



## Identificación morfológica, morfométrica y molecular de *Meloidogyne exigua* (Göeldi 1887) en café (*Coffea arabica*)<sup>1</sup>

### Morphological, morphometric and molecular identification of *Meloidogyne exigua* (Göeldi 1887) in coffee (*Coffea arabica*)

Roy Artavia-Carmona<sup>2</sup>, Walter Peraza-Padilla<sup>2</sup>

- <sup>1</sup> Recepción: 26 de agosto, 2019. Aceptación: 4 de marzo, 2020. Este trabajo formó parte de los resultados de la tesis de Licenciatura en Agronomía del primer autor. Universidad Nacional (UNA), Costa Rica.
- <sup>2</sup> Universidad Nacional, Laboratorio de Nematología, Heredia, Costa Rica. Apartado Postal 86-3000. roy.artavia.carmona@una.cr (<https://orcid.org/0000-0003-0906-5444>); walter.peraza.padilla@una.cr (<https://orcid.org/0000-0003-4651-5555>).

## Resumen

**Introducción.** El género *Meloidogyne* contiene muchas especies y el diagnóstico correcto de estas debe basarse en el uso de múltiples herramientas, mismas que en laboratorios de diagnóstico permiten una evaluación correcta y confiable, especialmente cuando podría tratarse de nematodos cuarentenarios. La identificación adecuada de un fitonematodo es importante no solo para establecer una apropiada estrategia de control, sino que también para evitar su diseminación a otras áreas donde podría provocar daños que se traducirían en pérdidas económicas. **Objetivo.** Realizar estudios taxonómicos y moleculares para confirmar la especie de *Meloidogyne*, asociada a una plantación de café en la localidad de San Pedro de Barva, Heredia. **Materiales y métodos.** Se recolectaron muestras de suelo y raíz en una plantación de café ubicada en Barva, Heredia, Costa Rica, las cuales se procesaron en el laboratorio de Nematología de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional (UNA), por el método centrifugación-flotación en solución azucarada y técnicas moleculares. **Resultados.** En promedio se contabilizaron 30 J<sub>2</sub> en 100 cc<sup>-1</sup> en suelo y 1000 J<sub>2</sub> en 10 g<sup>-1</sup> de raíces del nematodo agallador. Tanto las técnicas taxonómicas como moleculares permitieron identificar que las hembras y juveniles extraídos de raíces de café correspondieron a *Meloidogyne exigua*. El análisis de las secuencias generadas mediante PCR y el uso de la enzima *DraI* confirmaron la identidad de la especie con un 99 % de similitud al compararla con secuencias de Costa Rica y Nicaragua, reportadas en el Genbank. **Conclusión.** Mediante el uso de diferentes técnicas morfométricas y moleculares se identificó a *M. exigua* asociada a una plantación de café.

**Palabras clave:** *Coffea arabica*, nematodo agallador, identificación, análisis molecular.

## Abstract

**Introduction.** The genus *Meloidogyne* contains many species and their correct diagnosis of these must be based on the use of multiple tools, which in diagnostic laboratories allow a correct and reliable evaluation, specially for quarantine nematodes. The proper identification of a phytonematode is important not only to establish an appropriate



control strategy, but also to avoid its spread to other areas where it could cause damage that would result in economic losses. **Objective.** To perform taxonomic and molecular studies to confirm the *Meloidogyne* species, associated to a coffee plantation located in Barva, Heredia. **Materials and methods.** Soil and root samples were collected in a coffee plantation located in Barva, Heredia, Costa Rica, which were processed in the Nematology laboratory of the School of Agricultural Sciences at the Universidad Nacional (UNA), using the centrifugation-flotation method in sugary solution and molecular techniques. **Results.** On average, 30 J<sub>2</sub> 100 cc<sup>-1</sup> were counted in soil and 1000 J<sub>2</sub> 10 g<sup>-1</sup> of roots of the root-knot nematode. Taxonomic and molecular techniques allowed to identify that the females and juveniles extracted from coffee roots corresponded to *Meloidogyne exigua*. Analysis of the sequences generated by PCR and the use of the *DraI* enzyme confirmed the identity of the species with 99 % similarity when compared to sequences from Costa Rica and Nicaragua, reported in the Genbank. **Conclusion.** Using different morphometric and molecular techniques, *M. exigua* associated with a coffee plantation was identified.

**Keywords:** *Coffea arabica*, root-knot nematode, identification, molecular analysis.

## Introducción

En el cultivo de café, los fitonematodos ocasionan daños en las raíces en la mayoría de las fincas ubicadas en América Central. En esta región, los nematodos que generan los mayores problemas fitosanitarios de importancia económica pertenecen al género *Meloidogyne*. Dentro de este género destacan principalmente las especies *M. exigua* y *M. incognita*. En las plantaciones de café en Costa Rica, se reportan las especies, *M. exigua*, *M. arabicida*, *M. javanica*, *M. incognita*, *M. enterolobii* (López, 1984; López y Salazar, 1989; Rojas y Salazar, 2013; Villain et al., 2013) y *M. lopezi* (Humphreys-Pereira et al., 2014).

La primera especie de este nematodo endoparásito asociada al café fue reportada por Jobert en Río de Janeiro en 1878, quién observó el declive en plantas de café; sin embargo, nueve años después, fue descrita por Emil August Goldi, en 1887 como *M. exigua* (Luc et al., 1990). Actualmente, esta especie está presente en plantaciones de café en las regiones de Centro y Sur América, pero también hay reportes en el sur de la India, China y algunos países de Europa. Debido a su amplia distribución, provoca problemas fitosanitarios en el cultivo en todas las zonas cafetaleras donde es identificada, ya que origina considerables pérdidas económicas (Rodríguez-Da-silva, 2011; Elling, 2013). De acuerdo con Sasser (1979), *M. exigua* logra disminuir entre 10 al 24 % el rendimiento del cultivo en cafetales de América Latina. Dentro de los principales síntomas está la reducción en la altura y desarrollo de las plantas, decaimiento general, clorosis, caída temprana de hojas, síntomas de deficiencia de N y Zn, y bajos rendimientos (Ferreira y Crozzoli, 1995; Salgado et al., 2008).

No existen datos sobre pérdidas económicas para este cultivo en Costa Rica; sin embargo, hay factores bióticos y abióticos que influyen para que los fitonematodos encuentren las condiciones correctas que les permitan establecerse y reproducirse. Datos recopilados durante años sobre registros de diagnóstico de laboratorio realizados por el Laboratorio de Nematología de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional (ECA-UNA), han encontrado densidades poblacionales de *Meloidogyne* en el cultivo de café variadas, que van desde 500 hasta los 60 000 J<sub>2</sub> 10 g<sup>-1</sup> en raíz (W. Peraza, comunicación personal, 14 de octubre de 2017). De acuerdo con Rojas (2008), *M. exigua* se ha identificado morfológica y molecularmente en más del 80 % de los cafetales de Costa Rica, lo cual confirma su amplia distribución en este cultivo. No obstante, es importante mencionar que existen más especies asociadas al cultivo de café en Costa Rica y en la medida que se cuente con más información sobre ellas, se podrían realizar registros geográficos por provincia, cantón y hasta por distrito. Además, se podría avanzar en la implementación de estrategias encaminadas a determinar valores en cuanto a los límites de tolerancia y umbral económico para el cultivo de café, ya que son aspectos fundamentales para la toma de decisiones, principalmente

para técnicos y productores, respecto a si es necesaria alguna aplicación o el establecimiento de estrategias de combate más rigurosas para luchar contra los fitonematodos.

