1 Kg de suelo en cada invernadero a una profundidad de 5 - 30 cm consiguiendo una muestra significativa de nematodos debido a que éstos no se distribuyen uniformemente en el campo (Conye y Cole, 2007; INTA, 2010). Las muestras se recolectaron con un barreno el cual se limpió con agua y alcohol al 100 % en cada invernadero. Se tomaron 10 sub muestras como mínimo en cada invernadero, cada sub muestra se colocó en una funda plástica retirando de la punta del barreno los primeros y los últimos 5 cm hasta completar el total de sub muestras. Posteriormente, se etiquetaron las fundas y se guardaron en un *cooler* a temperatura ambiente en total oscuridad hasta su procesamiento en el laboratorio. Los puntos del muestreo se marcaron con un sistema de posicionamiento global GPS para tenerlos como referencias en futuras investigaciones.

2.5.1.1 Establecimiento del material vegetal de campo en el laboratorio

Para este estudio se utilizaron especies de la familia *Solanaceae*, específicamente *Solanum lycopersicum*, tomando en cuenta características como alta capacidad de enraizamiento y tolerancia a nematodos.

Las semillas utilizadas para la germinación se lavaron en agua jabonosa por 2 minutos. Luego fueron inmersas en una solución de etanol al 70% por 30 segundos para eliminar los contaminantes presentes en la corteza. A continuación, las semillas se lavaron por agitación constante en agua estéril a temperatura ambiente por 2 minutos. Posteriormente, se sometieron a una inmersión en cloro comercial al 1% durante 5 minutos y se realizaron varios enjuagues con agua destilada estéril hasta eliminar los restos de cloro.

Para el crecimiento del material vegetal se utilizaron dos tipos de sustratos, los cuales fueron definidos en función de las necesidades de los estadios de la planta. En la Tabla 5, se describen los sustratos utilizados y sus componentes.

Tabla 5 Descripción de los tipos de sustratos utilizados en el estudio para el desarrollo de *Solanum lycopersicum*.

Estadio de la planta	Tipo de sustrato	Componentes
Germinación y Trasplante	2T:1C:1TN	Turba Cascajo Tierra negra
Plantas trampa	2T:2C:2TN:S	Turba Cascajo Tierra negra preparada Suplemento inocular nematodos

La germinación de las semillas se realizó en el invernadero con materiales estériles. Se colocó de 2 a 4 semillas por maceta, las cuales se sometieron a un fotoperiodo de 12 h/luz y 12h/oscuridad hasta su germinación. Al cabo de 30 días, las plántulas fueron trasplantadas a otras macetas con un sustrato especial para las siguientes fases.

La fase de aclimatación y enraizamiento se realizó a un fotoperiodo de 16 h/luz y 8 h/oscuridad en la cámara de germinación. El sustrato de estos *pots* fue previamente hidratado con agua estéril para no causar mayor estrés a la planta durante su aclimatación. Luego del traspaso se mantuvo un riego permanente con agua destilada y una vez por semana se hizo un riego con solución Hoagland (Anexo 1). En la Figura 18 se puede observar la germinación y el crecimiento de las plantas trampa.



Figura 18 Cultivo de plantas de especies de la familia *Solanaceae*. A. Semillas de *S. lycopersicum*, B. Germinación de semillas, C. Desarrollo de plantas a los 20 días. Fuente: Cantuña, 2013.

A los cuatro meses de edad las plantas trampa se encuentran en el estadio óptimo para los ensayos de inoculación con nematodos.

2.5.1.2 Inoculación de *Solanum lycopersicum* con nematodos *Meloidogyne* spp.

Los ensayos de inoculación se obtuvieron de varios muestreos para la obtención de un inóculo de buena calidad de *Meloidogyne* spp. La primera zona de muestreo se encuentra localizada en los puntos N 00° 23.604' W 077° 56.953', N 00° 23.874' W 077° 57.106' y a una latitud aproximadamente de 2165 m .s.n.m (GPS, Garmin, ETREX 20), en

la ciudad de San Pedro de Pimampiro, cantón Pimampiro, provincia de Imbabura (Figura 19 A). En esta zona se obtuvieron plantas de tomate riñón con un alto índice de agallamiento (Figura 19 B). Los invernaderos fueron escogidos al azar mientras que las muestras de suelo se recolectaron mediante un muestreo sistemático tomando aproximadamente 1 Kg de suelo.

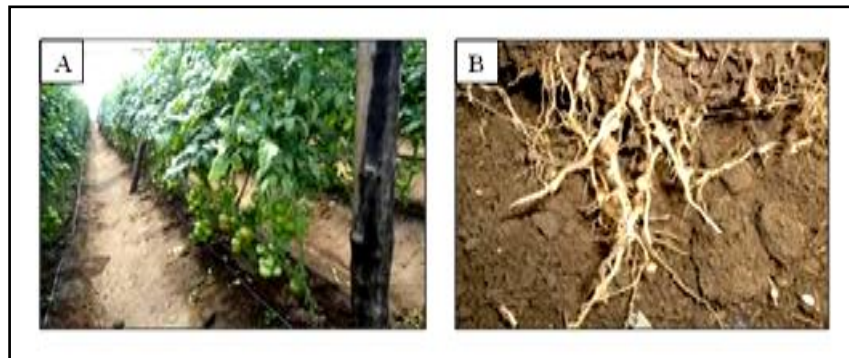


Figura 19 Zona 1 de muestreo de inoculo de nematodos en San Pedro de Pimampiro, Imbabura A. camas en uno de los invernaderos muestreados, B. Raíz de tomate con alto índice de agallamiento. Fuente: Cantuña, 2013.

La segunda zona de muestreo se encuentra localizada en la finca *Esmeralda Breeding Hilsea*, en los puntos $0^{\circ}13'0''\text{S}$ - $78^{\circ}58'2''\text{O}$ (GPS, Magellan eXplorist 600), a una altitud de 2219 m.s.n.m, en la ciudad El Quinche, cantón Quito, provincia de Pichincha (Figura 20 A). En esta zona se pudo obtener plantas de hipericum (*Hipericum perforatum*) con un alto índice de agallamiento (Figura 20 C), adicionalmente se tomaron muestras de suelo. Tanto las raíces como el suelo fueron escogidas sistemáticamente por camas de cultivo (Figura 20 B).

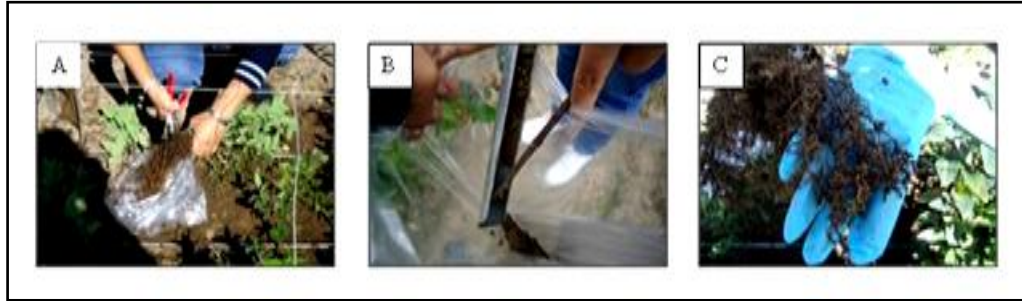


Figura 20 Zona 2 de muestreo de la obtención de inoculo de nematodos en la Finca La Morita de Hilsea, El Quinche. A. Recolección de raíz, B. Recolección de suelo, C. Raíz con agallamiento. Fuente: Cantuña, 2013.

Los nematodos, de la zona 1 y zona 2, fueron extraídos por el método de tamizaje selectivo (Figura 21). Primero se retiró el exceso de suelo de la raíz con suaves golpes sobre una superficie dura, luego se lavaron con agua corriente para retirar el remanente de suelo y material vegetal, para después lavarlo con agua destilada a fin de contrarrestar la dureza del agua corriente. A continuación, se cortó la raíz en fragmentos de aproximadamente 0,5 cm de longitud con ayuda de una tijera podadora y se pesó 20 gramos de la muestra procesada. Posteriormente, se realizó un troceado a máxima velocidad en la licuadora por 20 segundos y luego se sometió al tamizaje gradual en tamices No. 100 ($150\mu\text{m}$), 325 ($44\mu\text{m}$) y 400 ($38\mu\text{m}$). Se recolectó el contenido de los dos últimos tamices en un boeco. Finalizado el proceso con todas las muestras se procedió a realizar el conteo en el microscopio óptico a 10 X. Para el conteo primeramente se determinó el número de gotas existentes en 1 mL del inoculo total, luego se colocó 1 gota por cuadrante sobre una placa cuadrículada y se realizó el conteo de huevos en cada gota, para finalmente sacar un promedio y determinar el número de huevos por mililitro.



Figura 21 Proceso de extracción por tamizaje selectivo. A. Corte de raíces con tijera podadora, B. Lavado, C. Aforo de la muestra con agua, D. Licuado de la muestra, E. Tamizaje Selectivo, F. Recolección de huevos. Fuente: Cantuña, 2013.

La inoculación de las plantas se realizó colocando 3000 huevos por cada 500 mL de sustrato (Figura 22). Para ello, se realizaron 3 orificios cercanos a la raíz, se irrigó el inóculo equitativamente en los mismos y finalmente se taparon los orificios. Para evitar la pérdida del inóculo se suspendió la hidratación del suelo durante los siguientes tres días.



Figura 22 Proceso de inoculación en plantas trampa de tomate. A. Orificios cerca de la raíz de la planta, B. Inoculación de la solución de huevos, C. Plantas inoculadas. Fuente: Cantuña, 2013.

La Figura 23 muestran las plantas infectadas con nematodos cultivadas en la cámara de germinación acondicionada a una temperatura de 24 ± 2 °C, una humedad del 65 % y un fotoperiodo de 16 horas/luz y 8 horas/oscuridad en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la ESPE.



Figura 23 Ensayos de infección de nematodos en suelo de *Solanum lycopersicum* en la cámara de germinación y en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la ESPE, Sangolquí. Temperatura de 24 ± 2 °C, humedad relativa del 65 % y fotoperiodo de 16 horas/luz y 8 horas/oscuridad. Fuente: Cantuña, 2013.

La recolección del suelo para la estandarización de la técnica se realizó catorce días después de la infección. Para ello, se tomaron 5 g de suelo, los cuales fueron previamente homogenizados siguiendo el patrón que describe la Figura 24, y se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento.





Patrón de homogenización de suelo			
1. Zigzag	2. Vertical	3. Horizontal	4. Espiral
			

Figura 24 Patrón de homogenización para las muestras de suelo a ser procesada. Fuente: Cantuña, 2013.

2.5.2 Extracción y cuantificación de ADN genómico

La extracción y cuantificación de las muestras recolectadas en San Pedro de Pimampiro tanto de suelo como de raíz se realizaron mediante el uso de kits comerciales.

