

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA

Área de Diagnóstico Fitosanitario Laboratorio de Nematología

Protocolo de Diagnóstico:

Ditylenchus destructor

(Nematodo de la pudrición de la papa)

Tecámac, Estado de México, Octubre 2018

SENASICA nos protege a todos

SAGARPA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA,
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,
PESCA Y ALIMENTACIÓN



SENASICA
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD
AGROALIMENTARIA

Aviso

El presente protocolo de diagnóstico fitosanitario fue desarrollado en las instalaciones de la Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), con el objetivo de diagnosticar específicamente la presencia o ausencia de *Ditylenchus destructor*. La metodología descrita, tiene un sustento científico que respalda los resultados obtenidos al aplicarlo. La incorrecta implementación o variaciones en la metodología especificada en este documento de referencia pueden derivar en resultados no esperados, por lo que es responsabilidad del usuario seguir y aplicar el protocolo de forma correcta.

La presente versión podrá ser mejorada y/o actualizada quedando el registro en el historial de cambios.

I. ÍNDICE

1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO	1
2. INTRODUCCIÓN	1
2.1 INFORMACIÓN SOBRE LA PLAGA	1
2.2 INFORMACIÓN TAXONÓMICA	2
2.3 FLUJO DE TRABAJO	4
3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN.....	5
3.1 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE NEMATODOS.....	5
3.2 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA Y MORFOMÉTRICA	7
3.2.1 <i>Confusión con otras especies</i>	8
3.3 IDENTIFICACIÓN MORFOMÉTRICA.....	8
3.3.1 <i>Preparaciones temporales</i>	10
3.3.2 <i>Preparaciones permanentes</i>	11
3.3.3 <i>Interpretación de resultados</i>	11
3.4 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	11
3.4.1 <i>Extracción de DNA de juveniles, hembras y machos</i>	11
3.4.2 <i>PCR punto final</i>	12
3.4.2.1 <i>Ensayo con primers específicos</i>	12
3.4.2.2 <i>Ensayo con primers generales</i>	13
3.4.2.3 <i>Controles para las pruebas moleculares</i>	15
3.4.3 <i>Interpretación de resultados para los ensayos de PCR punto final</i>	15
3.5 IDENTIFICACIÓN DEL PATÓGENO	16
3.6 VERIFICACIÓN MEDIANTE SECUENCIACIÓN.....	16
4. REGISTROS	17
5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL.....	17
6. RECONOCIMIENTO	17
7. REFERENCIAS	17
8. ANEXOS.....	20
8.1 SÍNTOMAS	20
8.2 EXTRACCIÓN DE NEMATODOS POR MACERADO-TAMIZADO-CENTRIFUGADO-FLOTACIÓN.....	21
8.3 TABLA DE CARACTERES MORFOMÉTRICOS PARA DIAGNÓSTICO	22
8.3.1 <i>Caracteres para hembras</i>	22
8.3.2 <i>Caracteres para machos</i>	23

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características morfológicas de <i>D. destructor</i> (modificado de Thorne, 1961).	8
Figura 2. Morfología de <i>D. destructor</i>	9
Figura 3. Ensayo de PCR con el par de primers específicos Des2-F y Des1-R.	15
Figura 4. Ensayo de PCR con el par de primers generales D2A y D3B	16
Figura 5. Síntomas en vegetales inducidos por <i>D. destructor</i>	20
Figura 6. Procedimiento de extracción de nematodos	21

III. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Comparativo entre <i>D. destructor</i> y especies relacionadas (Hooper, 1973; Sturhan y Brzeski, 1991; Wendt <i>et al.</i> , 1995; Vovlas <i>et al.</i> , 2011; Subbotin y Riley, 2012; IPPC, 2016; EPPO, 2017).	10
Cuadro 2. Primers específicos para detección de <i>D. destructor</i>	12
Cuadro 3. Preparación de la mezcla de reacción para los primers Des2-F/Des1-R.	13
Cuadro 4. Programa del termociclador para el ensayo con los primers Des2-F/Des1-R.	13
Cuadro 5. Primers generales para detección de <i>D. destructor</i>	14
Cuadro 6. Preparación de la mezcla de reacción para los primers D2A/D3B.	14
Cuadro 7. Programa del termociclador para el ensayo con los primers D2A/D3B.	14

