

Identificación de especies de *Meloidogyne* utilizando la secuenciación de regiones espaciadoras transcritas internas de ADN ribosomal de estadios juveniles

Identification of *Meloidogyne* species by sequencing of internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA of juvenile stages

Juan Jaramillo-Pineda, Martha Guerrero-Olazarán, José Antonio Fuentes-Garibay, José María Viader-Salvadó, José Lorenzo Meza-García, Lilia Hortencia Morales-Ramos, Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología, Pedro de Alba s/n, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. C.P. 66450 Tel/fax (81) 83294000, ext. 7304, Fax/ext. 6415. Correspondencia: (lilia.moralesrm@uanl.edu.mx).

Recibido: Mayo 30, 2014 **Aceptado:** Diciembre 15, 2014

Jaramillo-Pineda J, Guerrero-Olazarán M, Fuentes-Garibay JA, Viader-Salvadó JM, Meza-García JL y Morales-Ramos LH. 2015. Identificación de especies de *Meloidogyne* utilizando la secuenciación de regiones espaciadoras transcritas internas de ADN ribosomal de estadios juveniles. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 1-11.

Resumen. Usualmente, la identificación de especies de *Meloidogyne* está basada en la morfología de hembras adultas, lo que dificulta la identificación de hembras y machos juveniles (J_2). Los nematodos son considerados entre los animales más difíciles de identificar, el uso de marcadores genéticos basados en el ADN ribosomal (ADNr) ha ganado aceptación en aplicaciones que van desde las determinaciones de cuarentena a las evaluaciones de la biodiversidad. Los nematodos del género *Meloidogyne* son conocidos por su habilidad para producir cambios fisiológicos en el sistema radical de las plantas y causar pérdidas en la absorción de nutrientes. El objetivo de este estudio fue determinar si la secuenciación de regiones espaciadoras transcritas (ITS) internas de ADNr pueden ser usadas como marcadores genéticos para la identificación

Abstract. Usually the identification of the *Meloidogyne* species is based on the morphology of adult females, making it difficult to identify juvenile males and females (J_2). Nematodes are considered among the most difficult animals to identify; the use of ribosomal DNA (rDNA)-based diagnostic methods have gained acceptance in applications ranging from quarantine determinations to assessments of biodiversity. Nematodes of the genus *Meloidogyne* are known for their ability to produce physiological changes in the root system of plants and cause losses in the absorption of nutrients. The objective of this study was to determine if the sequencing of internal transcribed spacer (ITS) regions of rDNA can be used as genetic markers for reliable identification of populations of juvenile males and females (J_2) for the main species of the genus *Meloidogyne*. From samples of diseased tomato roots (*Solanum lycopersicum* L.), larvae of juvenile females and males of *Meloidogyne* were collected for the DNA extraction. A rDNA region harboring two ITS regions was amplified. For subsequent sequencing, that region was ligated into pGEM®-T vector.

confiable de poblaciones de hembras y machos juveniles (J_2) para las principales especies del género *Meloidogyne*. De muestras de raíces enfermas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) se extrajeron larvas de hembras y machos juveniles de *Meloidogyne* para la extracción de ADN. Se amplificó una región génica del ADNr que contiene dos regiones ITS. Para su posterior secuenciación, dicha región se ligó al vector pGEM®-T. El análisis con el programa BLASTn indicó que la región génica presentó una identidad del 99.8 % respecto a una secuencia génica perteneciente a *Meloidogyne incognita* Kofoid & White, 1919. Tal resultado sugiere que las regiones ITS pueden ser usadas como un marcador genético en poblaciones de *Meloidogyne* para la identificación de especie.

Palabras clave: *Meloidogyne incognita*, ITS, ADN ribosomal (ADNr).

Los nematodos del género *Meloidogyne* son conocidos por su habilidad para producir cambios fisiológicos en el sistema radicular de las plantas y causar pérdidas en la absorción de nutrientes afectando su crecimiento (enanismo) y su producción (Wishart *et al.*, 2002). Sin embargo, los efectos de los nematodos sobre los cultivos son subestimados por agricultores y técnicos agrícolas debido a los síntomas no específicos, que suelen confundirse con desórdenes nutrimentales, estrés hídrico, problemas de fertilidad del suelo, y con otras infecciones secundarias inducidas por hongos y bacterias, cuya entrada suele estar facilitada por la acción del nematodo. Según Zuckerman *et al.* (1990), los nematodos parásitos de plantas reducen la producción agrícola mundial entre 12 y 20 %. Aunque existen al menos 70 especies descritas de nematodos formadores de nódulos de la raíz, la atención taxonómica se ha enfocado en seis (*Meloidogyne incognita* Kofoid & White, 1919, *M. javanica*

Analysis with the BLASTn program showed that the gene region identified 99.8 % with a gene sequence belonging to *Meloidogyne incognita* Kofoid & White, 1919. This result suggests that the ITS regions can be used as a genetic marker in populations for *Meloidogyne* species identification.