2.5.2.1 Extracción de ADN genómico de raíz

Para este ensayo se realizó la extracción de ADN mediante el *DNeasy Plant Mini Kit* de la casa comercial Qiagen® (catálogo No. 69104). Se utilizó 100 mg de raíz como material vegetal inicial, el cual fue triturado con nitrógeno líquido en un mortero congelado. El polvo obtenido de esta molienda se colocó en un tubo de 1,5 mL con 400 μ L de *buffer* de extracción AP1. Se homogenizó la muestra con el *buffer* de extracción y se agregó 4 μ L de ARNasa A (100 mg / mL). Posteriormente se realizó una incubación en baño maría durante 10 min a 65°C, con una mezcla en el vortex cada 3 min para afianzar el contacto entre las soluciones y la muestra. Al término de la incubación se añadió 130 μ L de *buffer* AP2, mezclándose e incubándose en hielo durante 5 min. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 14000 rpm por 5 min, donde el sobrenadante obtenido se traspasó a la columna *QIA shredder* y se centrifugó a 14000 rpm por 2 min. Al filtrado obtenido se le añadió 1.5 volúmenes de *buffer* AP3/E en un nuevo tubo de 2 mL. De esta nueva mezcla se transfirió 650 μ L a la columna *DNeasy Mini* y se centrifugó por 1 min a 10000 rpm. Posteriormente la columna se transfirió a un nuevo tubo y se colocó 500 μ L de *buffer* AW, para luego centrifugar por 1 min a 10000 rpm. El filtrado resultante se eliminó. Se añadió 500 μ L de *buffer* AW a la columna, y se centrifugó por 1 min a 14000 rpm. Finalmente para recolectar el ADN

extraído, se transfirió la columna a un nuevo tubo de 1.5 mL y colocó 50 μ L de *buffer* de elución. Se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 10000 rpm por 1 min. El ADN obtenido se almacenó a -20 °C hasta su posterior cuantificación.

2.5.2.2 Extracción de ADN genómico de suelo

Para la extracción de ADN genómico total de suelo se utilizó el *Ultraclean™ Soil DNA Isolation kit* de la casa comercial MoBio Laboratories, Inc (catálogo No. 12800-50). Se utilizó 0,5 g de suelo como material inicial, el cual se colocó en un tubo de 2 mL *Bead Solution Tubes* y se homogenizó en el vortex durante 5 seg. Se añadió 60 μ L de la *Solution S1* y nuevamente se homogenizó en el vortex durante 5 seg, se añadió 200 μ L de *IRS Solution* para luego realizar un vortex horizontal durante 10 min. Luego se centrifugó por 30 seg a 10000 g y se transfirió el sobrenadante a un tubo de 2 mL donde se agregó 250 μ L de *Solution S2* para después homogenizar la muestra en el vortex por 5 seg. Los tubos se incubaron en hielo a 4 °C durante 5 min, a continuación se centrifugó por 1 min a 10000 g y se transfirió 450 μ L del sobrenadante a un tubo de 2 mL al cual se le agregó 900 μ L de *Solution S3* y se homogenizó en el vortex por 3 seg. Posteriormente de esta nueva mezcla se transfirió 700 μ L en un tubo *Spin Filter* y se centrifugó por 1 min a 10000 g para después eliminar el filtrado. Se agregó el remanente de la mezcla obtenida anteriormente en el *Spin Filter*, se centrifugó por 1 min a 10000 g y se eliminó el filtrado. El lavado se realizó 2 veces, para ello se añadió 150 μ L de *Solution S4*, se centrifugó 30 seg y se descartó el filtrado. Finalmente para recolectar el ADN extraído, se realizaron dos eluciones de 25 μ L y una de 15 μ L con la *Solution S5*, en este paso se transfirió la columna del *Spin Filter* a un nuevo tubo de 2 mL *Collection Tube*. Se incubó por 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 10000 g por 30 seg. El ADN obtenido se almacenó a -20 °C hasta su posterior cuantificación.

2.5.2.3 Cuantificación de las muestras

La cuantificación de ácidos nucleicos se realizó con el equipo *NanoVue™ Spectrophotometer* (*General Electric*®), el cual trabaja bajo el principio de espectrofotometría de bajo volumen tomando en cuenta la relación de longitud de onda 260/280 y 260/230. Adicionalmente, se visualizó el ADN en geles de agarosa al 1 % (p/v) preparados con *buffer* Tris-Borato EDTA (TBE) 1X y teñidos con 0,035 µL *SYBR® Safe DNA gel stain* (10000*400uL, Invitrogen, catálogo No. S33102), por cada mL de *buffer*. El gel se cargó con 4 µL de muestra de ADN con 2 µL de *buffer* de carga (*Blue juice* 10X, Invitrogen, catálogo No.10816-015), como patrón de peso molecular se utilizó el marcador de bajo peso molecular (*Low DNA mass ladder*, Invitrogen, catálogo No.10068-013). Este procedimiento permitió analizar la integridad, calidad y cantidad del ADN extraído.

La corrida electroforética se realizó a 100 V durante una hora y se observó en el transiluminador *Biodoc-it™ System* bajo luz ultravioleta (UV). Finalmente el resultado se fotodocumentó para el análisis posterior.

2.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó en esta investigación para la detección y posterior identificación de las dos especies de mayor del nematodo formador del nudo *Meloidogyne* spp. en muestras de suelo y raíz.

2.5.3.1 Diseño de primers

Los primers para la identificación de la especie *M. incognita* y *M. javanica* fueron diseñados en base a las secuencias descritas en la base de dato del Centro Nacional de Investigaciones Biotecnológicas (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). En la Tabla 6 se detalla el número de accesión y la base de datos que describe la secuencia de los genes evaluados.

Tabla 6 Detalle del número de accesión y la base de datos de los genes.

Gen	Accesión No.	Descripción
<i>JavF/JavR</i>	U94492.1	<i>Meloidogyne javanica</i> collagen gene <i>Mjcol-3</i>
<i>IncF/IncR</i>	HQ728271.1	<i>Meloidogyne incognita</i> esophageal gland cell secretory protein 8D05 gene

Para mayor detalle sobre los genes a trabajar ver Anexo 2 B

Los primers se diseñaron usando el programa PRIMER-BLAST® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), donde se ingresaron las secuencias en formato FASTA y se establecieron los criterios para la generación de las mejores secuencias de primers (Tabla 7).

Tabla 7 Criterios básicos para el diseño de *primers* Fuente: Airton, 2010.

Característica	Rango o criterio óptimo
Tamaño del primer	Entre 17 a 32 pb
Tamaño de amplicón	200 a 1000pb
Temperatura de fusión	Entre 57 a 63°C la mejor 60°C
% G - C	De 30 a 70% , óptima 60%
Any	De 2 a 7, mejor 4

Los *primers* diseñados por esta herramienta bioinformática fueron analizados con los algoritmos en línea BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Estos programas permitieron comprobar la especificidad de cada *primer* a través de alineamientos múltiples *in silico*, verificando la hibridación con la secuencia para la que fueron diseñados.

Las secuencias de los *primers* más idóneos fueron enviadas a sintetizar a la casa comercial Invitrogen® través de un distribuidor autorizado en el país. Los *primers* se re-suspendieron a una concentración de 100 µM en agua DEPC y luego se incubaron a 4 °C por 24 horas. Una vez reconstituidos se almacenaron a - 20 °C.

2.5.3.2 Ensayos de optimización para la detección de *Meloidogyne* spp en raíz y suelo

Para optimizar la PCR se realizaron ensayos de amplificación por duplicado, modificando los componentes de la reacción y el programa de amplificación en base a la investigación de Grijalva (2013) y Huang y sus colaboradores (2006).

Los *primers* utilizados para la identificación de *Meloidogyne spp.* fueron: 16D10F (5'-GGC AAA AAG CCT AGT G-3') y 16D10R (5'- CAG ATATAATTTTATTTCAG-3') con un amplicón de detección de 200 pb (Anexo 2).

En la Tabla 8 se detallan las concentraciones y los volúmenes de reacción empleados para la detección de *Meloidogyne spp.* con los *primers* 16D10F y 16D10R.

Tabla 8 Concentraciones y volúmenes de reacción para ensamblaje de la PCR, en la detección de *Meloidogyne spp.* para los *primers* 16D10F y 16D10R.

Reactivos	C _i	C _f	Volumen por reacción (μL)	Catálogo No.
Agua			12,75	46-2224
Buffer PCR	10 X	1X	2,00	11615-010
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0,60	11615-010
dNTP's	10 mM	0,2 mM	0,40	10297-018
Primer F	10 μM	0,5 μM	1,00	---
Primer R	10 μM	0,5 μM	1,00	---
BSA **	700 ηg/μl			
Taq polimerasa	5 U/μL	1,25 U/μL	0,25	11615-010
Muestra (ADN)		50 ng/μL	2,00	
Volumen total (μL)			20	

C_i = concentración inicial, C_f = concentración final

** Reactivo utilizado sólo para la amplificación en suelo

Para la optimización del método de detección en suelo se incorporó como adyuvante de la PCR a albúmina sérica bovina (BSA), en la concentración recomendada por

Kreader (1995) y Farrel y Alexandre (2013), la misma que fue indician un rango de 50 ng / μ L a 400 ng / μ L de dentro de la *master mix*.

Para determinar el límite de detección de la PCR estandarizada y optimizada, se realizaron diluciones sucesivas del ADN iniciando con la concentración en la que se estandarizó la PCR. Las concentraciones de ADN usadas dentro de los *mix* fueron de 6 ng / μ L hasta 3,3 ng / μ L.

La Tabla 9 detalla las temperaturas y tiempos necesarios para la amplificación de *Meloidogyne* spp. utilizando los *primers* 16D10F y 16D10R.

Tabla 9 Temperaturas empleadas en la detección de *Meloidogyne* spp. planteado por Grijalva (2013) para los *primers* 16D10F y 16D10R.

		Temperatura	Tiempo	N° de ciclos
1	Denaturación inicial	94 °C	5 min	1
2	Denaturación del molde de ADN	94 °C	30 seg	35
3	Hibridación de los cebadores o primers	60 °C	45 seg	
4	Extensión de la copia	72 °C	60 seg	
5	Extensión final	72 °C	10 min	1
6	Almacenamiento	4 °C	5 min	1

La estandarización y optimización de esta técnica de detección se realizó en el termociclador ESCO HEALTHCARE Swift-MaxPro®, con reactivos de Invitrogen®. Los productos de amplificación se fraccionaron electroforéticamente dando un solo amplicón en geles de agarosa al 1,5 % (p/v) preparados con *buffer* TBE 1X y teñidos con 0,03 μ L SYBR® *Safe DNA gel stain* (10000*400uL, Invitrogen, catálogo No. S33102),

por cada mL de *buffer*. El gel se cargó con 4 µL de muestra con 2µL de *buffer* de carga (*Blue juice* 10X, Invitrogen, catálogo No.10816-015). Se utilizó el marcador de peso molecular de 100 pb (*TracItTM 100bp DNA Ladder*, Invitrogen, catálogo No.10488-058) para determinar las banda. La corrida electroforética se realizó a 100V y 300mA durante 1 hora y se observó en el transiluminador bajo luz UV (*UVP BioDoc-ItTM*). Los resultados se fotodocumentaron para el análisis posterior.

2.5.3.3 Ensayos de optimización para la identificación de *M. incognita* y *M. javanica* en raíz y suelo

Los *primers* diseñados para la identificación de *M. incognita* fueron: IncF (5'-CCA GGG CCT TCG CCA CAC AA-3') y IncR (5'-GGC CAC CAA AAG GTG GCT GT-3') con un amplicón de detección de 454 pb, mientras que para la identificación de la especie de *M. javanica* fue: JavF (5'-TCA AGG CGA AGC AGG ACG GC-3') y JavR (5'-AGG ACCTGGCGGCCCTTTGA-3') con un amplicón de detección de 241 pb.