1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO

Describir los procedimientos para la identificación de *Ditylenchus destructor* mediante caracterización morfológica-morfométrica, y técnicas moleculares, está dirigido a técnicos especialistas fitosanitarios o profesionales interesados en el diagnóstico de especies de nematodos de interés cuarentenario o económico.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Información sobre la plaga

El nematodo de la pudrición de la papa *Ditylenchus destructor* (Thorne, 1945) a diferencia de otras especies fitopatógenas del género, no afecta la parte foliar pero ocasiona graves daños a partes subterráneas de vegetales como tubérculos, rizomas, estolones, cormos y bulbos. Los principales hospedantes son: papa (*Solanum tuberosum* L.), ajo (*Allium sativum* L.), cebolla (*Allium cepa* L.), betabel (*Beta vulgaris* L.), zanahoria (*Daucus carota* L.), camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lamb), iris (*Iris* spp.), liatris (*Liatris* spp.), jacinto (*Hyacinthus orientalis* L.), tulipán (*Tulipa* spp.), gladiola (*Gladiolus* spp.) entre otros (Sturhan y Brzeski, 1991; Subbotin et al., 2011). El rango de hospedantes es muy amplio afectando a más de 90 especies vegetales y en ausencia de éstas puede sobrevivir como adulto o juvenil en residuos de cosechas o sobre el micelio de alrededor de 70 especies de hongos (Subbotin et al., 2011; EPPO, 2017). *D. destructor* puede sobrevivir a condiciones de baja temperatura o sequía, pero no forma “lana de nematodos” como *D. dipsaci*; sin embargo, inverna en estado de huevo (IPPC, 2016).

En tubérculos de papa este nematodo ingresa al tejido a través de los estolones. Los síntomas iniciales de infección se observan como pequeñas manchas blancas, calcáreas o de color claro, debajo de la epidermis. Posteriormente, estas manchas se agrandan y gradualmente cambian a más oscuras adquiriendo una textura esponjosa debido la invasión secundaria por bacterias, hongos y nematodos saprófagos. En tubérculos severamente afectados las áreas se observan ligeramente hundidas con la epidermis agrietada, arrugada, tipo papel. *D. destructor* es una plaga regulada en papa-semilla y bulbos de ornamentales en muchos países (Sturhan y Brzeski, 1991; EPPO, 2015).

De acuerdo con Subbotin et al. (2011) *D. destructor* presenta 7 haplotipos (A-G) diferenciables mediante al análisis PCR-ITS-RFLP. Todos los haplotipos, excepto el G, están presentes en China; B, E y G se encuentran en Europa; y C y E en Estados Unidos de América. Los haplotipos A, D y F únicamente han sido reportados en China; A, B, C y E en papa y camote, mientras que los haplotipos F y G han sido encontrados únicamente en camote y papa, respectivamente.

La presencia del nematodo de la pudrición de la papa ha sido reportada en regiones de clima templado como: Estados Unidos de América, Canadá, Perú, varios países europeos, Irán, Pakistán, Bangladesh, China, Japón, Hawaii, Nueva Zelanda y Sudáfrica (Hopper, 1973; Sturhan y Brzeski, 1991; IPPC, 2016).

La principal forma de diseminación de este nematodo es mediante material vegetal propagativo infectado, pero también por el suelo adherido a las partes subterráneas de las plantas o en maquinaria agrícola e incluso por el agua de riego. Por esta razón, varias agencias de sanidad agrícola de diversos países han establecido regulaciones fitosanitarias con el objetivo de reducir su dispersión (Subbotin y Riley, 2012; IPPC, 2016).

En México no existen registros de su presencia y su estatus fitosanitario es Ab1: Ausente (NAPPO, 2011). De acuerdo con SIAP (2018) en la república mexicana existe una superficie sembrada de papa de 59 mil ha con un valor de producción de 11.3 mil mdp, por lo que el establecimiento de *D. destructor* implica un riesgo económico considerable.

