UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

CARRERA DE BIOLOGÍA

LABORATORIO DE NEMATOLOGÍA DEL SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD, INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA (SENASICA)

"IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL DE LA ENFERMEDAD DESTRUCTIVA EN PLANTAS DE NONI (*Morinda citrifolia*) EN MÉXICO, MEDIANTE CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y PCR DE ALTA FIDELIDAD"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

MISAEL AQUINO BOLAÑOS

DIRECTORA

M. en C. SUSANA ALCÁNTARA MENDOZA

ASESORA

Biól. MARÍA DEL CARMEN SALGADO MEREDIZ

MÉXICO D. F. NOVIEMBRE 2010.

La excelencia a través de la integración

FES

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Mi tesis la dedicó a:

A Mi Padre **Anatolio Aquino Sánchez** por su amor, y cariño que siempre me lo ha demostrado en los momentos que lo necesito, también por sus palabras de aliento a seguir preparándome como profesionista, por sus consejos ante la vida pero sobre todo por procrearme y dado la vida.

A Mi Madre **Ofelia Bolaños Villegas** por darme y brindarme su amor, su cariño, su ternura, su fuerza que siempre me ha demostrado para seguir adelante ante la vida, por sus lindas palabras de apoyo para concluir mis metas, pero ante todo por haberme traído al mundo.

A Mi Hermano y Colega Israel Aquino Bolaños por estar siempre a mi lado en los buenos y malos momentos por escucharme, aconsejarme y apoyarme que son muestras de amor, de cariño y de afecto que siempre me ha demostrado, tú sabes que eres parte de este trabajo.

A Mi Hermana Jenny Anahy Aquino Bolaños por su amor, cariño y paciencia que me ha demostrado, también por alentarme a seguir preparando ante la vida y también en lo profesional deseando que este trabajo sea una razón de motivación para que continúe estudiando y superarse en lo profesional y también ante los retos que se presentan en la vida.

A Mi Hermano Giovanni Aquino Bolaños por su amor, cariño y afecto que siempre me ha demostrado y brindado para seguir adelante ante la vida, por lo que deseo y espero le inspire este trabajo a continuar estudiando para prepararse ante los retos y obstáculos que hay en la vida y sobre todo la satisfacción misma de alcanzar las metas propuestas.

A Mi novia Anayeli Rojas Labra por su gran amor y cariño que me has brindado, demostrado y correspondido durante todo este tiempo que hemos estado juntos. El apoyo incondicional con tus palabras de aliento a seguir adelante para cumplir este objetivo sinceramente gracias siempre voy a valorar y recordar todo lo que hemos vivido y compartido a mi lado eres y serás alguien muy especial para mí por el resto de mi vida.

A Mis Amigos que aprecio y estimo que conocí en la UAM-I

Eduardo Ulises Durán, Miguel Ángel García, Juan Gabriel Suarez, Armando Cabeza, Elizabeth Martínez, Juan Pablo Osorio, Alberto Odín Ortega, Rosalba Rosas, Araceli Gómez, Olga Paulino, Enrique Aguilar, Raúl Alejandro Cabrera, Julio Alejandro Mayen, Gabriel Oloño, Heraclio Casas, Manuel Farfán "Mane", Víctor Prado, Raúl, Ciro Alberto a todos ellos les agradezco su amistad y apoyo.

A mis amigas y también colegas que me han brindado su sincera amistad durante la carrera en la facultad.

Rebeca Ávila, Keyla Eugenio, Leticia Martínez, Elizabeth, Landy Godínez, Cathy Gamiño, Abilene, Mary Saavedra, Nadchely, Pilar, Safchenka, Sandra Anayeli, Cindel, Itzel, Karina, Ilia Carmina, Araceli, Angélica, Giovanna, Josefina, Areli, Nayeli, Yolanda, Patricia, Itzen, Marlen, Liliana, Anahis, Vannia Elizabeth, Anabel, Myriam, Verónica Jazmín, Viridiana "Nube", Cristina "Verdecita", Natalia, Evelyn, Emilia, Margarita, Gabriela, Diana Ivonne, Anahy, Zarahí, Viridiana, Rasviette, Cecilia, Pamela, Laura Estudillo, Yesica, Marlene Rivera, Vanessa, Raquel, Reyna, Juanita y Carolina, etc.

A mis amigos y ahora Colegas que me brindaron su amistad en el transcurso de la carrera y estoy seguro seguirá por mucho más tiempo

Miguel Ángel Trejo, Juan Antonio Poblano, Ángel León Tapia, Cesar Gallardo, Ezequiel Hernández "el Cheke", Serguei Bálam, Cesar Vinicio, Andrés Guevara, Pedro Flores, Bálam Quitze, Cesar "Ruso", Gino, Juan "You Know", Tomas Bautista, Eder, Omar David Cortes, Peter, Hugo Limón Sherpa, Julio Cesar Neri, el Chanfle, Ricardo "mudito", Adán, Mario, Uriel Saínos, Joaquín "Chaparro", Efraín "Chino", Javier Campos, Jonathan, Iván Giovanni, Ismael Pioquintó, Alejandro Rebolledo, Luis Emilio, Cristhián Yahir, Saúl, Gonzalo adrian, Fidencio "Richi", José "el enano", David, Mario "Sulfato", Uriel Godínez, Iván, Mario Anselmo, José Miguel, Rodrigo, Manuel, Alejandro, Oswaldo, Eros, Sergio Cruz, Dave y Mario Alberto Presa.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis M. en C. Susana Alcántara Mendoza por haberme asesorado en la elección de este tema y dedicado tiempo para compartir sus conocimientos y habilidades al realizar este trabajo pero sobre todo el brindarme su amistad que surgió y brindo durante mi estancia en el trabajo, de la elaboración, y la investigación en el laboratorio.

A mi asesora Biól. María del Carmen Salgado Merediz le agradezco el haber aceptado, asesorado y dirigido este trabajo con su experiencia para concluir mi licenciatura, así como también sus valiosas aportaciones y opiniones para el mejoramiento del mismo y fue gusto haber sido su alumno y el brindarme su amistad.

Biól. María Magdalena Ordoñez Reséndiz le agradezco sus valiosas opiniones y aportaciones para el enriquecimiento en este trabajo así como también sus comentarios que siempre fueron bien recibidos y el gusto de haber sido su alumno.

M. en C. María de las Mercedes Luna Reyes le agradezco sus muy sinceros comentarios, opiniones, aportaciones y sugerencias para el mejoramiento lo que contribuyo al enriquecimiento del presente trabajo y por haber tenido el gusto de conocerla durante el asesoramiento en este trabajo.

Biól. Roberto Cristóbal Guzmán mis más sinceros agradecimientos por brindar sus aportaciones, criticas, sugerencias y comentarios que contribuyeron a el presente trabajo así como el haber aceptado ser el suplente en el jurado y por el gusto de haber sido mi profesor en clase y laboratorio por lo cual nació una muy sincera amistad.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Biól. María de los Ángeles Galván Villanueva le estaré eternamente agradecido por brindarme su apoyo y alentarme para la realización de este trabajo así como también su amable comprensión, en los momentos que la necesite para salir a adquirir experiencia profesional y también por el gusto de haberme integrado a su equipo de trabajo lo que significó tener aun más conocimientos en esta profesión. La tendré presente siempre como un ejemplo por su generosidad, su entusiasmo ante la vida, el amor y pasión con la que se entrega día con día al compartir y brindar sus conocimientos en la Facultad siempre la recordaré y estaré muy agradecido.

Ing. Domingo Colmenares Aragón le agradezco sinceramente el haber compartido y brindado sus valiosos conocimientos, los cuales adquirí durante mi servicio social en SENASICA lo cual fue la base para la realización y elaboración de mi tesis así como su muy sincera amistad que me brindo por lo cual siempre le estaré muy agradecido

Ing. Mario Espinoza quiero agradecerle por haberme enseñado el manejo del equipo e instrumentos de laboratorio de Biología Molecular para la realización e investigación de mi tesis y el brindarme su muy sincera amistad.

M. en C. María del Roció Hernández Hernández Jefa del departamento de fitopatología por las facilidades y apoyo otorgadas para la realización de este trabajo sinceramente gracias

A los Técnicos Lorena Hernández, Claudia y Alfonso Cisneros, por el apoyo que me brindaron durante la realización de este trabajo así como también su amistad sinceramente muchísimas gracias.

ÍNDICE GENERAL

PÁG.

ÍNDICE DE FIGURAS..... III
ÍNDICE DE CUADROS..... IV

RESUMEN..... 1

I.INTRODUCCIÓN..... 3

2. HIPÓTESIS..... 5

3. OBJETIVOS..... 5

3. 1 Objetivo general 5

3.1. 1 Objetivos particulares..... 5

4. MARCO TEÓRICO
4. 1 Antecedentes del noni..... 6
4. 2 Distribución geográfica del noni..... 6

4. 3 Botánica y clasificación..... 6

4. 4 Problemas fitosanitarios del noni..... 7

4. 4. 1 Plagas de insectos..... 7

4. 4. 2 Enfermedades..... 7

4. 4. 3 Sintomatología causada por nemátodos del género *Meloidogyne* spp.. 8

4. 5 Antecedentes del Género *Meloidogyne* en México..... 9

4. 5. 1 Clasificación taxonómica del género *Meloidogyne* 10

4. 5. 2 Características morfológicas para la identificación del género *Meloidogyne*..... 10
4. 6 Detección Molecular de especies de *Meloidogyne*..... 12

4. 9 Manejo..... 13

5. MATERIAL Y MÉTODO.
5. 1 Material biológico..... 15
5. 1. 1 Extracción del agente causal 15

5. 2 Montaje, observación y medición de los ejemplares..... 15

5. 3 Identificación morfológica..... 16

5. 4 Detección molecular…… **16**

5. 4. 1 Extracción de DNA…… **16**

5. 4. 2 Extracción de DNA usando Buffer de Curran (1986**)**…….... **17**

5. 4. 3 Cuantificación de las variables calidad y cantidad del DNA…….. **18**

5. 4. 4 Condiciones de detección de PCR …… **18**

5. 4. 5 Condiciones de termociclaje para amplificar la región ITS1 a partir de DNA de Nemátodos *Meloidogyne* …… **19**

5. 4. 6 Digestión con enzimas de restricción (PCR – RFLP'S)…….... **20**

5. 4. 7 Reacción de Secuenciación de Nucleótidos…… **20**

5. 4. 8 Condiciones para la secuenciación de nucleótidos…… **23**

5. 4. 9 Electroforesis de los productos de PCR…… **24**

6.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6. 1. 1 Síntomas en la raíz de noni infectada por el agente causal……... **25**

6. 1. 2 Identificación Morfológica del agente causal…… **26**

6. 1. 3 Detección y corroboración Molecular del agente causal…… **29**

6. 1. 4Revelado de la digestión con enzimas de restricción (PCR – RFLP'S)…… **30**

6. 1. 5 Resultado de la Secuenciación de Nucleótidos…….. **32**

7. CONCLUSIONES…….. **34**

8. SUGERENCIAS…… **35**

9. LITERATURA CONSULTADA…… **36**

10. ANEXOS…….. **41**

11. ABREVIATURAS…… **42**

ÍNDICE DE FIGURAS

PÁG.

Fig.1.A Raíces con síntomas de malformaciones causados por nemátodos Agalladores**……..... 9**

Fig. 1. B Crecimiento irregular de la raíz de noni**……..... 9**

Fig. 2. Raíces de noni con síntomas de malformaciones causados por nemátodos agalladores**..... 25**

Fig. 3 Corte de la región anterior de una hembra de *Meloidogyne arenaria* a 100X comparándolo con el modelo de Llacer**…… 25**

Fig. 4 Modelo perineal de la hembra *Meloidogyne arenaria...*…… **27**

Fig. 5. Región perineal de una hembra de *Meloidogyne arenaria* lado derecho a 100X comparándolo con el modelo tomado de Llácer (2000)**..... 28**

Fig. 6 Región perineal de una hembra de *Meloidogyne javanica* (B), Región perineal de una hembra de *Meloidogyne*..... **29**

Fig. 7. Extracción del DNA de *Meloidogyne* spp. utilizando la metodología de (Currant *et al*,. 1986) ..…… **30**

Fig. 8 Secuencia de ADN mitocondrial de la especie de *Meloidogyne arenaria* con el primer 1108 en donde el carril 1 *M. arenaria* , *M. javanica* carril 2 y *M. chitwoodi* carril 3 de acuerdo a lo descrito por (Jeyaprakash y Tigano 2006)**……31**

Fig. 9. Secuencia de ADN mitocondrial de la especie de *Meloidogyne arenaria* con el primer C2F3 (Jeyaprakash *et al,.* 2006) **…… 32**

ÍNDICE DE CUADROS

PÁG.