Adicionalmente de la investigación de Devran y Ali Sôğüt en el 2009 se tomaron *primers* que fueron analizados con herramientas bioinformáticas, para la identificación de *M. incognita* fueron: MengincF (5'-GTG AGG ATT CAG CTC CCC AG-3') y MengincR (5'-ACG AGG AAC ATA CTT CTC CGT CC-3') con un amplicón de detección de 955 pb y para identificar *M. javanica* el *primer* seleccionado fue: ZiljavF (5'-GGT GCG CGA TTG AAC TGA GC-3') y ZiljavR (5'-CAG GCC CTT CAG TGG AAC TAT AC-3') con un amplicón de detección de 670 pb.

En la Tabla 10 se detallan las concentraciones y los volúmenes de reacción empleados para la identificación de las especies *M. incognita* y *M. javanica* utilizando los *primers* M engincF, M engincR, ZiljavF y ZiljavR.

Tabla 10 Concentraciones y volúmenes de reacción para ensamblaje de la PCR, en la identificación de de las especies *M. incognita* y *M. javanica* planteado por Devran y Ali Söğüt (2009) para los *primers* M engincF, M engincR, ZiljavF y ZiljavR

Reactivos	C _i	C _f	Volumen por reacción (uL)	Catálogo No.
A g u a			17,8	46-2224
B u f f e r P C R	10 X	1X	2,5	11615-010
M g C l 2	15 m M	2 m M	1,0	11615-010
d N T P ' s	20 m M	0,2 m M	0,5	10297-018
P r i m e r F	20 μ M	0,4 μ M	1,0	---
P r i m e r R	20 μ M	0,4 μ M	1,0	---
B S A **	700 η g / μ l			
T a q p o l i m e r a s a	5 U / μ L	1 U / μ L	0,2	11615-010
M u e s t r a (A D N)		20 n g / μ L	1,0	
V o l u m e n t o t a l (μ L)			25,0	

C_i= concentración inicial, C_f= concentración final

** Reactivo utilizado sólo para la amplificación en suelo

Para la optimización del método de detección en suelo se incorporó como adyuvante de la PCR a albúmina sérica bovina (BSA), en la concentración recomendada por Kreader (1995) y Farrel y Alexandre (2013), la misma que fue indican un rango de 50 ng / μ L a 400 ng / μ L de dentro de la *master mix*. Para determinar el límite de detección de la PCR estandarizada y optimizada, se realizaron diluciones sucesivas del ADN

iniciando con la concentración en la que se estandarizó la PCR. Las concentraciones de ADN usadas dentro de los *mix* fueron de 6 ng / μ L hasta 3,3 ng / μ L.

La Tabla 11 detalla las temperaturas y tiempos necesarios para la amplificación de *M. incognita* con los *primers* MengincF y MengincR y para *M. javanica* utilizando ZiljavF y ZiljavR.

Tabla 11 Temperaturas empleadas en la identificación de *M. incognita* y *M. javanica* planteado por Devran y Ali Söğüt (2009) para los *primers* MengincF, MengincR, ZiljavF y ZiljavR

		Temperatura	Tiempo	N° de ciclos
1	Denaturación inicial	94 °C	3 min	1
2	Denaturación del molde de ADN	94 °C	30 seg	35
3	Hibridación de los cebadores o primers	60 °C	30 seg	
4	Extensión de la copia	72 °C	60 seg	
5	Extensión final	72 °C	7 min	1
6	Almacenamiento	4 °C	5 min	1

La *master mix* y el programa para PCR tomados como base para determinar las condiciones idóneas para la amplificación de los genes que permitan la identificación de *M. incognita* y *M. javanica* mediante los *primers* diseñados se describen en la Tabla 12.

Tabla 12 Condiciones de *master mix* para la estandarización de la amplificación por PCR convencional para la identificación de *M. incognita* y *M. javanica* por Devran y Ali Söğüt (2009), b. Grijalva (2013).

Reactivos	C _i	C _f ^a	C _f ^b	Catálogo No.
Agua				46-2224
Buffer PCR	10 X	1 X	1 X	11615-010
MgCl ₂	50 mM	2 mM	1,5 mM	11615-010
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,2 mM	10297-018
Primer F	10 μM	0,4 μM	0,5 μM	---
Primer R	10 μM	0,4 μM	0,5 μM	---
BSA **	700 ng/μl	200 ng/μl	4,3 μL	
Taq polimerasa	5 U/μL	1,25 U/μL	1,25 U/μL	11615-010
Muestra (ADN)		10 ng/μL	50 ng/μL	
Volumen total (μL)	25 μl			

* C_i= concentración inicial, C_f= concentración final

** Reactivo utilizado sólo para la amplificación en suelo

Para la optimización del método de detección en suelo se incorporó como adyuvante de la PCR a albúmina sérica bovina (BSA), en la concentración recomendada por Kreader (1995) y Farrel y Alexandre en el 2013, la misma que fue indican un rango de 50 ng / μL a 400 ng / μL de dentro de la *master mix*.

Para determinar el límite de detección de la PCR estandarizada y optimizada, se realizaron diluciones sucesivas del ADN iniciando con la concentración en la que se estandarizó la PCR. Las concentraciones de ADN usadas dentro de los *mix* fueron de 6 ng / μL hasta 3,3 ng / μL.

La Tabla 13 y Tabla 14 detalla las temperaturas y tiempos necesarios para identificación de *M. incognita* y *M. javanica*.

Tabla 13 Programas de PCR para la estandarización de la amplificación por PCR convencional para la detección de *M. incognita* y *M. javanica* por Grijalva (2013).

		Temperatura	Tiempo	N° de ciclos
1	Denaturación inicial	94 °C	5 min	1
2	Denaturación del molde de ADN	92 °C	45 seg	35
3	Hibridación de los cebadores o primers	64 °C	1 min	
4	Extensión de la copia	72 °C	1 min	
5	Extensión final	72 °C	10 min	1
6	Almacenamiento	4 °C	5 min	1

Tabla 14 Programas de PCR para la estandarización de la amplificación por PCR convencional para la detección de *M. incognita* y *M. javanica* por Devran y Ali Sôğüt (2009).

		Temperatura	Tiempo	N° de ciclos
1	Denaturación inicial	94 °C	5 min	1
2	Denaturación del molde de ADN	94 °C	30 seg	35
3	Hibridación de los cebadores o primers	65 °C	45 seg	
4	Extensión de la copia	72 °C	1 min	
5	Extensión final	72 °C	10 min	1
6	Almacenamiento	4 °C	5 min	1

La optimización para la identificación de las especies de *Meloidogyne* spp, se realizó un ensayo de gradiente para determinar la mejor temperatura de alineamiento, en el cual se probó un rango de entre 55 a 65 °C con intervalos de 1 °C.

Para la verificación de la mejor concentración de cloruro de magnesio se realizó un gradiente en la concentración de este compuesto. Para ello se varió la concentración de $MgCl_2$ desde 1,5 mM hasta 3,0 mM con intervalos de 0,5 mM.

La estandarización y optimización de esta técnica de detección se realizó en el termociclador ESCO HEALTHCARE Swift-MaxPro®, con reactivos de Invitrogen®. Los productos de amplificación se fraccionaron electroforéticamente dando un solo amplicón en geles de agarosa al 1,5% (p/v) preparados con *buffer* TBE 1X y teñidos con 0.03 µL SYBR® *Safe DNA gel stain* (10000*400uL, Invitrogen, catálogo No. S33102). El gel se cargó con 4 µL de muestra con 2µL de buffer de carga (*Blue juice* 10X, Invitrogen, catálogo No.10816-015). Se utilizó como marcador de peso molecular de 100 pb (*TracIt™ 100bp DNA Ladder*, Invitrogen, catálogo No.10488-058). La corrida electroforética se realizó a 100 V y 300 mA durante 1 hora y se observó en el transiluminador bajo luz UV (UVP BioDoc-It™). Los resultados se fotodocumentaron para el análisis posterior.

CAPÍTULO 3

Detección e identificación del nematodo formador de agallas *Meloidogyne* spp. en suelos agrícolas destinados al cultivo de *Solanum lycopersicum* mediante la técnica PCR

3.1 Recolección de muestras de suelo en campo

Se muestrearon 10 invernaderos con cultivares de tomate (*S. lycopersicum*) localizados en el Barrio San José y en el barrio El Rosal en la ciudad de San Pedro de Pimampiro.

Se recolectó aproximadamente 1 Kg de suelo por cada muestra en cada punto de recolección. Las muestras fueron clasificadas y etiquetadas de acuerdo al punto geográfico GPS y al barrio donde fueron recolectadas (Tabla 15).

El muestreo sistemático se lo realizó tomando en cuenta que los nematodos no se distribuyen uniformemente por lo que se trató de recolectar una muestra significativa en el invernadero al tomar 10 submuestras siguiendo un patrón en zigzag que conformó una muestra compuesta.

Tabla 15 Puntos geográficos tomados por el GPS (Garmin, ETREX20) durante la recolección de muestras de suelo y raíz en cultivares de tomate (*S. lycopersicum*) en los barrios San José y El Rosal en la ciudad San Pedro de Pimampiro, provincia de Imbabura.

No.	Muestra	Sector	Coordenadas (DDMM.MMM)	Etapa de crecimiento
1	SJ1	San José	N 00° 23.459' W 077° 56.948'	Plantas de 3 meses
2	SJ2*	San José	N 00° 23.445' W 077° 56.970'	Cultivo en producción
3	SJ3	San José	N 00° 23.604' W 077° 56.953'	Cultivo en producción
4	SJ4	San José	N 00° 23.894' W 077° 57.107'	Plantas de 1 mes
5	SJ5*	San José	N 00° 23.874' W 077° 57.106'	Cultivo en producción
6	SJ6	San José	N 00° 23.619' W 077° 57.164'	Plantas de 4 meses
7	SJ7	San José	N 00° 23.617' W 077° 57.165'	Plantas de 2 meses
8	SJ8*	San José	N 00° 23.523' W 077° 57.044'	Cultivo en producción
9	SJ9	San José	N 00° 23.592' W 077° 56.883'	Cultivo en producción
10	R1*	El Rosal	N 00° 23.316' W 077° 56.783'	Plantas de 2 meses

*Muestras de raíz recolectadas en campo para los análisis

3.2 Extracción y cuantificación de ADN genómico

Los ensayos moleculares para la detección de *Meloidogyne* spp. e identificación de *M. javanica* y *M. incognita* se realizaron tanto en muestras de raíz como en muestras de suelo que fueron recolectados en campo.

La extracción de ADN de raíz de *Solanum lycopersicum* recolectado en los invernaderos de los barrios San José y El Rosal se realizó mediante el protocolo del *kit DNeasy Plant MiniKit (Qiagen®)*.

Los resultados se visualizaron en geles de agarosa al 1% (p/v). En la Figura 25 se observa la electroforesis de ADN de las muestras de raíz recolectadas, donde se verifica la calidad del ADN.

