

DETECCIÓN, DIAGNÓSTICO Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL NEMATODO DEL TALLO DE LA ALFALFA *Ditylenchus dipsaci* EN JALISCO, MÉXICO. [Detection, diagnosis and phylogenetic analysis of Alfalfa stem nematode *Ditylenchus dipsaci* in Jalisco, Mexico].

Leonel Rosas-Hernández, Ángel Ramírez-Suárez, Salomé Alcasio-Rangel y Oscar Morales-Galván. Laboratorio de Nematología "Dr. Carlos Sosa-Moss". Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Dirección General de Sanidad Vegetal. SENASICA-SAGARPA. Correo-e: leonel.rosas@senasica.gob.mx.

INTRODUCCIÓN

Durante 2014, el Programa Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria en el estado de Jalisco realizó un muestreo en el cultivo de alfalfa (*Medicago sativa* L.) con crecimiento reducido, acortamiento de entrenudos, deformación y decoloración de brotes y hojas (Fig 1. a y b). Estos síntomas son sospechosos a nematodos de importancia cuarentenaria por lo que el objetivo del trabajo fue la determinación taxonómica, molecular y la relación filogenética del nematodo foliar afectando este cultivo.



Figura 1. Síntomas observados: (a). Decoloración de foliolos ("hojas albinas") y (b). Deformación de hojas y acortamiento de entrenudos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se procesaron siete muestras de alfalfa procedentes de Atoyac, Jalisco. Para la extracción, las plantas se cortaron (2-3 cm) e incubados en agua destilada estéril a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ con 3 tratamientos: 1. raíces, 2. hojas+brotes y 3. tallos. Se realizaron montajes temporales en agua-agar 2% para su determinación taxonómica. Se efectuó el diagnóstico molecular amplificando la región ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA combinada con PCR-RFLP con las enzimas *RsaI* y *HinfI*, y de los segmentos de expansión D2 y D3 del gen 28S del rDNA. Los productos de PCR fueron secuenciados y comparados con la base de datos del NCBI y se realizó un análisis filogenético mediante el criterio de máxima probabilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En todas las muestras se detectaron nematodos del género *Ditylenchus* y el mayor número de especímenes activos se observó en el tratamiento 2 de hojas y brotes. La morfología y morfometría de los especímenes concordó con los reportados para *D. dipsaci* (Fig. 2. a-c) (Sturhan & Brzeski, 1991).

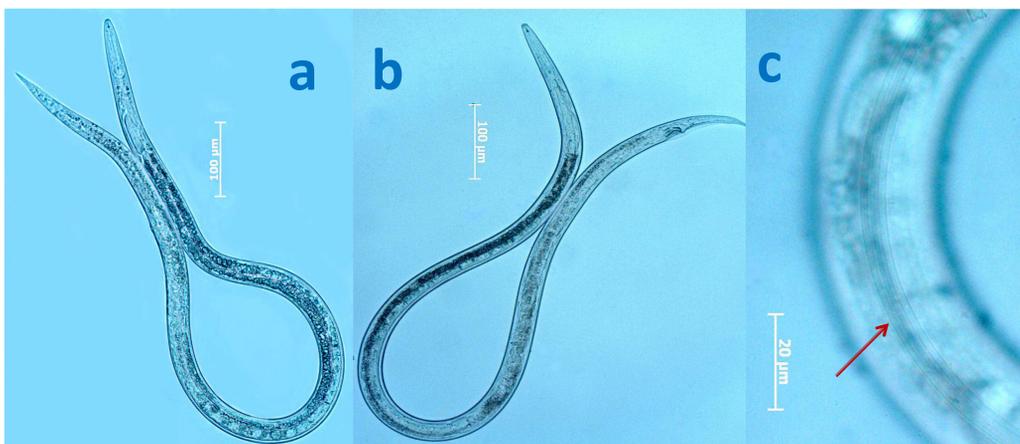


Fig. 2 Microfotografías de microscopía-Campo claro: (a). Hembra cuerpo completo, (b). Macho cuerpo completo, y (c). CL con 4 incisuras.

Se obtuvieron amplificadores de 750 pb (ITS1-5.8S-ITS2) (Fig. 3) y 800 pb (D2-D3).