Key words: *Meloidogyne incognita*, ITS, Ribosomal DNA (rDNA).

The nematodes of the *Meloidogyne* genus are known for their ability to produce physiological changes in the root system of plants and cause losses in the absorption of nutrients, affecting their growth (dwarfism) and their production (Wishart *et al.*, 2002). However, the effects of the nematodes on crops are underestimated by farmers and agricultural technicians due to the non-specific symptoms, that are often mistaken for lack of nutrients, water stress, problems of soil fertility, and with other secondary infections caused by fungi or bacteria, the entry of which is made easier by the nematode. According to Zuckerman *et al.* (1990), the parasite nematodes of the plants diminish the global agricultural production between 12 and 20%. Even though there are at least 70 nematode species that cause root nodules, taxonomic attention has focused on six of them (*Meloidogyne incognita* Kofoid & White, 1919, *M. javanica* Treub, 1885, *M. arenaria* Neal, 1889, *M. chitwoodi* Golden *et al.*, 1980, *M. fallax* Karssen, 1996 y *M. hapla* Chitwood, 1949) due to the fact that these are typically associated with agronomically important plants (Adam *et al.*, 2007). For the identification of species and populations of *Meloidogyne*, several methods have been used, although all of them have their limitations (Zijlstra *et al.*, 1995). It is important to determine the composition of species of *Meloidogyne* in crops in order to implement control

Treub, 1885, *M. arenaria* Neal, 1889, *M. chitwoodi* Golden *et al.*, 1980, *M. fallax* Karssen, 1996 y *M. hapla* Chitwood, 1949) ya que están asociadas típicamente con plantas agrónomicamente importantes (Adam *et al.*, 2007). Para la identificación de especies y poblaciones de *Meloidogyne* se han aplicado varios métodos aunque todos tienen sus limitaciones (Zijlstra *et al.*, 1995). Es importante determinar la composición de especies de *Meloidogyne* en cultivos con el propósito de introducir estrategias de control no químicas, como la rotación de cultivares resistentes y plantas alelopáticas (Cenis, 1993; Orui, 1998). La identificación de especies de *Meloidogyne* está basada en la morfología de las hembras adultas (Eisenback *et al.*, 1981) y la gama de hospedantes (Williamson *et al.*, 1997), siendo difícil la identificación para machos y hembras juveniles de segundo estadio (J_2). También se utiliza el análisis de isoenzimas, donde la comparación de patrones de esterasa muestran gran consistencia en la separación de las cuatro especies de mayor distribución en el mundo, sin embargo, no detecta variación intraespecífica entre nematodos de *Meloidogyne* (Volvas *et al.*, 2005). Los diagnósticos basados en ADN proveen atractivas soluciones a los problemas asociados con estos métodos de identificación, ya que son independientes tanto de los productos expresados del genoma como de la influencia del ambiente y el estadio de los nematodos (Wishart *et al.*, 2002; Powers, 2004). La mayoría de los análisis de ADN dirigidos a nematodos formadores de agallas usan ADN total (genómico y mitocondrial [ADNmt]) o ADNmt y son predominantemente a través de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLPs por sus siglas en inglés) (Zijlstra *et al.*, 1995; Orui, 1998; Powers, 2004). La comparación de secuencias de regiones espaciadoras transcritas internas (ITS, por sus siglas en inglés) de ADN ribosomal (ADNr) es usada en taxonomía, ya que tiene un alto grado de

strategies that do not involve any chemicals, such as the rotation of resilient cultivars and allelopathic plants (Cenis, 1993; Orui, 1998). The identification of *Meloidogyne* species is based on the morphology of adult females (Eisenback *et al.*, 1981) and the range of hosts (Williamson *et al.*, 1997), making the identification for young males and females of the second stage (J_2) more difficult. The analysis of isoenzymes is also used, where the comparison of patterns of esterase show a great consistency in the division of the four species most widely distributed in the world; however, it does not detect any intraspecific variation among *Meloidogyne* nematodes (Volvas *et al.*, 2005). The diagnoses based on the DNA provide some attractive solutions for the problems associated with these methods of identification, due to the fact that they are independent from the products expressed in the genome and from the influence of the environment and the stage of the nematodes (Wishart *et al.*, 2002; Powers, 2004). Most DNA analyses directed at nematodes that cause the formation of galls use total DNA (genomic and mitochondrial [mtDNA]) or mtDNA, and are predominantly done through Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) (Zijlstra *et al.*, Oruri, 1998; Powers, 2004). The comparison between sequences of internal transcribed spacer regions (ITS) of ribosomal DNA (rDNA) is used in taxonomy, due to its high level of polymorphism between closely related species and is virtually a constant for one specific species. Furthermore, the ITS regions are lined by retained sequences that facilitate the design of indicators for their expansion by the Polymerase chain reaction (PCR).

