



REVISTA
MEXICANA DE
FITOSANIDAD

Sección
Artículo científico.
Pp: 9–17
Fecha de publicación:
31-agosto-2017.

Recibido:
24-04-2017
Aceptado:
02-08-2017

Correos electrónicos

ISSN: 2448-9093

Edita
Sociedad Mexicana de
Fitosanidad.
Calle Amado Nervo
s/n, Tepatepec.
Francisco I. Madero,
Hidalgo. C. P. 42660.

Índice, resúmenes,
abstracts, vols., en:
www.revimexfito.com.mx

© 2017 - Revista
Mexicana de Fitosanidad

ANÁLISIS PCR-RFLP DE LA REGIÓN 18S DEL DNAr DE POBLACIONES DE *Nacobbus aberrans*¹ (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944

ANAYELI TIANGUISTENGO-MORALES¹, MARBAN-MENDOZA, N.¹, VALADEZ-MOCTEZUMA, E.², JUÁREZ-HERNÁNDEZ, P.², GUERRERO-TOLEDO, F. DE M.³ Y CABRERA-HIDALGO, A.^{1*}.

¹Departamento de Parasitología Agrícola, ^{2,1}Departamento de Fitotecnia,
³Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo,
Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo, Edo. de México, C. P. 56230

¹Ext. 5356. ²Ext. 6438. ³Ext. 5484

*Autor de correspondencia: ajcabrerahidalgo@gmail.com.mx

RESUMEN:

Nacobbus aberrans es un fitonematodo con alta heterogeneidad morfológica y amplio rango de hospedantes, esta distribuido en áreas tropicales y templadas de América, y parasita más de 84 especies vegetales de 18 familias botánicas. En este trabajo se evaluó la funcionalidad de la técnica PCR-RFLP para la identificación y diferenciación de poblaciones de *N. aberrans* usando la región 18S del DNA ribosomal (DNAr), digerida con nueve endonucleasas. Se recolectaron poblaciones de *N. aberrans* y *M. incognita* de seis estados de la Republica y se incrementaron en plantas de jitomate bajo condiciones de invernadero. La extracción de DNA se hizo de hembras de los nematodos y se amplificó la region 18S-DNAr. Los amplicones se digirieron con nueve enzimas de restricción: *AvaII*, *HhaI*, *HaeIII*, *KpnI*, *HindIII*, *SmaI*, *BsuRI*, *EcoRI* y *MboI*, y los productos se separaron en geles de acrilamida 8 %. El análisis de polimorfismos con marcadores RFLP mostró diferencias entre las poblaciones de fitonematodos. Seis de las nueve enzimas digirieron exitosamente los amplicones 18S-DNAr. Al comparar los patrones de digestión, se logró agrupar y separar claramente las poblaciones de *N. aberrans* de las de *Meloidogyne*; por lo que se recomienda el uso de esta técnica como una herramienta auxiliar en la identificación de estos organismos fitopatógenos.

Palabras clave: Fitonematodos agalladores, enzimas de restricción, DNA ribosomal, UPGMA.

PCR-RFLP Analysis of the 18s-rDNA region of populations of *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944

ABSTRACT:

Nacobbus aberrans is an important plant-parasitic nematode with a high morphological heterogeneity and a broad host range, which is distributed in tropical and temperate regions of the Americas, parasitizing 84 cultivated and non-cultivated plant species classified into 18 families. In this work, the functionality of the PCR-RFLP technique for the identification and differentiation of populations of *N. aberrans* using the 18S-rDNA region was evaluated. It was digested with nine restriction enzymes. The populations of *N. aberrans* y *M. incognita* were isolated from different hosts in Guanajuato, Michoacán, Mexico, Nayarit, Puebla and Tlaxcala, and were increased and maintained in a greenhouse on tomato plants. Subsequently, the DNA was obtained of females from different populations. The 18S-rDNA

region was amplified and digested with nine restriction enzymes *Ava* II, *Hha* I, *Hae* III, *Kpn* I, *Hind* III, *Sma* I, *Hae* III (*BsuR* I), *EcoR* I y *Mbo* I. The analysis of polymorphisms with RFLP showed differences between populations of phytonematodes. Only six enzymes (*Ava* II, *Hha* I, *Hae* III, *Kpn* I, *BsuR* I y *Mbo* I) digested successfully the 18S amplicons. Comparing the digestion patterns obtained with these enzymes was possible to separate clearly the populations of *N. aberrans* from *Meloidogyne*. Therefore, the use of this technique is recommended as an auxiliary tool in the identification of these phytopathogenic organisms.

Keys works: PCR-RFLP, root-knot nematode, restriction enzymes, ribosomal DNA, UPGMA clustering.

INTRODUCCIÓN

Nacobbus aberrans representa una amenaza en la agricultura mexicana y mundial, debido a que posee alta capacidad reproductiva, amplia gama de hospedantes, potencial de pérdidas en rendimiento y amplia distribución geográfica, por lo que al menos 40 países han establecido medidas cuarentenarias para prevenir su ingreso. Estos factores han hecho que *N. aberrans* esté considerado como uno de los diez nematodos más importantes en fitopatología (Jones *et al.*, 2013) y lo convierten en un patógeno importante y de difícil manejo, ya que bajo condiciones ambientales favorables, una sola hembra puede producir hasta 800 huevos (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Cabrera-Hidalgo *et al.*, 2015a).

En México, *N. aberrans* es considerado uno de los grupos de fitonematodos de mayor importancia económica y alimenticia, que ataca más de 84 especies cultivadas y no cultivadas pertenecientes a 18 familias botánicas, en ambientes secos y semiáridos, y en altitudes altas (Manzanilla-López *et al.*, 2002). Actualmente es objeto de diversos estudios, lo que ha permitido el uso y desarrollo de nuevas técnicas bioquímicas y moleculares en la fitonematología para facilitar su diagnóstico, estimar la diversidad genética de las poblaciones e inferir las relaciones filogenéticas entre los taxones (Cabrera-Hidalgo *et al.*, 2015b).