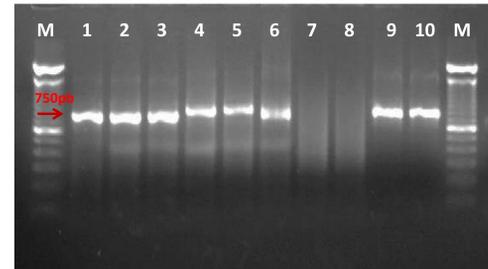


Figura 3. Amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA. M: marcador molecular de 100 pb; 1-6: amplificado a partir de extracción individual de DNA de *D. dipsaci* s.s.; 7 y 8: controles negativos (agua estéril grado PCR); 9 y 10: control positivo de *D. dipsaci* s.s. (ajo) de 750 pb.

El producto de 750 pb fue sometido a digestión enzimática y cuyo patrón de restricción fue de 335, 280, 200 y 132 pb con la enzima *RsaI* (Fig. 4a) y de 400 y 300 pb con *HinfI* lo cual coincide parcialmente con lo reportado para *D. dipsaci* (Vovlas *et al.*, 2011). El BLASTING con secuencias del NCBI mostró un 99% de identidad con *D. dipsaci* ($E=0.0$). La inferencia filogenética ubica a la población mexicana de alfalfa en el grupo que concentra las poblaciones de *D. dipsaci* s.s. de varias partes del mundo (Fig. 4b).

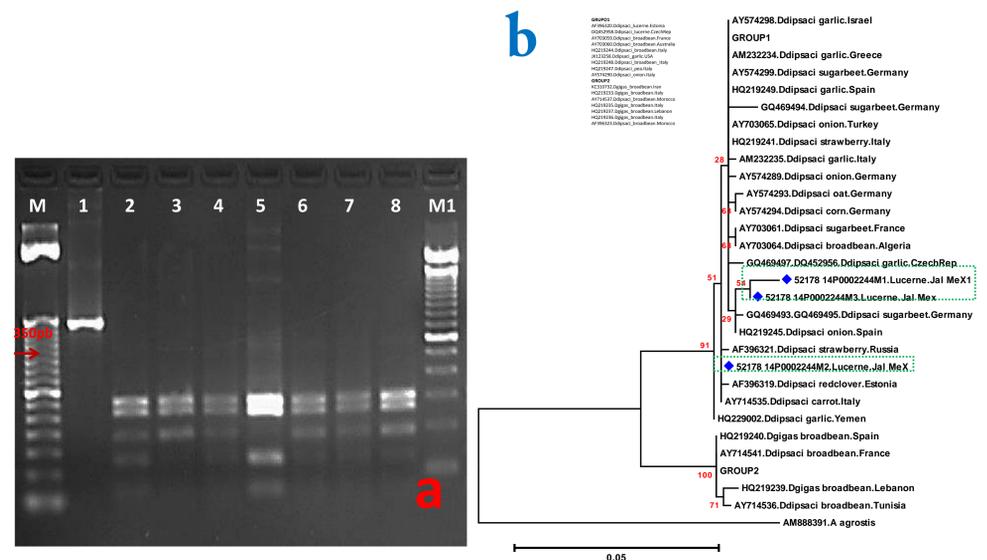


Figura 4: Análisis molecular y filogenético. (a). PCR-RFLP utilizando *RsaI*: M. 50pb, 1. Producto PCR sin digerir, 2-4, 6-8. Patrón de digestión 335, 280, 200 y 132 pb, 5: Digestión control positivo de *D. dipsaci* s.s. (ajo): 335, 280 y 132 pb y M1. 100 leader; y (b). Inferencia filogenética mediante el criterio de ML del nematodo de la Alfalfa en Jalisco, México de la región ITS1-5.8S-ITS2 utilizando los primers TW81 y AB28. Los números en rojo corresponden a los valores de soporte bootstrap de cada uno de los clades.

CONCLUSIONES

- ❖ La taxonomía tradicional y el análisis molecular confirmó la identidad del nematodo *D. dipsaci* s.s. como el causante de achaparramientos, decoloraciones y deformaciones de hojas en el cultivo de alfalfa.
- ❖ De acuerdo con el patrón de restricción obtenido con *RsaI* y a la gran variabilidad patogénica reportada de *D. dipsaci* manifestada en varias razas o patotipos, representados por el hospedero que afecta, este resultado podría indicar preliminarmente que el nematodo foliar y de los bulbos detectado en este hospedero se tratase de la raza alfalfa.

BIBLIOGRAFÍA

- Sturhan, D. & Brzeski, M. W. 1991. *Manual of Agricultural Nematology* (Ed. Nickle W. R.), pp. 423-464. Marcel Dekker, Inc., New York (US).
- Vovlas, N., A. Troccoli, J.E. Palomares-Rius, F. De Luca, G. Liébanas, B.B. Landa, S. A. Subbotin and P. Castillo. 2011. *Plant Pathology* 60: 762-775.