En el país la identificación de nematodos del género *Meloidogyne* y otros fitonematodos de importancia agrícola, se realiza usualmente a nivel de género, debido a la complejidad morfológica, a la alta inversión de tiempo y en algunas ocasiones, al escaso personal técnico capacitado (Solano et al., 2015). Por esta razón, es necesario el uso de más técnicas para la adecuada y certera determinación de especies.

Identificar especies de *Meloidogyne* con solo diseños perineales es complicado, debido a que hay muchas variaciones intraespecíficas (Xu et al., 2004). Aunado a esta afirmación, Brito et al. (2004), mencionaron que los diseños perineales pueden tornarse similares entre algunas especies, lo que podría inducir a un error en la identificación del especialista o investigador.

Existe la posibilidad de encontrar variabilidad en los parámetros morfométricos dentro de una misma especie, los cuales pueden estar ligados a factores ambientales que influyen directamente en el desarrollo de las poblaciones de nematodos. Sobre este tema Castillo (2014), mencionó que la identificación a nivel de especie es compleja, debido al creciente número de especies pertenecientes a una familia, la existencia y cantidad de especies desconocidas, a la morfometría que es muy variable y por último, a la variación intraespecífica. Todos estos factores dificultan definir los límites interespecíficos.

De acuerdo con algunas investigaciones, utilizar solo criterios morfológicos y la observación de diseños perineales, puede complicar la correcta identificación de especies de nematodos incluidas las pertenecientes al género *Meloidogyne* (Esbenshade y Triantaphyllou, 1990; Carneiro y Cofcewicz, 2008). Las técnicas moleculares para la caracterización de especies de nematodos agalladores, son una herramienta exitosa utilizada hoy en día, que permite junto con otras pruebas, identificar con certeza cualquier especie de nematodo.

Entre estos procedimientos se encuentran la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR-RFLP (Harris et al., 1990; Powers y Harris, 1993), electroforesis de isoenzimas (Esbenshade y Triantaphyllou, 1990), RAPD-PCR (Orui, 1998), región específica amplificada caracterizada por secuencia (SCAR)-PCR (Fourie et al., 2001), uso de patrones perineales (Hartman y Sasser, 1985) y la taxonomía tradicional. El uso de una u otra técnica, debe ser complementada con el propósito de lograr una adecuada identificación de una especie. Al utilizar la taxonomía y morfometría tradicional, esta debe ser combinada con técnicas moleculares para el correcto diagnóstico de nematodos (Peraza et al., 2013).

Es importante realizar una adecuada identificación de nematodos mediante el uso de varios criterios. El objetivo de este trabajo fue realizar estudios taxonómicos y moleculares para confirmar la especie de *Meloidogyne*, asociada a una plantación de café en la localidad de San Pedro de Barva, Heredia.

## Materiales y métodos

### Recolecta de material vegetal

Durante enero de 2016 (época seca), se recolectaron raíces de café (*Coffea arabica*) variedad Catuaí en la finca experimental del CICAPE (Centro de Investigaciones en Café) en la localidad de San Pedro de Barva, Heredia. El sistema de producción tiene aproximadamente diez años de establecido con una primera poda, se localiza a los 10° 2'6.86"N y 84° 8'9.24"O, con altitud de 1191 msnm. De acuerdo con el sistema de zonas de vida, San Pedro de Barva se ubica dentro de la categoría bosque húmedo premontano (bh-P). Esta zona de vida se encuentra entre los 1000 y 1800 msnm, con una precipitación anual de entre los 1000 a 2000 mm anuales y una temperatura promedio que va de los 18 a los 24 °C (Holdridge, 1982).

La variedad Catuaí muestreada es una de la más utilizadas en Costa Rica, ya que presenta plantas compactas con buen potencial de rendimiento y calidad estándar en Centroamérica; sin embargo, es susceptible a la roya, a nematodos así como a la antracnosis (*Colletotrichum kahawae*) en el fruto maduro por lo que se tomó la decisión

de incluirla como testigo en el ensayo. Asimismo, es una de las variedades más cultivadas en las diferentes regiones cafetaleras del país (WCR, 2016).

En una parcela de 1000 m<sup>2</sup>, se recolectó un total de veinte muestras de raíces agalladas de 50 g cada una, así como 20 muestras de suelo hasta completar 1 kg. Todas las muestras se llevaron al Laboratorio de Nematología de la Escuela de Ciencias Agrarias (ECA) de la Universidad Nacional (UNA) para su procesamiento, conteo, medición e identificación morfológica. Posteriormente los nematodos extraídos, se llevaron al Laboratorio de Biología Molecular de la ECA-UNA para los análisis moleculares.

### **Extracción de nematodos**

La extracción de los huevos y juveniles de *Meloidogyne* sp. en raíz se realizó mediante la metodología de centrifugación-flotación en solución azucarada, descrita por Taylor y Loegering (1953).

El mismo procedimiento se llevó a cabo para la extracción de nematodos en suelo, en el cual se utilizaron 100 g. Los nematodos se colocaron en una caja de conteo y se procedió a realizar la observación al microscopio para determinar la densidad poblacional tanto en suelo como en raíces.

### **Identificación taxonómica de hembras y juveniles**

Se tomaron algunas de las raíces agalladas recolectadas en campo y se colocaron en una caja Petri para luego ser observadas en un estereoscopio Motic SMZ-171 (Wetzlar, Germany) a 20X y determinar la presencia de hembras de *Meloidogyne*. Con la ayuda de agujas de disección, se extrajeron de su interior un total de diez hembras adultas con forma de pera, las cuales se colocaron en un porta objetos con una gota de ácido láctico al 45 %, para remover el contenido del cuerpo. Posteriormente, de las hembras se realizaron cortes y montajes de la región perineal con base en el método descrito por Hartman y Sasser (1985). Finalmente, se colocó un cubre objetos y se observaron a 100 X en un microscopio Nikon Eclipse 80i (Nikon, Tokio, Japón). Se comparó la morfología de los diseños perineales con descripciones e ilustraciones de varios autores (Whitehead, 1968; Esser et al., 1976; López y Dickson, 1977; Taylor y Sasser, 1983).

En el caso de los estados juveniles, se tomaron veinticinco de ellos y se obtuvo su morfometría tomando en cuenta las siguientes mediciones e índices: la longitud del cuerpo (L), diámetro del ancho máximo del cuerpo (MBW), diámetro del cuerpo en la región anal (ABW), longitud del estilete (E), ancho de la región labial (LRW), longitud de la base de los nódulos hasta el orificio de la glándula esofágica dorsal (DEGO), distancia desde la base del estilete hasta el poro excretor (o), longitud del esófago (Le), longitud de la cola (Lc) y longitud de la porción hialina de la cola (Ph). Asimismo, se obtuvieron algunas relaciones para describir las proporciones de los juveniles medidos, los cuales fueron los siguientes: a: (L/MBW), b: (L/Le), c: (L/Lc), c': (Lc/ABW). Tanto las mediciones como las fotomicrografías de juveniles y hembras se realizaron con un microscopio Nikon Eclipse 80i (Nikon, Tokio, Japón) acoplado a una cámara Nikon DS-Fil. Posteriormente, las fotomicrografías se editaron en el programa Photoshop CS6®.

Con los datos obtenidos de las mediciones morfométricas, se realizó un análisis estadístico descriptivo, en el cual se obtuvo el promedio, la desviación estándar y los valores máximos y mínimos de la población de *Meloidogyne* en estudio.