2.2. Información taxonómica (Hooper, 1972)

Nombre científico: *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945.

Sinónimos: ninguno

Nombres comunes: Nematodo de la pudrición de la papa (español).
Potato rot nematode (inglés).
Potato tuber nematode (inglés).
Maladie vermiculaire des pommes de terre (francés).

Posición taxonómica:

Con base en anatomía y fisiología (Siddiqi, 2000).

Phylum: Nematoda

Clase: Secernentea

Subclase: Diplogasteria

Orden: Tylenchida

Suborden: Tylenchina

Superfamilia: Tylenchoidea

Familia: Anguinidae

Género: *Ditylenchus*

Especie: *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945.

Con base en la filogenia de la subunidad pequeña (SSU-18S) del rDNA (De Ley *et al.*, 2006; Margulis y Chapman, 2010).

Dominio: Eukarya

Reino: Animalia

Phylum: Nematoda

Clase: Chromadorea

Subclase: Chromadoria

Orden: Rhabditida

Suborden: Tylenchina

Infraorden: Tylenchomorpha

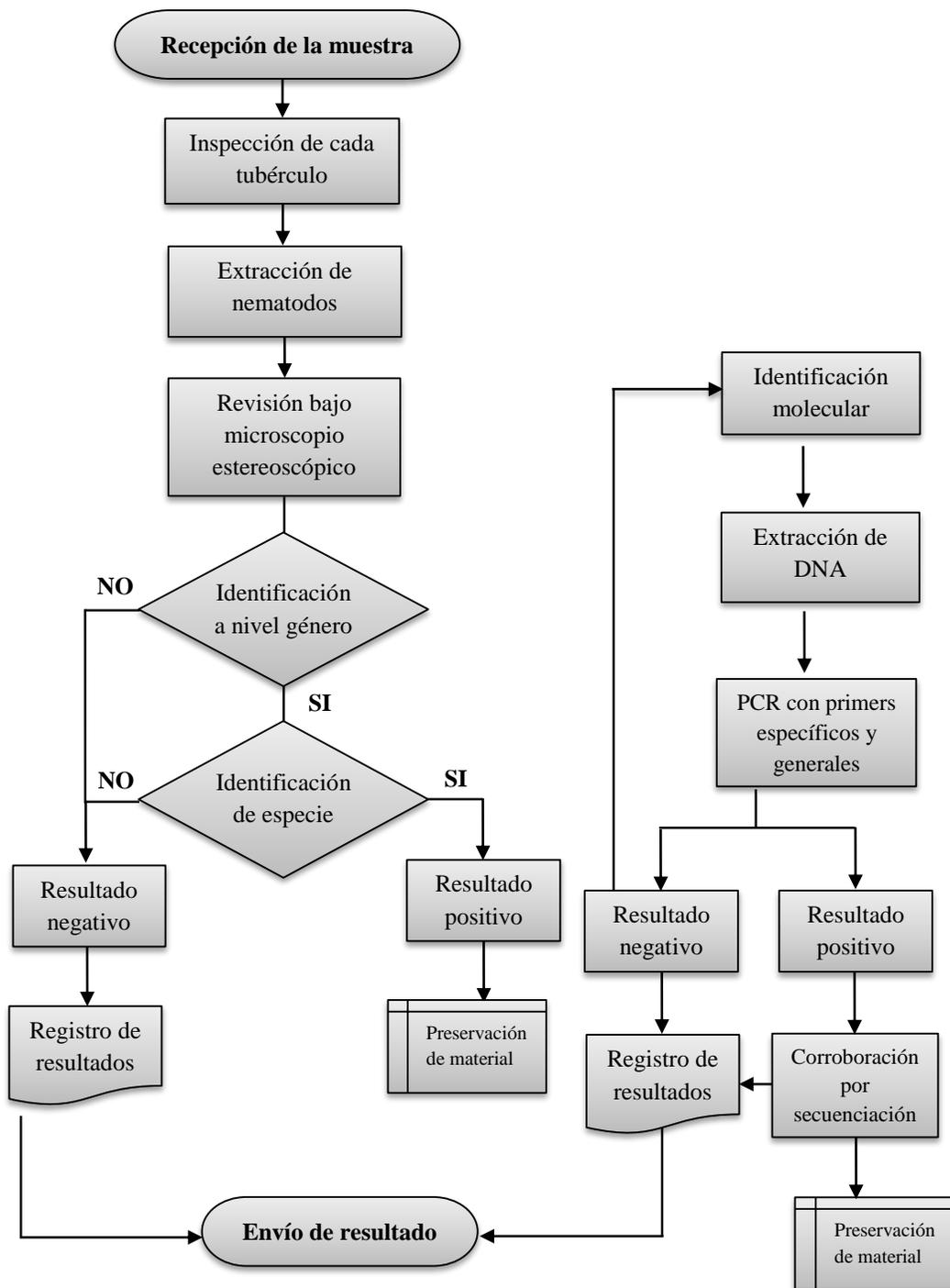
Superfamilia: Sphaerularioidea

Familia: Anguinidae

Género: *Ditylenchus*

Especie: *Ditylenchus destructor*

2.3. Flujo de trabajo



3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Para determinar la presencia de *D. destructor* es recomendable contar con material vegetal que presente los síntomas inducidos por este nematodo (Anexo 8.1). En el caso de que la muestra no cumpla con las características requeridas o se encuentre en mal estado, se registra en la bitácora y se conservan las imágenes fotográficas correspondientes para justificar el motivo por el cual no pudo ser procesada.

Los síntomas en vegetales afectados por este nematodo, de acuerdo con IPPC (2016) y EPPO (2017) son los siguientes: en tubérculos de papa, al realizar un corte transversal, se observan cambios de coloración del tejido de marrón claro a marrón oscuro, en ocasiones, necrótico de apariencia corchosa (Figura 8a). La zona necrótica presenta un agrietamiento y hundimiento de la superficie que se desprende muy fácilmente (Figura 8b). Esta sintomatología es más evidente en almacén, debido a que la pudrición seca ocasionada por el daño del nematodo se combina