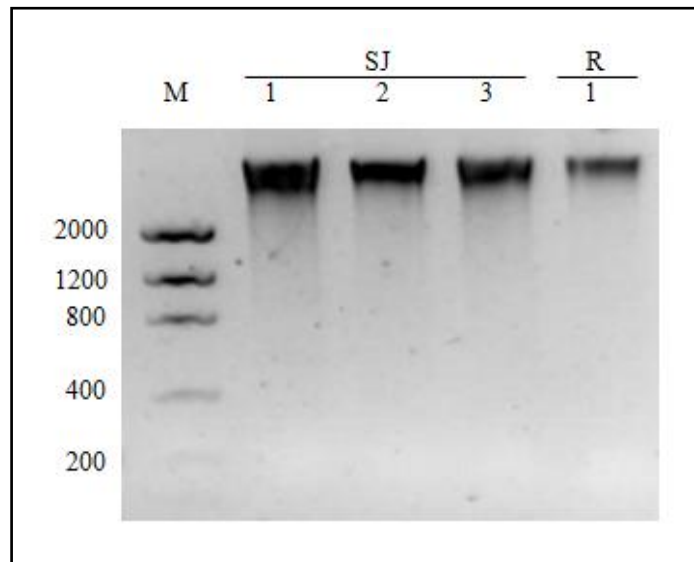


Figura 25 Electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con *SYBR® Safe DNA gel stain* del ADN extraído con el protocolo del *DNeasy Plant MiniKit* de *Qiagen®* de las muestras de raíz recolectadas en los barrios San José y El Rosal. La corrida electroforética se realizó a 110 V, 1h. Donde SJ: San José, R: El Rosal y M: marcador de bajo peso molecular de ADN (*Low DNA mass ladder*, Invitrogen®)

La determinación de la pureza y cantidad del ADN, se realizó mediante el *NanoVue™ Spectrophotometer*, donde la concentración promedio fue de 68,5 $\eta\text{g} / \mu\text{L}$. Los resultados de la cuantificación del proceso de extracción de ADN de raíz recolectadas en San Pedro de Pimampiro en cultivares de tomate (*S. lycopersicum*) se describen en la Tabla 16.

Tabla 16 Cuantificación de las muestras de raíz de tomate (*S. lycopersicum*) recolectadas en San Pedro de Pimampiro mediante el *NanoVue™ Spectrophotometer*. Donde SJ: *Solanum lycopersicum* del barrio San José, R: *Solanum lycopersicum* del barrio El Rosal y A: absorbancia

Muestra	Concentración ng/μl	Pureza	
		A 260/A 280	A 260/A 230
SJ 1	97,50	1,6890	2,6680
SJ 2	69,00	1,6200	3,7760
SJ 3	74,50	1,8520	2,1780
R 1	38,25	1,4223	1,4223

El ADN extraído de las muestras de suelo de cultivares de *Solanum lycopersicum* mediante el protocolo del *Ultraclean™ Soil DNA Isolation kit* (M oBio Laboratories, Inc), se visualizó en geles de agarosa al 1 % (p/v). En la Figura 26 se observa la electroforesis de ADN de las muestras recolectadas, donde se verifica la calidad del ADN, con bandas definidas en ausencia de degradación.

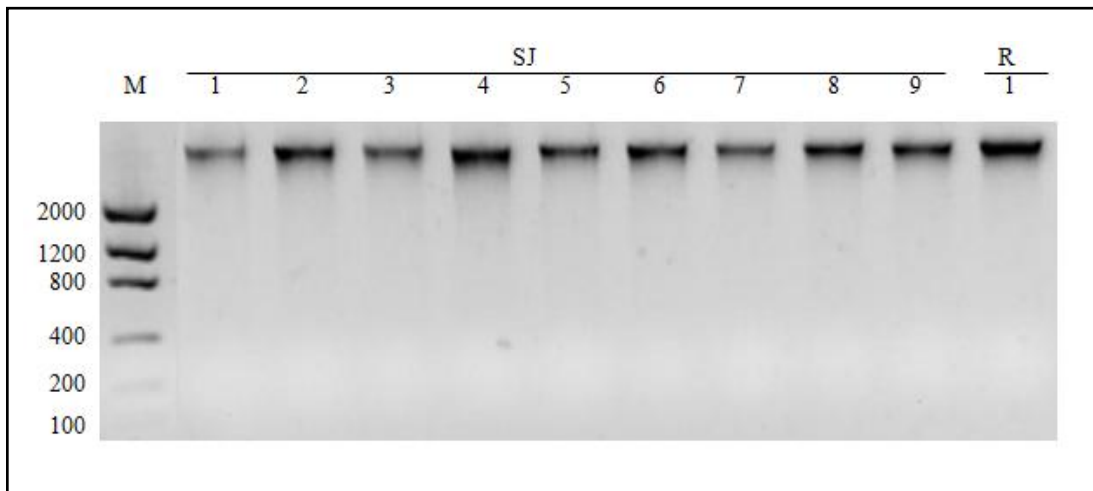


Figura 26 Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR® Safe DNA gel stain del ADN extraído con el protocolo del *Ultraclean™ Soil DNA Isolation kit* (MoBio Laboratories, Inc) de las muestras de suelo recolectadas en San Pedro de Pimampiro en invernaderos de tomate. La corrida electroforética se realizó a 110 V, 1h. Donde SJ: San José, R: El Rosal y M: marcador de bajo peso molecular de ADN (*Low DNA mass ladder*, Invitrogen®)

La determinación de la pureza y cantidad del ADN, se realizó mediante el uso *NanoVue™ Spectrophotometer*, donde la concentración promedio fue de 94,5 ng / μ L.

Los resultados de la cuantificación del proceso de extracción de ADN de suelo recolectado en San Pedro de Pimampiro en cultivares de tomate (*S. lycopersicum*) se describen en la Tabla 17.

Tabla 17 Cuantificación de las muestras de suelo con cultivares de tomate (*S. lycopersicum*) recolectadas en San Pedro de Pimampiro mediante el NanoVue™ Spectrophotometer. Donde SJ: *Solanum lycopersicum* del barrio San José, R: *Solanum lycopersicum* del barrio El Rosal y A: absorbancia

Muestra	Concentración	Pureza	
	ng/ μ l	A 260/A 280	A 260/A 230
SJ 1	59,50	1,6580	0,8600
SJ 2	95,00	1,5260	0,7950
SJ 3	100,75	1,5886	0,7360
SJ 4	85,00	1,5340	0,7110
SJ 5	91,25	1,5330	0,7150
SJ 6	141,50	1,6260	0,7290
SJ 7	70,50	1,6955	0,7270
SJ 8	107,00	1,5850	0,6840
SJ 9	96,00	1,6185	0,6690
R 1	98,50	1,5230	0,6862

3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa PCR al igual que la extracción se realizó en muestras de raíz y de suelo de tomate (*S. lycopersicum*).

3.3.1 Diseño de primers

Se diseñaron primers específicos para la identificación de *M. incognita* y *M. javanica* para lo cual se realizó una búsqueda en el *National Center for Biotechnology*

Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) donde se seleccionaron dos genes específicos para este propósito, el primero es el gen que codifica a la proteína 8D05 de la glándula esofageal en *Meloidogyne incognita* y el segundo es el gen del colágeno *Mjcol-3* de la pared celular en *Meloidogyne javanica*.

El diseño de los *primers* se realizó mediante el software *Primer-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) el cual generó múltiples secuencias en los genes de estudio los cuales se analizaron *in silico* para determinar los posibles alineamientos con diferentes tipos de genes que podrían generar “falsos positivos”. Luego del análisis bioinformático realizado a cada uno de los *primers*, se seleccionó las secuencias que expresaron mayor especificidad con cada gen y fueron enviadas a sintetizar en Invitrogen.

Los amplicones diseñados generan una sola banda de 200 y 500 pb aproximadamente para *M. incognita* y *M. javanica*, respectivamente. En el Anexo 3 se encuentra con mayor detalle la información de los *primers* seleccionados para la identificación de las especies de *Meloidogyne* spp.

La Tabla 18 muestran las secuencias escogidas para la identificación de las especies de *Meloidogyne* spp. con sus características más relevantes.

Tabla 18 Secuencia de *primers* seleccionados y enviadas a sintetizar para la identificación de *M. incognita* y *M. javanica* a partir de la proteína 8D05 de la glándula esofageal y del gen del colágeno *Mjcol-3* con sus características más relevantes.

Gen	Accesión	Cod	Secuencia	% GC	Tm °C	pb
Proteína 8D05 de la glándula esofageal en <i>M. incognita</i>	HQ728271.1	Inc F	CCAGGGCCTTCGCCACACAA	65	59,55	454
		Inc R	AGGACCTGGCGGCCCTTTGA	60	57,63	
Colágeno <i>Mjcol-3</i> de <i>M. javanica</i>	U94492.1	Jav F	TCAAGGCGAAGCAGGACGGC	65	59,70	241
		Jav R	AGGACCTGGCGGCCCTTTGA	65	60,11	

3.3.2 Ensayos de optimización para la detección de *Meloidogyne* spp.

Los ensayos de optimización para la detección de *Meloidogyne* spp. se basó en el gen del parasitismo *16D10* el cual es altamente conservado entre las cuatro especies de *Meloidogyne* (*M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla*). Este gen codifica un péptido 13-amino-ácido secretado por la glándula esofágica subventral de *M. incognita* y es el responsable de la trasducción de señales que se requiere para la formación y establecimiento del sitio de alimentación del nematodo en el huésped. La detección se realizó en paralelo tanto en muestras de raíz como de suelo recolectado en campo. Luego de la estandarización y modificación de los protocolos utilizados por Grijalva (2013) para la amplificación del gen *16D10* a partir de ADN de raíces de *Solanum lycopersicum* y de las muestras de suelo recolectadas mediante PCR se determinaron las condiciones óptimas para la *master mix* que se describen en la Tabla 19.

Tabla 19 Concentración de los componentes de la *master mix* para la amplificación del gen *16D10a* a partir de ADN de raíz y de suelo de las especies *Solanum lycopersicum*.

Reactivo	Ci	Cf
<i>Buffer</i>	10 X	1 X
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM
dNTPs	10 mM	0,2 mM
<i>Primer f</i>	10 μM	0,5 μM
<i>Primer r</i>	10 μM	0,5 μM
BSA**	700 ng/μl	200 ng/μl
<i>Taq polimerasa</i>	5 U/μl	1,25 U
ADN	Raíz 30 ng/μl	
	Suelo 20 ng/μl	
Volumen final de reacción 15μl		

Ci, concentración inicial, Cf, concentración final

** Reactivo utilizado solo en la amplificación de muestras de suelo

En la Tabla 20 se presenta el programa empleado para la amplificación del gen *16D10* a partir de ADN de raíces de *Solanum lycopersicum* y de suelo luego de la estandarización.

Tabla 20 Programa de PCR para la amplificación del gen *16D10* a partir de ADN de raíz y de suelo de las especies *Solanum lycopersicum*.

	Segmento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
1	Denaturación inicial	94	5:00	1
2	Denaturación	95	0:45	35
3	Annealing	50	1:00	
4	Extensión	72	1:00	
5	Extensión final	72	10:00	1
6	Estabilización	4	5:00	1

Los productos de PCR obtenidos de la amplificación en muestras de raíz de *S. lycopersicum* fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % (Figura 27). Estos resultados confirman la presencia del gen *16D10* que identifica la presencia de *Meloidogyne* spp. en las raíces de las especies estudiadas.

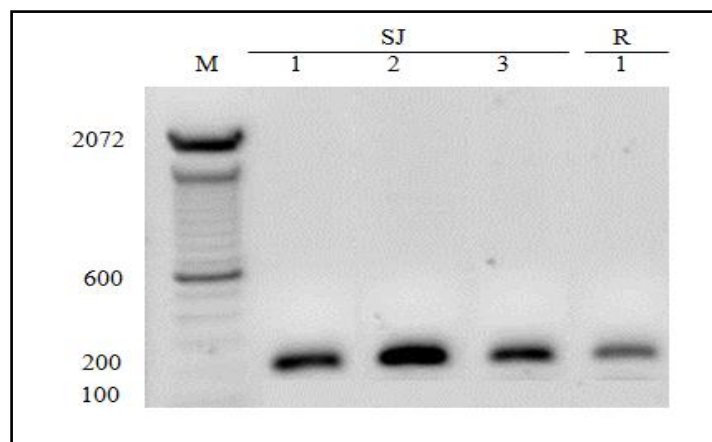


Figura 27 Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con SYBR® Safe DNA gel stain del amplicón del gen *16D10* de muestras de raíz recolectadas en San Pedro de Pimampiro. Donde SJ: San José, R: El Rosal y M: marcador de peso molecular de ADN de 100 pb (*TracitTM 100bp DNA Ladder*, Invitrogen®)

Los productos de PCR obtenidos fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % (Figura 28). Estos resultados confirman la presencia del gen *16D10* que identifica la presencia de *Meloidogyne* spp en las muestras de suelo de tomate estudiadas.