### **Identificación molecular**

#### *Extracción de ADN*

Para la extracción del ADN se empleó la metodología de Solano et al. (2013) con algunas modificaciones. Se aislaron y tomaron juveniles del segundo, tercer y cuarto estadio (J<sub>2</sub>, J<sub>3</sub> y J<sub>4</sub>, respectivamente), así como machos

los cuales se colocaron individualmente en tubos de PCR de 0,2 ml con 47  $\mu$ l de Tris-HCL (0,2 M), a pH de 8,0. Posteriormente, se agregaron 3  $\mu$ l de proteinasa K (20 mg ml<sup>-1</sup>) a cada tubo para completar un volumen final de 50  $\mu$ l. Los tubos se colocaron en un baño ultrasónico por 10 min a 60 °C, luego se procedió con otra incubación en calor durante 30 min a 60 °C en un termociclador y seguidamente se agitaron en un vórtex. Una vez terminado este proceso, las muestras se colocaron en un congelador a -20 °C por 15 min. Pasado este tiempo en el congelador, las muestras se incubaron por 10 min a 90 °C y se agitaron nuevamente en el vórtex. Se repitió el procedimiento de colocar las muestras en el congelador a -20 °C y en el termociclador por 10 min a 90 °C. Finalmente, los tubos que contenían los nematodos se centrifugaron por 2 min a 2000 rpm y se transfirieron 45  $\mu$ l de la suspensión de ADN a un nuevo tubo que se colocó a -20 °C para realizar los análisis posteriores.

#### *Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)*

Mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se amplificó una región entre la subunidad II de la citocromo oxidasa (COII) y el gen 16S del ADN mitocondrial (ADNmt). Se utilizaron los imprimadores C<sub>2</sub>F<sub>3</sub> (5'-GGT-CAATGTTTCAGAAATTTGTGG-3') y 1108 (5'-TACCTTTGACCAATCAGCT-3') (Powers y Harris, 1993).

Se realizaron reacciones de PCR de 50  $\mu$ l, que contenían una mezcla de reacción con DreamTaq Master Mix™ a una concentración de 1X, 15  $\mu$ l de agua ultra pura, cada imprimador (*forward* y *reverse*) a 0,4 mM cada uno y 6  $\mu$ l del ADN en solución (Solano et al., 2015). La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador. Las condiciones del perfil térmico utilizadas comprendían una desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 min, seguido de 40 ciclos a 94 °C por 10 s, 52 °C por 30 s, 68 °C por 2 min y una extensión final de 72 °C durante 2 min (Jeyaprakash et al., 2006). Posteriormente, se analizaron los productos de PCR en geles de agarosa al 1 % previamente teñidos.

#### *Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP)*

Con los productos resultantes de la PCR, se procedió a realizar un análisis de Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP). Para ello, se cortaron los productos de PCR con la enzima de restricción *Dra*I, la cual reconoce el sitio de corte en la secuencia de *M. exigua* (Powers et al., 2005), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se tomó 1  $\mu$ l de la enzima, 1,5  $\mu$ l de buffer específico para la enzima, 7,5  $\mu$ l de agua ultra pura y 5  $\mu$ l del producto de la PCR, y se incubó en un termociclador a 37 °C por 3 h. Después de este procedimiento, se tomaron los fragmentos del PCR sin cortar y los del RFLP, los cuales se separaron por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 2 %, previamente preparado con TBE 1X.

#### *Secuenciación y análisis filogenético*

Se tomaron 30  $\mu$ l de los productos de PCR obtenidos a partir de muestras de juveniles infectivos del segundo estadio (J<sub>2</sub>), juveniles del tercer y cuarto estadio (J<sub>3</sub> y J<sub>4</sub>), así como machos, los cuales se enviaron a Macrogen Inc. en Corea del Sur para su purificación y secuenciación. Las secuencias se editaron y ensamblaron con el programa BioEdit versión 7.2.5 (Hall, 1999) y se analizaron con el programa BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se analizó y comparó el porcentaje de similitud entre las secuencias previamente editadas de la población de *Meloidogyne* en estudio, versus las depositadas en el GenBank® del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Se realizó un análisis filogenético a partir del alineamiento múltiple de secuencias con el programa MUSCLE (Edgar, 2004) y se editó manualmente. Se utilizó el programa jModelTest v.2.1.4 (Darriba et al., 2012) para determinar el mejor modelo de sustitución de nucleótidos y el programa PhyMLv.3.0 (Guindon et al., 2010) para

generar el dendrograma (con 1000 reemplazos) basado en el criterio de Máxima Verosimilitud (ML; Hemmerle y Hartley, 1973). Se incluyeron dieciocho accesiones de *Meloidogyne* del GenBank® en el análisis filogenético y se utilizó una accesión de la especie *Pratylenchus penetrans* como taxón externo.

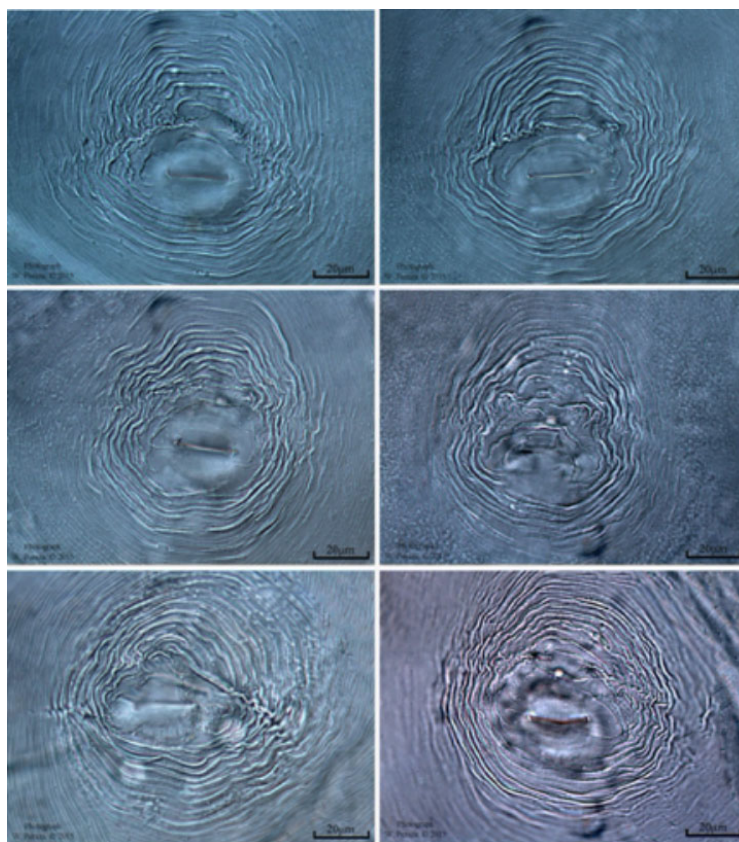
Posterior a los análisis de secuenciación, se hicieron reacciones de PCR, con el set de imprimadores tipo SCAR, ex-D15-F (5'-CATCCGTGCTGTAGCTGCGAG-3) y ex-D15-R (5'-CTCCGTGGGAAGAAAGACTG-3), diseñados por Randig et al. (2002), los cuales son específicos para *M. exigua* para así reconfirmar la identidad de las muestras secuenciadas.