The objective of this study is to determine if the internal transcribed spacer regions of rDNA can be used as genetic markers for the reliable identification of young female and male J_2 populations for the main species of the *Meloidogyne* genus.

polimorfismo entre especies estrechamente relacionadas y es prácticamente constante para una especie específica. Además las regiones ITS son flanqueadas por secuencias conservadas que facilitan el diseño de iniciadores para su amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés).

El objetivo de este estudio fue determinar si las regiones espaciadoras transcritas (ITS) internas de ADNr pueden usarse como marcadores genéticos para la identificación confiable de poblaciones de hembras y machos juveniles J₂ para las principales especies del género *Meloidogyne*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Los juveniles J₂ de *Meloidogyne* se obtuvieron usando la técnica del embudo de Baermann (Agrios, 2005) de raíces de plantas agalladas de tomate (*Solanum lycopersicum*), un cultivo ubicado en San Nicolás de los Garza Nuevo León, proporcionadas por el Departamento de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, e identificadas como género *Meloidogyne* por claves taxonómicas para la identificación de nematodos parásitos de plantas (Zuckerman *et al.*, 1990).

Identificación del nematodo

El ADN genómico se aisló de 5000 nematodos (J₂) usando una lisis con detergentes seguido por una extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Sambrook y Russell, 2001). Los especímenes se recolectaron por centrifugación a 16,000 g por 5 min, y el pellet se resuspendió en 200 µL de amortiguador lisis TSNT (2 % Tritón X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl y 1 mM EDTA, pH 8), 500 µL de fenol saturado con Tris-HCl y 100 µL de una mezcla cloroformo:

MATERIALS AND METHODS

Biological Material

The juvenile J₂ of *Meloidogyne* were obtained using the Baermann funnel technique (Agrios, 2005) of tomato plant roots with gall formations (*Solanum lycopersicum*), a farm located in San Nicolás de los Garza Nuevo León, provided by the Department of Plant Pathology of the Faculty of Life Sciences at the Autonomous University of Nuevo León, and identified as belonging to the *Meloidogyne* genus by taxonomic keys for the identification of parasitic plant nematodes (Zuckerman *et al.*, 1990).

Identification of the nematode

The genomic DNA was isolated from 5000 nematodes (J₂) using lysis with detergents followed by an extraction with phenol-chloroform-amy alcohol (Sambrook and Russell, 2001). The specimens were collected through centrifugation at 16,000 g for 5 minutes and the pellet was resuspended in 200 µL of lysis buffer TSNT (2 % Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM, Tris-HCl and 1mM EDTA, pH 8), 500 µL of saturated phenol with Tris-HCl and 100 µL of a mixture of chloroform: amy alcohol (24:1). The suspension was mixed in vortex for 5 minutes and 200 µL of buffer TE 1X were added (10mM Tris-HCl and 1 mM EDTA, pH 8.0); the phases were separated by centrifugation at 16,000 g for 10 minutes, the DNA settled on the aqueous phase with pure ethanol. The DNA pellets were dried at room temperature for 10 minutes and were resuspended in 48 µL of TE buffer, 2 µL of 2 µg µL⁻¹ RNase and quantified through agarose gel densitometry dyed with GelRed 1X (Biotium, Hayward, CA) solution, using the EDAS 290 system and the Kodak Digital Science 1D (Eastman Kodak Company, Rochester, New York) program.

A fragment of rDNA was amplified by PCR using the ITS1 (5'-TTGAACCGGGCAAAAGTCCG-3')

alcohol isoamílico (24:1). La suspensión se mezcló en vortex por 5 min y se agregaron 200 µL de amortiguador TE 1X (10 mM Tris-HCl y 1 mM EDTA, pH 8.0); las fases se separaron por centrifugación a 16,000 g por 10 min y el ADN se precipitó de la fase acuosa con etanol puro. Los pellets de ADN se secaron a temperatura ambiente por 10 min y resuspendieron en 48 µL de amortiguador TE, 2 µL de 2 µg µL⁻¹ RNasa y cuantificaron por densitometría en geles de agarosa teñidos con solución GelRed 1X (Biotium, Hayward, CA) usando el sistema EDAS 290 y el programa Kodak Digital Science 1D (Eastman Kodak Company, Rochester, New York).

Un fragmento ADN_r fue amplificado por PCR usando el iniciador ITS1 (5'-TTGAACCGGGCA-AAAGTCG-3') y el iniciador ITS2 (5'-TTAGTTTCTTTTCTCCGCT-3') dirigidos a las regiones 3' y 5' del ADN_r 18S y 28S, respectivamente (Stock *et al.*, 2001; Meza-García *et al.*, 2014). La PCR se realizó en un termociclador TC020-24 MultiGene Mini (Labnet International, Inc., Edison, NJ) en un volumen final de 25 µL conteniendo 1X buffer GoTaq PCR (Promega, Madison, WI), 200 ng de ADN genómico, 200 µM de cada dNTPs, 0.5 µM de cada iniciador, agua estéril y 1 U de GoTaq DNA polimerasa (Promega, Madison, WI). Se usó un programa de amplificación de 32 ciclos: 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 75 s, con una primera etapa de desnaturalización de 94 °C por 3 min y una etapa final de elongación de 72 °C por 5 min. Un plásmido que contiene un fragmento de regiones ITS de *Heterorhabditis indica* Poinar, Karunakar & David 1992, (pGEMITSLZO), se usó como testigo positivo de la PCR y como negativo los componentes de la mezcla de PCR sin ADN. Los productos de la PCR se analizaron en un gel de electroforesis de agarosa 2.5 % teñido con solución GelRed 1X, usando una unidad de electroforesis horizontal MSMUNIDUO (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO), 100 volts por 60 min, y el producto