con el efecto de otros agentes secundarios como bacterias, hongos e incluso nematodos de vida libre que se alimentan del tejido en descomposición. En zanahoria, la infección se manifiesta por un agrietamiento transversal de color marrón oscuro y de aspecto corchoso (Figura 8c) y al hacer un corte transversal se pueden observar manchas blanquecinas en el tejido subepidérmico (Figura 8d). En bulbos y cormos, las lesiones iniciales se observan como puntuaciones marrones en la base y se extienden gradualmente hasta cubrir la totalidad del tejido vegetal (Figuras 8e y 8f).

De acuerdo a lo establecido en el “Plan de trabajo para la importación de semilla de papa de Canadá a México”, firmado en octubre de 2008 entre ambos países, para la detección de nematodos fitopatógenos deben analizarse 400 tubérculos. Asimismo, para el caso de la importación de papa para consumo en la zona fronteriza de México, con base a lo establecido en el “Módulo de consulta de requisitos fitosanitarios para la importación de mercancía de origen vegetal”, la muestra a analizar para nematodos consiste de 200 tubérculos.

3.1. Procedimiento de extracción de nematodos

Los especímenes (J2, J3, J4 y adultos) deben ser extraídos del material vegetal mediante el método de macerado-tamizado-centrifugación-flotación. Iniciar con la inspección de los tubérculos de papa buscando la sintomatología descrita anteriormente y en caso de que se presenten, procesar los tubérculos afectados por separado. Asimismo, realizar el pelado y el procesamiento de la totalidad de los tubérculos (Carta *et al.*, 2005).

El método de tamizado para la extracción de *D. destructor* incluye algunas modificaciones a la metodología propuesta por van Bezooijne (2006) y permite recuperar un alto porcentaje de ejemplares. Se fundamenta en la separación de los nematodos al pasar el material macerado a través de una serie de tamices de diferentes tamaños de abertura de malla (850, 250, 150,

45 y 32 μm) posteriormente, dos centrifugaciones, primero con caolín y finalmente una separación por densidad utilizando solución azucarada (Hopper *et al.*, 2005).