## Resultados

### Análisis morfológicos y morfométricos de *M. exigua*

#### *Patrones perineales*

Los diez cortes perineales de hembras con forma de pera, presentaron en su mayoría, una forma redondeada a oval con un arco dorsal claramente bajo, estriado y liso, que coincidió con la especie *M. exigua* (Figura 1).



**Figura 1.** Diseños perineales de hembras de *M. exigua* extraídas de agallas de raíces de café en la finca experimental del Centro de Investigaciones en Café (CICAFÉ), ubicada en San Pedro de Barva, Heredia, Costa Rica. 2016.

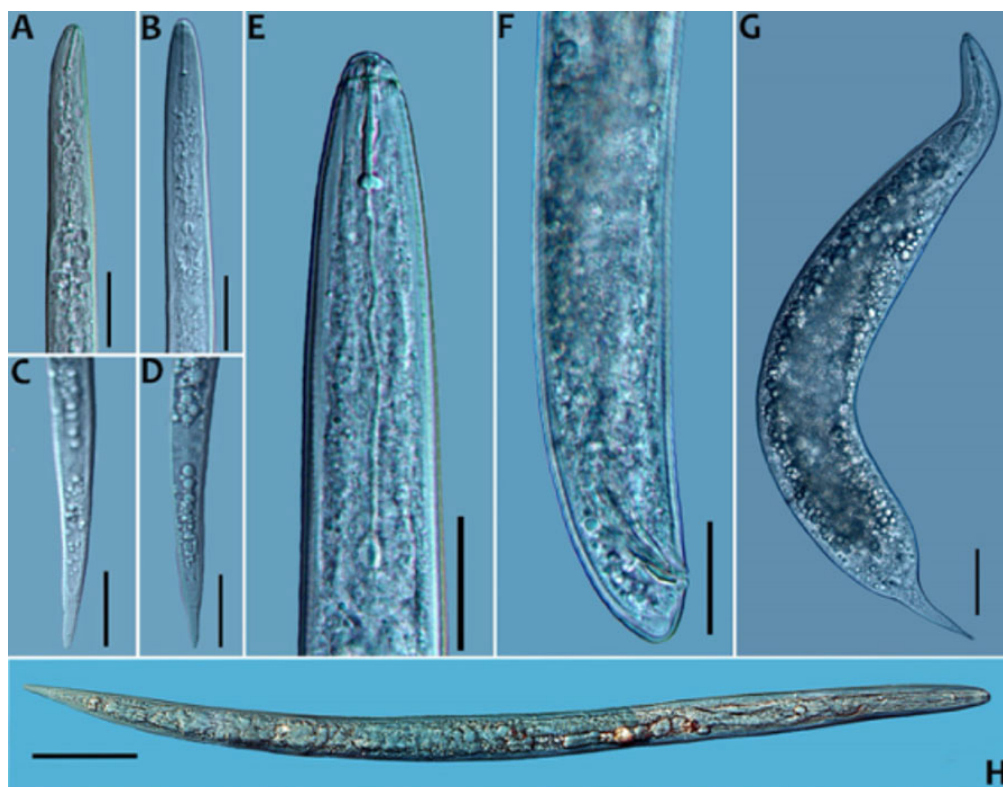
**Figure 1.** Perineal designs of females of *M. exigua* extracted from galls of coffee roots, in the experimental farm of Coffee Research Center (CICAFÉ), located in San Pedro de Barva, Heredia, Costa Rica. 2016.

Asimismo, se observó estrías ampliamente espaciadas y gruesas. Algunos de los diseños perineales, mostraron algunas variaciones intraespecíficas que son frecuentes para una misma especie.

### Morfometría de juveniles

El análisis morfométrico de diez juveniles del segundo estadio ( $J_2$ ), junto con las descripciones y comparaciones de Lordello y Zamith (1958) y Whitehead (1968), permitieron la correcta identificación de *M. exigua* (Figura 2, Cuadro 1). El valor promedio de la longitud del cuerpo para los diez juveniles medidos fue de  $357,4 \mu\text{m}$ , encontrándose dentro del rango de la descripción original para la especie *M. exigua* ( $333,5\text{-}358 \mu\text{m}$ ).

En cuanto a los valores de la longitud de la cola (Lc) ( $44,8 \mu\text{m}$ ), y la longitud del esófago (Le) ( $80,7 \mu\text{m}$ ), descritos por Lordello y Zamith (1958) y Whitehead (1968), fueron similares a los identificados en esta investigación para la especie *M. exigua*, con  $44 \mu\text{m}$  de Lc y  $80,3 \mu\text{m}$  de Le. Por otra parte, el valor promedio de la longitud del estilete (E) de la población en estudio fue  $11,9 \mu\text{m}$  versus  $9,9 \mu\text{m}$  a partir de la figura de Lordello y Zamith (1958), lo que hace que la población de *M. exigua* de Barva tenga en promedio, un estilete con  $2 \mu\text{m}$  más largo (Cuadro 1).



**Figura 2.** Fotomicrografías de la población de *M. exigua*. A y B. Región anterior de juveniles del segundo estadio ( $J_2$ ). C y D. Región posterior de  $J_2$ . E y F. Región anterior y posterior de un macho. G. Juvenil del tercer estadio ( $J_3$ ). H. Juvenil completo de *M. exigua*. Centro de Investigaciones en Café (CICAFÉ), San Pedro de Barva, Heredia, 2016. Escala: A-F=  $20 \mu\text{m}$ , G y H=  $30 \mu\text{m}$ .

**Figure 2.** Photomicrographs of the *M. exigua* population. A and B. Anterior region of second stage juveniles ( $J_2$ ). C and D. Posterior region of  $J_2$ . E and F. Anterior and posterior region of a male. G. Third stage juvenile ( $J_3$ ). H. Entire body of a juvenile of *M. exigua*. Coffee Research Center (CICAFÉ), San Pedro de Barva, Heredia, 2016. Scale: A-F =  $20 \mu\text{m}$ , G and H =  $30 \mu\text{m}$ .

**Cuadro 1.** Medidas morfométricas de juveniles del segundo estadio ( $J_2$ ) de la población de *M. exigua* obtenida en la finca experimental del Centro de Investigaciones en Café (CICAFÉ), ubicada en San Pedro de Barva, Heredia, Costa Rica. 2016.

**Table 1.** Morphometric measurements of juveniles of the second stage ( $J_2$ ) of the *M. exigua* population obtained in the experimental farm of Coffee Research Center (CICAFÉ), located in San Pedro de Barva, Heredia, Costa Rica. 2016.

Medidas e índices ( $\mu\text{m}$ ) n=25	Café ( <i>Coffea arabica</i> ) San Pedro de Barva, Heredia	Descripción original Lordello y Zamith, 1958
L	357,4±17,84 (329,5-380,4) <sup>a</sup>	345,7 (333,5-358,0)
MBW	14,4±0,82 (13,2-15,3)	14,5 (13,7-15,3)
ABW	9,2±0,62 (8,1-10,4)	8,4 (7,7-9,2)
E	11,9±0,64 (11,2-13,1)	9,9 (8,6-11,4)**
LRW	4,7±0,12 (4,5-5,0)	4,4*
DGO	3,6±0,31 (3,3-4,1)	3,2 (2,5-4,1)**
o	61,5±3,29 (56,9-66,2)	45*
Le	80,7±6,11 (73,2-91,2)	80,3 (78-82,6)
Lc	44,8±1,59 (42,4-46,8)	44,0(39-50,0)**
Porción hialina	12,2±1,11 (10,3-13,6)	11,1*
a	24,8±1,31 (21,5-26,0)	24,1 (22,2-26,0)
b	4,5±0,48 (3,8-5,1)	4,3 (4,2-4,4)
c	8,0±0,47 (7,4-8,9)	7,5 (7,3-7,8)
c'	4,9±0,30 (4,5-5,3)	5,1 (4,3-6,0)**

<sup>a</sup> Promedio ± desviación estándar (rango) / <sup>a</sup> Average ± standard deviation (range).

n= número de especímenes medidos / n = number of specimens measured.