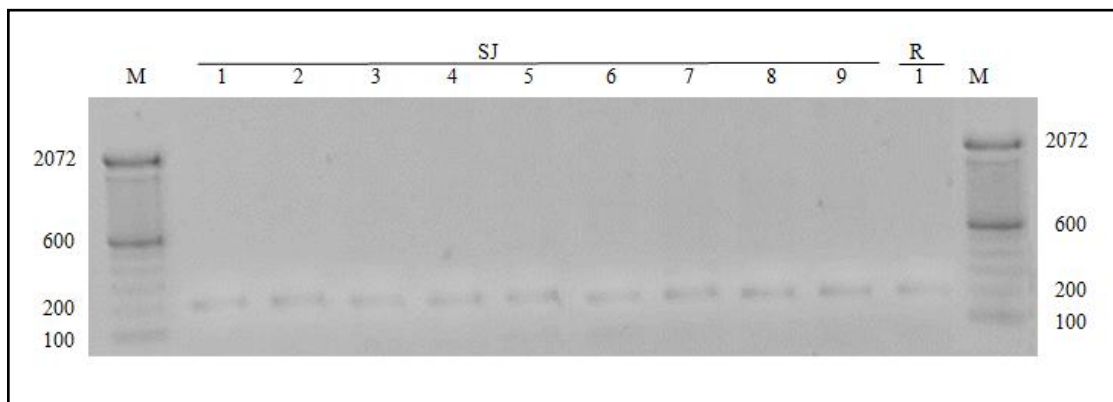


Figura 28 Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con SYBR® Safe DNA gel stain del amplicón del gen *16D10* de muestras de suelo recolectadas en San Pedro de Pimampiro. Donde SJ: San José, R: El Rosal y M: marcador de peso molecular de ADN de 100 pb (*TracitTM 100bp DNA Ladder*, Invitrogen®)

3.3.3 Ensayos de optimización para la identificación de *M. incognita* y *M. javanica*

La identificación de dos de las cuatro especies más importantes de *Meloidogyne* spp. se realizó mediante la amplificación del gen del colágeno *Mjcol-3* para *M. javanica* y de la proteína 8D05 de la glándula esofageal para *M. incognita* a partir de ADN de raíces y de suelo de las especies *Solanum lycopersicum* recolectadas en San Pedro de Pimampiro.

Las condiciones óptimas de la *master mix* para la PCR se detallan en la Tabla 21 después de la estandarización y modificación de los protocolos utilizados por Devran y Ali Sôgût (2009) y Grijalva (2013).

Tabla 21 Concentración de los componentes de la *master mix* para la identificación de las especies *M. incognita* y *M. javanica* a partir de ADN de raíz y de suelo de las especies *Solanum lycopersicum*.

Reactivo	Ci	Cf
<i>Buffer</i>	10 X	1 X
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM
dNTPs	10 mM	0,2 mM
<i>Primer f</i>	10 µM	0,5 µM
<i>Primer r</i>	10 µM	0,5 µM
BSA**	700 ng/µl	200 ng/µl
<i>Taq polimerasa</i>	5 U/µl	1,25 U
ADN	Raíz 30 ng/µl	
	Suelo 20 ng/µl	
Volumen final de reacción 15µl		

CI, concentración inicial, CF, concentración final

**Reactivo utilizado solo en la amplificación de muestras de suelo

En la Tabla 22 se presenta el programa empleado para la amplificación de los genes que permiten la identificación de las especies *M. incognita* y *M. javanica* luego de la estandarización.

Tabla 22 Programa de PCR para la amplificación de los genes de *M. incognita* y *M. javanica* a partir de ADN de raíz de *Solanum lycopersicum*.

	Segmento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
1	Denaturación inicial	94	5:00	1
2	Denaturación	95	0:45	35
3	Annealing	Raíz 65	1:00	
4	Extensión	72	1:00	
5	Extensión final	72	10:00	1
6	Estabilización	4	5:00	1

Los productos de PCR obtenidos fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (Figura 29).

Estos resultados muestran la identificación solamente de *M. javanica* en las muestras de raíz de las especies estudiadas.

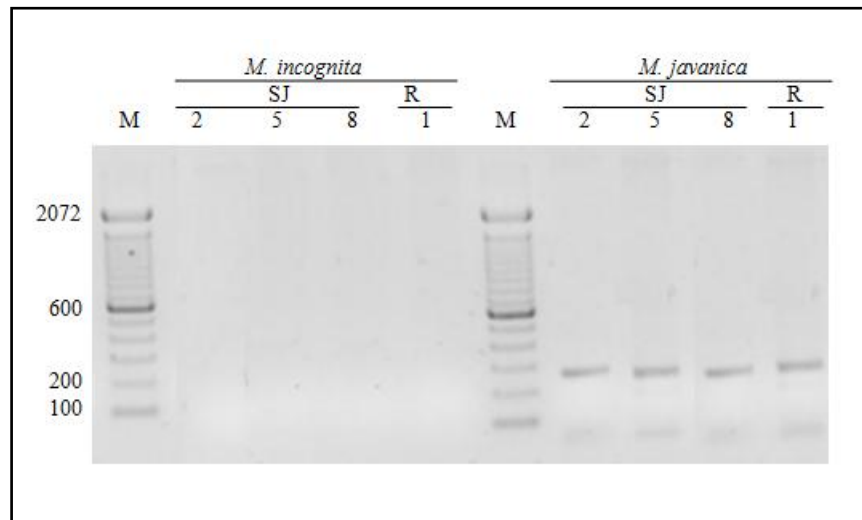


Figura 29 Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con SYBR® Safe DNA gel stain del amplicón para el gen del colágeno *Mjcol-3* de *M. javanica* y el gen de la proteína 8D05 de la glándula esofageal para *M. incognita* de muestras de raíz recolectadas en San Pedro de Pimampiro. Donde SJ: San José, R: El Rosal y M: marcador de peso molecular de ADN de 100 pb (*TracItTM 100bp DNA Ladder*, Invitrogen®)

En la Tabla 23 se presenta el programa empleado para la amplificación de los genes que permiten la identificación de las especies *M. incognita* y *M. javanica* luego de la estandarización.

Tabla 23 Programa de PCR para la amplificación de los genes de *M. incognita* y *M. javanica* a partir de ADN de suelo de *Solanum lycopersicum*.

	Segmento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
1	Denaturación inicial	94	5:00	1
2	Denaturación	95	0:45	35
3	Annealing	59	1:00	
4	Extensión	72	1:00	
5	Extensión final	72	10:00	1
6	Estabilización	4	5:00	1

Los productos de PCR obtenidos fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (Figura 30). Estos resultados muestran la identificación solamente de *M. javanica* en las especies estudiadas, debido a que cuando se amplificó para *M. incognita* no se observó ningún amplicón.

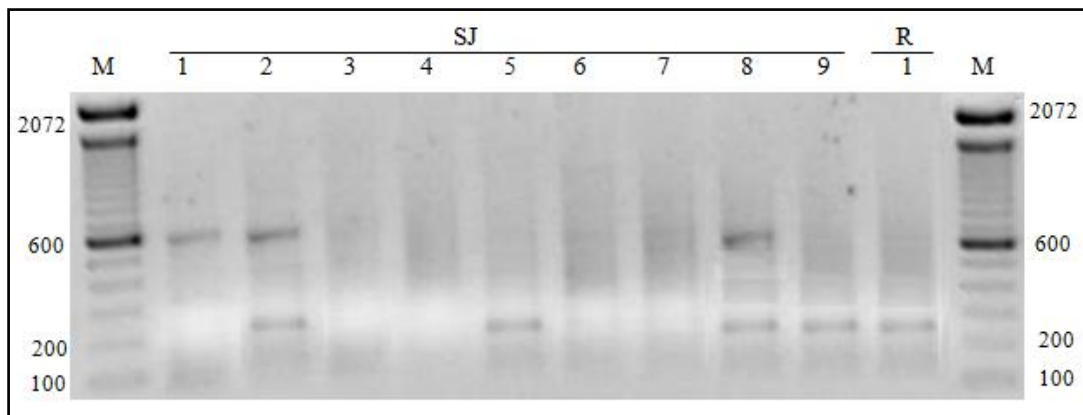


Figura 30 Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con SYBR® Safe DNA gel stain del amplicón para el gen del colágeno *Mjcol-3* de *M. javanica* de muestras de suelo recolectadas en San Pedro de Pimampiro. Donde SJ: San José, R: El Rosal y M: marcador de peso molecular de ADN de 100 pb (*TracI*TM 100bp DNA Ladder, Invitrogen®)

CAPÍTULO 4

Detección e identificación del nematodo formador de agallas *Meloidogyne* spp. en suelos agrícolas destinados al cultivo de *Solanum lycopersicum* mediante la técnica PCR

En la presente investigación se trabajó con muestras del cantón de Pimampiro en la provincia de Imbabura para recolectar las muestras de suelo y de raíz de plantas de tomate (*S. lycopersicum*) con el objeto de analizarlos en el laboratorio. Pimampiro es conocido como la capital del tomate riñón (Diario La Hora, 2009) debido a que sus suelos son altamente fértiles y con un clima cálido, donde más del 50 % de la población se dedica a la agricultura en especial al cultivo de tomate. Adicionalmente esta región presenta uno de los principales problemas fitosanitarios que atacan al cultivo del tomate como es el nematodo formador de nudo *Meloidogyne* spp. Estudios realizados por la Universidad Técnica del Norte en Imbabura confirman la existencia de este nematodo en este sector por lo que es importante implementar un método de detección temprana de este patógeno lo que ayudaría a reducir los problemas de producción en este cultivo.

4.1 Extracción y cuantificación de ADN genómico

La extracción y cuantificación de ADN genómico es fundamental para el desarrollo de la investigación (Surzycki, 2003), ya que el análisis de la amplificación de los fragmentos que permiten la detección e identificación del nematodo dependen de este procedimiento. El ADN requerido para estos análisis debe ser de alta calidad para ser sometidos a diferentes pruebas moleculares como la PCR.

En esta investigación se realizó la extracción de ADN de raíz y de suelo de plantas de *Solanum lycopersicum* con el objeto de comprobar la efectividad del protocolo de detección del nematodo *Meloidogyne* spp. e identificación de las especies *M. incognita* y *M. javanica* como las principales especies presentes en el país. En el Ecuador se encuentran presentes las cuatro especies del género *Meloidogyne* spp. (*M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla*). Siendo la especie más abundante con un 80 % de incidencia *M. incognita* seguido de *M. javanica* (Triviño *et al.*, 2003). Trabajos de Revelo y sus colaboradores en el 2007 confirman la existencia de estas dos especies en el cultivo de tomate. Taylor y Sasser en 1983 y Arias y sus colaboradores en el 2008 mencionan a *M. javanica* y *M. incognita* como las principales plagas en zonas tropicales.