El procedimiento se describe a continuación:

- 1) Colocar la muestra (producto del pelado) en el vaso de la licuadora (Figura 6a) y adicionar agua hasta cubrirla.
- 2) Macerar tres veces por lapsos de cinco segundos con velocidad moderada para asegurar una extracción eficiente.
- 3) Colocar el tamiz de mayor abertura: 850 μm sobre un recipiente de plástico de 10 L vacío y verter la suspensión en él.
- 4) Sobre otro recipiente de plástico de 10 L vacío colocar el tamiz de mayor abertura: 850 μm y verter la suspensión sobre el tamiz.
- 5) Repetir el paso 4.
- 6) Descartar material retenido en tamiz de 850 μm .
- 7) Repetir los pasos 4 y 5 con cada uno de los siguientes tamices. Lavar, con agua a presión, el material retenido en el tamiz de 250 μm .
- 8) Decantar lo retenido en el tamiz de 150 μm sobre el de 45 μm y este a su vez sobre el de 32 μm .
- 9) Transferir el producto colectado en el tamiz de 32 μm a tubos de centrífuga de 50 mL de capacidad (30 mL por tubo).
- 10) Agregar 1 g de caolín por cada 30 mL de producto en el tubo y mezclar vigorosamente (Figuras 6d y e).
- 11) Centrifugar por 5 min a 700 g (Figura 6f).
- 12) Eliminar cuidadosamente el sobrenadante de cada tubo y disolver la pastilla en 30 mL de solución azucarada con una gravedad específica de 1.22 (473 g de azúcar estándar en 500 mL de agua) (Figura 6g). Este paso debe hacerse lo más rápido posible debido a que los nematodos pueden plasmolizarse.

- 13) Centrifugar por 4 min a 700 g.
- 14) Verter el sobrenadante en un tamiz de 32 μm y adicionar agua para enjuagar la solución azucarada de los especímenes (Figura 6h).
- 15) Concentrar los nematodos en un vaso de precipitado procurando que el volumen de agua no exceda los 20 mL.
- 16) Vaciar esta suspensión en una caja Petri.
- 17) Observar los nematodos extraídos bajo el microscopio estereoscópico.

3.2. Descripción morfológica y morfométrica

Las características de *D. destructor* de acuerdo con Hopper (1973) y Siddiqi (2000) son: nematodos alargados, filiformes, delgados y generalmente de gran movimiento, muy similares a *D. dipsaci*. Deiridios generalmente visibles cerca de la base del cuello. Hemizonidio localizado ligeramente anterior al poro excretor. Los fasmidios generalmente no visibles. Papilas cefálicas y anfídios visibles únicamente en vista frontal, los cuales están arreglados de manera similar que en *D. dipsaci*. Estilete pequeño, fuerte con nódulos redondeados (Figuras 2a y b). Bulbo basal del esófago con núcleos glandulares (tres grandes y dos pequeños). La región glandular sobrepuesta dorsalmente. El intestino tiene apariencia densamente granular. El ovario se extiende hacia la parte anterior hasta la base del esófago; frecuentemente los oocitos se desarrollan en dos líneas. La vulva presenta labios gruesos y elevados. El saco postuterino mide $\frac{3}{4}$ de la longitud de la cola. La distancia de la región vulvar-ano es $1\frac{3}{4}$ a $2\frac{1}{2}$ veces la longitud de la cola. La cola es aguda con punta redondeada. Uno de los caracteres morfológicos de diagnóstico para esta especie es la presencia de seis incisuras o líneas en el campo lateral, en la parte media lateral del cuerpo y en los extremos se reducen a dos (Figuras 1; 2e y f). El testículo es recto y se extiende hasta la base del esófago con los espermatogonios arreglados generalmente en una sola línea hasta la mitad del cuerpo. La espícula tiene un patrón esclerotizado distintivo. La bursa abarca hasta $\frac{2}{3}$ partes de la longitud de la cola.