initiator and the ITS2 (5'-TTAGTTTCTTTTCTCCGCT-3') initiator, directed at the regions 3' and 5' of the rDNA 18S and 28S, respectively (Stock *et al.*, 2001; Meza-García *et al.*, 2014). PCR was carried out in a TC020-24 MultiGene Mini (Labnet International, Inc., Edison, NJ) thermal cycler, with a final volume of 25 µL containing 1X buffer GoTaq PC (Promega, Madison, WI), 200 ng of genomic DNA, 200 µM of each dNTPs, 0.5 µM of each initiator, sterilized water and 1 U of GoTaq DNA Polymerase (Promega, Madison, WI). An amplification program of 32 cycles was used: 94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 75 s, with a first denaturing stage of 94 °C for 3 min and a final elongation stage of 72 °C for 5 min. A plasmid that contains a fragment of ITS regions of *Heterorhabditis indica* Poinar, Karunakar & David 1992, (pGEMITSLZO) was used as a positive control of the PCR and the components of the PCR without DNA were used as negative control. The products of the PCR were analyzed in an electrophoresis with agarose gel 2.5 % dyed with GelRed 1X solution, using one unit of horizontal electrophoresis MSMUNIDUO (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO), 100 volts for 60 minutes, and the product of the amplification was cloned in the pGEM®-T (Promega) vector, following the instructions of the manufacturer. The mixture of the ligation was used to transform cells of *Escherichia coli* DH5α, the transformed cells were selected through a white-blue test in agar slates LB with ampicillin (100µg mL⁻¹), 100 µL IPTG (isopropil-β-D-1-thiogalactopyranoside) (2 mg mL⁻¹). The resulting cell colonies of the transformed cells were analyzed in order to detect the presence of plasmid DNA through the extraction by alkaline lysis with an agarose gel 0.8 % dyed with GelRed 1X solution. Furthermore, the correct insertion of the amplified product in the pGEM®-T vector was confirmed through PCR using the ITS1 and ITS2 initiators, as was previously described.

del amplificado se clonó en el vector pGEM®-T (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de la ligación se usó para transformar células de *Escherichia coli* DH5 α , las células transformadas se seleccionaron por una prueba azul-blanco en placas de agar LB con ampicilina (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 100 μL IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) (2 mg mL^{-1}). Las colonias resultantes de las células transformados se analizaron para detectar la presencia del ADN plasmídico mediante una extracción por lisis alcalina y en un gel de agarosa 0.8 % teñido con solución GelRed 1X. Además, la correcta inserción del producto amplificado en el vector pGEM®-T se confirmó por PCR usando los iniciadores ITS1 y ITS2, tal como se describió anteriormente.

Los seis plásmidos positivos por PCR de diferentes colonias de *E. coli* se secuenciaron usando los iniciadores T7 y SP6 (Promega) y un analizador genético ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA) en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Autónoma de México (UNAM).

Las secuencias T7 y SP6 (12 secuencias en total) se alinearon usando el módulo Contig Assembly Program del programa BioEdit v7.0.8.0 (Hall, 1999) y la secuencia consenso se comparó con secuencias nucleotídicas en bases de datos usando la herramienta nucleotide BLAST (BLASTn) del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI). El género y especie del organismo con la secuencia nucleotídica de mayor identidad a la secuencia consenso se consideró como el género y especie del nematodo analizado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método de extracción de ADN produjo 25 μg de ADN genómico de alta calidad (DO260/DO280

The six positive plasmids by PCR of different colonies of *E. coli* were sequenced using the T7 and SP6 (Promega) initiator and a genetic analyzer ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA) in the Unit of Molecular Biology of the Institute of Cellular Physiology of the Autonomous University of Mexico (UNAM).

The T7 and SP6 sequences (12 sequences in total) were aligned using the Contig Assembly Program module of the BioEdit v7.0.8.0 (Hall, 1999) program and the consensus sequence was compared to the nucleotide sequences in the databases using the nucleotide BLAST (BLASTn) tool of the National Center of Information about Biotechnology (NCBI). The genus and species of the organism with the nucleotide sequence most related to the consensus sequence was considered as the genus and species of the analyzed nematode.