La extracción de ADN de raíz se realizó con el kit *DNeasy Plant MiniKit* de la casa comercial *Qiagen*®, el cual separa los ácidos nucleicos mediante columnas y filtros selectivos. La utilización de este protocolo fue fundamental para obtener un ADN de calidad a concentraciones entre 300 – 3000 µg debido a que las muestras de raíz son ricas en polisacáridos, proteínas y otros componentes extracelulares (Surzycki, 2003). Adicionalmente, el proceso inicial de maceración permitió destruir la mayoría de polisacáridos, ligninas y ácidos grasos de la muestra. Con estas consideraciones la cuantificación de las muestras se pudo obtener un ADN de buena calidad con concentraciones superiores a los 60 ng/µL como se describe en la Tabla 16 en los resultados.

La extracción de ADN de suelo se realizó mediante el *Ultraclean™ Soil DNA Isolation kit* de la casa comercial *MOBio*, el cual elimina los contaminantes mayores del suelo como los ácidos húmicos, fúlvicos y otros compuestos fenólicos que hacen interferencia en la reacción de PCR la cual se utilizará posteriormente. Los ácidos húmicos al ser semejantes a los ácidos nucleicos dificultan su separación de las muestras

en los métodos tradicionales (Bakken y Frostergård, 2006) por lo que se utilizó este procedimiento en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal con lo cual se consiguió un ADN de una elevada concentración, libre de inhibidores (Yeates, *et al.*, 1998). Este método de extracción permitió obtener en este trabajo un ADN apto para realizar la técnica PCR con concentraciones superiores a los 90 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ como se demuestran en la Tabla 17 en los resultados. Los kits comerciales tienen ventajas sobre los métodos tradicionales ya que poseen agentes purificadores que les permite atrapar como blanco las secuencias de ácidos nucleicos mediante cuentas magnéticas de un extracto complejo de ADN. El kit permitió obtener una pureza aceptable de ADN con ratios cerca de 1,7 en absorbancias A260/A280. Sin embargo, los valores bajos en el ratio A260/A230 indica que aún existe la presencia de contaminantes (Yeates *et al.*, 1998) por lo que se debe mejorar este procedimiento.

4.2 Ensayos de optimización para la detección de *Meloidogyne* spp.

Los ensayos para la detección de *Meloidogyne* spp. tanto en muestras de suelo como de raíz en *Solanum lycopersicum* se realizaron mediante la amplificación del gen *16D10* el cual se expresa en las glándulas esofageales de los nematodos del nudo principalmente en *M. incognita*. Sin embargo, Huang y sus colaboradores en el 2006 demostraron que este fragmento es conservado también en las otras tres especies principales de nematodo del nudo como los son *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla* las cuales amplifican un fragmento único de 200 pb.

Los ensayos se realizaron en muestras de raíz debido a que es la zona más afectada de la planta por el nematodo, sin embargo, éstas son una muestra crítica debido

a que los agricultores no pueden perder las plantas de tomate para proporcionar este material. Por esta razón adicionalmente se tomaron muestras de suelo para ser analizadas. La amplificación de este gen se consiguió mediante la modificación de las condiciones descritas por Grijalva (2013), las cuales se describen en la Tabla 19 bajo el programa de termociclado de la Tabla 20 como se detallan en los resultados. Además del kit para la extracción de ADN de suelo se decidió emplear el coadyuvante suero albumino bovino (BSA) en la reacción de PCR para evitar posibles inhibidores de la muestra. El BSA, según Kreader (2005) a una concentración de 200 ng/ μ l dentro del *master mix* de PCR previene la inhibición ocasionada por EDTA, FeCl₃ y compuestos húmicos. Con el objeto de estandarizar la técnica se disminuyó el volumen de la reacción para reducir costos, haciendo que la reacción planteada sea más eficiente y manejable para realizarlo a gran escala. Para concluir con la estandarización y optimización del método, se realizó un ensayo para determinar la sensibilidad de la reacción. Se estableció que la cantidad mínima de ADN detectable es 30 ng/ μ L de ADN de raíz y 20 ng/ μ L de ADN de suelo, lo que equivale aproximadamente 200 larvas en 10 g de suelo y 1000 huevos en 10 g de raíz. Finalmente, se comprobó que el método de detección desarrollado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal para los dos tipos de muestras es altamente reproducible y útil en la detección de nematodos.

La estandarización de la PCR con muestras de suelo y raíz permitió obtener productos puros y sin amplificaciones no específicas como se muestra en la Figura 27 y Figura 28 de los resultados. En la amplificación la presencia de un sólo fragmento de 200 pb indica la presencia de *Meloidogyne* spp., aunque este fragmento solamente indica la existencia del nematodo más no la especie que afecta al cultivo.

El método de detección en muestras de suelo fue exitoso ya este método logró detectar al nematodo en cultivos que aún no estaban en su fase de producción

permitiendo una detección temprana como lo indican los Laboratorios CSR en España en el 2006. El método logra determinar la presencia del nematodo en diferentes etapas de crecimiento de la planta lo que muestra la alta sensibilidad del método en la detección del nematodo. Estos resultados demuestran que la detección se puede realizar en muestras de suelo donde se encuentran nematodos, huevos o larvas, en estado de dormancia cuando la humedad no es adecuada para su desarrollo. Se ha descrito el método de detección únicamente cuando el nematodo se encuentra activo durante la etapa de producción del cultivo donde la humedad es apropiada debido a la constante irrigación haciendo inminente la formación de agallas como lo indica Taylor y Sasser en 1983.

Finalmente, se determinó que en los suelos recolectados el promedio de nematodos fue 20 larvas en 10 g de suelo el cual representa el límite umbral de daño establecido en investigaciones de Perry y sus colaboradores en el 2009 donde la media es 0,5 – 2 juveniles por g de suelo o 1000 individuos en 500 cm³ de suelo. Análisis de suelos realizados en los Laboratorios CRS en España (2006) confirman que existen pequeñas pérdidas de producción a densidades menores de 10 nematodos por g de suelo, (conocido como límite de tolerancia T), aunque las pérdidas aumentan a densidades entre 10 – 20 nematodos por g de suelo. Sin embargo, estas densidades no justifican la aplicación de un tratamiento (conocido como umbral económico de daño E). En el caso de sobre pasar éstos valores de densidad se recomienda un tratamiento del suelo con un nematocida.

4.3 Identificación de *M. incognita* y *M. javanica*

La identificación de las principales especies de *Meloidogyne* spp. en los cultivos agrícolas, especialmente en tomate, es fundamental para el manejo integrado de plagas y enfermedades. Como se mencionó anteriormente, las dos especies con mayor incidencia poblacional en el país que atacan al cultivo de *Solanum lycopersicum* son *M. incognita* y *M. javanica*. Por esta razón se están analizando estas dos especies, en este sentido esta investigación es el primer estudio a nivel molecular para la identificación por especies con una técnica precisa, confiable, sensible y con la cual se pueden analizar varias muestras a la vez.

En un inicio para la amplificación en la PCR se tomaron *primers* bibliográficos derivados del estudio de Devran y Ali Söğüt en el 2009, donde la identificación de *M. incognita* se realizó con los *primers* MengincF/MengincR y la identificación de *M. javanica* con los *primers* ZiljavF/ZiljavR. Estos *primers* deberían amplificar un amplicon de 955 pb y 670 pb, respectivamente. Sin embargo, al reproducir las condiciones mencionadas de la *master mix* y el perfil térmico aplicado en el estudio no se obtuvo ningún amplicon en las muestras de suelo y raíz. Se presume que esto se debe a que puede existir una variación entre las especies estudiadas tomando en cuenta su distribución geográfica, superposición, entrecruzamiento u otros factores como lo indican Taylor y Sasser en 1983. De igual forma los estudios de identificación se basan principalmente en la utilización de ADN de juveniles, hembras o masas de huevos y no con ADN de raíz o de suelo como se realiza en esta investigación. Adicionalmente, las secuencias de los *primers* se derivaron de otras técnicas moleculares como SCARs o RFLPs las cuales fueron específicas para las especies y razas detectadas en esos países,

en el caso de los *primers* para *M. incognita* el estudio se realizó en China mientras que para la identificación de *M. javanica* se realizó en Noruega.

Por estos motivos, se diseñaron en el laboratorio *primers* específicos para identificar *M. incognita* y *M. javanica*. La identificación de *M. incognita* se realizó con los *primers* IncF/IncR del gen que codifica la proteína 8D05 la cual es secretada por el estilete de los nematodos parásitos cuya función modifica drásticamente las células de las plantas en células gigantes para la alimentación del patógeno. Este gen muestra su máxima expresión cuando los juveniles J2 se encuentran dentro de las raíces del hospedero (Xue *et al.*, 2013). *M. javanica* se identificó con los *primers* JavF/JavR del gen del colágeno *Mjcol-3* de la superficie del nematodo de esta especie. Este gen se caracteriza porque posee un carboxi-terminal más corto lo que la diferencia de otros nematodos como *Caenorhabditis elegans*. La expresión de este gen principalmente se observa en el desarrollo de los huevos y juveniles, menos en parásitos juveniles en tercera y cuarta etapa o en hembras antes de la puesta de huevos (Koltai *et al.*, 1997).

La amplificación de los *primers* para la identificación de *M. incognita* en muestras de raíz y suelo no mostraron resultados favorables posiblemente debido a que esta especie es la más variable de todo el género como lo confirman Taylor y Sasser en 1983. Estudios realizados por Revelo (2003) y Revelo, Piedra y Hernández (2007) indican la presencia de *M. incognita* en Pimampiro, sin embargo, estas investigaciones no emiten reportes de cómo se realizó su identificación. A nivel nacional en 1992 el INIAP realizó un estudio de los principales fitonemátodos en el cual describen la presencia de *M. incognita* así como de *M. javanica* en el Ecuador pero al igual que los anteriores investigaciones no se describe el método para la identificación, por lo que el presente trabajo es el primero en identificar las especies a nivel molecular.

Es importante recalcar que los *primers* diseñados para *M. javanica* sí amplificaron en las muestras de raíz y de suelo. Esta especie en el Ecuador se considera como la segunda a nivel poblacional como lo indica Triviño y sus colaboradores en el 2003. *M. javanica* se caracteriza por ser conservada en todas sus poblaciones a nivel mundial. Taylor y Sasser en 1983 y Arias y sus colaboradores en 1998 describen que la frecuencia de *M. javanica* es mayor en el Ecuador. La amplificación de este gen se consiguió mediante el empleo de las condiciones de la *master mix* expuestas en la Tabla 21, bajo el programa de termociclado de la Tabla 22 y la Tabla 23 descrito en los resultados. Al igual que en la detección de *Meloidogyne* el ADN de suelo se decidió emplear un coadyuvante en la reacción de PCR para evitar posibles inhibiciones a concentraciones de 200 ng/ μ l como lo recomienda Kreader (2005). Para concluir con la estandarización y optimización del método, se realizó un ensayo para determinar la sensibilidad de la reacción. Se estableció que la cantidad mínima de ADN detectable es 30 ng/ μ L de ADN de raíz y 20 ng/ μ L de ADN de suelo, lo que equivale aproximadamente 200 larvas en 10 g de suelo y 1000 huevos en 10 g de raíz.