La correcta identificación de fitonematodos tiene importantes implicaciones, y es fundamental para lograr el éxito en la implementación de medidas de combate en cualquier sistema de producción agrícola. La estrategia más utilizada para la identificación de organismos plaga es la caracterización morfológica y morfométrica, sin embargo, tienen la desventaja de ser laboriosas y demandan un amplio conocimiento en taxonomía. En el caso particular de fitonematodos, puede

conducir a errores si no se tiene la debida preparación científica, ya que estos organismos pueden presentar marcada variación fenotípica o similitudes morfológicas intraespecíficas, lo que dificulta su correcta identificación (Cabrera-Hidalgo, comunicación personal). Existen otras técnicas auxiliares como las moleculares, que proporcionan una vía más precisa y disminuyen de manera importante las variaciones inconsistentes asociadas a las características morfológicas, y proporciona una mayor confiabilidad en el diagnóstico de plagas (Cabrera-Hidalgo *et al.*, 2015b).

Entre las herramientas de biología molecular usadas para la identificación y caracterización de organismos patógenos, se encuentran los marcadores moleculares, útiles para localizar y aislar genes de interés. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o co-dominante (Simpson, 1997). El análisis de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) fue el primer marcador de DNA utilizado por biólogos poblacionales (Parker *et al.*, 1998). Esta técnica expresa diferencias específicas del DNA que son reconocidas por enzimas de restricción particulares (endonucleasas). Cada una de las endonucleasas reconoce y corta solamente una secuencia específica de bases nitrogenadas en el DNA, generando fragmentos de longitud definida; y cualquier mutación dentro de esos sitios, podría cambiar el patrón del fragmento y permitir que se detecte un RFLP al comparar dos o más genomas (Valadez y Kahl, 2000). Esta técnica provee una clara discriminación de las variaciones intra e interespecíficas de fitonematodos y permiten la diferenciación entre poblaciones de nematodos (Powers *et al.*, 1997; Devran *et al.*, 2002).

El análisis de PCR- RFLP de las regiones ITS del DNAr se usan en diversos estudios para el diagnóstico de distintos géneros de nematodos, incluyendo los géneros *Meloidogyne* y *Nacobbus* (Reid y Pickup, 2005; Subbotin *et al.*, 2005). Por ejemplo, Ibrahim *et al.* (1997) reportaron por primera vez diferencias moleculares y enzimáticas entre poblaciones de *N. aberrans* procedentes de Perú, México y Argentina mediante el análisis de RAPD, RFLP e isoenzimas, comprobando así la sensibilidad de esta técnica para detectar variaciones a nivel de DNA en estos organismos fitopatógenos.

Dada la importancia económica de *N. aberrans* en la agricultura nacional, no solo por las alteraciones que inducen en los cultivos sino también por su extraordinaria adaptación a distintas condiciones climáticas, su variabilidad morfológica y rango de hospedantes; el objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficiencia y sensibilidad de la técnica PCR-RFLP en la identificación y separación de poblaciones de *N. aberrans* con el uso de la región 18S del DNA ribosomal.

MATERIALES Y MÉTODO

Nematodos. Se recolectaron 18 poblaciones de fitonematodos agalladores de la rizosfera de diferentes hospedantes (*Cucurbita pepo* L., *Solanum lycopersicum* L., *Capsicum annum*, L., *Daucus carota* L., *Physalis ixocarpa* Brot. ex. Horm, *Cucumis sativus* L.) provenientes de distintas áreas geográficas de importancia agrícola a nivel nacional (Michoacán, Guanajuato, Puebla, Tlaxcala, Estado de México y Nayarit).

Extracción e identificación morfológica. Las poblaciones se mantuvieron e incrementaron en condiciones de invernadero como se describe en Cabrera-Hidalgo *et al.* (2015b). A los 60 días después del trasplante se tomaron muestras de suelo y se procesaron mediante la técnica de tamizado de Cobb (Cobb, 1918). Los nematodos extraídos se identificaron con base en las características morfológicas descritas por Sher (1970) y Manzanilla-López *et al.* (2002) para *N. aberrans*, y Hunt y Handoo (2009) para el caso de

Meloidogyne sp. Se utilizó un microscopio compuesto a 10X (Olympus®, CX31).

Extracción de DNA. Se extrajeron manualmente diez hembras de cada población de nematodos y se colocaron en tubos Eppendorf® de 1.5 ml de capacidad que contenían 500 µl de buffer de extracción (Tris 0.1 M pH 8.0, EDTA 10 mM, SDS, proteinasa K 0.2 mg·l⁻¹). Con la ayuda de un pistilo de vidrio previamente esterilizado, se maceraron todas las hembras y se colocaron en baño María a 38 °C durante 30 min. Se agregaron 30 µl de CTAB al 10 % y 70 µl de cloruro de sodio 5 M, se homogeneizó la mezcla y se mantuvo a 60 °C por 15 min. Se añadieron 50 µl de acetato de potasio 5 M y se incubaron durante 5 min en hielo. Se agregaron 700 µl de cloroformo-alcohol-isoamílico (24:1) y se centrifugó a 13 000 rpm por 10 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf® nuevo de 1.5 ml y se agregaron 640 µl de isopropanol frío y 60 µl de acetato de sodio 3 M pH 5.8 y se mezcló. Los tubos se incubaron a -20 °C durante 10 min. Posteriormente, se centrifugaron a 13 000 rpm por 10 min para obtener el pellet; se desechó el sobrenadante y se agregaron 500 µl de etanol 70 %, y se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 min., se desechó el etanol y se agregaron 40 µl de Tris-EDTA (TE) (pH 8.0).