RESULTS AND DISCUSSION

The DNA extraction method produced 25 μg of high quality genomic DNA (DO260/DO280 1.9) without any visible degradation. The analysis in agarose gel for the amplified product by PCR of genomic DNA showed a band of 608 pb, and for the positive control (*H. indica*) a band of 890 pb was obtained. Likewise, the analysis of PCR of 6 different plasmids of different transformed *E. coli* colonies confirmed the presence of the rDNA fragment inside the extracted plasmids (Figure 1B).

The 66 identity percentages (BioEdit identity matrix) in pairs of the 12 nucleotide sequences (T7 and SP6 sequences of the 6 sequenced plasmids) oscillated between 99.6 and 100%, which allowed the calculation of a consensus sequence. Furthermore, the consensus nucleotide sequence presented an identity of 99.8% (2 differences, one generated by the ITS1 oligonucleotide) with a rDNA

1.9) sin aparente degradación. El análisis en gel de agarosa para el producto amplificado por PCR de ADN genómico mostró una banda 608 pb y mientras que para el control positivo (*H. indica*) se obtuvo una banda de 890 pb (Figura 1A). Del mismo modo, el análisis de PCR de 6 plásmidos de diferentes colonias de *E. coli* transformadas confirmó la presencia del fragmento de ADN dentro de los plásmidos extraídos (Figura 1B).

Los 66 porcentajes de identidad (matriz de identidad BioEdit) por pares de las 12 secuencias nucleotídicas (secuencias T7 y SP6 de los 6 plásmidos secuenciados) oscilaron entre 99.6 y 100 %, lo cual permitió calcular una secuencia consenso. Además, la secuencia nucleotídica consenso presentó una identidad del 99.8 % (2 diferencias, una generada por el oligonucleótido ITS1) con una región ADN de *M. incognita* (Figura 2) que incluye la región 3' de 18S, el espaciador transcrito interno 1, la región

region of *M. incognita* (Figure 2) that includes the region 3' of 18S, the internal transcribed spaces, the region 5.8S, the internal transcribed spacer 2 and a portion of the region and 5' 28S. Therefore, the unknown nematode was identified as *Meloidogyne incognita*, confirming the presence of this species in the state of Nuevo León (México).

In México, the Secretary of Agriculture, Livestock, Rural Developments, Fisheries and Food (SAGARPA) reported the presence of the nematode *M. incognita*, which is a significant pest for the state of Nuevo León (SENASICA-CNRF- Department of Plague Risk Analysis 2012). Usually, the species of the nematode of the *Meloidogyne* genus are identified by taxonomic keys in accordance to the morphological characteristics observed under the microscope (Powers, 2004). The morphological criteria represent a problem due to the variability and the need of experienced personnel in order to

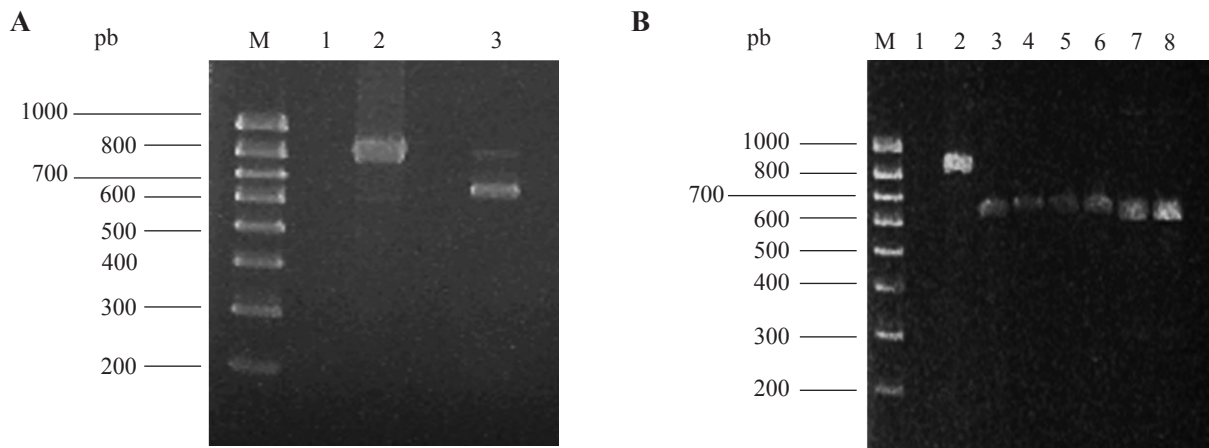


Figura 1. Productos de amplificación por PCR a partir de ADN genómico de nematodos juveniles (A) o varios plásmidos de diferentes colonias de *E. coli* transformadas (B). En A: Carril M, marcador de tamaño molecular Hyperlader IV (Bioline, London, UK); carril 1, control negativo; carril 2, control positivo (pGEMITSLZO); carril 3, el producto amplificado de 608 pb. En B: Carril M, marcador de tamaño molecular Hyperlader IV (Bioline, London, UK); carril 1, control negativo; carril 2, control positivo (pGEMITSLZO); carriles 3-8, plásmidos de diferentes transformantes (608 pb).

