

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Meloidogyne arenaria* (NEAL) CHITWOOD NEMATODO NODULADOR DEL CULTIVO DE POROTO EN LA PROVINCIA DE JUJUY, ARGENTINA

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Meloidogyne arenaria* (NEAL) CHITWOOD ROOT-KNOT NEMATODE OF BEANS CROPS IN JUJUY PROVINCE, ARGENTINA.

Gallardo, C. B.¹, Achinelly, M. F.², Cap, G. B.³, Nico, A.⁴ y Brito, J. A.⁵.

RESUMEN

Argentina es el quinto productor de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) del continente americano y el 99% de la producción nacional se concentra en las provincias del noroeste. Los nematodos del nudo de la raíz pertenecientes al género *Meloidogyne* son importantes plagas del cultivo de poroto en esta región pero hasta el presente, la identificación de las especies se realiza sobre la base de los caracteres morfológicos externos de la hembra adulta. El objetivo de este estudio fue identificar *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood, asociada al cultivo de poroto alubia en la provincia de Jujuy (Argentina). Las muestras procedieron de raíces noduladas de plantas de var. alubia de un campo ubicado en Río Blanco (Jujuy, Argentina). Para aumentar el número de individuos se realizó la cría en plantas de *Impatiens* sp. en invernadero. Hembras adultas coincidieron con la descripción de *Meloidogyne arenaria* (Neal). Para el análisis molecular hembras extraídas de raíces se mantuvieron individualmente en etanol 96%. El ADN mitocondrial fue amplificado usando los siguientes cebadores: MORF (5'-ATCGGGGTTTAATAATGGG-3'), MTHIS (5'-AAATTCAATTGAATTAATAGC-3'), TRNAH (5'-TGA ATT TTT TAT TGT GAT TAA-3') y MHR 106 (5' – ATT TCC TAA AGA CTT TTC TTA GT-3'). Un fragmento de 740 y 550 pares de bases respectivamente se obtuvo con los cebadores descriptos anteriormente. Posteriormente se usó el cebador SCAR específico de *M. arenaria* Far (5'-TCGGCGATAGAGGTAAATGAC-3'), Rar (5'TCGGCGATAGACACTACAAC-3') obteniendo un fragmento de aproximadamente 430 pb coincidiendo con *M. arenaria*. Este reporte constituye la primera caracterización molecular de *M. arenaria* sobre raíces de poroto alubia para Argentina.

Palabras claves: Identificación. *Meloidogyne*. Poroto.

SUMMARY

Argentina is the fifth largest producer of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on the American continent, 99% of the national production is concentrated in the northwest provinces. Root knot nematodes belonging to the genus *Meloidogyne* are important pests of the bean crop in this region but until now, species identification is made on the basis of the external morphological characters of the adult female. The objective of this study was to identify *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood, associated with bean crops in the province of Jujuy (Argentina). The samples came from nodular roots of var. Alubia from a field located in Río Blanco (Jujuy, Argentina). To increase the number of individuals, they were bred in *Impatiens* sp. in greenhouse. Adult females coincided with the description of *Meloidogyne arenaria* (Neal). To perform the molecular analysis females extracted from roots were individually kept in 96% ethanol. Mitochondrial DNA was

1-Cátedra de Zoología Agrícola. Facultad de Ciencias Agrarias. UNJu. Alberdi 47. San Salvador de Jujuy (4600) Argentina. 2- CEPAVE (CCT – La Plata, CONICET- UNLP). Calle 60 y 120 s/n, Bs. As. Argentina. 3- AE La Plata – EEA – AMBA – UCT – Sur – INTA. Ruta 36 km 44 – La Plata. Bs. As. (1900). 4- Cátedra de Horticultura – Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Calle 60 y 119, La Plata, Bs. As. (1900). 5- División of Plant Industry, DPI/FDACS, Gainesville, 32608, FL, USA. claudiagallardo52@yahoo.com

amplified using the following primers: MORF (5' - ATCGGGGTTTAATAATGGG-3'), MTHIS (5' - AAATTCAATTGAATTAATAGC-3'), TRNAH (5' - TGA ATT TTT TAT TGT GAT TAA-3') and MHR 106 (5' - ATT TCC TAA AGA CTT TTC TTA GT-3'). A fragment of 740 and 550 base pairs respectively was obtained with the primers described above. Subsequently, the specific SCAR primer of *Meloidogyne arenaria* Far (5' - TCGGCGATAGAGGTAAATGAC-3'), Rar (5'-TCGGCGATAGACACTACAAC-3') was used, obtaining a fragment of approximately 430 bp coinciding with *M. arenaria*. This report is the first molecular characterization of *M. arenaria* on alubia beans for Argentina.

Keywords: Beans. Identification. *Meloidogyne*.