Cuadro 1. Condiciones para la PCR para cada tubo**……19**

Cuadro 2 Reactivos para la desnaturalización y amplificación**……21**

Cuadro 3. Reactivos Para La Preparación De Las Cadenas De Ida**……22**

Cuadro 4. Reactivos Para La Preparación De Las Cadenas De Regreso**……23**

PÁG.

Cuadro 5. Medidas promedio mínimas y máximas de hembras y juveniles de *M. arenaria*..... **26**

Cuadro 6. Resultado de la secuenciación de DNA AT-RICH del *Meloidogyne* arenaria usando primers C2F3 inicial y 1108 reversible..... **33**

Cuadro 7. Resultado de la secuenciación de DNA AT-RICH del *Meloidogyne* arenaria usando primers C2F3 inicial y 1108 reversible..... **33**

RESUMEN

En la localidad de Villa Ávila Camacho, estado de Puebla se presentaron síntomas de agallas, hinchazón radical, necrosis, decoloración, clorosis foliar y malformación de la corteza en la base del tallo de plantas de noni (*Morinda citrifolia*). Por tal razón se realizó el presente estudio para identificar el agente causal que provocó los síntomas mencionados. Se utilizaron las raíces infestadas de noni para extraer las agallas y huevecillos del agente causal. De acuerdo a caracteres morfológicos y morfométricos se identificó el género *Meloidogyne* el fitopatógeno que provoca la enfermedad en el noni como nematodo perteneciente a la especie *arenaria*. De acuerdo a las medidas que características descritas en hembras adultas de nemátodos del género *Meloidogyne* fueron los siguientes promedios: longitud total del cuerpo 62.2 μm, ancho del cuerpo 484 μm y ancho del cuello 166 μm.

El patrón anterior de *Meloidogyne* presentó su región anterior redondeada a oval, pocas estrías y las estrías cercanas a la línea lateral están desordenadas. La unión de las estrías laterales y dorsales en ocasiones formó una oscilación y no tenían presencia de puntuaciones por arriba del ano. El estilete fue cónico y puntiagudo, el cono curveado hacia la parte dorsal, nódulos redondeados. La hembra tuvo una longitud del estilete de 18 µm, DGO= 4 µm, Vulva=23 µm, ano a la vulva 14 µm, longitud del poro excretor a la cabeza 20 µm. Los juveniles en segundo estadio de nemátodos del género *Meloidogyne* midieron 48.0 µm de longitud, Ancho del cuerpo 14.7 µm, Longitud de la cola 54 µm, Distancia del estilete al DGO 2.1 µm, Altura del arco dorsal 7.3 µm, distancia del DGO= 4.5 µm, longitud del estilete de 12.5 µm, Morfología del estilete en forma de cono. No se encontraron machos en las muestras analizadas.

Se realizó la identificación molecular de la especie del nematodo utilizando la técnica de (PCR) de alta fidelidad utilizando los primers C2F3 inicial (5'-GGTCAATGTTCAGAAATTTGTGG-3´) y (1108 5'-TACCTTTGACCAATCACGCT-3'), diseñados de la región conservada del citocromo COII y 16S rRNA, que amplifican el fragmento de 1100 pb aproximadamente que corresponden a *M. floridensis* y *M. arenaria*. Se realizó la secuenciación del fragmento amplificado y se realizó un blasteo en el banco de genes de las especies que pertenecen al género *Meloidogyne*, en el cual se obtuvo un 98% de compactibilidad con la especie *Meloidogyne arenaria.*

I. INTRODUCCIÓN

El noni (*Morinda citrifolia*) es un fruto que comienza a ser importante en el mundo debido a sus propiedades antibióticas y antioxidantes, también por su contenido en aminoácidos, proteínas, minerales, propiedades antibacteriales, propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias y como analgésico, por lo cual se le considera curativa para distintas enfermedades y padecimientos (Elkins, 1997). Las enfermedades de las plantas son uno de los factores naturales que más afectan la productividad agrícola. Es común ver cultivos destruidos por los patógenos que llegan a causar daños tan graves que la cosecha se pierde totalmente (Hidalgo, 2005).

Los nemátodos parásitos de plantas son muy comunes en todos los suelos cultivados o no cultivados. En relación con la fitosanidad, únicamente causan pérdidas económicas cuando se presentan condiciones que los favorecen y sus poblaciones se elevan desmedidamente o cuando aun en poblaciones bajas actúan como agentes fitopatógenos primarios, que debilitan, predisponen o causan heridas, que permiten la infección por otros patógenos (Cid del Prado *et al*., 1997).

Uno de los principales nemátodos de importancia en los cultivos agrícolas son los nemátodos agalladores del género *Meloidogyne.* Estos patógenos presentan una distribución mundial y son parásitos obligados de cientos de especies vegetales, incluyendo monocotiledóneas, dicotiledóneas, herbáceas y forestales (Sosa-Moss *et al,.* 1997). Las especies *M. incognita, M. javanica, M. arenaria, M. hapla, M. graminicola, M. naasi, M. exigua, M. acornea, M. chitwoodi, M. decalineata, M. africana, M. coffeicola, M. aryzae y M. thamesi* son las de mayor importancia agrícola (Sosa-Moss, 1997).

La habilidad de las cuatro especies más comunes (*M. incognita, M. javanica, M. arenaria y M. hapla*), para atacar a tantas plantas cultivadas diferentes es la causa de que estén ampliamente distribuidas. En la República Mexicana, los nemátodos agalladores se encuentran ampliamente distribuidos, se han reportado en al menos 23 de los 32 estados del país (Cid del Prado, 1995).

El género *Meloidogyne* es un nematodo de importancia económica mundial, cosmopolita y polífago, ya que disminuye considerablemente el rendimiento e incrementa los costos de producción del 30% a 40 % de la inversión total de los cultivos para su control, además las especies que pertenecen a este género son consideradas de importancia cuarentenaria, es decir que representa un riesgo fitosanitario y a pesar de que se encuentra en México está restringida a ciertas zonas, principalmente en aquellas que tienen climas templados y tropicales (SAGARPA, 2007).

Taylor y Passer (1993) mencionan que la textura y la composición química del suelo influyen de forma importante en la migración de una zona a otra de éste nematodo. Este género ocupa el primer lugar de importancia económica por su amplia distribución y número de hospederos (Ramírez *et al*., 1991).

El peligro potencial de la presencia del género *Meloidogyne* como nematodo de importancia cuarentenaría radica en que ataca a más de 50 especies de plantas de 16 familias botánicas, entre las que se encuentran cultivos de importancia agrícola como papa, jitomate, zanahoria, chile, alcatraz, noni, etc. induciendo pérdidas significativas (Cid del Prado *et al.,* 1997).

Por lo anterior, el presente estudio está enfocado a detectar e identificar al agente causal para sentar las bases del manejo integrado de una enfermedad que afecta la producción de *Morinda citrifolia* (noni) y que podría representar un riesgo para la agricultura en México. Debido a que lo síntomas encontrados son semejantes a los ocasionados por nemátodos agalladores se consideró como objeto de estudio la identificación del agente causal de la enfermedad del noni.

II. HIPÓTESIS

La deformación de las raíces de la planta de noni (*Morinda citrifolia*), las cuales presentan síntomas de agallas e hinchazón radical, necrosis, decoloración y crecimiento irregular en el tamaño de la raíz, amarillamiento, marchites, clorosis foliar y malformación de la corteza de la base del tallo son síntomas que probablemente sean causados por la presencia de nemátodos agalladores fitopatógenos del género *Meloidogyne*.

III. OBJETIVOS

3. 1 Objetivo General

Identificar el agente causal que provoca la enfermedad en plantas de noni (*Morinda citrifolia*), mediante la caracterización morfológica y por reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR) de alta fidelidad.

3. 1. 1 Objetivos Particulares

Describir las características morfológicas del agente causal en sus diferentes etapas del ciclo biológico.

Corroborar la especie a que pertenece el agente causal presente en la raíz del noni (*Morinda citrifolia*), mediante PCR de alta fidelidad.

Determinar mediante secuenciación directa la identidad del agente causal de la enfermedad de la raíz de la planta de noni (*Morinda citrifolia*).

4. MARCO TEÓRICO

4. 1 Antecedentes del noni

En México, las plantas de noni son de uso homeopático para prevenir la artritis, la diabetes, la presión sanguínea alta, dolores musculares, intensos dolores de cabeza, enfermedades del corazón y la ulcera gástrica. En otros países del mundo se ha realizado algunos estudios sobre su efecto terapéutico, antiviral, antihongos, antitumoral, analgésico, antiinflamatorio, ya que tiene componentes como el ácido octanóico, potasio, vitamina C, terpenoides, alcaloides, antraquinonas tales como (morindonas, antraquinonas glucosúricos), β-sistosterol, carotenos, vitamina A, aminoácidos, ácido caproíco, ácido caprílico, ácido linoléico y la Xeronina (Wang y Su, 2000).

4. 2 Distribución geográfica del noni

El noni es nativo del Suroeste de Asia hasta Australia y se distribuye en latitudes de 19º N. Fue introducido en las islas Polinesias hasta llegar a Hawaii. Recientemente se ha comenzado a propagar sobre el centro y Sur de América desde México, Panamá, Venezuela, las Islas Bahamas, las Islas Bermudas, y los Cayos de la Florida (Wang y West, 2002). También se le ha localizado en bosques perturbados, bosques semiáridos, praderas, en plantaciones de cocoteros, sobre litorales, cerca de cascadas y en algunas villas alrededor de las islas de África (Johansson, 1994).

4. 3 Botánica y Clasificación

La planta del noni es miembro de la familia *Rubiaceae* (familia del café) subfamilia *Rubioideae*, la cual comprende alrededor de 80 especies del género *Morinda*. Es una planta que crece en climas costeros a los 400 msnm (Dixon y McMillen, 1999). El noni es un arbusto que usan su fruto, sus hojas, flores, corteza como medicina para diferentes enfermedades y prevenciones desde hace 2000 años por los habitantes de las islas de la Polinesia (Dixon, 1999).

Recientes estudios han demostrado que el fruto contiene una gran cantidad de antibióticos y antioxidantes; estas propiedades han ocasionado que se haga la investigación en valores nutricionales y medicinales para los seres humanos (Dittmar, 1993).

El noni es una planta perenne cuyo tamaño varía desde los 3 cm cuando se encuentran en las etapas iníciales en el vivero, hasta una altura de 7 m; posee ramas de color verde y sin tricomas; su corteza externa es lisa, con estípulas interpeciolares, redondeadas, de 6 a 20 mm de largo (Sánchez, 2001). Presenta floración durante todo el año, dichas flores son pequeñas, blancas y fragantes. Sus inflorescencias se desarrollan solitarias o de dos a tres por nido axilar, agrupadas en las cabezuelas; poseen una corola blanca, tubular, hasta de uno a 25 cm de largo (Sánchez, 2001).

4. 4 Problemas Fitosanitarios del Noni

4. 4. 1 Plagas por insectos

El noni también es dañado por algunos pulgones de la especie *Aphis gosypii*, especies de gorgojos aun no identificados, moscas de ala blanca especie *Dialuerodes kirkaldyi*, orugas de la especie *Achaea janata*. Estos insectos causan principalmente daños en las hojas, la corteza y en la flor provocando marchitez en las partes mencionadas (Abbott y Shimazu 1985).