Figure 1. Amplification products by PCR from a genomic DNA of juvenile nematodes (A) or several plasmids of different transformed *E. coli* colonies (B). In A: Lane M, molecular sized marker Hyperlader IV (Bioline, London, UK); lane 1, negative control; lane 2, positive control (pGEMITSLZO); lane 3, the amplified product of 608 pb. In B: Lane M, molecular sized marker Hyperlader IV (Bioline, London, UL); lane 1, negative control; lane 2, positive control (pGEMITSLZO); lanes 3-8, plasmids of different transformants (608 pb).

```

>gb|AY438556.1| Meloidogyne incognita T1A 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene,
and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and
28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=768

      Score = 1112 bits (602),   Expect = 0.0
      Identities = 606/608 (99%), Gaps = 0/608 (0%)
      Strand=Plus/Plus

Query  1      TTGAACCGGGTAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCTGCTGGATCATTAC 60
      |||
Sbjct 131      TTGAACCGGGCAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCTGCTGGATCATTAC 190

Query  61      TTTATGTGATGTTCAAATTTGAATTCGCAATGAAATGATCGTTGTGAAACGGCTGTCGCT 120
      |||
Sbjct 191      TTTATGTGATGTTCAAATTTGAATTCGCAATGAAATGATCGTTGTGAAACGGCTGTCGCT 250

Query  121     GGTGTCTAAGTGTGCTGATACGGTTGTGAACGTCCGTGGCTGTATATGTGGTGACATGT 180
      |||
Sbjct 251     GGTGTCTAAGTGTGCTGATACGGTTGTGAACGTCCGTGGCTGTATATGTGGTGACATGT 310

Query  181     TAGGACTCTAATGAGTTTAAAGACCTAATGAGCCTCTTAAAGTGAAGCCGCCAGCAACctt 240
      |||
Sbjct 311     TAGGACTCTAATGAGTTTAAAGACCTAATGAGCCTCTTAAAGTGAAGCCGCCAGCAACCTTT 370

Query  241     tttttCTCTACATTTTaaaaaaaaaCTAAAATCTACCCTTATCGGTGGATCACTAGGC 300
      |||
Sbjct 371     TTTTCTCTACATTTTAAAAAAAAAACTAAAATCTACCCTTATCGGTGGACCCTAGGC 430

Query  301     TCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCAAACCTGCGATAATTATTGCGAACTGCAGAAGTATTG 360
      |||
Sbjct 431     TCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCAAACCTGCGATAATTATTGCGAACTGCAGAAGTATTG 490

Query  361     AGCACAAAAGTTTTGAAACGCAAATGGCCGATGAGGTCAAACCTCTTTGCAACGCTGCTGGT 420
      |||
Sbjct 491     AGCACAAAAGTTTTGAAACGCAAATGGCCGATGAGGTCAAACCTCTTTGCAACGCTGCTGGT 550

Query  421     TCAGGGTCATTTCTCTTATAGCGGAAGCTTTAATTTCTATAATGATGTTGTTGCTTTAT 480
      |||
Sbjct 551     TCAGGGTCATTTCTCTTATAGCGGAAGCTTTAATTTCTATAATGATGTTGTTGCTTTAT 610

Query  481     ATTTTAAAAGGATTTTGTGTTTATTCATGTATTAAATCTAACTGTGAAAATCAAACAATTT 540
      |||
Sbjct 611     ATTTTAAAAGGATTTTGTGTTTATTCATGTATTAAATCTAACTGTGAAAATCAAACAATTT 670

Query  541     TGACCTGAACTCAGTCGAGAGCACCCGCTGAACTTAAGCATATCAGTAAGCGGAGGAAAA 600
      |||
Sbjct 671     TGACCTGAACTCAGTCGAGAGCACCCGCTGAACTTAAGCATATCAGTAAGCGGAGGAAAA 730

Query  601     GAAACTAA 608
      |||
Sbjct 731     GAAACTAA 738
    
```

Figura 2. Análisis BLASTn de la secuencia consenso de un fragmento de ADNr de nematodos juveniles amplificada por PCR (Query), que muestra el alineamiento con una secuencia de ADNr de *M. incognita* (Sbjct), código de GenBank AY438556.

Figure 2. BLASTn Analysis of the consensus sequence of a fragment of rDNA of juvenile nematodes amplified through PCR (Query), that shows the alignment with a rDNA sequence of *M. incognita* (Sbjct), GenBank code AY438556.

5.8S, el espaciador transcrito interno 2 y una parte de la región y 5' 28S. Por tanto, el nematodo desconocido fue identificado como *Meloidogyne*

achieve the reliable identification of the species (Williamson *et al.*, 1997). The identification of *Meloidogyne* spp. is based on the morphology of the

incognita, confirmando la presencia de esta especie en el estado de Nuevo León (México).