\* Medidas tomadas a partir de las figuras de Lordello y Zamith (1958) / \* Measures taken from the figures of Lordello and Zamith (1958).

\*\* Medidas tomadas de Whitehead (1968) / \*\* Measures taken from Whitehead (1968).

L: longitud del cuerpo. MBW: diámetro del ancho máximo del cuerpo. ABW: diámetro del cuerpo a nivel del ano. E: longitud del estilete. LRW: ancho de la región labial. DEGO: distancia desde la base de los nódulos hasta el orificio de la glándula esfágica dorsal. o: distancia desde la base del estilete hasta el poro excretor. Le: longitud del esófago. Lc: longitud de la cola. a: (L/MBW). b: (L/Le). c: (L/Lc). c': (Lc/ABW) / L: body length. MBW: diameter of the maximum width of the body. ABW: body diameter at anus level. E: length of the stylet. LRW: width of the labial region. DGO: length of the base of the nodules to the orifice of the dorsal gland. o: distance from the base of the stylet to the excretory pore. Le: length of the esophagus. Lc: length of the tail. a: (L / MBW). b: (L / Le). c: (L/Lc). c': (Lc/ABW).

### Densidad poblacional de *M. exigua*

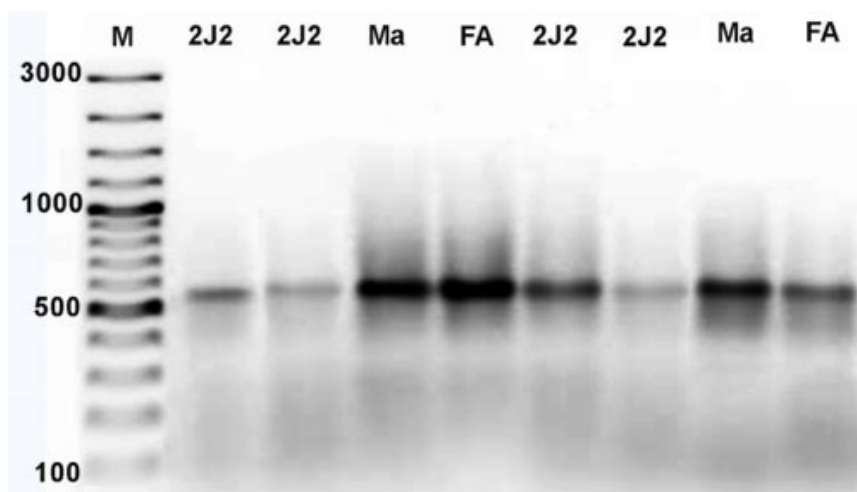
Los resultados de los muestreos realizados en la finca experimental del Centro de Investigaciones en café (CICAFÉ) tanto en suelo como en raíz, mostraron densidades poblacionales de *M. exigua* de 30  $J_2$  100  $\text{cc}^{-1}$  en suelo y 1000  $J_2$  10  $\text{g}^{-1}$  en raíz, respectivamente.

### Identificación molecular

#### Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con los imprimadores  $C_2F_3$  y 1108, generó productos de 580 pb para todas las muestras analizadas (Figura 3), lo que concuerda con otros estudios de *M. exigua* (Powers y Harris, 1993; Flores, 2008; Humphreys-Pereira et al., 2014).



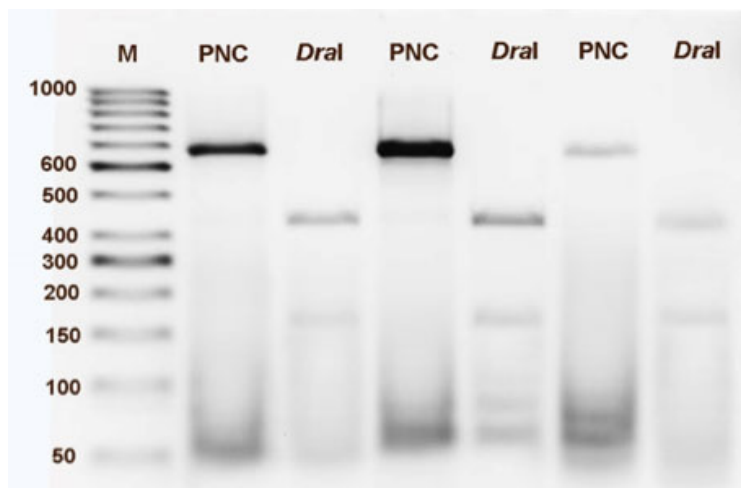


**Figura 3.** Productos de la amplificación (PCR) de la región mitocondrial COII/16S con los imprimadores C<sub>2</sub>F<sub>3</sub>/1108. M: marcador de peso molecular de 100 pb. Carriles 2, 3, 6 y 7: dos juveniles (2J<sub>2</sub>) de *M. exigua*; carriles 4 y 8: machos (Ma); carriles 5 y 9: formas aberrantes (FA). Centro de Investigaciones en Café (CICAFÉ), San Pedro, Barva, Heredia, Costa Rica. 2017.

**Figure 3.** Amplification products (PCR) of the mitochondrial region COII / 16S with the primers C<sub>2</sub>F<sub>3</sub>/1108. M: 100 bp molecular weight marker. Lanes 2, 3, 6, and 7: two juveniles (2J<sub>2</sub>) of *M. exigua*; lanes 4 and 8: males (Ma); lanes 5 and 9: aberrant forms (AF). Coffee Research Center (CICAFÉ), San Pedro, Barva, Heredia, Costa Rica. 2017.

#### *Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP)*

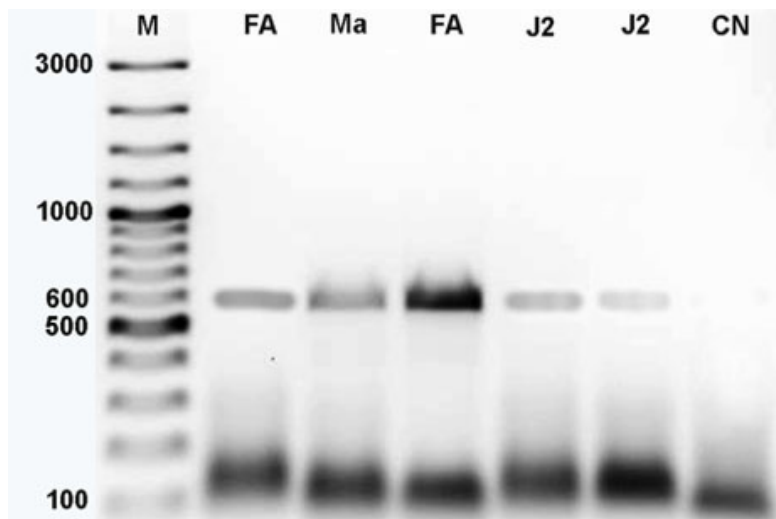
El análisis de RFLP dio como resultado dos fragmentos, uno de 160 y otro de 420pb aproximadamente (Figura 4). Los fragmentos generados con los imprimadores ex-D15-F y ex-D15-R (Randig et al., 2002), fueron de



**Figura 4.** Patrones RFLP generados con la enzima *DraI* en un gel de agarosa al 2 %. M: marcador Gene Ruler de peso molecular 50 pb. Carriles 2, 4 y 6: Producto de PCR sin cortar con la enzima (PNC); Carriles 3, 5 y 7, fragmentos generados con la enzima *DraI*. Centro de Investigaciones en Café (CICAFÉ), San Pedro Barva, Heredia, Costa Rica. 2017.