4. 4. 2 Enfermedades

La mayoría de las enfermedades ocurre por lugares inadecuados para la producción comercial del noni. Los suelos que contienen cenizas, aserrín, hojas dispersas y arena son lugares en donde las semillas y la maleza tienen un control de retención de agua, lo que causa algunas enfermedades. Hay enfermedades ocasionas por los campesinos debido al mal manejo en el campo (Abbott y Shimazu 1985).

Algunas enfermedades que hasta el momento se han empezado a investigar es si las lluvias frecuentes al causar inundación en el área donde se encuentra plantada el noni, el hongo *Colletotrichum* spp. es el que se hospeda en las hojas y provoca la destrucción del fruto, otra enfermedad es la del "pañuelo negro" causada por otro hongo provocándole inhibición en el crecimiento de la hoja y desarrollo del fruto (Abbott y Shimazu 1985).

4. 4. 3 Sintomatología provocada por nemátodos del género *Meloidogyne*

Durante el segundo estadio juvenil (J2) los nemátodos de raíz del género *Meloidogyne* se hospedan estableciéndose principalmente en la raíz ya que este es su sitio de alimento, el nematodo induce cerca de seis parénquimas vasculares de la planta y estas células se replican en su núcleo sin que haya división celular y cada una de estas células comienza agigantarse debido a las células que se alimentan de los multinucleícos (Sasser 1966, Bird 1967; Trudgill y Block, 2001).

Los daños que ocasionan los nemátodos en la planta de noni son notables, ya que en el follaje de la planta se observa síntomas de amarillamiento, una menor cantidad de hojas pequeñas tienden a marchitarse cuando el clima es cálido por lo que no sobreviven durante el transcurso de la estación. Las inflorescencias y frutos no se forman o se atrofian y son de baja calidad de crecimiento. La mayor concentración de nódulos o agallas producidas por el nematodo se localizan en el ápice de las raíces, que impiden la absorción del agua y los nutrientes del suelo y además, bloquean el paso ascendente y descendente de estos a otros órganos de la planta (Johansson, 1994).

Las raíces infectadas se hinchan en la zona de invasión y desarrollan las agallas típicas del nudo de la raíz, las cuales tienen un diámetro dos o tres veces mayor al de las raíces sanas. Se producen varias infecciones sobre la misma raíz y las agallas en proceso de desarrollo le dan a la raíz una forma irregular que se asemeja a una maza (B Fig.1)

En las raíces infectadas por algunas de las especies de este nematodo se forman, además, varias ramificaciones cortas de la raíz, las cuales nacen en la parte superior de la agalla y forman un sistema radicular denso y tupido. Sin embargo, es frecuente que las raíces infectadas sean más pequeñas y muestran varios grados de necrosis (A Fig. 1). Con frecuencia se produce la pudrición de las raíces, particularmente a finales de la estación (Taylor y Passer, 1993). El tamaño de las agallas llega a ser tan grande que deforma por completo el sistema radicular, como consecuencia del ataque a la raíz, las plantas en la parte aérea presentan achaparramiento, amarillamiento, marchitez (Cid del Prado *et al.*, 1997).

(A Figura 1) (B Figura 2)

A Figura 1. Raíces con síntomas de malformaciones causados por nematodos Agalladores **B Figura 2.** Crecimiento irregular de la raíz de noni tomada de Llácer (2000).

4. 5 Antecedentes del Género *Meloidogyne* en México

El género *Meloidogyne* es el más importante en México a nivel mundial por su amplia distribución y número de hospedantes, ya que ocasiona grandes daños a las plantas cultivadas, disminuyendo considerablemente el rendimiento e incrementa los costos de producción. De este género las cuatro especies más comunes son *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White), Chitwood; *M. arenaria* (Neal), Chitwood; *M. javanica* (Treub y Chitwood) y *M. hapla* (Chitwood)

(Moreno, 2005). Estas especies se presentan en zonas de nuestro país donde la temperatura anual es de 15 a 35 °C (Barker *et al*., 1985).

En 1970 se detectó que en algunos campos de la República Mexicana a *Meloidogyne arenaria* parasitan a tomate, a chile, a sandia, apio, a betabel, a zanahoria y cebolla reportando perdidas del 36% en el rendimiento de estos cultivos (Williams, 1974).

4. 5. 1 Clasificación taxonómica del género *Meloidogyne* de acuerdo a Jepson (1987)

Phyllum: Nematoda

Clase: Secernentea

Orden: Tylenchida

Suborden: Tylenchina

Superfamilia: Tylenchoidea

Familia: Heteroderidae

Subfamilia: Meloidogyninae

Género: Meloidogyne

4. 5. 2 Características morfológicas para la identificación del género *Meloidogyne*

Las características principales de las hembras de *Meloidogyne* son (Eisenback y Hirschmann 1983).

A) Modelo perineal. El arco dorsal es aplanado, redondeado, las estrías en el arco se curvan ligeramente hacia las líneas laterales y forman generalmente una ondulación pronunciada, llamada “hombreras”. Las estrías son lisas a onduladas y se dirigen hacia la vulva.

B) Los modelos perineales pueden también presentar estrías que se prolongan lateralmente para formar una o dos alas.

C) El estilete. Es muy robusto, el cono y la columna son gruesos, esta última incrementa su anchura hacia la base y emerge gradualmente de los nódulos basales, estos son anchos y redondos en su parte superior.

D) Cabeza. El disco labial tiene forma de “mancuerna” generalmente presentan un anillo incompleto.

En Macho

A) Cabeza. La región cefálica es baja, con declive hacia la parte posterior. Forma una estructura lisa y continua presenta tres anillos incompletos.

B) El estilete. El cono es puntiagudo, la abertura del lumen está señalando en el lado ventral, por una pequeña protuberancia. La porción del cono es mucho más ancha que la parte anterior de la columna, ésta generalmente es cilíndrica, aunque su diámetro puede aumentarse ligeramente en la parte media. Los nódulos basales están proyectados hacia la parte anterior, son muy grandes y emergen gradualmente de la columna.

Segundo estadio Juvenil

A) Cabeza. El disco labial tiene forma de “mancuerna” en la mayoría de los especímenes la región cefálica no está anillada.

B) Cola. Presentan una cola angosta, su término es redondeado mide 55.8 µm de largo, la parte hialina presenta una constricción, ésta mide 14.8 µm de largo.

Las hembras de *M. arenaria* tienen estiletes típicos que son muy característicos de la especie. En general, el estilete es muy robusto; ambos, el cono y la columna son gruesos. La columna incrementa su anchura hacia la base y emerge gradualmente de los nódulos basales del estilete; éstos son anchos y redondeados en su parte posterior (Sosa-Moss, 1997).

La morfología de la cabeza el disco labial y los labios medios de *M. arenaria* tienen forma de "mancuerna" como en *M. javanica* o *M. incognita*, los labios laterales son grandes y están separados de los labios medios y de la región cefálica; ésta generalmente presenta un anillo incompleto (Sosa-Moss, 1997).

La morfología en los Machos: la morfología de la cabeza. La capsula cefálica de los machos de *M. arenaria* es baja y con declive hacia la parte posterior. Forma una estructura lisa y continua que es casi tan ancha como la región cefálica, la cual presenta dos o tres anillos incompletos (Sosa-Moss, 1997).

Los estiletes de los machos de *M. arenaria* son puntiagudos y la abertura del lumen esta señalado en el lado ventral, por una pequeña protuberancia. La porción posterior del cono es mucho más ancha que la parte anterior de la columna; esta generalmente es cilíndrica, aunque su diámetro puede incrementarse ligeramente en la parte media. Los nódulos basales del estilete proyectados hacia la parte anterior, son muy grandes y emergen gradualmente de la columna (Sosa-Moss, 1997).

4. 6 Detección Molecular de especies de *Meloidogyne*

Todos los nemátodos de raíz están previamente descritos del género *Meloidogyne* los cuales comprenden cerca de 70 especies caracterizados basados en sus rasgos morfológicos en el segundo estadio, juveniles, machos y hembras (Luc, 1990). En la práctica, la identificación de la mayoría de estas especies frecuentemente se realiza en el microscopio examinando patrones perineales de hembras adultas y también por las pruebas de diferentes tipos de hospederos. La precisión y la confiabilidad de la identificación de especies es una formidable tarea para los taxónomos y expertos calificados con experiencia en el género *Meloidogyne* (Eisenback *et al.,* 1983)

Los estudios bioquímicos durante los últimos 20 años han sido lo más práctico para diferenciar e identificar especies de *Meloidogyne*. La primera demostración en que se usaron enzimas para identificar especies de *Meloidogyne* fue un trabajo de Dickson *et al.,* (1971). Este trabajo inmediatamente tuvo un seguimiento por (Hussey y Sasser, 1972) en la

Universidad estatal de Carolina del Norte donde extrajeron 100 proteínas crudas de las hembras adultas de *Meloidogyne* este procedimiento lo aplico en un gel de policramida y en una cámara de electroforesis diseñada apropiadamente revelo el contenido de las diferentes enzimas contenidas en los fenotipos. La esterasa, deshidrogenasa de malta y alfa-glicerofosfato, los fenotipos de deshidrogenasa indicaron a cuatro especies más comunes de *Meloidogyne incognita, M. arenaria, M. javanica y M. hapla* estos estudios nos conducen a que con un pequeño número de estas especies.

Se podría garantizar el parentesco entre los fenotipos del género *Meloidogyne* a que especie le pertenece. La reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) es un nuevo desarrollo que amplifica exponencialmente el DNA, usando esta técnica (Harris *et al*,.1990) amplifico 1.1 kb de un fragmento de mtDNA del DNA de un huevecillo que contenía una extensión del polimorfismo (RFLPs) para la enzima de restricción *HinfI* que permite la separación de *M. incognita, M. arenaria, de M. javanica* y *M. hapla*. El PCR permite la identificación de especies de *Meloidogyne* durante sus diferentes ciclos de vida que puede ser indistinguible por cualquier otra técnica (Caetano *et al.,* 1991, Welsh, 1990 y Williams *et al.,* 1990).

4. 8 Manejo

Los suelos infestados por nemátodos podrían ser evitados con un tratamiento de calentamiento (esterilización) a más de 50 ºC por 15 minutos. La mayoría de las enfermedades ocurre por preferir lugares inadecuados para la producción comercial del noni (Canto-Sáenz, 1985).Tradicionalmente, los problemas causados por los nemátodos se resuelven con la aplicación de nematicídas químicos muy efectivos, pero inconvenientes por su toxicidad humana y los daños severos que causan al ecosistema. En los últimos años, las enmiendas orgánicas han mostrado ser efectivas en la reducción de la población de nemátodos; como la gallinaza y la harina de caparazón de camarón (Canto-Sáenz, 1985).

El mecanismo de acción de la gallinaza consiste en que la materia orgánica estimula e incrementa la actividad microbial (algas, bacterias, hongos del género *Actinomicetos* y otros organismos), y ésta a su vez promueve la

actividad enzimática, de tal manera que en el suelo enmendado se acumulan compuestos orgánicos que ejercen acciones de un nematicida biológico.

La enmienda quitinosa como la harina de caparazón de camarón, ha resultado efectiva en el manejo de la población de nemátodos Agalladores (Llácer *et al.,* 2000). Existe evidencia de que la quitina forma parte de la matriz gelatinosa que envuelve la masa de huevos en las especies de nemátodos del género *Meloidogyne.*

Por consiguiente, la incorporación de quitina al suelo estimula el crecimiento de hongos nematófagos consumidores de quitina. Los nematófagos, consumen la quitina que forma parte de la matriz gelatinosa que envuelve la masa de huevos de los nemátodos (Llácer *et al.,* 2000).

Una vez que los nematófagos consumen la cobertura quitinosa de la masa de huevos, quedan expuestos en la solución del suelo a las condiciones adversas de temperatura y humedad, pueden ser parasitados y/o consumidos por otros microorganismos. La dosis por planta de harina de caparazón de camarón a adicionar en la planta, va a depender de la población de nemátodos agalladores que estén presentes en el suelo. Por lo tanto, si no se cuenta con la información sobre la población de nematodos agalladores en el suelo, se recomienda incorporar en el suelo, a un lado de la planta, ocho onzas de harina de caparazón de camarón, en intervalos de tiempo de 50 días (Llácer, *et al.,* 2000).