En México, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) reportó la presencia del nematodo *M. incognita*, la cual es una plaga importante para el estado de Nuevo León (SENASICA-CNRF-Departamento de Análisis de Riesgo de Plagas 2012). Comúnmente, las especies de nematodos del género *Meloidogyne* son identificados por claves taxonómicas de acuerdo con las características morfológicas observadas bajo el microscopio (Powers, 2004). Los criterios morfológicos representan un problema debido a la variabilidad y la necesidad de personal con experiencia para lograr una identificación fiable de la especie (Williamson *et al.*, 1997). La identificación de *Meloidogyne* spp. se basa en la morfología de las hembras adultas (Eisenback *et al.*, 1981). Sin embargo, un método rápido para la identificación de nematodos en la etapa J₂ podría mejorar las decisiones para el manejo óptimo de los cultivos infectados (Powers y Harris, 1993).

En este trabajo, se logró la identificación de una especie de nematodo fitoparásito de raíz usando la secuencia de regiones ITS de ADNr. El protocolo utilizado facilita la identificación o confirmación de las especies, evitando la dependencia de personal experimentado para la correcta identificación de los nematodos por el uso de claves taxonómicas.

Otros métodos de extracción de ADN usados para el ADN genómico a partir de los nematodos fitoparásitos, incluyen una ruptura del tejido celular por presión (Powers y Harris, 1993), el uso de soluciones de lisis con proteinasa K (Williamson *et al.*, 1997), y la extracción de ADN con fenol-cloroformo seguido de precipitación con etanol (Williamson *et al.*, 1997) o isopropanol (Blok *et al.*, 1997). En este trabajo se usó buffer TSNT como solución de lisis y el fenol-cloroformo- alcohol isoamílico para la extracción de ADN. Este método permitió

adult females (Eisenback *et al.*, 1981). However, a quick method for the identification of nematodes in the J₂ stage could improve decision making for the optimal handling of infected crops (Powers and Harris, 1993).

In this work, the identification of a species of phytoparasitic root nematode using the ITS regions sequence of rDNA was achieved. The protocol used facilitates the identification or confirmation of the species, preventing the need for experienced personnel for the correct identification of the nematodes through the use of taxonomic keys.

Other DNA extraction methods used for the genomic DNA starting from the phytoparasitic nematodes, include the rupture of the cellular tissue through pressure (Powers and Harris, 1993), the use of lysis solutions with proteinase K (Williamson *et al.*, 1997), and the extraction of DNA with phenol-chloroform followed by precipitation with ethanol (Williamson *et al.*, 1997) or isopropanol (Blok *et al.*, 1997). In this work, TSNT buffer was used as a lysis solution and the phenol-chloroform amyl alcohol was used for the extraction of DNA. This method allowed for the procurement of high quality genomic DNA for the amplification through PCR of the ITS regions of the rDNA.

The CDFA (California Department of Food and Agriculture, U.S.A.) includes the use of molecular methods in its protocol for the identification of the genus and species of different parasite nematodes present in plants, such as the Restriction Fragment Length Polymorphism of Amplified products (PCR-RFLP) (Dong, 2007). 5238 sequences of nematode ITS sequence regions are currently in the database of GenBank; among these sequences, 139 correspond to nematodes of the *Meloidogyne* genus. Therefore, the sequencing of ITS regions of problematic nematodes and the search in the nucleotide database is an appropriate alternative for their identification.

obtener ADN genómico de alta calidad suficiente para llevar a cabo la amplificación por PCR de las regiones ITS del ADNr.

La CDFA (Departamento de Alimentos y Agricultura de California, EE.UU.) incluye el uso de métodos moleculares en sus protocolos para la identificación de los géneros y especies de diferentes nematodos parásitos de las plantas, como polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de productos amplificados (PCR-RFLP) (Dong, 2007). Actualmente en la base de datos GenBank se encuentran 5238 secuencias de regiones ITS de nematodos, de estas secuencias 139 corresponden a nematodos del género *Meloidogyne*. Por lo tanto, la secuenciación de regiones ITS de nematodos problemáticos y la búsqueda en bases de datos de nucleótidos es una alternativa adecuada para su identificación.

CONCLUSIONES

Los métodos moleculares y bioinformáticos son una herramienta útil y rápida para el diagnóstico de fitoparásitos del género *Meloidogyne*. Este estudio aporta una opción rápida para la identificación de nematodos en etapas juveniles y además demuestra que la amplificación y análisis de regiones ITS es otra opción además de los métodos tradicionales. La claridad de los resultados permite la identificación de más especies de nematodos, además es un método fácil, adecuado tanto para juveniles machos como hembras, no dependiente de criterios subjetivos y que no requiere del apoyo inmediato de especialistas en taxonomía de nematodos fitoparásitos.