Históricamente, la morfometría de *D. destructor* ha sido descrita por diversos autores como Thorne (1961), Hooper (1973) y Sturhan y Brzeski (1991) y Subbotin y Riley (2012), siendo esta última la más actualizada:

Hembras: $L = 0.69-1.89$ mm; $a = 18-49$; $b = 4-12$; $c = 9-30$; $V = 73-90$; *estilete* = 10-15 μm .

Machos: $L = 0.63-1.35$ mm; $a = 24-50$; $b = 4-11$; $c = 11-21$; *estilete* = 10-12 μm ; *espículas* = 24-27 μm ; *gubernáculo* = 9-12 μm .

3.2.1. Confusión con otras especies

Debido a que los índices De Man pueden traslaparse entre especies de *Ditylenchus*, en muchos casos es difícil realizar la diferenciación entre ellas. *D. destructor* puede confundirse con *D. africanus*, *D. dipsaci* s. s., *D. gigas* y *D. myceliophagus*. Para evitar falsos positivos o negativos es necesario realizar análisis morfológicos y morfométricos detallados. En el Cuadro 1 se muestran las características morfológicas y morfométricas que pueden ser utilizadas para separar estas especies.

3.3. Identificación morfométrica

Una vez detectados hembras y machos de *Ditylenchus* spp. se deben medir y calcular los caracteres morfométricos descritos en el Anexo 8.3 considerando, al menos, 10 especímenes para obtener una fuente de variación aceptable. Por ello, es necesario elaborar preparaciones temporales y permanentes.

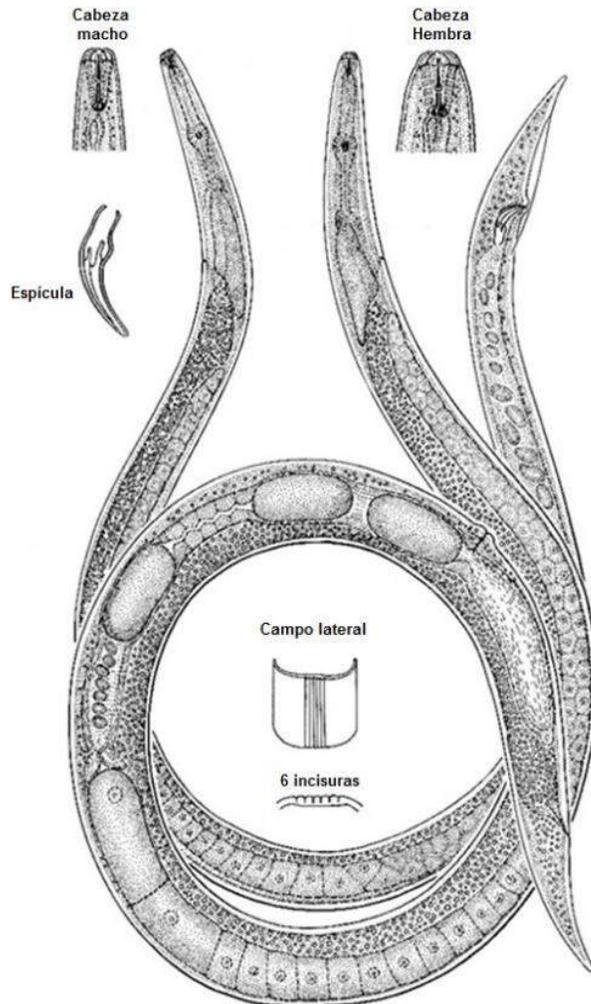


Figura 1. Características morfológicas de *D. destructor*
(modificado de Thorne, 1961).