La calidad del DNA se determinó por electroforesis en gel de agarosa 1.2 % y se cuantificó mediante espectrofotometría.

Amplificación y secuenciación de la región 18S del DNA ribosomal. La región 18S DNAr se amplificó con los pares de primers universales 988F (5'-CTC-AAA-GAT-TAA-GCC-ATG-C-3') y 1912R (5'-TTT-ACG-GTC-AGA-ACT-AGG-G-3') ambos descritos por Holterman *et al.* (2006). La reacción de PCR se hizo en una mezcla de reacción que consistió de 4 µl de DNA, 5 µl de buffer de reacción (5X), 5 µl de la mezcla de dNTP (1 mM), 2.5 µl MgCl₂ (25 mM), 1.0 µl de cada primer (100 pM), 0.3 µl de *Taq* DNA polimerasa (5 U/ µl) y agua desionizada para completar un volumen total de 25 µl. El buffer de reacción, dNTPs y la *Taq* DNA polimerasa fueron obtenidas de Promega™ (Madison, WI USA). Las condiciones térmicas para la PCR consistieron de 94 °C por 5 min, 5 ciclos [94 °C, 30 s; 45 °C, 30 s; 72 °C, 70 s], seguido de 35 ciclos [94 °C, 30 s; 54 °C, 30 s; 72 °C, 70 s], y una

extensión final de 5 min a 72 °C. Los productos de PCR se visualizaron por tinción en bromuro de etidio en gel de agarosa 1.2 % en buffer TBE 1X.

Los amplicones se purificaron y secuenciaron en la casa comercial Macrogen (Seul, Korea) con un secuenciador automático 3730xl DNA analyzer® en ambas direcciones para cada muestra. Con las secuencias editadas se hizo una búsqueda en la base de datos del GenBank para obtener la identidad de las muestras analizadas.

Análisis PCR-RFLP de la región 18S DNAr.

Las regiones 18S DNAr amplificadas se digirieron con nueve endonucleasas, de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes (Cuadro

1). La reacción de digestión incluyó 14.5 µl de agua calidad HPLC, 3 µl del DNA amplificado, 2 µl del buffer de la enzima y 0.5 µl de la enzima de restricción. Los componentes de la reacción se mezclaron cuidadosamente, se dio un pulso de centrifuga y se incubaron a la temperatura correspondiente para cada enzima (25-37 °C) por 1-16 horas.

Los productos de la digestión se verificaron en un gel de agarosa al 1.2 % (5 µl del producto digerido más 5 µl de buffer de carga) y se fotodocumentaron con el sistema Universal Hood II (Bio-Rad Laboratories, Inc.) con el programa QuantityOne®.

Cuadro 1. Tamaño de fragmentos de restricción de la región 18S-DNAr de poblaciones de *N. aberrans* digeridas con seis endonucleasas.

Enzimas de restricción [†]	Sitios de reconocimiento	Fragmentos de restricción		Tamaño esperado del fragmento (pb) ^{††}
		Nº	Tamaño (pb)	
<i>Ava</i> II	G [▼] G(A/T)C C	1	600	567
	C C(T/A)G [▲] G	2	260	261
<i>Hha</i> I	G CG [▼] C	1	650	652
	C [▲] GC G	2	230	230
		3	110	116
<i>Hae</i> III	GC [▼] CC	1	580	587
	CC [▲] GG	2	180	159
		3	100	147
<i>Kpn</i> I	G GTAC [▼] C	1	700	-
	C [▲] CATG G	2	300	-
<i>Bsu</i> R I	A [▼] AGCTT	1	580	587
	TTCGA [▲] A	2	180	159
		3	100	147
<i>Mbo</i> I	GATC	1	510	513
	CTAG	2	360	363
<i>Hind</i> II	A [▼] AGCT T	0	-	-
	T TCGA [▲] A	0	-	-
<i>Eco</i> R I	G [▼] AATT C	0	-	-
	C TTAA [▲] G	0	-	-
<i>Sma</i> I	CCC [▼] GGG	0	-	-
	GGG [▲] CCC	0	-	-

[†] Temperatura de digestión= 27 °C para *Sma* I y 37 °C para el resto de las enzimas.

Finalmente, los productos de digestión se separaron en geles de acrilamida 8 % (21:1) en buffer TBE y teñidas con nitrato de plata 0.2 %. Para determinar el tamaño de los fragmentos digeridos se incluyó el marcador molecular de 1 kb (Promega®, Madison, WI USA). La electroforesis se condujo a 240 volts durante 2 horas. Todas las imágenes se digitalizaron con

una cámara fotográfica marca Sony Cyber-shot (Carl Zeiss®, USA).

Análisis de datos. Las bandas digeridas se codificaron en una matriz binaria, a partir de la cual se construyó una matriz de similitud con el programa NTSyS pc. 2.0 y el coeficiente de similitud Dice (Dice, 1945). Para el análisis de conglomerados se utilizó el método del promedio

aritmético de pares no ponderados (UPGMA) (Sneath y Sokal, 1973). En el estudio se incluyeron poblaciones de *Meloidogyne incognita* con el propósito de contrastar los agrupamientos.

RESULTADOS

Identificación morfológica de las poblaciones de fitonematodos. Los especímenes de *Nacobbus* sp. se caracterizaron por presentar un fuerte dimorfismo sexual. Los juveniles de *N. aberrans* fueron alargados y delgados con cola redondeada, curvada ventralmente y con una zona hialina (Fig. 1A).