5. MATERIAL Y MÉTODO

5.1 Material Biológico

Los materiales biológicos que se utilizaron fueron muestras de las raíces de plantas de Noni infectadas el agente causal. Las muestras fueron proporcionadas por el laboratorio de Nematología de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV).

5. 1. 1 Extracción del agente causal

Las agallas de las raíces de la planta de noni se colectaron en una siracusa con agua corriente por un período mínimo de cinco horas, con el propósito de que las agallas se hidraten y los nemátodos salgan de su estado de anhidrobiosis. Pasado este período se procedió a disectar las agallas en 30 µl de agua destilada estéril bajo microscopio de disección (American Optical) y se extrajeron los huevecillos, los juveniles, machos y hembras con ayuda de pescadores, pinzas de disección, bisturí y portaobjetos cóncavo.

5. 2 Montaje, observación y medición de los ejemplares

Los huevecillos y las hembras extraídos con ayuda de una micropipeta se colocaron directamente en un portaobjetos con un pedazo de medio de cultivo agua-agar al 2% (Anexo 1) para su observación y medición al microscopio compuesto (Carl Zeiss). Los juveniles, machos y hembras de las raíces de noni se pescaron y se relajaron con calor en un portaobjetos, posteriormente se montaron en agua-agar al 2% y se tomaron sus medidas e imágenes fotográficas. El número del total de individuos medidos fue de 10 (n=10). Los nemátodos sobrantes se transfirieron con una micropipeta a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se realizaron los diferentes tratamientos de extracción de DNA.

5. 3 Identificación morfológica

Se identificaron los nemátodos extraídos de las agallas de las raíces del noni con base a la morfología, se apoyó del uso de claves taxonómicas e información de diversos autores (Eisenback y Hirschmann 1980, Barker *et al*., 1985, Jepson, 1987 y Cid del Prado, 1995). En cada estadío se realizó un seguimiento de las siguientes variables:

Juvenil: Longitud y anchura del cuerpo, índices de Man: (Anexo 2) L, a, c, c', longitud del cuerpo hacia la mitad del primordio genital, longitud de la cola, distancia de la terminación de la cabeza a la base del estilete, longitud del estilete, morfología de la cabeza.

Hembras: Longitud y ancho del cuerpo, longitud del estilete, distancia de los nódulos del estilete al orificio de la glándula esofágico dorsal (DGEO), tipo de modelo perineal, (altura del arco dorsal, presencia o ausencia de incisuras laterales, presencia o ausencia de puntuaciones, tipo de estrías y forma de la vulva).

Machos: Longitud de la cabeza, morfología de la cabeza, morfología del estilete y tamaño, distancia de la cabeza al poro excretor.

Las variables de medición fueron evaluadas en micras (µm), con un micrómetro adaptado al microscopio compuesto (Carl Zeiss) con los objetivos de 10X, 40X y 100X, utilizando los índices de Man (Sosa-Moss, 1997) para ser comparados con las claves taxonómicas de las diferentes especies del género *Meloidogyne.*

5. 4 DETECCIÓN MOLECULAR

5. 4. 1 Extracción de DNA

Los nemátodos, que se encontraron en las agallas de la raíz de noni, se colocaron en tubos de microcentrífuga, y se procedió a macerarlos con un pistilo esteril colocado a un taladro, para la obtención de su DNA a esto se le añadió 1.5 ml de agua destilada estéril libre de DNAsas y se almacenaron en el congelador (General Electric) a -20ºC.

5. 4. 2 Extracción de DNA usando Buffer de Currant (Currant *et al,* .1986)

1.- Se empastilló el DNA de los nemátodos obtenidos (hembras, machos, juveniles y huevecillos) se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos.

2.- Se les agregó Buffer de extracción de Currant (Anexo 2) se macero con un pistilo limpio adaptado a un taladro manual. Al final se le agregó otros 50 µl de Buffer de extracción para completar un total de 100 µl.

3.- Se adicionó 0.05 µl de proteinasa K, dando un vortex ligero para mezclar, después se incubó a 65 ºC por 20 minutos.

4.- Se adicionó un volumen de fenol-cloroformo alcohol-isoamílico (25:24:1) dando un vortex para mezclar con la muestra y posteriormente se centrifugó a 12 000 rpm por 15 minutos.

5.- Se transfirió la fase acuosa a un tubo de centrífuga limpio y se adicionó fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó a 12 000 rpm por 15 minutos.

6.- Se transfirió la fase acuosa y se colocó en otro tubo de microcentrífuga limpio.

7.- Se adicionó 250 µl de alcohol absoluto frío grado biología molecular (-40ºC) para precipitar el DNA y se mezclara suavemente por inversión de 3 a 4 veces.

8.- Se centrifugó por 10 minutos a 12 000 rpm, después el sobrenadante se decantó y se lavó la pastilla con 200 µl de etanol grado biología molecular al 75% a temperatura ambiente.

9.- Se despegó la pastilla con un vortex y se centrifugó a 12, 000 rpm por 5 minutos se decantó y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente.

10.- La pastilla se disolvió en 50 µl de agua destilada estéril libre de DNAsas y RNAsas y se almacenó a -20 ºC en un refrigerador (General Electric).

5. 4. 3 Cuantificación de las variables calidad y cantidad del DNA

Las extracciones de DNA obtenidas por el procedimiento mencionado en el punto 5.4.1. Fueron corridas por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 8% y se evaluó la concentración y calidad del DNA de las muestras en un Espectrofotómetro (Gene Quant Pro.). Se utilizó una cantidad de 10 µl de cada muestra de análisis. El intervalo de mayor pureza del DNA quedó comprendido entre 1.7 a 2 unidades ópticas.

5. 4. 4 Condiciones de detección de PCR

La detección de nemátodos del género *Meloidogyne* se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).

Los indicadores que se utilizó para la detección de especies de *Meloidogyne* fueron primer´s mitocondriales de DNA mitocondrial rico en AT- : C2F3, (5'–GGTCAATGTTCAGAAATTTGTGG-3') y el Primer reversible 1108, (5'–TACCTTTGACCAATCACGCT-3') diseñados por Powers y Harris (1993), que amplificaronn un fragmentos de 0.5 kb para *Meloidogyne chitwoodi*, 0.7 kb para *M. mayaguensis*, 1.1 kb para *M. arenaria* y *M. floridensis*, 1.5 para *M. incognita* y 1.6 para *M. javanica* (Powers y Harris 1993).

Para la corroboración del *Meloidogyne arenaria* por PCR, se descongeló en una charola de unicel con hielos los reactivos y el ADN, enseguida se rotularon los tubos eppendorf con los datos de la muestra y la mezcla de la reacción, se procedió a realizar los cálculos de acuerdo a la concentración y cantidad de los reactivos que componen a la PCR de acuerdo al número de tubos de la reacción que se utilizó.

La mezcla de reacción consistió en solución Buffer de PCR a una concentración de 1X, de $MgCl_2$ una concentración de 2.5 mM, una concentración de dNTP'S de 200 pM, de cada Primer (1108 y el C2F3) una concentración de 20 pM, de Taq Polimerasa a 2.5 U/µL y agua destilada estéril para completar un volumen total de 50 µL.

Todos estos reactivos se adicionaron en un mismo tubo eppendorf de 1.5 µL para después dar un vortex ligero y mezclar bien los reactivos.

Componente de PCR	**1 tubo**
Buffer de PCR 10x	5.0 µl
$MgCl_2$ 2.5 mM	5.0 µl
DNTP's 10 mM	1.0 µl
Primer 1(C_2F_3) 20 pmol	2.5 µl
Primer 2 (1108) 20 pmol	2.5 µl
Polimerasa *Taq* 2.5 U/µl	0.5 µl
DNA 50 ng	2.0 µl
Agua destilada estéril	31.50 µl
Vol. Final	**50.0 µl**

Cuadro 1. Condiciones para la PCR para cada tubo

Después se distribuyó una cantidad de la mezcla en cada tubo eppendorf estéril inicialmente rotulado con los datos de la muestra, como se indica en el cuadro 1, a los cuales se les agregó 2 µl de DNA de la muestra del agente causal a una concentración de 50 ng, un control negativo de agua destilada estéril y un control positivo de DNA de *Meloidogyne* spp. Correspondientes a cada tubo ya rotulado con la mezcla de reacción, estos componentes se mezclaron para realizar la reacción con el DNA, y se procedió a centrifugar por 2 minutos a 6 000 rpm, después todos los tubos se colocaron en el termociclador (Biorad).

5. 4. 5 Las condiciones de termociclaje para amplificar la región ITS1 a partir de DNA de nematodos *Meloidogyne*

El programa de termociclaje consistió en los siguientes pasos: un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C con un tiempo de 30 segundos para ayudar a elevar la temperatura inicial en el equipo, 40 ciclos compuestos por una desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, un anillamiento a una temperatura de 57 °C por un minuto, una extensión final a una temperatura de 72 °C por 2 minutos, en el siguiente paso se repitió la desnaturalización.

El anillamiento y la extensión final por 40 ciclos lo que equivale a una hora con 30 minutos en total y la conservación se hará a 4 °C.

Finalizado el termociclaje el producto de PCR de la muestra que se obtuvo se procedió a correr en un gel de agarosa al 1.4%, después se colocó y observó en un transluminador (Cole Parmer instruments), esta muestra se fotografió como resultado y corroboración del DNA del agente causal.

…..5. 4. 6 Digestión con enzimas de restricción (PCR – RFLP'S)

Los productos amplificados por PCR fueron sometidos a una digestión con enzimas de restricción de Roche® con el propósito de identificar a la especie en la muestras de raíz de Noni.

Se utilizó la enzima de restricción Ssp I (Powers y Harris 1993), para *Meloidogyne* en raíz de Noni, a una temperatura de incubación de 37 °C por tres horas en un termociclador (Biorad).

La reacción de la digestión enzimática fue de Buffer de digestión 1.4 µl, enzima de restricción 10 U/µl, producto amplificado por PCR (DNA): 6 µl y agua destilada estéril 6 µl.

Los productos de PCR a partir de los diferentes procedimientos de extracción de DNA, de huevecillos, de hembras y de juveniles y el producto de la digestión enzimática PCR-RFLP's fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% Por pozo se colocaron 10 µl del producto de PCR con 5 µl de Buffer loading naranja G y se utilizó 3 µl de marcador molecular (promega) de 50 y 100 pb. Se corrió a 100 volts, por 30 minutos.

5. 4. 7 Reacción De Secuenciación De Nucleótidos

Se llevó a cabo una reacción de elongación mediante la DNA polimerasa la cual integra tanto desoxinucleótidos como dideoxinucleótido. La reacción de secuenciación consistió en la determinación de bases de una región especifica de DNA y esta se utilizó para la identificación y corroboración del nematodo *Meloidogyne arenaria* por medio de la amplificación en tiempo real y la visualización del fragmento amplificado gráficamente y la traducción de la secuencia de nucleótidos que fueron transcritos.

La reacción de secuenciación se llevó a cabo en los siguientes pasos:

1.- Amplificación del fragmento muestra

Se preparó mezcla de reacción para la desnaturalización y amplificación mediante marcaje de la cadena de interés, utilizando las siguientes cantidades y concentraciones de reacción:

Reactivo	Sol. Stock	Volumen (Por muestra a analizar)
Big Dye terminator	2.5	- 4µL
Buffer BDT	5X	- 2 µL
Primer C2F3	1 pmol/µL	- 3.2 µL
Primer 1108	1 pmol/µL	- 3.2 µL
DNA	3 a 10 ng	1 µL
Agua		- 20 µL

Cuadro 2 Reactivos para la desnaturalización y amplificación

Los tubos con la mezcla de reacción fueron sometidos a una amplificación en un termociclador Biorad iCycler. El programa de termociclaje consistió de un ciclo de desnaturalización inicial de 94ºC con un tiempo de 1 minuto para ayudar a elevar la temperatura inicial en el equipo, 30 ciclos compuestos por una desnaturalización a 95°C por 15 segundos, un anillamiento a una temperatura de 50°C por 5 segundos, una extensión final a una temperatura de 60°C por 4 minutos y se conservó a 4°C hasta que se purificaron.