**Figure 4.** RFLP patterns generated with the *DraI* enzyme in 2% agarose gel. M: Gene Ruler marker of molecular weight 50 bp. Lanes 2, 4, and 6: PCR product without cutting with the enzyme (PNC); Lanes 3, 5, and 7, fragments generated with the *DraI* enzyme. Coffee Research Center (CICAFÉ), San Pedro Barva, Heredia, Costa Rica. 2017.

aproximadamente 600 pb (Figura 5). De acuerdo con los resultados obtenidos en secuenciación y a la característica de estos imprimadores de ser específicos para la especie en estudio, se comprobó nuevamente que la población de nematodos procedente del CICAFAÉ era *M. exigua*.



**Figura 5.** Productos de la amplificación (PCR) de la región mitocondrial COII/16S con los imprimadores ex-D15-F y ex-D15-R en gel de agarosa al 1 %. M: marcador de peso molecular de 100 pb. Carriles 2 y 4: Formas aberrantes (FA), carril 3: macho (Ma), carriles 5 y 6: dos juveniles ( $J_2$ ), carril 7: control negativo (CN), de *M. exigua*. Centro de Investigaciones en Café (CICAFAÉ), San Pedro Barva, Heredia, Costa Rica. 2017.

**Figure 5.** Amplification products (PCR) of the mitochondrial region COII/16S with the primers ex-D15-F and ex-D15-R in 1% agarose gel. M: 100 bp molecular weight marker. Lanes 2 and 4: Aberrant forms (FA), lane 3: male (Ma), lanes 5 and 6: two juveniles ( $J_2$ ), lane 7: negative control (CN) of *M. exigua*. Coffee Research Center (CICAFAÉ), San Pedro Barva, Heredia, Costa Rica. 2017.

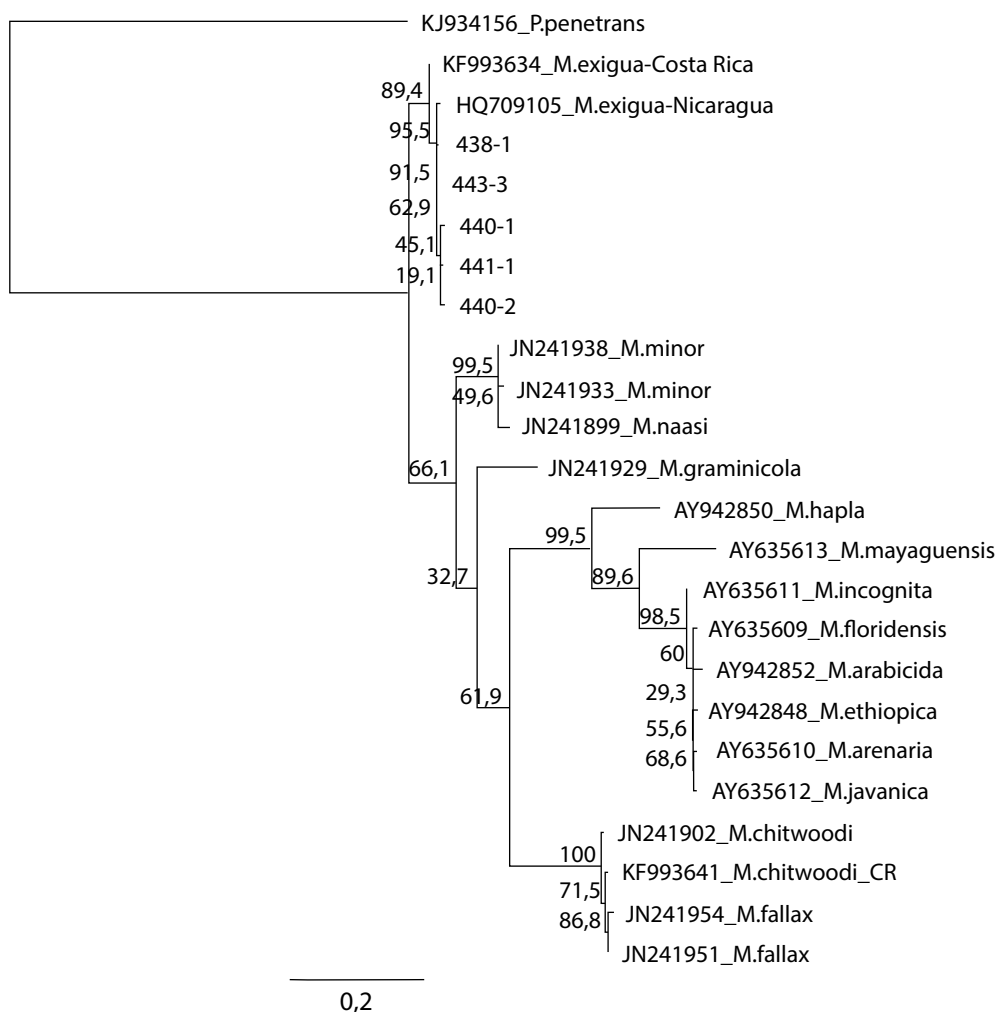
### Secuenciación

Las accesiones KF993640, 1, HQ709105, 1 y la 442-1\_Costa Rica, fueron comparadas con la accesión JN241938, 1, correspondiente a la especie *M. minor*, asociada a un césped de Holanda (McClure et al., 2012) y con la KY020413, 1, que corresponde a una población de *M. graminicola* procedente de una muestra de soya de China (Long et al., 2017). Se utilizaron todas las secuencias de estas accesiones para realizar un alineamiento múltiple de secuencias de la región entre el gen de la subunidad II de la citocromo oxidasa (COII) y el 16S del ADNmt ribosomal para compararlas y observar si existían diferencias o similitudes entre ellas (Figura 6).

## Discusión

Los diseños perineales de las hembras fueron coincidentes con otras investigaciones de *M. exigua* (Chitwood, 1949; Lordello y Zamith, 1958; Cain, 1974; López y Vilchez, 1991; Carneiro et al., 2004). Asimismo, el análisis morfométrico fue semejante a estudios realizados por (Lordello y Zamith, 1958; Whitehead, 1968; Kepenekçi et al., 2014) para la misma especie.

El análisis nematológico realizado tanto en suelo como en raíz, mostró densidades de 30  $J_2$  100 cc<sup>-1</sup> en suelo y 1000  $J_2$  10 g<sup>-1</sup> en raíz de juveniles de *Meloidogyne*; no obstante, en estudios nematológicos realizados en el



**Figura 6.** Dendrograma generado por Máxima Verosimilitud (ML) con el programa PhyML a partir de secuencias parciales de ADN de la región entre el gen de la subunidad II de la citocromo oxidasa (COII) y el 16S del ADNmt ribosomal de varias especies de *Meloidogyne*. 438-1, 443-3, 440-1, 441-1 y 440-2 corresponden a los nematodos de este estudio. Centro de Investigaciones en Café (CICAFÉ), San Pedro Barva, Heredia, Costa Rica. 2017.