El estilete y el bulbo medio con válvula bien desarrollada (Figs. 1A y C). La glándula esofágica fue alargada y sobrepuesta dorsalmente al intestino (Fig. 1A, flecha roja). Machos vermiformes, con región labial hemisférica y cola redondeada (Fig. 1B). Ala caudal inconspicua, con espículas ligeramente curvadas ventralmente y gobernáculo simple (Fig. 1D). Las hembras maduras se presentaron como endoparásitas sedentarias de las raíces, de forma sacular en la parte central del cuerpo, con cola corta redondeada en forma de domo, cuello corto y región posterior redondeada (Figs. 1F y G).

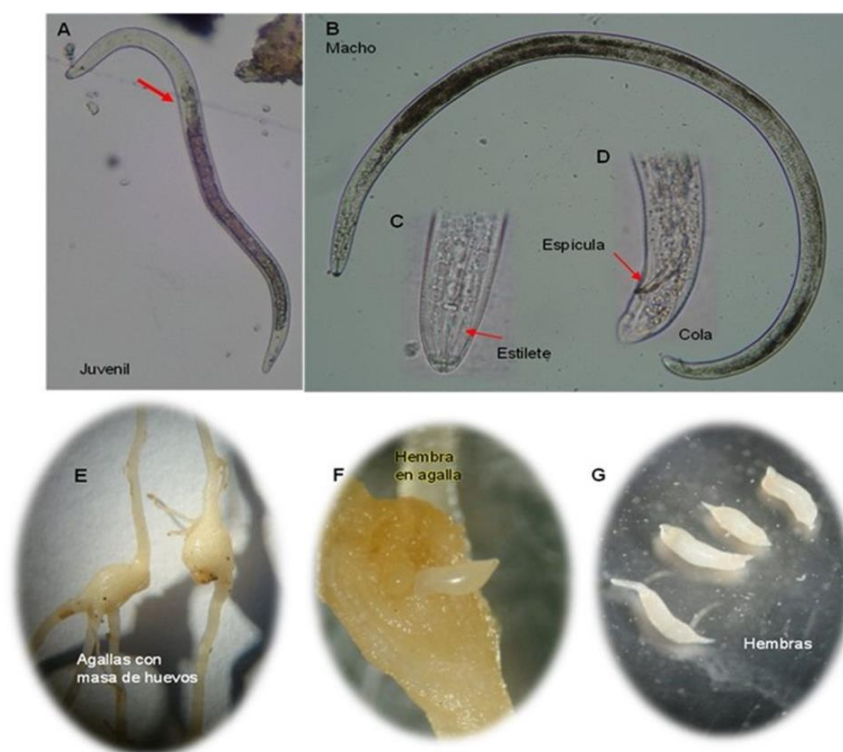


Figura 1. *Nacobbus aberrans*. Juvenil de segundo estadio (A) (la flecha indica trasposición esófago-intestino); macho (B) y detalle de la región anterior (C) y posterior (D) del macho; hembras maduras (F y G); agallamiento inducido por *N. aberrans* (E).

Detalles de las agallas asociadas a *N. aberrans* se muestran en la figura 1E.

El análisis morfológico de juveniles y patrones perineales de las hembras permitió la identificación de las poblaciones de *Meloidogyne* en estudio. Las hembras de *M. incognita* se caracterizaron por presentar cuerpo en forma de pera, patrón perineal oval a redondeado, con arco dorsal alto y cuadrado; estrías lisas a onduladas y campos laterales ausentes y el espacio lateral está

cubierto por estrías con quiebres y bifurcaciones. La cola de los juveniles de segundo estadio terminada en punta ligeramente redondeada y con región hialina larga.

Amplificación y secuenciación de la región 18S del DNA ribosomal. El par de primers 988F-1912R amplificó un solo fragmento en todas las poblaciones de nematodos. El amplicón de la región 18S-DNAr fue de aproximadamente 1000 pb para ambas especies de fitonematodos (Fig. 2).

El alineamiento y comparación de secuencias con referencias obtenidas del GenBank confirmaron

que los especímenes en estudio corresponden molecularmente a *N. aberrans* y *M. incognita*.

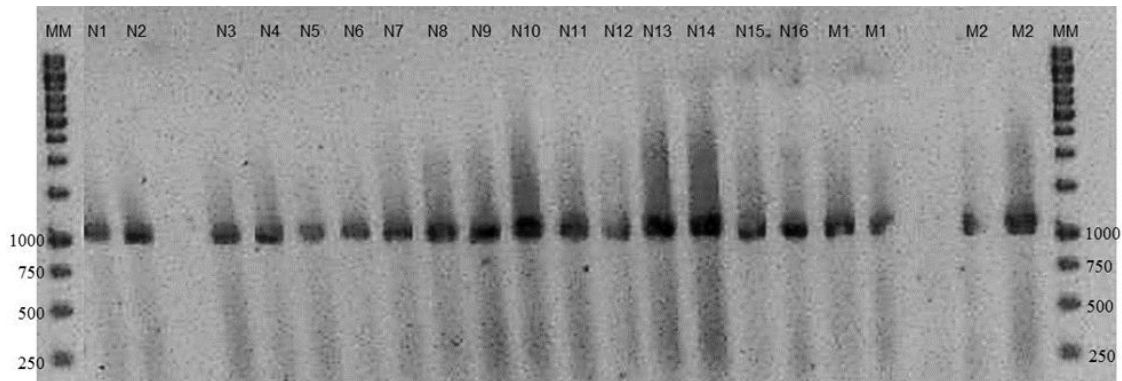


Figura 2. Amplificones de la región 18S del DNAr de poblaciones de fitonematodos. MM= Marcador molecular de 1 kb. MC y M1-M2= Corresponden a poblaciones de *M. incognita*. El resto de las poblaciones pertenecen a *N. aberrans*.