2.- Purificación de la reacción de secuenciación

En este paso se procedió a eliminar los nucleótidos para evitar la interferencia en el análisis del secuenciador, la cual se realizó mediante columnas centri-sep

Se hidrató una columna para cada muestra con 800 ml de agua por 2 horas antes de utilizarlos.

A cada tubo se le retiro la tapa inferior y se coloco en tubos colectores. Si el flujo no comienza de inmediato, se puede aplicar una presión a la columna. Se desechó el agua recolectada en el tubo.

Se centrifugó la columna en una microcentrífuga a 2800 rpm por dos minutos.

En los tubos que contenían la reacción de secuenciación se les agregó 10 ml de agua desionizada

Se retiro la columna el tubo lavado, y se colocó dentro de un microtubo de 1.5 ml el cual se rotuló

Con una micropipeta se tomó toda la muestra que contiene la reacción de secuenciación y se depositó en el centro de la columna

Se centrifugó la columna en el microtubo de 1.5 ml por tres minutos a 2800 rpm

Se desechó la columna. La muestra se quedó en el microtubo de 1.5 ml

Se dejó secar la muestra en un concentrador (speed-vac) hasta que se secó.

El producto de PCR amplificado se resuspendió con 15 µL de Hi-Di formamida la cual, impidió la formación de los enlaces por puente de hidrogeno en el DNA y por lo tanto se obtuvo el reordenamiento de las hebras.

3.-Configuración del Software

Se configuró el software de Colección de datos de acuerdo al número de bases esperadas (1.1 kb) y (863 pb) como se muestra en los cuadros 1 y 2. El tipo de kit utilizado fue el de BigDye terminator.

Los cuales se corrieron los productos de PCR secuenciados con el kit BigDye Terminator obteniéndose

Cuadro 3. Reactivos Para La Preparación De Las Cadenas De Ida

Reactivo	Cantidad
Big Dye®	8 µL
Primer M13- 21	4 µL
Primer C2F4	1-2 µL
pGEM control DNA	1-2 µL
Agua desionizada	6-7 µL

Cuadro 4. Reactivos Para La Preparación De Las Cadenas De Regreso.

Reactivo	Cantidad
Big Dye®	8 µL
Primer M13- 21	4 µL
Primer 1108	1-2 µL
pGEM control DNA	1-2 µL
Agua desionizada	6-7 µL

Material de inicio

Extracción del DNA con Prepman /prepfiler

PCR con primers específicos (1 reacción/muestra)

Purificación del producto de PCR + Gel

Reacción secuencia con BigDye terminator kit

(2 reacciones/muestra: forward reverse)

Purificación del producto de secuencia

Electroforesis capilar en el Genetic Analyzer

Análisis de datos en seuencing/seqscape software

5. 4. 8 Condiciones Para La Secuenciación de nucleótidos

Los productos de PCR se purificaron con el reactivo de Wizard® SV (Promega Corporation, USA). Los fragmentos se secuenciaron en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, en un secuenciador automático de DNA (Genetic Analyzer 3100, Applied Biosystem Corp). Las secuencias obtenidas se alinearon con las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank, utilizando el método BLAST (NCBI, 2007. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

La especie del género en estudio, se determinó mediante el porcentaje de homología con las especies comparadas y el número de scores obtenidos en el análisis del GenBank. El porcentaje de homología más alto será el utilizado como referencia para determinar la especie en estudio.

5.4.9. Electroforesis de los productos de PCR.

Los productos de PCR se analizaron por medio de una electroforesis; en gel al 2% de agarosa con TBE. La agarosa se mezcló con el TBE 1x en un vaso de precipitado de 100 ml, y se calentó durante 5min y se agregó 0.5 µl de bromuro de etidio, para la visualización de los productos. Una vez polimerizado el gel, se coloco en el primer pozo el control de pares de bases (marcador de peso), para identificar el producto de 1100 pb, posteriormente se colocaron 2.5 µl de cada una de las diferentes muestras de la extracción de DNA y los (productos de PCR) en los pozos del gel. Se corrió el gel en una cámara de electroforesis (Biorad), cubierto de TBE al 0.5 % de 80 – 90 volts, durante una hora aproximadamente. Finalmente, se coloco el gel en un transiluminador (Applied Biosystem Corp), que con ayuda de la luz ultravioleta de pudieron observar los productos y así lograr localizar las diferentes bandas para su propio análisis.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6. 1. 1 Síntomas en la raíz de noni infectada por el agente causal

La muestra de noni (Fig. 2) mostró malformación en sus raíces y tallos, los cuales son síntomas de nemátodos agalladores, ya que concuerda con la literatura citada por las características de los síntomas descritos por Eisenback *et al.* (1983). En la raíz se encontraron algunas hembras en forma globosas de color blanco con forma de perlas (Fig.2) los cuales son similares a los nemátodos del género *Meloidogyne* de acuerdo con Bird (1967). Durante el segundo estadio juvenil (J2) los nemátodos de este género se hospedan estableciéndose principalmente en la raíz, ya que este es su sitio de alimento donde inducen cerca de 6 parénquimas vasculares de la planta y estas células se replican en su núcleo sin que haya división celular y cada una comienza a agigantarse. Las agallas que se observaron en las raíces presentaron una coloración café pardo en el tallo y raíz del noni como se observa en la (Fig.2).

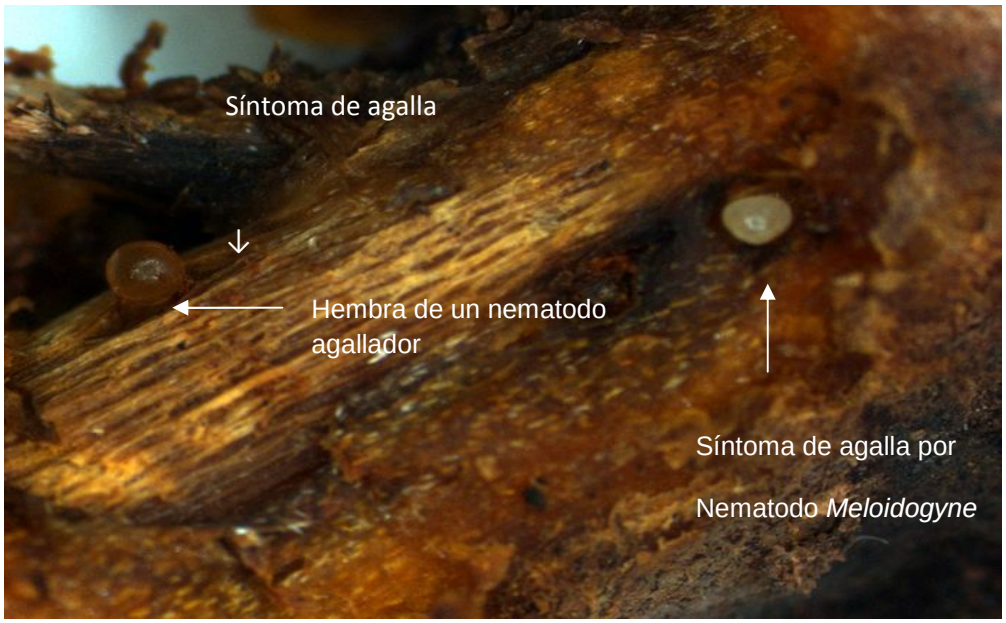


Figura 2. Raíces de noni con síntomas de malformaciones causados por nemátodos agalladores

6. 1. 2 identificación morfológica del agente causal

A partir de las características morfológicas y morfométricos obtenidas de 20 hembras y 20 juveniles en el segundo estadio (cuadro 5) se llegó a determinar de acuerdo a los parámetros más importantes obtenidos en el (cuadro 5) que pertenece al género *Meloidogyne* los cuales son el tipo de estilete típico, robusto en forma de cono, longitud del estilete y la distancia del DGO (Orificio de la Glándula Esofágica dorsal) se presume que el agente causal es *Meloidogyne arenaria* lo cual concuerda con los autores Cid del Prado (1995), Eisenback y Hirschmann (1983), y Sosa-Moss (1997)

Características	Juvenil 2do estadío	Hembra
Longitud del cuerpo	48.0 µm	62.2 µm
Ancho del cuerpo	14.7 µm	48.4 µm
Long. Del poro excretor a la cabeza	No presenta	20.0 µm
Longitud de la cola	54 µm	No presenta
Distancia del estilete al DGO	2.1 µm	3.50 µm
Longitud del estilete	12.5 µm	18.00 µm
Distancia del DGEO	4.5 µm	4 µm
Altura del arco dorsal	7.3 µm	13.3 µm
Longitud de la Vulva		23 µm
Tipo de estrías	No presentan	Lisas a onduladas
Distancia del ano a la vulva		14 µm
Morfología del estilete	Estilete en forma de cono	Estilete típico, robusto en forma de cono

Cuadro 5. Medidas promedio mínimas y máximas de hembras y juveniles de *M. arenaria*

Se realizó el corte en la región anterior de una hembra del género *Meloidogyne* que fue extraída de la raíz del noni para verificar que pertenezca a la especie *arenaria* (Fig. 4), la cual presentó la región cefálica bien separada de los anillos del cuerpo; capsula cefálica no tan ancha como su disco labial y la región cefálica (1), el estilete típico y corto (3); nódulos basales del estilete (4), redondeados, bien separados de la columna, la distancia de la base de los nódulos a la DGO larga de 4-6 µm.

Estas características son las principales que nos indicaron que corresponden a *Meloidogyne arenaria* descritas por Cid del Prado (1995)

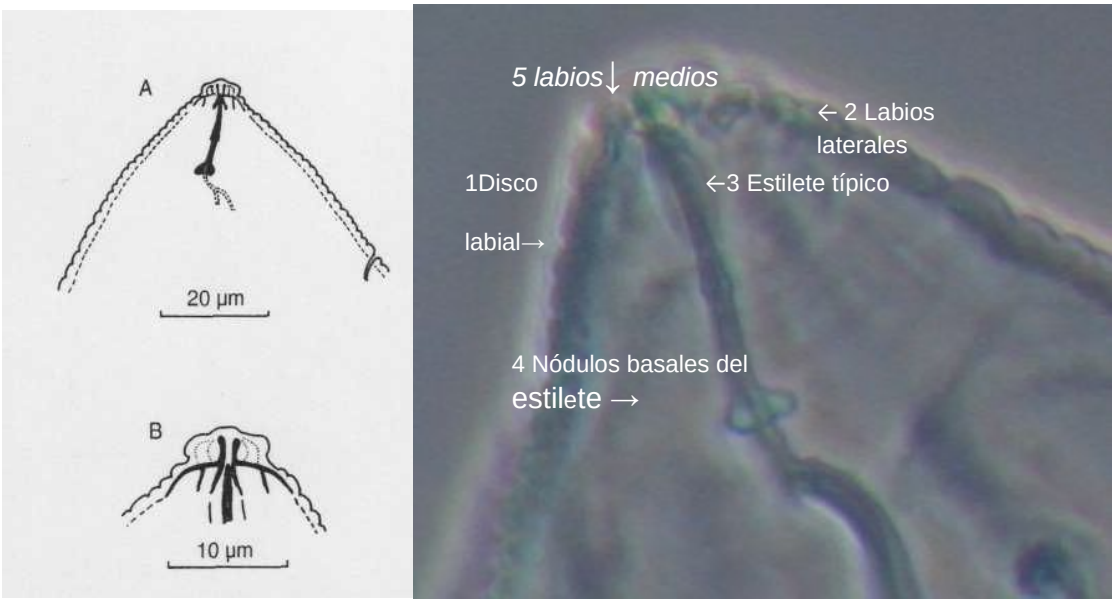


Figura 3. Corte de la región anterior de una hembra de *Meloidogyne arenaria* a 100X comparándolo con el modelo tomado de Llácer (2000) lado izquierdo.