**Figure 6.** Dendrogram generated by Maximum Likelihood (ML) with the PhyML program from partial DNA sequences in the region between the cytochrome oxidase subunit II gene (COII) and the 16S ribosomal mtDNA of various *Meloidogyne* species. 438-1, 443-3, 440-1, 441-1, and 440-2 correspond to the nematodes in this study. Coffee Research Center (CICAFÉ), San Pedro Barva, Heredia, Costa Rica. 2017.

laboratorio de Nematología de la ECA-UNA, para este cultivo, han mostrado densidades poblacionales variadas que van desde 500 hasta los 60000  $J_2$  10 g<sup>-1</sup> en raíz (Peraza, comunicación personal, 2017).

La ampliación molecular con PCR obtenida con los imprimadores C<sub>2</sub>F<sub>3</sub> y 1108 fue concordante con otros estudios de *M. exigua* (Powers y Harris, 1993; Flores, 2008; Humphreys-Pereira et al., 2014). Mientras que con los imprimadores ex-D15-F y ex-D15-R (Randig et al., 2012) se confirmó la identidad de la especie. El uso de imprimadores especie-específicos, como herramienta molecular, brindan mayor precisión y rapidez en la identificación de especies del género *Meloidogyne*, muchas de ellas asociadas al cultivo de Café (Adam et al., 2007).

El análisis de las secuencias de ADN, mostró 100 % de similitud de la secuencia 442-1\_Costa Rica con las secuencias de las accesiones KF993640, 1 y HQ709105, 1, ambas pertenecientes a poblaciones de *M. exigua* reportadas y depositadas en el GenBank por Humphreys-Pereira et al. (2014) en Costa Rica, y Herrera et al. (2011) en Nicaragua (Figura 6). Las accesiones JN241938, 1, y KY020413, 1, correspondientes a poblaciones de *M. minor* y *M. graminicola*, efectivamente no presentaron porcentajes de similitud significativos por tratarse de otras especies de *Meloidogyne*, por lo que simplemente se utilizaron para realizar el alineamiento múltiple de secuencias parciales de la región entre el gen de la subunidad II de la citocromo oxidasa (COII) y el 16S del ADNmt ribosomal entre las especies de *Meloidogyne*. Las técnicas moleculares fueron precisas y los resultados mostraron alta sensibilidad y confiabilidad para la identificación de *M. exigua*.

## Conclusiones

La taxonomía clásica de nematodos se basaba en estudios morfológicos y morfométricos; no obstante, gracias a los avances científicos actualmente se incluyen métodos moleculares para la identificación de especies de *Meloidogyne*. Existe un esfuerzo cada vez creciente de caracterizar nematodos mediante métodos taxonómicos y la combinación de enfoques moleculares precisos, confiables y rápidos. Es importante que la integración de todas estas técnicas se utilice pronto con mayor regularidad en los laboratorios nematológicos de todo el mundo.

Se espera que la información recopilada en este estudio sea útil para científicos, estudiantes y otros profesionales interesados en diagnosticar especies del nematodo agallador. Identificar correctamente una especie de nematodo se logra mediante el uso de diferentes técnicas lo cual es crucial para establecer una apropiada estrategia de control y evitar su diseminación a otras áreas o fincas en las cuales no haya sido confirmada su presencia. Además, se puede lograr disminuir las pérdidas causadas por este nematodo.

Con base en los estudios taxonómicos y moleculares realizados en una finca experimental del Centro de Investigaciones en Café (CICAFÉ) se logró la identificación de *Meloidogyne exigua*.

## Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a la M. Sc Irena Hilje Rodríguez por su ayuda en la interpretación de las secuencias y en la elaboración del dendograma.

## Literatura citada

- Adam, M.A.A., Phillips, M.S and V.C. Block. 2007. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). Plant Pathol. 56:190-197.
- Brito, J., T. Powers, P. Mullin, R. Inserra, and D. Dickson. 2004. Morphological and molecular characterization of *Meloidogyne mayaguensis* isolates from Florida. J. Nematol. 36(3):232-240.
- Cain, S.C. 1974. *Meloidogyne exigua*. C.I.H. descriptions of plant-parasitic nematodes. Set 4, # 49, Commonwealth Institute of Helminthology, Herts.
- Carneiro, R.M.D.G., Tigano, M.S., Randig, O., Almeida, M.R.A.A and Sarah, J.L. 2004. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. Nematology 6(2):287-298.

- Carneiro, R.M., and E.T. Cofcewicz. 2008. The taxonomy of Coffee-Parasitic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. In: R.M. Souza, editor, Plant-parasitic nematodes of coffee. Springer, Dordrecht, NLD. p. 87-122.
- Castillo, J.H. 2014. Identificación de especies del género *Meloidogyne* spp. presentes en el municipio de Patzicía, Chimaltenango. Tesis de grado. Universidad Rafael Landívar, Nueva Guatemala de la Asunción, GUA.
- Chitwood, B.G. 1949. Root-knot nematodes - Part 1. A revision of the genus *Meloidogyne* Göldi, 1887. Proc. Helminthol Soc Wash 16:90-104.
- Darriba, D., G.L. Taboada, R. Doallo, and D. Posada. 2012. jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods 9:772-772. doi:10.1038/nmeth.2109.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 32:1792-1797. doi:10.1093/nar/gkh340
- Elling, A.A. 2013. Major emerging problems with minor *Meloidogyne* species. Phytopathology 103:1092-1102. doi:10.1094/PHYTO-01-13-0019-RVW
- Esbenshade, P.R., and A.C. Triantaphyllou. 1990. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. J. Nematol. 22(1):10- 15.
- Esser, R.P., V.G. Perry, and A.L. Taylor. 1976. A diagnostic compendium of the genus *Meloidogyne* (Nematoda: Heteroderidae). Proc. Helminthol. Soc. Wash. 43(2):138-150.
- Ferreira, I y Crozzoli, R. 1995. Efectos del nematodo agallador *Meloidogyne exigua* sobre el crecimiento de plantas de café en vivero. Nematología Mediterránea 23:325-328.
- Flores, L. 2008. Identificación de especies de *Meloidogyne* descritas en Costa Rica con base en la variabilidad del ADN mitocondrial. Tesis MSc., Universidad de Costa Rica, San José, CRI.
- Fourie, H., Zijlstra, C. and McDonald, A.H. (2001) Identification of root-knot nematode species occurring in South Africa using the SCAR-PCR technique. Nematology 3:675-689.
- Guindon, S., J.F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk, and O. Gascuel. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Syst. Biol. 59:307-321. doi:10.1093/sysbio/syq010
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41:95-98.
- Harris, T., L. Sandall, and T.O. Powers. 1990. Identification of single *Meloidogyne* juveniles by polymerase chain reaction amplification of mitochondrial DNA. J. Nematol. 22:518-524.
- Hartman, K., and J. Sasser. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal patterns morphology. In: K.R. Barker et al., editors, An advanced treatise on *Meloidogyne* biology and control. North Carolina State University Graphics, NC, USA. p. 69-77.
- Hemmerle, W.J., and H.O. Hartley. 1973. Computing maximum likelihood estimates for the mixed AOV model using the W transformation. Technometrics 15:819-831. doi:10.2307/1267392
- Herrera, L., T. Bryngelsson, A. Monzón, and M. Geleta. 2011. Identification of root-knot based on perineal pattern, SCAR markers and nuclear ribosomal DNA sequences. Nematol. Mediterr. 39(2):101-110.
- Holdridge, L. 1982. Ecología basada en zona de vida. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, San José, CRI.