INTRODUCCIÓN

La República Argentina es el quinto productor de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) del continente americano y el 99% de la producción nacional se concentra en la región del noroeste (Gallardo y otros, 2016). La provincia de Salta, cubre el 62,6% del total nacional, seguida por Tucumán, mientras que Jujuy produce el 6,4%. En 2016 las exportaciones totales de poroto alcanzaron las 354.872 ton y colocaron al país en el sexto lugar mundial entre los países exportadores (Informe de Cadenas de Valor, 2016). Las perspectivas de este cultivo son alentadoras ya que hay un sostenido aumento de la demanda brasileña y mexicana, tendencia que no parece modificarse en el mediano plazo (Foastat, 2016).

Además de los insectos plaga y de las enfermedades que afectan a este cultivo, se encuentran los nematodos (Nematoda). Entre estos últimos los que afectan el cultivo de poroto en el NOA, pertenecen al género *Meloidogyne*. Estos organismos comprenden un grupo de nematodos endoparásitos obligados con una amplia gama de plantas hospedadoras y una incalculable potencialidad de impacto económico sobre múltiples cultivos agrícolas en diversas partes del mundo (Pagan y otros, 2015). En Argentina estos nematodos han sido mencionados como parásitos de numerosas plantas cultivadas en prácticamente la totalidad de nuestro territorio (Doucet y Lax, 2007). Las especies de este género se caracterizan por ser endoparásitos sedentarios y los juveniles de segundo estadio ingresan a la raíz por la zona subapical y migran intercelularmente hasta dar con el cilindro vascular. Una vez situados allí pierden la movilidad e inducen la formación en el hospedador de sitios especiales de alimentación, que resultan en potentes sumideros de fotoasimilados. La continuidad del haz vascular

se ve interrumpida y se altera la funcionalidad de la raíz. La caracterización precisa de las poblaciones de nematodos presentes es esencial para implementar estrategias de manejo tales como la utilización de cultivares resistentes, control biológico y rotación de cultivos, que dependerán de la especie y la raza del nematodo plaga. Del mismo modo el diagnóstico preciso de las especies y las razas es fundamental para la elaboración de normas de vigilancia y cuarentena. La identificación de las especies de *Meloidogyne* exige no sólo la correcta caracterización morfológica sino una clasificación subespecífica que debe recurrir a métodos suplementarios. En efecto los métodos bioquímicos y moleculares de identificación permiten entre estos nematodos agalladores confirmar los resultados que se obtienen con métodos morfométricos clásicos, así como discriminar grados mayores de especialización fisiológica, tal como la existencia de "razas". Por ello el objetivo del presente trabajo consistió en caracterizar molecularmente una población de *Meloidogyne arenaria* nematodo nodulador del cultivo de poroto *P. vulgaris* en la provincia de Jujuy, Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material inicial de estudio se recolectó durante 2016 de un campo cultivado con poroto blanco var. alubia en la localidad de Río Blanco (24°13' 40"S y 65°14'40.70"W), provincia de Jujuy. En el laboratorio de la Cátedra de Zoología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Jujuy se procedió a separar las raíces noduladas de poroto obtenida del campo, de las que se extrajeron las masas de huevos. Luego se colocó una masa de huevos por maceta en plantas de *Impatiens* sp., limpias de otros nematodos. Para ello se las cultivó sobre tierra tindallizada. Transcurridos 60

días se tomaron muestras de nematodos de las raíces noduladas de *Impatiens sp.* para realizar las preparaciones microscópicas de acuerdo con la metodología de Eisenback, 1985. Para la identificación específica de *Meloidogyne spp.* se estudió la morfología de los patrones perineales, altura del arco dorsal, presencia de campos laterales, forma y grosor de las estrías (Hartman y Sasser, 1985; Jepson, 1987).

Identificación molecular

Una hembra de *Meloidogyne* fue transferida a un tubo Eppendorf en etanol 96%. El ADN fue extraído usando el protocolo del kit de extracción Quiagen (Quiagen R). Los nematodos fueron disgregados utilizando el buffer ATL y proteinasa K, e incubados en agua caliente a 56°C. La región del ADN mitocondrial entre la subunidad COII y la subunidad ribosomal mayor fue amplificada usando los siguientes cebadores: MORF (5'-ATCGGGGTTTAATAATGGG-3'), MTHIS (5'-AAATTCAATTGAATTAATAGC-3'), TRNAH (5'-TGAATT TTT TAT TGT GAT TAA-3') y MHR 106 (5'-ATT TCC TAAAGACTT TTC TTAGT-3'). La PCR fue llevada a cabo usando un termociclador Eppendorf en volumen de reacción de 25 ul consistiendo de: 1ul de ADN templado, 1.25 ul de 0.5 uM de cada primer, 9 ul de agua estéril y 12.5 ul de Master Mix QIAGEN. Para asegurar confirmar aún más la identificación de la especie se utilizó el cebador específico SCAR para la especie *M. arenaria*, Far (5'-TCGGCGATAGAGGTAAATGAC-3'), Rar (5'-TCGGCGATAGACACTACAACT-3'). La PCR para los pares de primers MORF/M-THIS y TRNAH/MHR 106, consistió de una desnaturalización inicial de 15 minutos a 95°C; 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30s, a 61°C durante 30s y extensión a 72°C durante 60s, un único período de extensión final de 72°C por 7 minutos. Mientras que para los primers Far/Rar las condiciones de amplificación fueron: 95°C durante 15'; 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30s, a 50°C durante 30s y extensión 68°C durante 60s; un único período de extensión final de 68°C por 7 minutos. Todos los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% durante 60 minutos y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