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo del proyecto Clave CT2909-10 (PAICYT) de la Universidad Autónoma de Nuevo

CONCLUSIONS

The molecular and bioinformatic methods are useful and quick tools for the diagnosis of phytoparasites of the *Meloidogyne* genus. This study provides a quick solution for the identification of nematodes in juvenile stages and also demonstrates that the amplification and analysis of ITS regions represents another option besides that of traditional methods. The clarity of the results allows for the identification of more species of nematodes, it is also an easy method, appropriate for both male and female juveniles, non-dependent of subjective criteria and does not require the immediate support of phytoparasitic nematode taxonomy experts.

Acknowledgements

We appreciate the support of this project with the key number CT2909-10 (PAICYT) of the Autonomous University of Nuevo León. J.J.-P., J.A.F.-G. y J.L.M.-G., and to CONACYT for their scholarships. We also thank MC Nabor González Garza for the supply and morphological identification of the biological material and to Sergio M. Salcedo Martínez, PhD. for his stylistic suggestions during the preparation of the manuscript.

~~~~~ Finaliza la versión en Inglés ~~~~~

León. J.J.-P., J.A.F.-G. y J.L.M.-G. y al CONACYT por sus becas. También damos las gracias al MC Nabor González Garza por el suministro y la identificación morfológica del material biológico y al Dr. Sergio M. Salcedo Martínez por sus sugerencias estilísticas en la preparación del manuscrito.

## LITERATURA CITADA

Adam MAM, Phillips MS, Blok VC. 2007. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven

- common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). *Plant Pathology*. 56:190-197.
- Agrios GN, 2005. *Plant Pathology*. Fifth Edition. Academic Press. New York, USA. 922p.
- Blok VC, Philips MS, and Fargette M. 1997. Comparison of sequences from the ribosomal DNA intergenic region of *Meloidogyne mayaguensis* and other major tropical root-knot nematodes. *Journal of Nematology*. 29:16-22.
- Cenis JL. 1993. Identification of four Major *Meloidogyne* spp. by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR). *Phytopathology*. 83:76-80.
- Dong K. 2007. PCR-RFLP Identification of *Globodera pallida*, *G. rostochiensis*, *Heterodera* spp. and *Meloidogyne* spp. Available at: [http://www.cdfa.ca.gov/plant/PPD/nematode\\_molecular.html](http://www.cdfa.ca.gov/plant/PPD/nematode_molecular.html). (Consulta, septiembre 2013).
- Eisenback JD, Hirschmann H, Sasser JN, and Triantaphyllou AC. 1981. A guide to the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species), with a pictorial key. *Journal of Nematology*. 13: 513-521.
- Hall TA. 1999. BioEdit: A user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Meza-García JL, Eías-Santos M, Cortez-Mondaca E, Guerrero-Olazarán M, Viader-Salvadó JM, Luna-Olvera HA, Maldonado-Blanco MG, Quintero-Zapata I, and Pereyra-Alfárez B. 2014. Evaluation of *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) Nematode Strain from Sinaloa, Mexico, against *Bemisia tabaci* Immatures under Laboratory Conditions. *Southwestern Entomologist*. 39(4), en impresión.
- Orui Y. 1998. Identification of Japanese species of the genus *Meloidogyne* (Nematoda: Meloidogynidae) by PCR-RFLP analysis. *Journal of Applied Entomology*. 33: 43-51.
- Powers TO. 2004. Nematode molecular diagnostics: From Bands to Barcodes. *The Annual Review of Phytopathology*. 42:367-383.
- Powers TO, Harris TS. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology*. 25:1-6.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA. 2100p.
- SENASICA-CNRF-Departamento de Análisis de Riesgo de Plagas. 2012. Ficha técnica de *Meloidogyne incognita*. Available at: <http://www.encuentra.gob.mx/resultsAPF.html?q=Meloidogyne%20incognita&client=sagarpa&ts=all&geo=0>. (Consulta, septiembre 2013).
- Stock SP, Campbell JF, and Nadler SA. 2001. Phylogeny of *Steinernema travassos*, 1927 (Cephalobina: *Steinernema*) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology*. 87:877-889.
- Vovlas N, Mifsud D, Landa BB and Castillo P. 2005. Pathogenicity of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on potato. *Plant Pathology*. 54:657-664.
- Williamson VM, Caswell-Chen EP, and Westerdahl FF. 1997. A PCR assay to identify and distinguish single juveniles of *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. *Journal of Nematology*. 29:9-15.
- Wishart J, Phillips MS, and Blok VC. 2002. Ribosomal Intergenic Spacer: A Polymerase Chain Reaction Diagnostic for *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax*, and *M. hapla*. *Phytopathology*. 92: 884-892.
- Zijlstra C, Lever AEM, Uenk BJ and Silfhout CH. 1995. Differences between ITS Regions of Isolates of Root-knot Nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. *Phytopathology*. 85: 1231-1237.
- Zuckerman BM, Mai WF, and Krusberg LR. 1990. *Plant Nematology Laboratory Manual Revised Edition 1990*. University of Massachusetts Agricultural Experiment Station, Massachusetts. USA. 252 p.