Análisis PCR-RFLP de la región 18S DNAr.

Los patrones de digestión predichos de la región 18S-DNAr de las poblaciones de fitonematodos en estudio, coincidieron con los patrones observados en los gels de acrilamida, y se encontraron variaciones entre y dentro de las poblaciones de *N. aberrans* y *M. incognita* con PCR-RFLP (Figs. 3-5).

Los amplicones fueron digeridos con nueve enzimas, de las cuales seis revelaron sitios de restricción polimórficos (*Ava* II, *Hha* I, *Hae* III, *Kpn* I, *Bsu*R I y *Mbo* I), se observaron varias

diferencias en los sitios de restricción. Por ejemplo, la digestión con *Ava* II produjo un patrón con dos fragmentos para las poblaciones de *N. aberrans* y permitió diferenciarlas de las poblaciones de *Meloidogyne*; ya que el DNA de esta última especie no fue digerida por esta enzima. Con *Hha* I y *Hae* III, todas las poblaciones fueron digeridas y generaron un perfil con tres fragmentos de restricción para las poblaciones de *N. aberrans*, separándolas claramente de las poblaciones de *M. incognita* (Figs. 3 y 4).

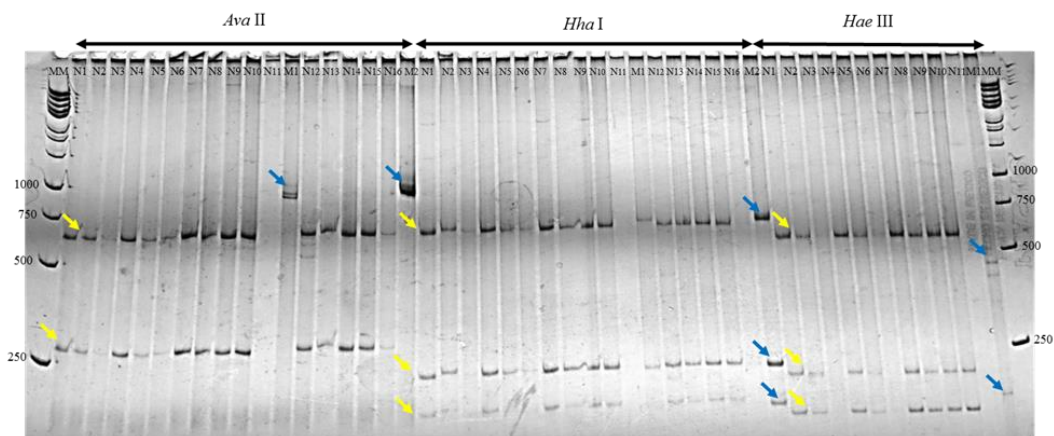


Figura 3. Perfiles de digestión de la región 18S del DNAr de poblaciones de fitonematodos agalladores obtenidos con las enzimas de restricción *Ava* II, *Hha* I y *Hae* III. Las flechas indican el fragmento digerido o un tipo de polimorfismo. Las flechas en color azul señalan las poblaciones de *M. incognita* y las amarillas las poblaciones de *N. aberrans*.

Los patrones de digestión generados con *Kpn* I y *Bsu*R I fueron más complicados de interpretar; sin embargo, con el apoyo de la digestión virtual fue

posible identificar los fragmentos de interés. *Kpn* I produjo un patrón con dos fragmentos de aproximadamente 700 y 300 pb para *N. aberrans* (Fig. 4).

Con la enzima *BsuR* I, se obtuvieron tres fragmentos de digestión para *N. aberrans* y *M. incognita*. La digestión generada con *BsuR* I permitió separar claramente las poblaciones de *N. aberrans* de las de *M. incognita* (Fig. 4).

La enzima *Mbo* I generó un patrón con dos fragmentos de digestión, de 510 y 360 pb para las poblaciones de *N. aberrans*, diferenciándolas de

las poblaciones de *Meloidogyne*, en las cuales se obtuvieron cuatro fragmentos (Fig. 5). El DNA de la población N9 no fue digerido (Fig. 5).

Con las enzimas *Hind* III, *EcoR* I y *Sma* I no fue posible digerir el fragmento 18S del DNAr de las poblaciones en estudio. En todos los casos, la población de T87 no fue digerida debido a la ausencia de DNA.

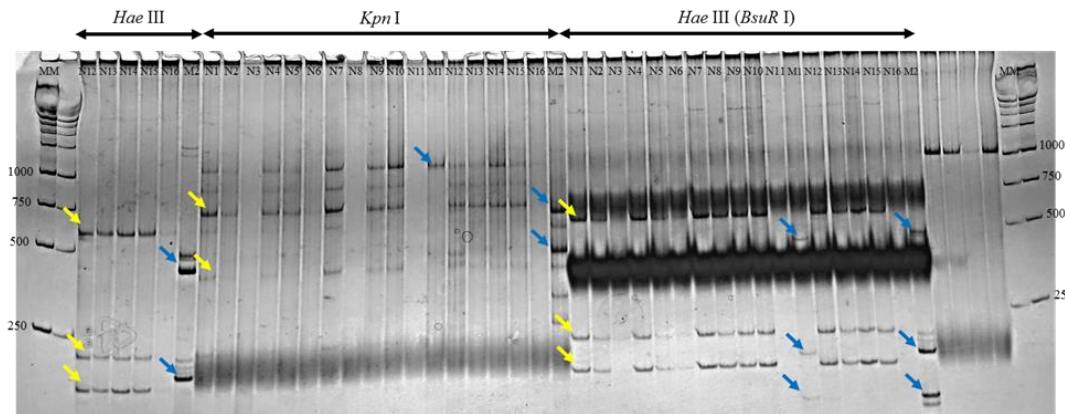


Figura 4. Perfiles de digestión de la región 18S del DNAr de poblaciones de fitonematodos agalladores generados por las enzimas de restricción *Kpn* I y *BsuR* I. Las flechas indican el fragmento digerido o un tipo de polimorfismo. Las flechas en color azul señalan las poblaciones de *M. incognita* y las amarillas las poblaciones de *N. aberrans*.