Los productos de PCR obtenidos en muestras de raíz se presentaron puros y sin amplificaciones no específicas como se observa en la Figura 29 de los resultados. Mientras que la identificación de *M. javanica* se presentó solamente en cinco muestras de suelo lo cual indica la presencia de esta especie. Sin embargo, tres de los cinco productos de PCR amplificados en suelo se presentó la amplificación de otra banda de aproximadamente de 600 pb lo cual puede deberse a una nueva raza dentro del grupo de *M. javanica* o a secuencias similares del gen utilizado para la identificación de esta especie como se observa en la Figura 30 en los resultados. Se comprobó que el método desarrollado es altamente reproducible al no encontrar diferencias en los resultados de detección tras las repeticiones de todo el método estandarizado y optimizado.

CAPITULO 5

Detección e identificación del nematodo formador de agallas *Meloidogyne* spp. en suelos agrícolas destinados al cultivo de *Solanum lycopersicum* mediante la técnica PCR

El muestreo sistemático para la recolección de muestra de suelo en campo es la técnica ideal para el estudio del nematodo formador del nudo *Meloidogyne* spp, debido a que esta técnica toma en cuenta la naturaleza del campo y la distribución inequitativa de este parasito. El patrón de recolección en zigzag al interior de cada invernadero fue el más idóneo para la obtención de muestras de suelo.

Esta investigación logró obtener buenos resultados a partir de muestras de suelo y raíz de *Solanum lycopersicum*. Los métodos estandarizados y optimizados para la detección e identificación de las especies de *Meloidogyne* spp. permitieron determinar la existencia del nematodo formador del nudo.

El método de extracción de ADN mediante el *DNeasy Plant Mini Kit* y el *UltracleanTM Soil DNA Isolation kit* de MoBio reducen la cantidad de inhibidores presentes en las muestras recolectadas en campo mediante el uso de columnas y filtro selectivos permitiendo obtener un ADN de buena calidad.

El gen efector *16D10* permitió la detección del nematodo formador del nudo *Meloidogyne* spp. en las muestras recolectadas en el cantón San Pedro de Pimampiro en la provincia de Imbabura. La detección de *Meloidogyne* spp se consiguió exitosamente en las muestras de suelo y raíz de plantas de tomate (*S. lycopersicum*) a diferentes etapas de desarrollo. La utilización del gen *16D10* cuya región se conserva entre las cuatro

especies principales de este nematodo (*M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla*) amplificó un fragmento específico del genoma correspondiente a 200pb.

En el presente estudio se determinó que el límite de detección de *Meloidogyne* spp. y la identificación de la especie *M. javanica* en muestras de suelo es 20 ng/ μ l mientras que en muestras de raíz es de 30 ng/ μ l lo que equivale aproximadamente 200 larvas en 10 g de suelo y 1000 huevos en 10 g de raíz.

Se determinó que los nematodos provenientes de diferentes puntos de recolección presentan diferencias genéticas. El empleo de *primers* específicos determinó que en Pimampiro mayoritariamente se encuentra la especie *M. javanica* lo cual refuta la presencia de *M. incognita* como lo indican algunas investigaciones realizadas en dicho cantón por parte de la Universidad del Norte de Imbabura.

La identificación de la especie *M. javanica* se logró exitosamente tanto en muestras de raíz como de suelo mediante el empleo de los *primers* JavF/JavR. El diseño se realizó a partir del gen del colágeno *Mjcol-3* para esta especie.

Los *primers* diseñados para la identificación de la especie *M. incognita* (IncF/IncR) no amplificaron en ninguna de las muestras de raíz y de suelo.

CAPITULO 6

Detección e identificación del nematodo formador de agallas *Meloidogyne* spp. en suelos agrícolas destinados al cultivo de *Solanum lycopersicum* mediante la técnica PCR

Es necesario realizar una búsqueda de un método de extracción de ADN a partir de muestras de suelo diferente que se aproxime a los resultados obtenidos mediante el kit para ser utilizado en la técnica de PCR.

Es de suma importancia continuar con este estudio para la identificación de las otras especies de *Meloidogyne* spp como lo son *M. arenaria* y *M. hapla*, cuya incidencia poblacional es menor en el Ecuador respecto a las especies estudiadas.

Se recomienda realizar la secuenciación del amplicon de aproximadamente 600 pb que se manifiesta en la identificación de *M. javanica* en algunas muestras de suelo con el propósito de buscar secuencias similares y determinar su origen.

Se recomienda efectuar un estudio de patógenos en tomate, particularmente del nematodo agallador *Nacobus aberrans* reportado en Pimampiro ya que al igual que *Meloidogyne* este patógeno ocasiona la formación de nódulos en las raíces.

Se recomienda emplear los protocolos estandarizados y optimizados en esta investigación a nivel de campo dentro del país para la detección de fitopatógenos en el Laboratorio de Biotecnología de la ESPE.

BIBLIOGRAFIA

Abad, P., Favery, B., Rosso, M. y Castagnone - Sereno, P. (2003). Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology*, 4, 217-214.

Arias, Y., Gonzales, I., Rodríguez, M., Rosales, C., Suarez, Z y Peteira, B. (2009). Aspectos generales de la interacción de tomate (*Solanum lycopersicum*) - *M. incognita*. *Revista protección vegetal*, 24 (1), 1-13.

Arias, Y., Gonzáles, I., Rodríguez, M., Rosales, C., Suarez, Z y Peteira, B. (2009). Patógenos y plantas interacción. *Revista protección vegetal*, 24 (2), 1-13.

Asociación de Agrónomos Indígenas de Cañar (AAIC). (2003). El cultivo de tomate riñón en invernadero (*Lycopersicum esculentum*). Ecuador.

Atkins, S. D., Clark, I. M., Penny, S.-P., Hirsch, R. y Kerry, B. R. (2005). The use of real-time PCR and species-specific primers for the identification and monitoring of *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Ecology*, 51, 257 - 264.

Bakken, L. y Frostergård, A. (2006). Nucleic acid extraction from soil. *Soil Biology*, 8.

Bendezu, F. y Starr, J. (2003). Mechanism of resistance to *Meloidogyne arenaria* in the peanut cultivar COAN. *Journal of Nematology - The society of Nematologists*, 35, 115 - 118.

Bioquímica III. (2009). Extracción de RNA y DNA bacteriano. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

Bird, D.M. y Kaloshian, I. (2003). Are roots special? Nematodes have their say. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62, 115 - 123.

Chitwood, D. J. (2003). Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture–Agricultural Research Service. *Pest Management Science*, 59, 748 - 753.

Corpeño, B. (2004). Manual del Cultivo de Tomate. Centro de Inversión, Desarrollo y Exportación de Agronegocios. El Salvador.

Conye, D., Nicol, J., & Claudius-Cole, B. (2007). Nematología práctica: Una guía de campo y laboratorio. Conotou, Benin.

Devran y Ali Sôğüt.(2009). Distribution and Identification of Root-knot Nematodes from Turkey. *Journal of Nematology*, 41, 2,128,-,133.

Diario El Comercio. (12 de marzo del 2011). Ocho variedades de tomate riñón están en los mercados locales. Diario El Comercio versión electrónica. Recuperado el 29 de noviembre de 2012 de http://www.elcomercio.com/agromar/variedades-tomate-rinon-mercados-locales_0_442755750.html

Dogliotti, S. (2011). Bases fisiológicas del crecimiento y desarrollo del cultivo de Tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill). Material del apoyo al Módulo Hortícola. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. Recuperado el 20 de diciembre de 2012 en: http://www.fagro.edu.uy/~fisveg/docencia/curso%20fisiologi%20cultivos/materiales%20teoricos/Repartido_Fisiologia_Tomate.pdf

Dong, K., R. A. Dean, B. A. Fortnum 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, 273 - 282.

Douglas, T. G., Hoang, L y Hornby, D. (2009). RNA Extraction, Separation, and Analysis. *RNA Purification and Analysis: Sample Preparation, Extraction, Chromatography*, 1-16.

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. The Departments of Plant Pathology and Genetics North Carolina State University. Estados Unidos, pp. 1 - 31, 45 - 48

Escalona, V., Alvarado, P., Monardes, H., Urbina, C. y Martin, A. (2009). Manual del Cultivo de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Chile. pp 10-19, 36-54

Escudero, P. (2004). Evaluación de la Competitividad del sistema agroalimentario del tomate riñón. SICA. Ecuador. Recuperado el 15 de diciembre de 2012, de: http://www.sica.gov.ec/agronegocios/biblioteca/Ing%20Rizzo/perfiles_productos/tomate.pdf

Espinoza, L. (1998). Capítulo 17. Guía práctica sobre la técnica de PCR. Recuperado el 15 de abril de 2013 de <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap17.pdf>

Falcón, L. y Valera, A. (2007). Extracción de ácidos nucleicos. Las herramientas moleculares. Recuperado el 11 de noviembre de 2012 en: <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap16.pdf>

FAOSTAT. (2011). Principales países productores de tomate a nivel mundial. Producción de productos alimenticios agrícolas. Recuperado el 10 de enero del 2013, de: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>

Galván, A., Tejada, M., Camargo, A., Higuera, J., Mariscal, V. y Fernández, E. (2001). 41. Comprobación de colonias transgénicas mediante PCR y electroforesis. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Campus Universitario de Rabanales.

Hernández, I., García, J.E., Tarango, L., García, J.P., Becerra, J., Torres, M., Pastor, F., Martínez, O., Valverde, A., Espinoza, A., Cedillo, I., Talavera, D., Quero, A.,

Amante, A., Róssel, D., Ortiz, H. y Tiscareño, A. (2003). Estudio de la trayectoria y prospectiva de los mercados del tomate. San Luis de Potosí, Chile.

Hernandez-Ochandía, D., Arias, Y., Gómez, L., Peteira, B., Miranda, I. y Rodríguez, M. (2012). Elementos del ciclo de vida de población cubana de *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood en *Solanum Lycopersicum* L. *Revista Protección vegetal*, 27 (3).

Hirsch, P. R., Mauchline, T. H., Mendum, T. A., y Kerry, B. R. (2000). Detection of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* in nematode-infested plant roots using PCR. *Mycological Research*, 104, 435 - 439.

Huang, G., Dong, R., Allen, R., Davis, E., Baum, T. y Hussey, R. (2006). A root-knot nematode secretory peptide functions as a ligand for a plant transcription factor. *The American Phytopathological Society*, 19, 5, 463-470

Hubschen, J., Kling, L., Ipach, U., Zinkernagel, V., Brown, D. y Neilson, R. (2004). Development and validation of species-specific primers that provide a molecular diagnostic for virus-vector longidorid nematodes and related species in German viticulture. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 883 - 891.

INFOAGRO. (2003). El cultivo del tomate. Recuperado el 5 de enero de 2013, de: <http://www.infoagro.com/hortalizas/tomate.htm>

Instituto nacional de estadísticas y censos (INEC). (2010). Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua ESPAC. Extraído el 15 de diciembre de 2012 en <http://www.ecuadorencifras.com/cifras-inec/main.html>.

Instituto nacional de estadísticas y censos (INEC). (2011). Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua ESPAC. Extraído el 15 de diciembre de 2012 de <http://www.ecuadorencifras.com/cifras-inec/main.html>.

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). (2010). NEMATODOS: Muestreo de Suelo para prevención y diagnóstico en cultivos hortícolas. Centro Regional Mendoza - San Juan PROYECTO: Desarrollo sustentable de la horticultura regional

Jaramillo, J., Rodríguez V., Guzmán M., Zapata M. y Rengifo, T. (2007). Manual técnico: buenas prácticas agrícolas (BPA) en la producción de tomate bajo condiciones protegidas. Recuperado el 10 de diciembre de 2012, de <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1374s/a1374s02.pdf>

Jones, J. J., Jones, R., Stall J. y Zitter, T. (2001). Plagas y enfermedades del tomate. *The American Phytopathological Society*. Traducido por M. Jiménez y Revisado por R. Jiménez, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp: 25-30.