Un ejemplar tipo de la especie de *Meloidogyne* identificada se depositó en la Colección de Nematología del Laboratorio de Zoología Agrícola de

la Universidad Nacional de Jujuy.

RESULTADOS

Los patrones perineales y la selección de caracteres morfométricos de hembras adultas como: referidos al cuerpo, forma del estilete y largo de cola coincidieron con la descripción de *Meloidogyne arenaria* (Neal 1889) Chitwood, 1949. (Figura 1).

A través del análisis molecular se obtuvo un fragmento de aproximadamente 740 pb y 550 pb con cada uno de los conjuntos de cebadores MORF/MTHIS y TRNAH/MHR 106, respectivamente (Figura 2). El conjunto de cebadores SCAR Far/Rar produjo un fragmento de aproximadamente 430 pb, el cuál es idéntico al informado previamente para *M. arenaria* (Figura 2). Una búsqueda de BLAST de Genbank produjo una coincidencia del 99% con *M. arenaria* población Malino 2 (Genbank KP234264.1) y 98% *M. arenaria* población SCAR marcador 3 (Genbank KP253748.1). Cebadores empleados SCAR – Far/Rar usando como testigo *Meloidogyne javanica*. (Ref. 1, 3,4 *M. arenaria* 430pb. 2- Control *M. javanica*) (Fig. 3).

DISCUSIÓN

Al presente, el reconocimiento de especies de *Meloidogyne* que afectan cultivos de poroto en la provincia de Jujuy se realiza mediante caracteres morfológicos de hembras adultas (Muruaga de L'Argentier y otros, 2007; Gallardo y otros 2016). Los resultados obtenidos en este estudio ofrecen una alternativa para dar mayor certeza a la identificación de nematodos plaga de cultivos de importancia comercial para la provincia de Jujuy.

Las metodologías moleculares por PCR, son de creciente importancia en el diagnóstico y la filogenia de este género, que incluyen claves moleculares para la determinación de varias de las especies, basada en la amplificación, secuenciación y análisis de polimorfismos de la longitud de los fragmentos amplificados (Power y Harris, 1993; Adams y otros, 2007; Meng y otros., 2004; Moens y otros, 2009).

Meloidogyne arenaria ha sido citada en Argentina para varios cultivos como poroto, tabaco, tomate, sin embargo la única caracterización molecular ha sido realizada para poblaciones en asociación con el cultivo de tomate en la localidad de Tupungato

provincia de Mendoza (García y Sánchez Puerta, 2012).

La técnica molecular fue muy precisa y los resultados mostraron la alta sensibilidad y confiabilidad para la identificación de las distintas especies de *Meloidogyne*. (Figuras 2 y 3).

CONCLUSIÓN

Este reporte constituye la primera caracterización molecular de *M. arenaria* sobre raíces de poroto alubia para la provincia de Jujuy y para Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

Adams M. A. M., Phillips M. S., and Blok B. C. 2007. Molecular diagnostic key for identification of single juvenile of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). *Plant Pathology*. 56, 190–197.

Doucet M. E., and Lax P. (2007). El género *Meloidogyne* y su situación con respecto a la Agricultura en Argentina. *Anales Acad. Nac. Agr. Vet.* 61, 31–50.

FOASTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations- FAO. 2016. Base de datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Disponible en: <http://fao.org>

Eisenback, J. D. 1985. Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) 95-112. In J. N. Sasser y C. C. Carter de *An advanced treatise on Meloidogyne*. Vol. 1. Biology North Carolina State University Graphics.

Gallardo, C., Quintana de Quinteros, S., Bautista, R., Cap, G. y Nico, A. 2016. Asociación del nematodo *Meloidogyne incognita* con *Phaseolus vulgaris* L. en la localidad de Río Blanco – Dpto. Palpalá – Provincia de Jujuy. *RANA. Revista Agronómica del Noroeste Argentino. Suplemento* 36(1). 82.