La morfología de la cabeza el de una hembra *Meloidogyne arenaria* presenta los siguientes caracteres 1) disco labial y los labios medios (5) de *M. arenaria* tienen forma de "mancuerna" como en *M. javanica* o *M. incognit*a los 2) labios laterales son grandes y están separados de los labios medios y de la región cefálica; está generalmente presente un anillo incompleto, de acuerdo a las características descritas por (Eisenback y Hirschmann 1980). Se observa en la (Fig. 3) el resultado de los nódulos basales (4) del estilete proyectado hacia la parte anterior, son muy grandes y emergen gradualmente de la columna. El estilete que presentó la hembra de *M. arenaria* fue como resultado un estilete típico (3), característicos de la especie que concuerdo a lo descrito por (Eisenback *et al.*, 1983).

Se observó en los nemátodos extraídos del noni el estilete robusto, el cono y la columna son gruesos coincidieron las características descritas en la (fig. 4.1letra A) para la especie *M. arenaria*. La columna incrementa su anchura hacia la base y emerge gradualmente de los cuatro nódulos basales del estilete; estos son anchos y redondeados en su parte posterior, esto concuerda con los de la (fig. 4.1letraB) descritos por Eisenback y Hirschmann (1980).

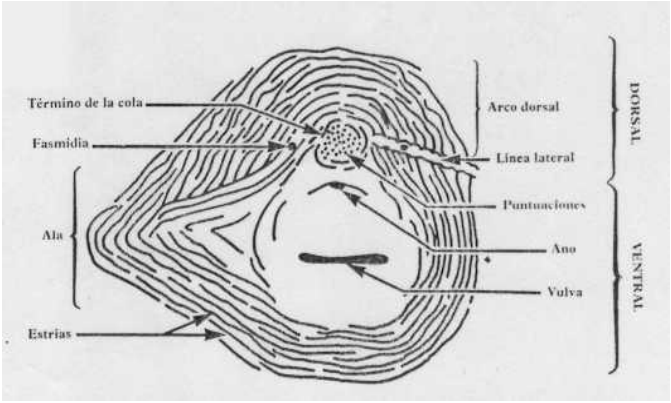
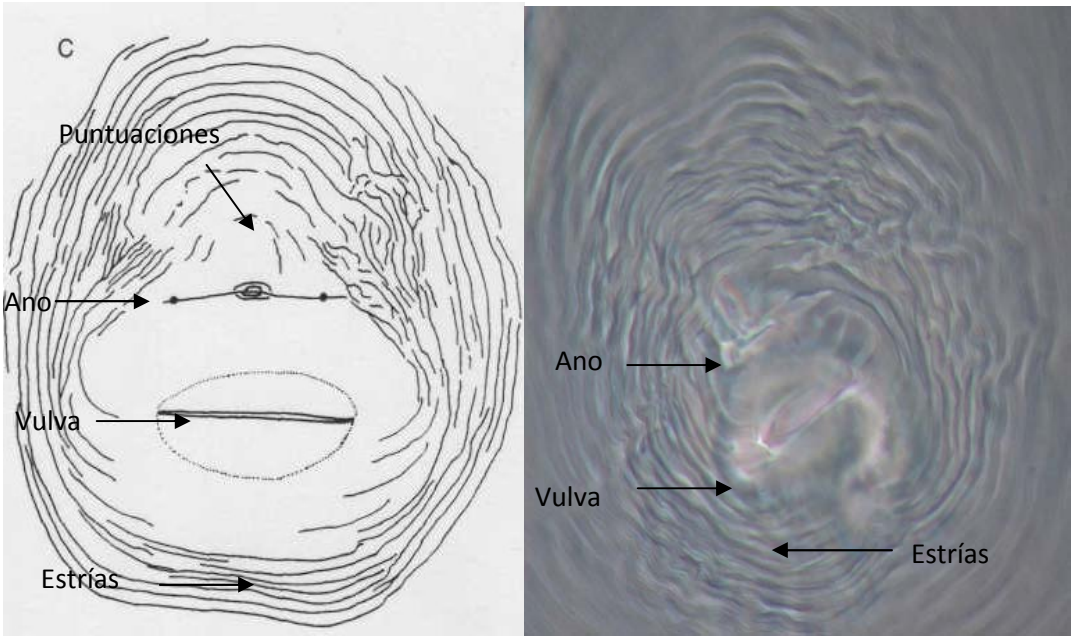


Figura 4. Modelo perineal de hembra del género Meloidogyne tomado de Eisenback (1983).

Para la corroboración de la hembra con caracteres al género *Meloidogyne* y que pertenezca a la especie *arenaria*, se tomó las características principales del modelo perineal correspondiente a este género como lo indica en la (Fig.4) la cual nos permitirá asegurar si es *arenaria*.

El resultado del corte en la región perineal de la hembra adulta, la cual tiene forma de pera, al igual que en la (5 fig. letra C) la cual nos sirvió para observar y determinar las características principales en *M. arenaria* obteniéndose que las estrías en las líneas laterales se forman las hombreras, característica de *arenaria*, las estrías que presento son lisas a onduladas dirigiéndose a la vulva con una distancia al ano de 14µm medida que corresponde *arenaria* las cuales otras especies como *M. javanica* es de 10µm *y M. hapla* una distancia de 9µm.



. **Figura 5.** Región perineal de una hembra de *Meloidogyne arenaria* lado derecho a 100X comparándolo con el modelo tomado de Llácer (2000) lado izquierdo.

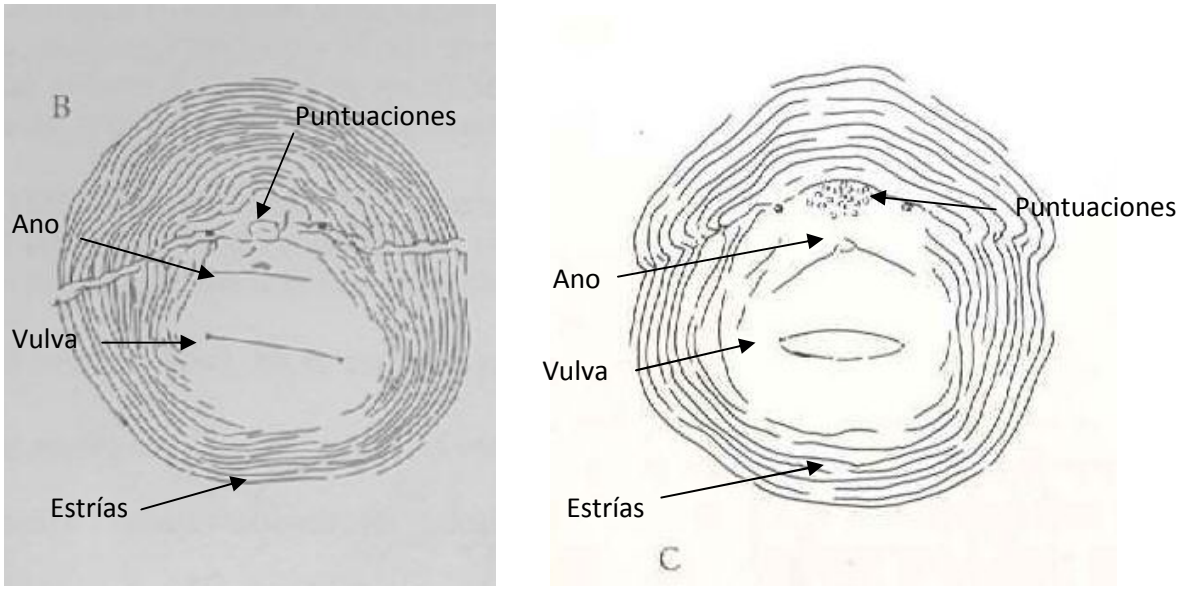


Figura 6 Región perineal de una hembra de *Meloidogyne javanica* (B), Región perineal de una hembra de *Meloidogyne hapla* (C) tomado de Llácer (2000) para la comparación con *Meloidogyne arenaria.*

De acuerdo a la comparación de los caracteres de especies *Meloidogyne javanica* (C Fig. 6) tienen una distancia de la vulva al ano de 10µl y sus estrías están más pronunciadas hacia la vulva lo cual en *M. arenaria* sus estrías están más distantes hacia la vulva como se observa en la (CFig.5), esta característica confirmo que es *arenaria,* en *M. hapla* (C Fig.6) se distingue de arenaria por el ano que se encuentra pronunciado hacia las puntuaciones como se observa en la (C Fig.6) ya que en *M. arenaria* no presenta puntuaciones aunque el ano está más cerca a ellos como se observa en la (C Fig.5).

DETECCIÓN MOLECULAR

6.1. 4 Detección y corroboración Molecular del agente causal

Con las hembras y sus huevecillos se extrajo la cantidad de DNA suficiente (Fig.7) para identificarlo por medio de marcadores específicos y detectar los fragmentos de DNA específico. Con esta técnica se corroboró que el agente causal de la enfermedad del noni es el nematodo *Meloidogyne arenaria* como se determinó por su morfología. Por lo que el peso molecular esperado de acuerdo a lo reportado por Block *et al.,* (2002) y Brito *et al*. (2004) es de 1.1 Kb (Fig.7) lo que equivale a 1100 pb que es el tamaño de DNA de la banda que pertenece a *Meloidogyne arenaria*.

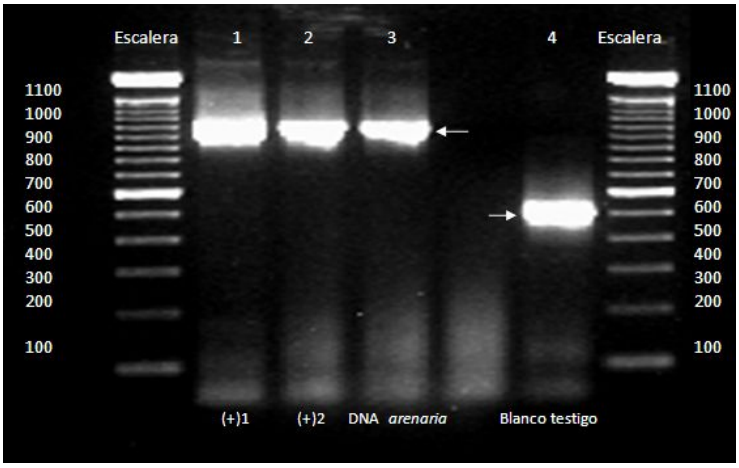


Figura 7. Extracción del DNA de *Meloidogyne* spp. Utilizando la metodología de Currant *et al*, (1986).

La técnica de PCR de alta fidelidad se utilizó para duplicar varias veces el ADN del posible *M. arenaria* y obtener copias múltiples de un fragmento de las hembras y huevecillos extraídos, de la raíz del noni de esta manera se obtuvo la cantidad de DNA de tres muestras idénticas por lo que pertenece a *M. arenaria* como se observa en la (Fig.7) por la obtención de 1100 pb.

El resultado donde fue posible distinguir, a *M. arenaria* de *M. javanica y M. incognita* se debió al tamaño de la banda según Dong *et al.* (2001) que es por los patrones que se generaron usando la enzima de restricción *Ssp 1.*

6. 1. 4 Revelado de la digestión con enzimas de restricción (PCR – RFLP'S)

Con el DNA de *M. arenaria* de noni (carril 1 Fig.8 con un peso de1.1 pb) *M. javanica* extraídos de tomate (carril 2 con un peso de 1.6 pb Fig.8) y *M. incognita* en papa (carril 3 peso de .8 pb Fig. 8), los cuales se usaron como testigos positivos ya que sus fragmentos de acuerdo al peso obtenido nos indicó a la especie que pertenece acuerdo con (Cenis *et al.,* 1993) este procedimiento nos confirmó que el DNA pertenece al nematodo descrito y se corroboró que efectivamente el DNA es de *Meloidogyne arenaria* como lo indica la (Fig.8).