Klug, W.S y Cummings, M.R. (1999). Conceptos de Genética. (Ménsua, J.L. y Bueno D., Trans). España, 814.

Koltai, H. Chejanovsky, N., Raccach, B. y Spiegel, Y. (1997). The first isolated collagen gene of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* is developmentally regulated. *Gene*, 196 (1-2), 191-199.

Lars, B. y Åflsa, F. (2006). Nucleid acid extraction from soil. Universidad de Agricultura de Noruega. *Soil Biology*, 8.

Lopez, R., Salazar, L. y Azofeita, J. (1991). Observaciones sobre la morfología de *Meloidogyne iincognita* con el microscopio electrónico de rastreo. *Agronomía Costarricense*, 15, ½, 105-112

Lovic, B. R., Valadez, V. A., Martyn, R. D. y Miller, M. E. (1995). Detection and identification of *Monosporascus* spp with genus-specific PCR primers and nonradioactive hybridization probes. *Plant Disease*, 79, 1169 - 1175.

Malaga, J. (2011). *Solanum Lycopersicum* L. Fam: *Solanaceae*. Recuperado el 20 de enero de 2013, en <http://josenaturaleza.blogspot.com/2011/09/solanum-lycopersicum-l-fam-solanaceae.html>

María Rosa M., Tauk, S. y Ceccato-Antonini, R. (2010). Avaliação de diferentes técnicas para extração directa de DNA de solo agriculturável Brasileiro. *HOLOS Environment*, 10, 1.

McCuiston, J. L., Hudson, L. C., Subbotin, S. A., Davis, E. L. y Warfield, Y. C. (2007). Conventional and PCR detection of *Aphelenchoides fragariae* in diverse ornamental host plant species. *Journal of Nematology*, 39, 343 - 355.

Ministerio de Agricultura y Ganadería. (1991). Aspectos Técnicos sobre Cuarenta y Cinco Cultivos Agrícolas de Costa Rica. Dirección General de Investigación y Extensión San José, Costa Rica. Recuperado el 9 de marzo de 2013 en http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/tec_tomate.pdf

Mitkowski, N.A. y Abawi, G.S..(2003). Root-knot nematodes. *The Plant Health Instructor*. Recuperado el 15 marzo de 2013 de: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/Nematodes/Pages/RootknotNematodes.aspx>

New England Biolabs.(2013). PCR AMPLIFICATION & PCR. Recuperado el 30 de abril de 2013 en: <https://www.neb.com/applications/dna-amplification-and-pcr>

Núñez, F. (1995). El Cultivo del Tomate. Ediciones Mundi-Prensa. Primera edición. Ecuador. pp 45-78

Nuez, F. (2001). El cultivo del Tomate. España: Mundi-Prensa.

Ñuño, R. (2007). Manual de Producción de Tomate rojo bajo condiciones de invernadero para el Valle de Mexicali, Baja California. Fundación Produce.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura [FAO]. (2002). El clima protegido en clima mediterráneo. Manual preparado por el Grupo de Cultivos Hortícolas. Dirección de producción y protección vegetal. Recuperado el 15 de febrero de 2013 de: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/005/s8630S/s8630S00.pdf>

Pérez, G. (2000). Amplificación de DNA mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). Departamento de Bioquímica y Biología molecular. Córdoba.

Pérez, M. (2010). Mejoramiento genético en *Solanum lycopersicum* para la resistencia al pasador del fruto *Neoleucinodes elegantalis* Guenée (Lepidoptera: Crambidae). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Palmira. pp. 20 - 23.

Perry, R. y Moens M. (2006). Plant nematology. *CABI Head Office, British Library*, 7.

Perry, R., Moens, M. y Starr, J. L. (2009). Root-knot nematodes. Reino Unido, 1 - 13, 18 - 23, 55 - 88, 98 - 112

Posso, D. (2009) Electroforesis del ADN en geles de agarosa. Protocolos de Laboratorio UEG. Recuperado el 28 de abril de 2013 en <http://www.ivic.gob.ve/ecologia/ueg/formatos/Electroforesis%20de%20ADN%20en%20geles%20de%20agarosa.pdf>

Productores de hortalizas. (2006). Plagas y enfermedades del Tomate. Guía de identificación y manejo.

Powers, T. O., Mullin, P. G., Harris, T. S., Sutton, L. A. y Higgins, R. S. (2005). Incorporating molecular identification of *Meloidogyne* spp. into a large-scale regional nematode survey. *Journal of Nematology*, 37, 226-235.

Puedmag, J. y Hernández M. (2007). Eficiencia de nematocidas biológicos en el control de *Meloidogyne incognita* en tomate de mesa (*lycopersicon esculentum* mill.)

Bajo invernadero, en Socapamba - Imbabura. *Proyecto de grado previa a la obtención de Título de tercer nivel. Universidad Técnica del Norte.*

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, 434-441.

Rahman, L. (2003). Root knot disease and its control. National Wine and Grape Industry Centre. Tercera edición. Wagga Wagga.

Revelo, J. (2003). Manejo integrado de plagas para el mejoramiento de la producción sostenible de frutas en la zona andina. Proyecto FONTAGRO 5

Revelo, J., Piedmag, J y Hernandez, M. (2007). Eficiencia de nematocidas biológicos en el control de *Meloidogyne incognita* en tomate de mesa (*Lycopersicon esculentum* Mill) bajo invernadero en Socapamba Imbabura. *Proyecto de grado previa a la obtención del Título de tercer nivel. Universidad Técnica del Norte.*

Rodríguez, N. y Barrios, M. (2011) Capítulo 85: reacción en cadena de la polimerasa PCR y otras técnicas moleculares en el estudio de afecciones dermatológicas. Laboratorio de Ingeniería Genética, Universidad Central de Venezuela.

Rodríguez, M., Sánchez, L., Gómez, L., Hidalgo, L., González, E., Gómez, M., Díaz-Viruliche, L., Casanova, A., Cuadra, R., Fernández E. y Hernández, R. (2005). *Meloidogyne* spp. plagas de las hortalizas: Alternativas para su manejo en sistemas de cultivo protegidos. *Revista Protección Vegetal*, 20 (1)

Romero, A. (2010). *Caracterización de la Biodiversidad Fúngica de ecosistemas de áridos de Baja California, México*

Salazar, E. (2004). Estrategia Nacional de Seguridad Alimentaria. Despacho del Viceministro de Desarrollo Rural Integral. Ministerio de Agricultura y Tierras. Lima-

Perú. Recuperado el 20 de febrero, 2011 en <http://www.fao.org/righttofood/inaction/countrylist/Venezuela/EstrategiaNacionaldeSeguridadAlimentaria.pdf>

Sánchez, G. (2007). Comportamiento de las principales variedades comerciales de tomate de mesa (*Lycopersicon esculentum* Mill) al parasitismo de los nematodos “Nudo de la raíz” (*Meloidogyne incognita*) y “rosario de la raíz” (*Nacobbus aberrans*) en Ibarra – Imbabura. *Proyecto de grado previa a la obtención del Título de tercer nivel. Universidad Técnica del Norte.*

Sánchez, I. y Barrera M. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*, VII, 3

Sanguinetti, M. (2003). Nueva variante de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* afectando plantas de tomate en invernadero en la V Región. Universidad de Valparaíso. Chile. Recuperado el 10 de enero de 2013 en http://ucv.altavoz.net/prontus_unidacad/site/artic/20061205/pags/20061205174914.html

Sardanelli, S. (2010). Root-knot Nematode. Plant Nematology Resources. College of Agriculture & Natural Resource. University of Maryland.

Sasser, J. (1982). Proceedings of the third research & planning conference on root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp.

Sasser, J. N. & D. W. Freckman, (1987). A world perspective on nematology: the role of the society. *Vistas on Nematology*, editada por J. A. Veech and D. W. Dickson. *Society of Nematologists, Hyattsville, MD*. pp: 7-14.

Sayed, S., Zulfarnain, M., Othman, R., Swennen, R., Panis, B., Waele, D., Remy, S., & S. Carpentier. (2010). *In planta* PCR-based detection of early infection of plant-parasitic nematodes in the roots: a step towards the understanding of infection and plant defence. *European Journal of Plant Pathology*, 128 (3).

SICA.(2001). El tomate "*Lycopersicon esculentum*".Ecuador. Recuperado el 3 de enero de 2013, en http://www.sica.gov.ec/agronegocios/biblioteca/Ing%20Rizzo/perfiles_productos/tomate.pdf

Somma, M. y Querci, M. (2007). Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. Sesión nº 5. Electroforesis en gel de agarosa. Organización mundial de la salud. Oficina regional para Europa. Recuperado el 28 de abril de 2013 en <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/Sesi%C3%B3n5.pdf>

Song, D. (2007). Plant Stress and Biotechnology. *Republic of China: National Research Centre/or Banana, Trichy.*

Starr, J. (2011). Root-knot Nematodes. Texas Plant Disease Handbook. Recuperado el 15 de febrero de 2013 en <http://plantdiseasehandbook.tamu.edu/problems-treatments/problems-affecting-multiple-crops/root-knot-nematodes/>

Surzycki, S. (2003). Human molecular biology. *Germany: Blackwell Publishing.*

Taylor A.L. y Sasser, J.N. (1983). Biología, Identificación y Control de los nematodos de Nódulo de la Raíz (Especies de *Meloidogyne*). Proyecto internacional de *Meloidogyne*. Universidad de Carolina del Norte. Estados Unidos.

Tigrero, J. y Ortega C. (2002). Cultivo de Tomate Riñón bajo invernadero. Sangolquí, Ecuador. pp: 3 – 5, 20 – 25.

Triviño, C., León, J., Casco, C., Solano, T., Navia, S., Velasco, L., Guijarro, G., Castro, E., Bustamante, J., Romero, M. y Songor Y. (2003). Control biológico del nematodo agallador *Meloidogyne* spp. con la bacteria *Pasteuria penetrans* en campos de producción. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones agropecuarias, Universidad Técnica de Babahoyo, Universidad Técnica del Norte y Universidad Nacional de Loja.

Velasco, R. (2005). Marcadores moleculares y la extracción de ADN. Facultad de Ciencias Agropecuarias, 3, 1.

Walters, D. (2011). Plant Defense Warding off attack by pathogens, herbivores, and parasitic plants. Primera edición. Editorial Blackwell. USA. pp 15 - 77

Xue, B., Hamamouch, N., Li, C., Huang, G., Hussey, R., Baum, T. y Davis, E. (2013). The 8D05 Parasitism Gene of *Meloidogyne incognita* is required for successful infection of host roots. *Phytopathology*, 103, 2, 175 (2013)

Yeates, C., Gillings, M.R., Davinson A.D., Altavilla, N. y Veal D.A. (1998). Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biological procedures*, 1, 1, 1-8

Zarate, P., Jiménez, C., Badillo, J., Garibay, C. y Oliver, M.C. (2009). Manual de Laboratorio de Biotecnología Molecular. Instituto Politécnico Nacional. Departamento de Bioprocesos. Academia de Biotecnología. México.

Zouhar, M., Marek, M., Douda, O., Mazáková, J. y Ryšánek, P. (2007). Conversion of sequence-characterized amplified region (SCAR) bands into high throughput DNA markers based on RAPD technique for detection of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* in crucial plant hosts. *Plant Soil and Environment*, 53, 97-104.