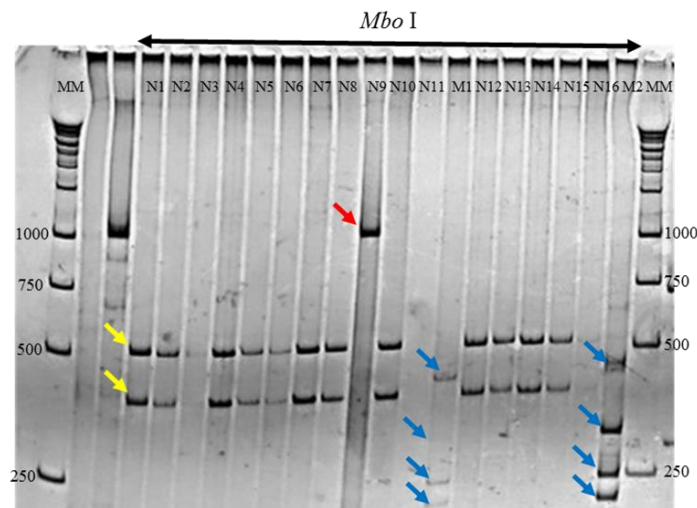


Figura 5. Perfil de digestión de la región 18S del DNAr de poblaciones de fitonematodos agalladores obtenido con la enzima de restricción *Mbo* I. Las flechas en color azul señalan las poblaciones de *M. incognita* y las amarillas las poblaciones de *N. aberrans*. La flecha roja indica el amplicon no digerido de la población N9.

El tamaño de los fragmentos digeridos con las diferentes enzimas de restricción se muestra en el Cuadro 1. Las enzimas *Hind* III, *EcoR* I y *Sma* I no se incluyen debido a que no digirieron el fragmento 18S del DNAr de las poblaciones en estudio.

El análisis UPGMA con la información de las

seis enzimas de restricción permitió agrupar las poblaciones de fitonematodos en tres grupos principales (0.72) (Fig. 6). El grupo A estuvo conformado por diez poblaciones de *N. aberrans* (N1, N2, N6, N3, N4, N5, N7, N8, N10 y N9) asociados a los cultivos de chile, jitomate y tomate, y procedentes del estado de México, Michoacán,

Puebla y Guanajuato. El segundo grupo incluyó cinco poblaciones de *N. aberrans* (N12, N14, N15, N16 y N13), asociados a los cultivos de calabaza, tomate verde, jitomate, pepino, chile y zanahoria y obtenidos de Michoacán, Tlaxcala y Guanajuato.

El grupo C estuvo representado por las dos poblaciones de *M. incognita* (M1 y M2) asociadas al cultivo de jitomate y procedentes de Nayarit y Guanajuato.

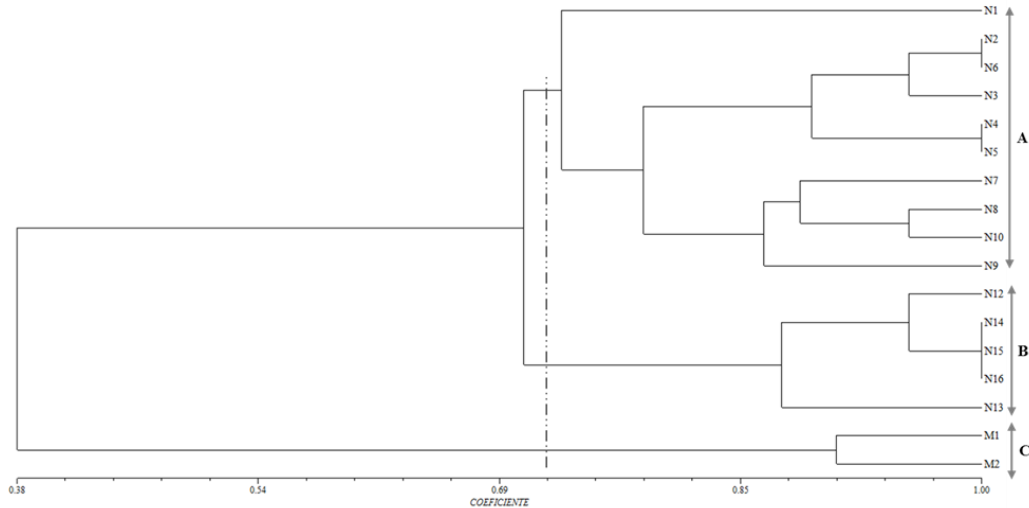


Figura 6. Dendrograma UPGMA generado a partir de la digestión del fragmento 18S del DNAr de poblaciones de *N. aberrans* con seis enzimas de restricción *Ava* II, *Hha* I, *Hae* III, *Kpn* I, *Bsu*R I y *Mbo* I. Los grupos se definieron a una distancia euclidiana de 0.72 (línea punteada).

DISCUSIÓN

La extracción de DNA a partir de hembras adultas de fitonematodos (*N. aberrans* y *M. incognita*) es una técnica de importancia práctica, ya que los nematodos son relativamente fáciles de obtener de las raíces vegetales y aportan una buena cantidad de material genético. Sin embargo, tiene la desventaja de requerirse mayor tiempo y espacio que cuando se usan juveniles, ya que las poblaciones recolectadas de campo deben incrementarse en invernadero y esperar a que se reproduzcan para contar con suficiente material biológico (Adam *et al.*, 2007).