Así de esta manera se corroboró el resultado obtenido anteriormente en la extracción que fue muy preciso y confiable por lo que se procedió a realizar la siguiente técnica de obtener la secuenciación de *Meloidogyne arenaria* que corresponde a la (Fig. 8)

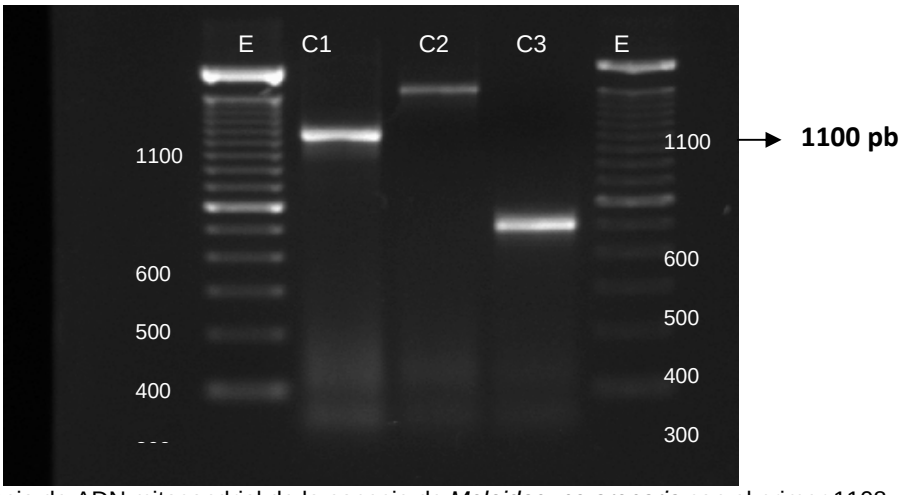


Figura 8. Secuencia de ADN mitocondrial de la especie de *Meloidogyne arenaria* con el primer 1108 en donde el carril 1 *M. arenaria* , *M. javanica* carril 2 y *M. chitwoodi* carril 3 de acuerdo a lo descrito por (Jeyaprakash y Tigano 2006)

De acuerdo con los tamaños reportados de la amplificación mitocondrial usando los primers C2F3 y 1108 para PCR de alta fidelidad obtenidos por Blok *et al*. (2002) concuerdo nuestros resultados de *Meloidogyne arenaria* carril (1) con una obtención de 1.1 pb que es el tamaño de la banda que nos indica en la escalera. En la (Fig.8) es el resultado que indicó que la digestión con enzimas de restricción (PCR- RFLP'S) con el propósito de confirmar que *Meloidogyne arenaria* es el agente causal de la enfermedad en plantas de noni se volvió a utilizar como controles positivos a *Meloidogyne arenaria* (Fig.7 carril 1), *Meloidogyne a javanica* (Fig.8 carril 2) y *Meloidogyne chitwoodi* (Fig.7 carril 3).

De igual forma se utilizó la enzima de restricción *DRA*1 y se corroboró la identidad de la especie de *Meloidogyne arenaria* Se obtuvieron fragmentos de 290, 130 y 100 pb aproximadamente en el control positivo de *Meloidogyne chitwoodi*, mientras que para las muestras de *Meloidogyne arenaria*, solo se obtuvo un fragmento de 750 pb aproximadamente.

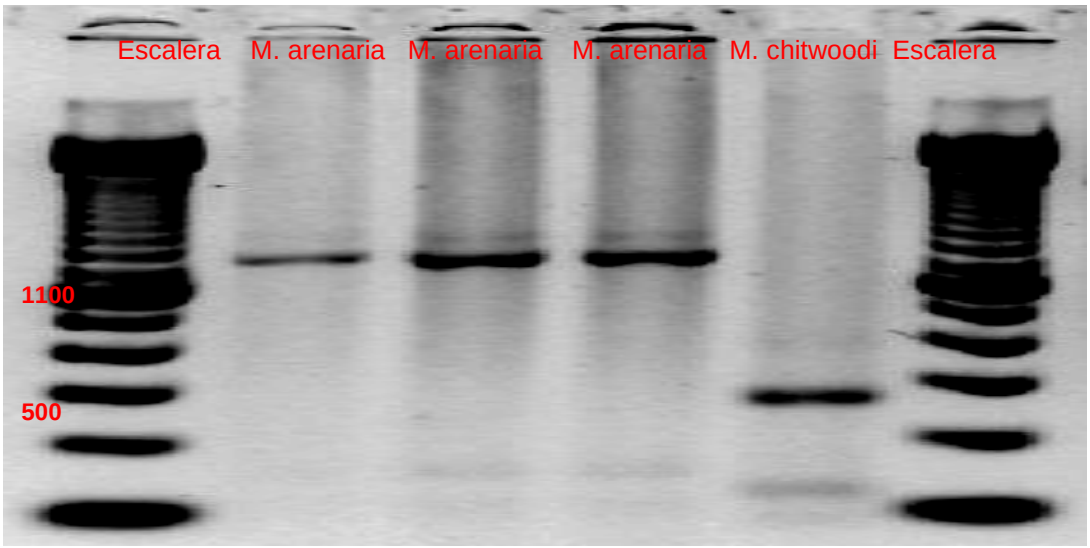


Figura 9. Secuencia de DNA mitocondrial de la especie de *Meloidogyne arenaria* con el primer C2F3 (Jeyaprakash *et al,.* 2006).

En la (Fig. 9) se observa el resultado obtenido de la secuenciación de DNA de la especie *Meloidogyne arenaria* con el primer C_2F_3 para obtener sus fragmentos de DNA ya purificados. De esta manera se demostró que sus pares de bases están purificados y listos para ser secuenciados.

6. 1. 5 Resultado de la Secuenciación de Nucleótidos

Con los productos de PCR obtenidos se procedió a realizar la secuenciación obteniéndose una cantidad de **815** pb con el Primer C2F3 ida resultado en el (cuadro 2) y el otro Primer 1108 reversible obteniéndose **863** pb resultado en el (cuadro 3) con estos resultados se procedió a consultarlos en un Gen Bank en la pág. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

Con lo cual mediante un blasteo se corroboró la homología que tiene a *Meloidogyne arenaria* y otras especies de *Meloidogyne* en el cual se obtuvo un 98% de compactibilidad de similitud con la especie *Meloidogyne arenaria* de acuerdo a la cantidad de pares de bases y el 93% con *Meloidogyne incognita* en cantidad de pares de bases por lo que de acuerdo al resultado de similitud

se determinó que el nematodo que ocasiono los síntomas ya mencionados se trató de *Meloidogyne arenaria*.

REGION C_2 F_3 En SENTIDO

CATTGTCAGG TAAATTTATT	GATGGTTGGG AACTAATTGA	CCCATGGGAG TTATTTTATT	TCGTGATTAC TTTGTTGAAG	TTTATTTGAT CAAGAGAAAA	TTTTTTAAGT TATTAGTTGT
TTAAATTTTT GATTAACAAT	TTTATTAGTT TATATTATTT	TTAAAAATAA ATTATTATAA	TAAAAAATGT GTTTTTTGAA	TTTTAAGTGA TATTATTTTG	TTAGGGATTA ATTTTTTGTT
GTTTAGTTAA TTGGAAAAAA	TTTTATTTAA AAATTTTTTT	AACAAAAAAT TTAATTTTTT	TAAAAATTGG TTACAAAAAA	AATATTCTAA AAATAAGCTA	ATTTTAATTA AAAAAATAAT
TTAGCCAAAA AAGCATACTA	AATTTTTTAA AAAAGATAAA	TTGCAATAAA AAATTTTGTTC	AATTCCCTTG TTTAAAGAAC	AAATTAATAG TTAACTCTCA	CTTTTTTTTT TAACAAAAA
AACAAAATCC ACCAAAATAT	TCTCCCTCAT TTTTTTTTTT	AATTTTTCCC TTCCCCCTAG	CAAAAAAAAT GGCCCCCTTT	TAAAAAAAAA TTATCCCCGC	ATTCCCTAAA TCTTTAAAGA
AGATTAACCC AATATTTTCC	ACCCACTGAA CTTTTTTGG	AAATCACCCT TTAATTCCCC	TTCTCTCTCT TTCAAAAATT	TTTTTTTTCC AAATTCCACA	CCCCTTGGAA AATTAAAAAT
TTTTTCCCCC AATGGGTATT	AAAGAGATTT ATTTTATTAT	AACCCCAAAC TAAAATATTT	ACAAATTTTT TTTTT 35	CAACATTTTA	AAAAAAAAAA

Cuadro 6. Resultado de la secuenciación de DNA AT-RICH del Meloidogyne arenaria usando primers C_2F_3 inicial y 1108 reversible.

REGION 1108 ANTISENTIDO

GATTTGGCGT TGGAAAAGGC	CTTTGCTGGC ATTTGTTATT	GTTGGCCTGC AAATTTATTT	GCCTTGGTCG AATAGAAAAT	GGCCTCCGGG TTTATATTTA
ATTATTAAAT AAATAAAAAA	TTAAATAAAT AATAAAAATT	AATTATAATT ATAAAAAATA	AAATTATTTT TTTTTAATAT	TTTTTTAAAA AAATAAATTA
ATTTAATTTA TAAAACTAAA	TAACAAAATT AATTAAAAAT	TTTTTTATTT GGAAATATTA	TCATATTTGT TAAATTTTAA	AATTTTTATT TTATGGGAAA
AAACAATTGG AATTTGGCCA	TTTTTAATTT AAAACTTTTT	TTTCAACAAT TAATCACAAT	AAAAAATAAT AAAAAATTCA	CTAAAAAAAT ATGGAAATTA
ATGGCTTTAT GGAACTTAAA	TTTTAATAAT CTCTAAATAA	ACTAAAAAGA CAAAAAATCA	TAAAAAATTT AAATCTTCTC	GGTTCTATAA CCTAATAATT
TTTCGTATAA ATATTTTAAT	AAATAAATTA AATTAACACA	AATAAAAAAT ATAAAGAACC	TTCACTAAAA CATTATTAAA	AACCAAAATA CCCCGATCTA
ATAAAGAATG ATGATATTAA	ATTAACACAA TAATAAAAAA	CCAATTGAAA AAAAATCTAA	ATATCCTAAT TCAATTCCTC	AATAAATAAA TCTAATTTTA
ATTCCCCCAA TTAAAATTAA	ATTAGAAAAA ATACCAAATT	ATTTTAACAA AAATATTTAA	TTTTTTTGGT TCCAAAAAAG	TAAGTTCCAA AATTAACACA
AAATCAATAA TCGCTAATCA	TTTCCAAAAC CTT 13	CTTAAATATA	AATAATATAT	TGTTATCTAA

Cuadro 7. Resultado de la secuenciación de DNA AT-RICH del Meloidogyne arenaria usando primers C_2F_3 inicial y 1108 reversible.

De acuerdo a los resultados que se obtuvieron de la secuenciación citados en los (cuadros 2 y 3) son la cantidad de los pares de bases de un gen del nematodo especie *Meloidogyne arenaria* estos pueden utilizarse para una corroboración en futuros estudios.

Finalmente el PCR de alta Fidelidad nos confirmó la identidad del agente causal y al amplificar las secuencias para este nematodo se utilizó los primers C_2F_3 y el 1108, los cuales son específicos para corroborar que pertenece a *M. arenaria* de lo contrario no se obtendría en el gel de agarosa el DNA visualizado con el bromuro de etidio y visto en el transiluminador. Como si se acopló de manera específica en la dirección 5`-3` y 3´-5´ a su respectiva hebra de DNA de *M. arenaria* nos indicó que si pertenece a la especie que se describió en la parte morfológica.

7. CONCLUSIONES

El Agente causal del agallamiento en las raíces de noni que provoca la hinchazón radical, necrosis, decoloración y crecimiento irregular en el tamaño de la raíz, amarillamiento, marchitez, clorosis foliar y muerte de las plantas de noni en la región de Villa Ávila Camacho del estado de Puebla es el nematodo *Meloidogyne arenaria* por lo que se confirmó la hipótesis planteada en el trabajo

La identificación morfológica del nematodo agallador encontrado en el noni pertenece a la especie *Meloidogyne arenaria* de acuerdo con los cortes perineales obtenidos de Longitud del cuerpo 48.0 µm, Ancho del cuerpo14.7 µm, Longitud del estilete 12.5 µm, Distancia del DGEO 4.5 µm, Morfología del estilete en forma de cono y en hembras se obtuvieron las medidas de Longitud del cuerpo 62.2 µm, Ancho del cuerpo 48.4 µm, Long. Del poro excretor a la cabeza 20.0 µm, Distancia del estilete al DGO 3.50 µm, Longitud del estilete 18.00 µm, Longitud de la Vulva 23 µm, Tipo de estrías Lisas a onduladas, Distancia del ano a la vulva 14 µm y Morfología del estilete típico, robusto en Forma de cono. Estos caracteres morfológicos de esta especie coincidieron con las características mencionadas en el método y descritas por los autores Eisenback 1980 y Sasser 1966.