García E., and Sánchez-Puerta M. (2012). Characterization of a Root-Knot Nematode Population of *Meloidogyne arenaria* from Tupungato (Mendoza,

Argentina). *Journal of Nematology* 44 (3), 291-30.

Hartman, K L. y J. N. Sasser. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal-pattern morphology. pp. 69-77. En: *An Advanced Treatise on Meloidogyne. Vol. II: Methodology* (Barker, K.R., Carter C. C., y Sasser, J.N., eds.). North Carolina State University Graphics, Raleigh. Pp. 69-78. In: Barker, K. R. Carter, C. C. *Volume II. Methodology*. Raleigh: North Carolina State University Graphics.

Informe de Cadenas de Valor 2016. Legumbres. Ministerio de Hacienda y Finanzas Públicas. Presidencia de la Nación. Año 1 N°20.40pp.

Jepson, S. 1987. Identification of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* species) CAB International, Wallingford, UK. 265 pp.

Meng Q., Long H. y Xu J. 2004. PCR assays for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. *Acta Phytopathologica Sinica*. 34, 204–210.

Moens M., Perry R., and Starr J. 2009. *Meloidogyne* species- a diverse group of novel and important plant parasites. Root-knot nematodes, 1, 483.

Muruaga de L'Argentier, S.; Gallardo, C.; Quintana de Quinteros, S. y Vilte, H. 2007. Nematodos fitófagos de importancia agrícola de diferentes localidades de la provincia de Jujuy – NOA Argentina. *EdiUNJu*. Año 2007. Vol. III (10) 41-48.

Perry R, Moens M y Starr J. (eds). Root-knot nematodes, 1. Wallingford, UK. 483 pp.

Powers T., and Harris T. 1993. A polymerase chain reaction method for the identification of five major *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 25, 1–6.

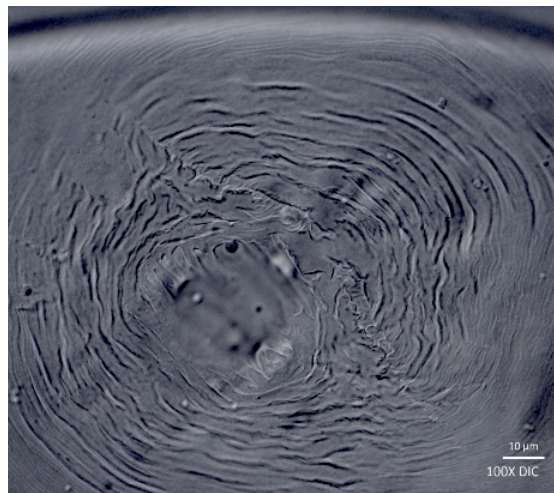


Fig. 1. *M. arenaria*. Patrón perineal de la hembra adulta.

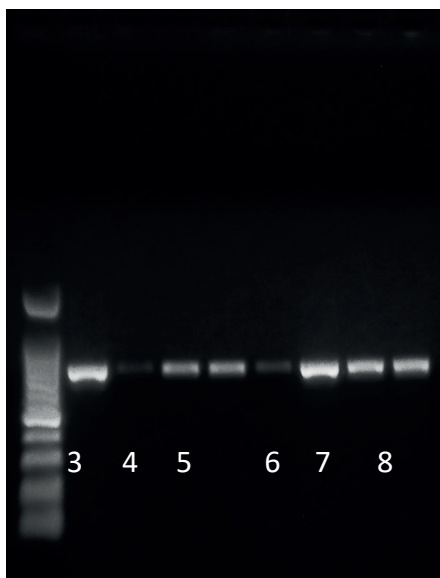


Fig. 2. Patrones de bandeo obtenidos a partir del ADN mitocondrial de hembras de *Meloidogyne* asociadas a raíces de poroto.

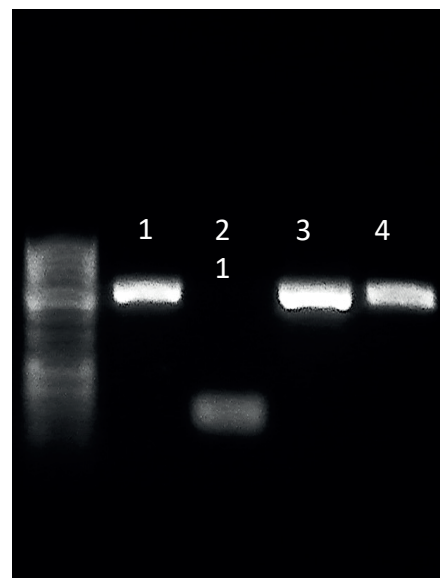


Fig. 3. Cebadores empleados SCAR – Far/Rar usando como testigo *Meloidogyne javanica*. (Ref. 1,3,4 *M. arenaria* 430pb. 2- Control *M. javanica*)