El análisis directo del genotipo mediante la detección de diferencias en la longitud de los fragmentos de restricción del DNA (RFLP) es una técnica molecular que permite la identificación precisa de especies de nematodos, ya que provee una clara discriminación de la variación intra e interespecífica en nematodos agalladores (Hyman y Whipple, 1996; Powers *et al.*, 1997) y permite diferenciar entre poblaciones de nematodos, como se comprobó con los resultados obtenidos en este trabajo, con la digestión de la región 18S del

DNAr de poblaciones de fitonematodos con la información de seis enzimas de restricción. Power *et al.* (1997) recomiendan esta técnica como un método de análisis taxonómico en géneros como *Helicotylenchus* que contiene numerosas especies con pocas características morfológicas de valor taxonómico.

La PCR-RFLP permitió comparar los perfiles de restricción de la región 18S-DNAr y separó claramente las poblaciones de *N. aberrans* de *M. incognita*. Esta técnica demostró ser una herramienta útil para distinguir especies y poblaciones de fitonematodos agalladores. Otros investigadores comprobaron la eficiencia de esta técnica en diferentes especies de fitonematodos (Ibrahim *et al.*, 1997; Zijlstra *et al.*, 1995; Zijlstra *et al.*, 1997; Szalanski *et al.*, 1997; Subbotin *et al.*, 2005; Reid *et al.*, 2003). Estos investigadores lograron distinguir diferencias en los patrones de digestión de diferentes poblaciones de fitonematodos.

Por ejemplo, Ibrahim *et al.* (1997) demostraron la sensibilidad de esta técnica para detectar variaciones a nivel de DNA en poblaciones de *N. aberrans* de México, Perú y Argentina. Similar a

lo reportado por Zijlstra *et al.* (1995) con la digestión de la región ITS de fitonematodos agalladores del género *Meloidogyne*. Por su parte, Szalanski *et al.* (1997) analizaron aislamientos de *Heterodera zae* de Estados Unidos de América e India mediante la técnica de PCR-RFLP y detectaron diversas diferencias en los perfiles de restricción de la región ITS1 del DNA ribosomal.

La digestión del producto amplificado 18S-DNAr con *Ava* II, *Hha* I, *Hae* III, *Kpn* I, *Hae* III (*Bsu*R I) y *Mbo* I generaron perfiles RFLPs para todas las poblaciones, excepto para Yu (para el caso de *Mbo* I) y T87, está última debido a la ausencia de amplicón. Con las enzimas *Hind* III, *Sma* I y *Eco*R I no se logró digerir el DNAr de las poblaciones estudiadas, debido a la ausencia del sitio de restricción, que se comprobó con la digestión virtual del fragmento de la región 18S secuenciada.

Las diferencias en los perfiles de digestión encontradas en las poblaciones en estudio, pueden explicarse por ligeras variaciones inter e intrapoblacionales, debido a la existencia de diferencias en los sitios de restricción en las secuencias 18S del DNAr como consecuencia de mutaciones a nivel de nucleótidos, ya sea por delección o sustitución, que pueden o no generar una alteración fenotípica, como lo reportó Hugall *et al.* (1994) en especies de *Meloidogyne*, donde señala que una sola sustitución de bases generan cambios en los sitios de restricción y una sola delección provoca cambios en los fragmentos de DNAr separando un haplotipo de otros.

Finalmente, el análisis RFLP de la región 18S del DNAr de poblaciones de *N. aberrans* permitió separarlas claramente de las poblaciones de *Meloidogyne*; y la comparación de los perfiles RFLP de las muestras de DNA proporcionó una herramienta sensible, rápida y confiable para la correcta identificación de estos nematodos. La región 18S-DNAr es altamente conservada entre especies lo que permite obtener patrones de digestión más fácilmente diferenciables en comparación con los obtenidos cuando se usan otras regiones del DNA de fitonematodos.

CONCLUSIONES

La identificación morfológica de las poblaciones de fitonematodos se corroboró

molecularmente mediante la secuenciación y análisis de la región 18S del DNAr.

La técnica RFLP usada para la digestión de la región 18S del DNAr de poblaciones de fitonematodos es una técnica relativamente fácil y rápida de realizar, y con seis enzimas de restricción se generaron perfiles de digestión que permitieron diferenciar claramente las poblaciones de *N. aberrans* de las de *Meloidogyne*.

Al comparar los patrones de digestión de la región 18S del DNAr se logró agrupar y separar las poblaciones de *N. aberrans* de las poblaciones de *Meloidogyne*, por lo que se recomienda el uso de esta técnica en fitonematología como una herramienta auxiliar en la identificación de estos organismos fitopatógenos.

La comparación de los perfiles RFLP de las muestras de DNA proporcionó una herramienta rápida para la identificación de fitonematodos.

LITERATURA CITADA

- ADAM, M. A. M., PHILLIPS, M. S. AND V. C. BLOCK. 2007. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). *Plant Pathology*, 56(1): 190–197.
- CABRERA-HIDALGO, A. J., VALADEZ-MOCTEZUMA, E. Y N. MARBÁN-MENDOZA. 2015a. Efecto del fluensulfone sobre la movilidad *in vitro*, y la reproducción y agallamiento de *Nacobbus aberrans* en microparcels. *Nematropica*, 45(1): 59-71.
- CABRERA-HIDALGO, A. J., MARBÁN-MENDOZA, N., VALDOVINOS-PONCE, G. AND E. VALADEZ-MOCTEZUMA. 2015b. Genetic variability and phylogenetic analyses of *Nacobbus aberrans sensu lato* populations by molecular markers. *Nematropica*, 45(2): 263–278.
- COBB, N. A. 1918. Estimating the nema population of the soil. *Agric. Tech. Circ. I. Bur. Plant, Industr. U. S. Depart. Agric.* 48 pp.
- DEVIRAN, Z., GÖZEL, U., SÖĞÜT, M. A., YILDIZ, Ş. AND İ. H. ELEKÇIOĞLU. 2002. Identification of Root-Knot Nematodes in the Mediterranean Region of Turkey by Using rDNA and mtDNA Markers. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 26: 337–341.
- DICE, L. R. 1945. Measurements of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26(3): 297–302.