Se logro corroborar con el método de extracción de DNA por Curran et al., 1986 para la obtención de una buena cantidad del DNA obtenida de las hembras y huevecillos para su identificación y corroboración de *Meloidogyne arenaria* por medio de PCR.

Se cumplió el objetivo mediante el uso de la PCR de alta fidelidad lo que nos permitió corroborar la presencia de *Meloidogyne arenaria* debido al fragmento amplificado de 1100 pb aproximadamente, con los primer´s C2F3 y 1108.

Se cumplió el objetivo de determinar por la secuenciación de nucleótidos y confirmar la identidad por medio de un blasteo en el gen bank de NCBI que la identidad del nematodo correspondió a *Meloidogyne arenaria*.

SUGERENCIAS

Como consecuencia de los resultados obtenidos, en el presente trabajo, se puede confirmar que la aplicación del método de extracción ADN utilizado permite la obtención, de forma rápida y confiable, a partir de todos los materiales de extracción analizados, el suficiente material genético del *Meloidogyne arenaria* estudiado, para su utilización posterior en técnicas moleculares de identificación y corroboración

Es importante mencionar que el uso y aplicación de las técnicas en la biología molecular, son importantes para la realización de estudios posteriores y el incremento de amplias colecciones en banco de genes.

LITERATURA CITADA

Abbott, I., Shimazu C., (1985). The Geographic origin of the plants most Commonly used for medicine by Hawaiians. Journal of Ethnopharmacology 14: 213-222.

Barker R. K., Carter C. C. y Sasser, J. N. V. II. (1985). An advanced treatise on *Meloidogyne*. A cooperative publication of the department of plant pathology and the United States agency for International Development pag 32-43

Bird, A. F. (1967). Changes associated with parasitism in nematodes I. Morphology and Physiology of preparasitic and parasitic larvae of *Meloidogyne javanica*. The journal of Parasitology 53: 142- 146.

Block, V. C., Wishart J., Fargette M., Berthier K. and Phillips. (2002). Mithochondrial DNA differences distinguishing *Meloidogyne mayaguensis* from the major species of tropical root-knot nematodes. *Nematology* 4:773-781

Brito J., Powers, T.O., Mullin P. J., Inserra R. N and Dickson D.W. (2004). Morphological and Molecular characterization of *Meloidogyne mayaguensis* isolates from Florida. Journal of Nematology 36:232-240

Caetano-Anolles, Bassam G. B. J. and Gresshoff P. M. (1991). DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Bio/Technology 9:553-557

Canto-Saenz, M. (1985). The nature of resistance to Meloidogyne incognita (Kofoid and White, 1919) Chitwood, 1949. In J. N. Sasser, C.C. Carter (Edts) An advanced treatise on Meloidogyne. Vol. I Biology and Control. Edt. North Carolina State Graphics, Raleigth, North Carolina U.S.A.

Cenis J. L. (1993). Identification of four major Meloidogyne spp by random amplified polymorphic DNA (Rapd-PCR) The American Phytopathological Society Vol. 83: 76-78

Cid del Prado, V. I. (1995). Apuntes de práctica del curso de nematología. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Méx. Pag. 80-96.

Cid del Prado-Vera I., Tovar A., y Hernández J. A. (1997). Distribución de especies y razas de *Meloidogyne* en México. Revista Mexicana de Fitopatología 19:32-39.

Curran, J.; McClure, M. A. and Webster, J. M. (1986). Genotypic differentiation of *Meloidogyne* populations by detection of Restrition Fragment Length Difference in total DNA. *Journal of Nematology* vol18 pag. 83-86.

Dickson, D. W., Huisingh D. and Sasser J. N. (1971). Dehidrogenases, acid and alkaline phosphatises, and esterases for chemotaxonomy of selected *Meloidogyne, Ditylenchus, Heterodera* and *Aphelenchus* spp. Journal of Nematology 3:1-16

Dittmar, A. (1993). *Morinda citrifolia* L.: Use in indegenous Samoan Medicine. Journal of Herbs and Medicinal Plants Vol. (3).

Dixon, A. y McMillen, H. (1999). Ferment This Transformation of Noni A Traditional Polynesian Medicine. Economic Botany. pag. 72: 87-98

Dong K. Dean A. R. Fortnum B. A. and Lewis S. A. (2001). Development of PCR primers to identify species of root-knot nematodes: Meloidogyne arenaria, M. hapla, M. incognita and M. javanica. *Nematropica* 31: 273-282.

Eisenback, J. D. y Hirschmann, H. (1980). Morphological comparison of Meloidogyne males by scanning electron microscopy. Journal of Nematology 12: 23-32

Eisenback, J. D., H. Hirschmann, J. N. Sasser, y A. C. T Triantaphyllou. (1983). Guía para la identificación de las cuatro especies más comunes del Nemátodo Agallador (*Meloidogyne* especies) con una clave pictórica. Traducida al español por C. Sosa-Moss. IMP. Raleingh North Carolina U. S. A. pag. 15-40

Elkins, R. M. H. (1997). Noni (*Morinda citrifolia*) La Hierba Preciada Del Pacífico Del Sur. Woodland Publishing. Healths, series 31. pp. 56-65.

Hidalgo, G. (2005). Al Ataque de los nemátodos De Las Agallas. Jornada científica, INIFAT, La Habana Cuba. pag. 40-65.

Hussey, R. S. Sasser J. N. (1972). Disc-electrophoretic studies of soluble proteins and enzymes of Meloidogyne incognita and M. arenaria. Journal of Nematology 4:183-189.

Jepson, S. B. (1987). Identification of root nematodes (*Meloidogyne* spp*)* Wallinaford, U. K. Commonwealth agricultural bureau international. 255 pag.

Jeyaprakash, A. Tigano M. S. (2006) Differentation of *Meloidogyne floridensi* from *M. arenaria* using High- Fidelity PCR amplified Mithochondrial AT rich sequences. *Journal of Nematropica* Vol. (36) No. (1) 2006 pag. 12-2.6

Johansson, J. T. (1994). The genus *Morinda* (Morindae, Rubiodeae, Rubiaceae) in New Caledonia: Taxonomy and Phylogeny. Opera Botanica 122: 2-57.

Luc M. (1990). The family Heteroderidae root-knot nematodes. Revue de Nematologie 11:159-176.

Llacer G., López M. M. y Trapero A. (2000). Patologia vegetal tomo II Edit. Phytoma sociedad española de fitopatología Gpo. Mundi prensa

Moreno L. I. (2005). Vigilancia Fitosanitaria División Protección Agrícola. Servicio Agrícola y Ganadero de Chile. Informativo Fitosanitario Nº 01- 2005 pag. 43-58.

Powers O. T. and S. T. Harris (1993). A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* Species. *Journal of Nematology* 25: 1-6.

Ramírez, A. J., Cid Del Prado, A. I. D. Téliz O. y E. Zavaleta, M. (1991). Respuesta de portainjertos de vid a *M. javanica*. Tesis de Maestría en Ciencias del Colegio de Postgraduados. Montecillos México 67 pag.

Sasser, J. N. (1966). Behavior of Meloidogyne spp from various geographical locations on ten host differencials. Nematologica 12: 97- 108.

SAGARPA. (2007). Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Anuario estadístico de cultivos Perennes de los Estados Unidos Mexicanos pag. 450-458.

Sánchez, P. (2001). Plantas Medicinales Del Trópico Húmedo. UNED 2da ed. San José Costa Rica. Pag. 80- 96.

Sosa-Moss, C. (1997). Clave para los Géneros y Especies de Heteroderidos (*Nematoda*) que se enquistan. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura-Colegio de Postgraduados. ACT/México. pag. 11-35.

Sosa-Moss, C., Brathwaite D. Ch. Perdomo R. F., y Salazar C. J. J. (1997). Técnicas para el Diagnostico de las Enfermedades de las Plantas. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura Agencia de Cooperación Técnica IICA/México. pag 20-32, 44-54.

Taylor C .E. y Passer J. N. (1993). Biología, Identificación y control de los Nemátodos del Nódulo de la raíz (especies de *Meloidogyne)*. Proyecto internacional de Carolina del Norte, Estados Unidos de América. pag 22-30, 34-47

Trudgill, D. L. and Blok V. C. (2001). Apomictic,polyphagous root-knot nematodes: exceptionallysuccessful and damaging biotrophic rootpathogens. Annual Review of Phytopathology Vol. 39:53-77.

Wang M.Y. y Su C. Cancer preventive effect *Morinda citrifolia* (Noni). The proceedings of the strang International Cancer prevention conference. 2000/11/10 New York.

Wang M. y West B. J. (2002). *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. Acta Pharmacological sinica 2002 Dec. 23 (12): 1127- 1141.

Wang M. y., West B. J. (1997). *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in noni research. Acta Pharmacological sinica 2000 Sep. 23 (09): 117- 124.

Welsh J. and Mclelland M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18:7213-7218.

Williams J. G. Kubelik A. R. Livak K.J. Rafalsky J.A. and Tingey S.V. (1990). DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ consultada en abril 21 del 2009

http://www.siap.gob.mx consultada en mayo 9 del 2009

(Anexo1) PREPARACIÓN DEL AGUA-AGAR AL 2%

Agar---------- 2.0 g

Agua destilada---------- 100 ml

Modo de preparación:

Medir la cantidad de agua requerida y pesar la cantidad de agar, adicionar el agua a un matraz Erlenmeyer, pesar la cantidad de agar a usar agregarlo al agua y esterilizar el medio.

Una vez esterilizado dejar enfriar el medio hasta que su temperatura sea soportable en el dorso de la mano y vaciar en cajas petri, se debe de vaciar una pequeña cantidad la cual cubra la base de la caja petri.

(Anexo 2) ÍNDICES DE MAN

(n)=Numero de especimenes, (L)= Longitud del cuerpo, (a)= Longitud total del cuerpo/entre el ancho máximo del cuerpo, (b)=Longitud total del cuerpo/entre la longitud esofageal, (b')=Longitud total del cuerpo/entre la distancia de la parte anterior del cuerpo a la parte final posterior de la glándula esofageal, (c)=Longitud del cuerpo/entre la longitud de la cola, (c´)= Longitud de la cola/entre la anchura del cuerpo a nivel del ano, (v)=Posición de la vulva con respecto a la longitud total del cuerpo expresada en porcentaje, (T)=Distancia entre cloaca y la parte anterior de los testículos expresada en porcentaje con respecto a la longitud total del cuerpo, (R)=Número total de anulaciones del cuerpo y (S)=Longitud del estilete/entre el diámetro del cuerpo a nivel de la base del estilete.

(Anexo 3) PREPARACION DEL BUFFER DE CURRAN et al., (1986)

Para preparar 50 ml en un matraz Erlenmeyer de 100 ml, adicionar 5 ml de Tris ácido clorhídrico (Tris-HCl) 1M pH 8.0; 5 ml de Sal disódica dihidratada (EDTA) 0.5 M pH 8.0; 2 ml de cloruro de sodio (NaCl) 5M; 2.5 ml de Sulfato duodécil de sodio (SDS) al 20%, aforar a 50 ml con agua destilada estéril. Mezclar perfectamente los reactivos y tapar perfectamente con tapón de rosca para evitar contaminación. No se esteriliza.

ABREVIATURAS

DNA	Ácido Desoxirribonucleico.
DGO	Orificio De la Glándula Esofágica Dorsal.
DNTP's	Desoxirribonucleótidos de Trifosfato.
PB	Pares de Bases.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
RFLP´s	Fragmento de restricción y extensión de polimorfismo
RNA	Ácido Ribonucleico.
TBE	Amortiguador Tris ácido bórico EDTA.