- Humphreys-Pereira D.A., L. Flores-Chaves, M. Gómez, L. Salazar, L. Gómez-Alpízar, and A.A. Elling. 2014. *Meloidogyne lopezi* sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a new root-knot nematode associated with coffee (*Coffea arabica* L.) in Costa Rica, its diagnosis and phylogenetic relationship with other coffee-parasitizing *Meloidogyne* species. *Nematology* 16:643-61. doi:10.1163/15685411-00002794
- Jeyaprakash, A., M. Tigano, J. Brito, R. Carneiro, and D. Dickson. 2006. Differentiation of *Meloidogyne floridensis* from *M. arenaria* using high-fidelity PCR amplified mitochondrial AT-rich sequences. *Nematropica* 36:1-12.
- Kepenekçi İ., E. Evlice, G. Öztürk. 2014. Taxonomic characteristics of *Meloidogyne exigua* Goeldi which is a new root-knot nematode for Turkey and other root-knot nematode species. *Bitki Koruma Bülteni* 54:1-9.
- Long, H.B., Y.F. Sun, T.Z. Feng, Y.L. Pei, and D.L. Peng. 2017. First Report of *Meloidogyne graminicola* on Soybean (*Glycine max*) in China. *Plant Dis.* 101(8):1554. doi:10.1094/PDIS-03-17-0334-PDN
- López, R. 1984. Differential plants responses and morphometrics of some *Meloidogyne* spp. from Costa Rica. *Turrialba* 34:445-458.
- López, R., y D. Dickson. 1977. Morfometría y respuesta de hospedantes diferenciales a tres poblaciones de *Meloidogyne incognita* y una de *Meloidogyne javanica*. *Agron. Costarricense* 1(2):119-127.
- López, R., y H. Vilchez. 1991. Dos nuevos hospedantes de *Meloidogyne exigua* en Costa Rica. *Agron. Costarricense* 15 (1/2):163-166.
- López, R., y L. Salazar. 1989. *Meloidogyne arabicida* sp. (Nematoda: Heteroderidae) nativo de Costa Rica: un nuevo y severo patógeno del cafeto. *Turrialba* 39:313-323.
- Lordello, L.G., and A.P. Zamith. 1958. On the morphology of the coffee root-knot nematode, *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1887. *Helminthol. Soc.* 25(2):133-137.
- Luc, M., R.A. Sikora, and J. Bridge. 1990. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. CAB International, Wallingford, GBR.
- McClure, M.A., C. Nischwitz, AM. Skantar, ME. Schmitt, and S.A. Subbotin. 2012. Root-knot nematodes in golf course greens of the western United States. *Plant Dis.* 96:635-647. doi:10.1094/PDIS-09-11-0808
- Orui, Y. 1998. Identification of Japanese species of the genus *Meloidogyne* (nematode: Meloidogynidae) by PCR-RFLP analysis. *Appl. Entomol. Zool.* 33:43-51. doi:10.1303/aez.33.43
- Peraza, W., Rosales, J., Esquivel, A., Hilje, I., Molina, y R., Castillo. 2013. Identificación morfológica, morfométrica y molecular de *Meloidogyne incognita* en higuera (*Ficus carica* L.) en Costa Rica. *Agron. Mesoam.* 24(2):337-346. doi:10.15517/am.v24i2.12533
- Powers, T., and T. Harris. 1993. A polymerase chain reaction method of identification five major *Meloidogyne* species. *J. Nematol.* 25(1):1-6.
- Powers, T.O., P.G. Mullin, T.S. Harris, L.A. Sutton, and R.S. Higgins. 2005. Incorporating molecular identification of *Meloidogyne* spp. into a largescale regional nematode survey. *J. Nematol.* 37:226-235.
- Randig, O., M. Bongiovanni, R., Carneiro, and P. Castagnone-Sereno. 2002. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR marker specific for the coffee damaging species. *Genome* 45:862-870.
- Rodríguez-Da-silva, L. 2011. Efeito do extracto de capeba *Pothomorphe umbellata* (L.) MIQ. Na mobilidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne exigua*. Tesis Grado, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, Muzambinho, BRA.

- Rojas, M. 2008. Avance sobre la caracterización morfológica y molecular de especies de *Meloidogyne* en cafetales de Costa Rica. Instituto del Café de Costa Rica, Heredia, CRI.
- Rojas, M., y L. Salazar. 2013. Densidad crítica de *Meloidogyne exigua* en plantas de almácigo de café variedad Caturra. *Agron. Costarricense* 37(2):115-123.
- Salgado, M., L. Oliveira, R. Silva, y V. Campos. 2008. Aspectos importantes de los fitonematodos del cafeto. *Informe agrícola* 29(247):42-50.
- Sasser, J.N. 1979. Economic importance of *Meloidogyne* in tropical countries. In: F. Lamberti, and C.E. Taylor, editors, *Root-knot nematodes*. Academic Press, London, GBR. p. 360-374.
- Solano, S., A. Esquivel, R. Molina, y B. Morera. 2015. Identificación de especies de *Meloidogyne* asociadas a plantas ornamentales de altura en Costa Rica. *Agron. Mesoam.* 26:247-256. doi:10.15517/am.v26i2.19280
- Solano, F., Beacham, J., Thomas, S., Steinberger, y Hanson, S. 2013. Evaluación de la biodiversidad de nematodos del suelo en muestras de suelo conservadas. *Nematodos En el Congreso de la Sociedad Americana de Fitopatólogos (2013APS Anual, Austin, Texas)*. La Sociedad Americana de Fitopatología, APS. Reunión conjunta de MSA. Austin, Texas, USA.
- Taylor, A., and W.Q. Loegering. 1953. Nematodes associated with roots lesions in ábaca. *Turrialba* 3:8-13.
- Taylor, A., y J. Sasser. 1983. *Biología, identificación y control de los nematodos del nudo de la raíz: (Especies de Meloidogyne)*. North Carolina State University Graphics, NC, USA.
- Villain, L., J.L. Sarah, A. Hernández, B. Bertrand, F. Anthony, P. Lashermes, P. Charmetant, F. Anzueto, P. Figueroa, and R.M.D.G. Carneiro. 2013. Diversity of root-knot nematodes associated with coffee orchards in Central America. *Nematropica* 43:194-206.
- Whitehead, A. 1968. Taxonomy of *Meloidogyne* (Nematodea: Heteroderidae) with descriptions of four new species. *Trans. Zool. Soc. Lond.* 31:263-401. doi:10.1111/j.1096-3642.1968.tb00368.x
- World Coffee Research (WCR). 2016. Las variedades de café de Mesoamérica y El Caribe, WCR, TX, USA. [https://worldcoffeeresearch.org/documents/26/Variedades\\_de\\_Cafe\\_de\\_Mesoamerica\\_y\\_el\\_Caribe\\_20160609.pdf](https://worldcoffeeresearch.org/documents/26/Variedades_de_Cafe_de_Mesoamerica_y_el_Caribe_20160609.pdf) (consultado 25 ago. 2016).
- Xu, J., P. Lui, Q. Meng, and H. Long. 2004. Characterization of *Meloidogyne* species from China using isoenzyme, phenotypes and amplified mitochondrial DNA restriction fragments length polymorphism. *Eur. J. Plant Pathol.* 110:309-315. doi:10.1023/B:EJPP.0000019800.47389.31