- HALL, A. H. 1999. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95–98.
- HOLTERMAN, M., VAN DER WURFF, A., VAN DEN ELSSEN, S., VAN MEGEN, H., BONGERS, T., HOLOVACHOV, O., BAKKER, J. AND J. HELDER. 2006. Phylum-Wide Analysis of SSU rDNA Reveals Deep Phylogenetic Relationships among Nematodes and Accelerated Evolution toward Crown Clades. *Molecular Biology and Evolution*, 23(9):1792–1800.
- HUGALL, A., MORITZ, C., STANTON, J. AND D. R. WOLSTENHOLME. 1994. Low, but Strongly Structured Mitochondrial DNA Diversity in Root Knot Nematodes (*Meloidogyne*). *Genetic Society of America*, 136(3): 903–912.
- HUNT, D. J. AND Z. A. HANDOO. 2009. *Taxonomy, identification and principal species*. Pp. 55–97. In: R. N. Perry, M. Moens and J. L. Starr (Eds.). Root-knot nematodes. CAB International, London, UK.
- HYMAN, B. C. AND L. E. WHIPPLE. 1996. Application of Mitochondrial DNA Polymorphism to *Meloidogyne* Molecular Population Biology. *Journal of Nematology*, 28(3): 268–276.
- IBRAHIM, S. K., BALDWIN, J. G., ROBERTS, P. A. AND B. C. HYMAN. 1997. Genetic Variation in *Nacobbus aberrans*: An Approach toward Taxonomic Resolution. *Journal of Nematology*, 29(3): 241–249.
- JONES, J. T., HAEGEMAN, A., DANCHIN, E. G. J., GAUR, H. S., KELDER, J., JONES, M. G. K., KIKUCHI, T., MANZANILLA-LÓPEZ, R. H., PALOMARES-RIUS, J. E., WESEMAEL, W. M. L. AND R. N. PERRY. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14(9): 946–961.
- MANZANILLA-LÓPEZ, R. H., COSTILLA, M. A., DOUCET, M., FRANCO, J., INSERRA, R. N., LEHMAN, P. S., CID DEL PRADO, V. I., SOUZA, R. M. AND K. EVANS. 2012. The genus *Nacobbus* Thorne and Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): systematics, distribution, biology and management. *Nematropica*, 32(2): 149–227.
- PARKER, P. G., SNOW, A. A., SCHUG, M. D., BOOTON, G. C. AND P. A. FUERST. 1998. What molecules can tell us about population: choosing and using a molecular marker? *Ecology*, 79(2): 361–382.
- POWERS, T. O., TODD, T. C., BURNELL, A. M., MURRAY, P. C. B., FLEMING, C. C., SZALANSKI, A. L., ADAMS, B. A. AND T. S. HARRIS. 1997. The rDNA Internal Transcribed Spacer Region as a Taxonomic Marker for Nematodes. *Journal of Nematology*, 29(4): 441–450.
- REID, A., MANZANILLA-LÓPEZ, R. H. AND D. J. HUNT. 2003. *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae); a nascent species complex revealed by RFLP analysis and sequencing of the ITS-rDNA region. *Nematology*, 5(3): 441–451.
- REID, A. AND J. PICKUP. 2005. Molecular characterization of a morphologically unusual potato cyst nematode. *EPPO Bulletin*. Edinburgh, Scotland, 35(1): 69–72.
- SZALANSKI, A. L., SUI, D. D., HARRIS, T. S. AND T. O. POWERS. 1997. Identification of cyst nematodes of agronomic and regulatory concern with PCR-RFLP of ITS1. *Journal of Nematology*, 29(3): 255–267.
- SHER, S. A. 1970. Revision of the Genus *Nacobbus* Thorne and Allen, 1944 (Nematoda: Tylenchoidea). *Journal on Nematology*, 2(3): 228–235.
- SNEATH, P. H. A. AND R. R. SOKAL. 1973. *Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification*, 1st ed., WF Freeman and Co., San Francisco, 573 pp.
- SIMPSON J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms (AFLPs). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 60: 119–122.
- SUBBOTIN, S. A., MADANI, M., KRALL, E., STURHAN, D. AND M. MOENS. 2005. Molecular diagnostics, taxonomy, and phylogeny of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* species complex based on the sequences of the internal transcribed spacer-rDNA. *Phytopathology*, 95(11): 1308–1315.
- VALADEZ, M. E. Y G. KAHL. 2000. *Huellas de DNA en Genomas de Plantas: Teoría y Protocolos de Laboratorio*. Ed. Mundi-Prensa. México, D.F. 147 pp.
- ZIJLSTRA, C., LEVER, A. E. M., UENK, B. J. AND C. H. VAN SILFHOUT. 1995. Differences between ITS Regions of isolates of root-knot nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. *Phytopathology*, 85(10): 1231–1237.
- ZIJLSTRA, C., UENK, B. J. AND C. H. VAN SILFHOUT. 1997. A reliable, precise method to differentiate species of root-knot nematodes in mixtures on the basis of ITS- RFLPs. *Fundamental and Applied Nematology*, 20(1): 59–63