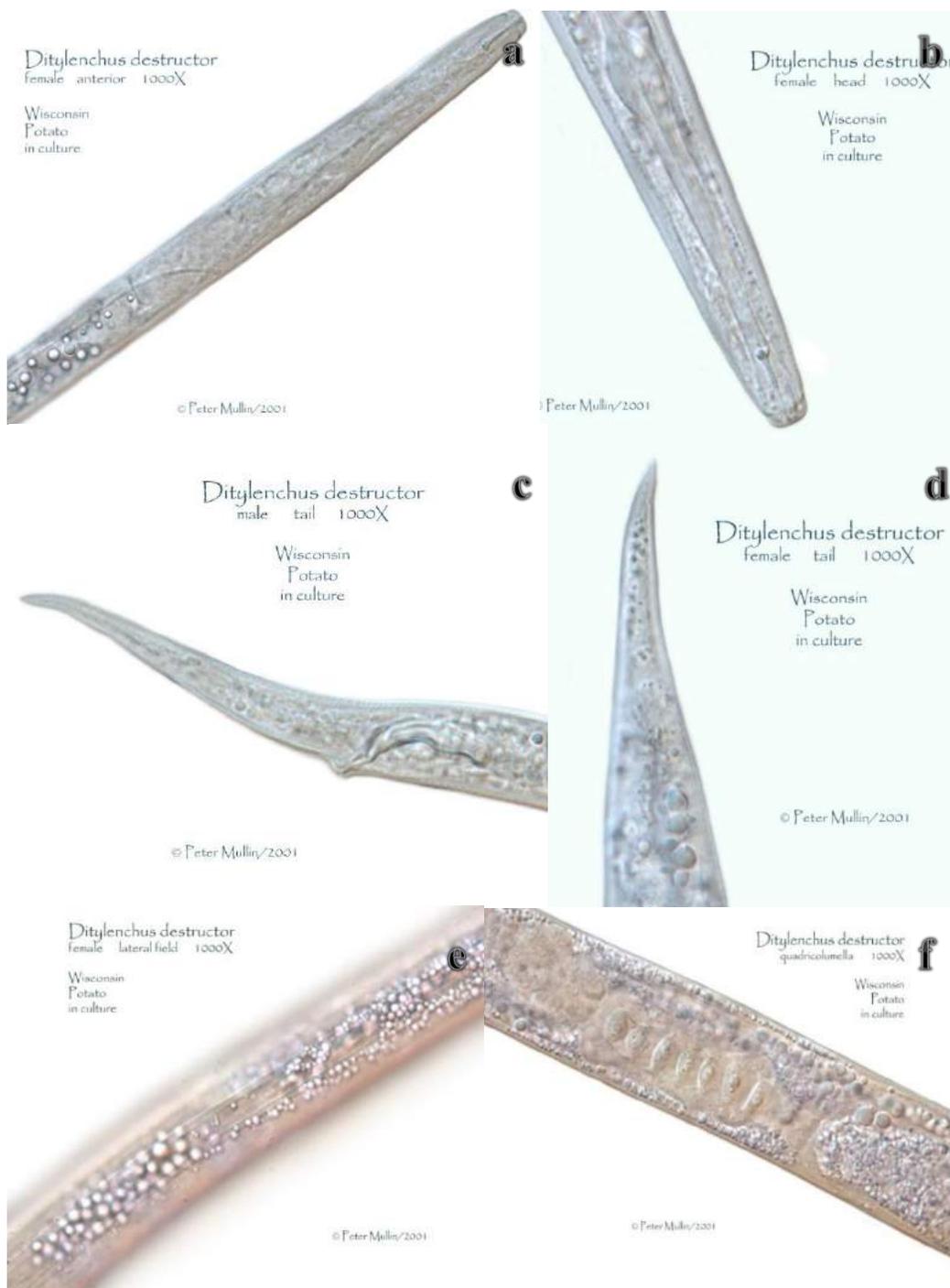


Figura 2. Morfología de *D. destructor*. Hembra: a) y b). Región anterior; d). Cola; e). Campo lateral con seis incisuras; f). Cuadricolumella. Macho: c). Cola y espículas (Créditos: Peter Mullin, <https://nematode.unl.edu>).

3.3.1. Preparaciones temporales

- 1) Transferir los nematodos a una gota de agua destilada estéril sobre un portaobjetos, preferentemente, cóncavo.
- 2) Relajar los nematodos con calor sin matarlos, con la ayuda de un mechero de alcohol hasta que no presenten movimiento.
- 3) Colocar los nematodos sobre medio de montaje agua-agar 1 % en un portaobjetos. Es recomendable colocar los especímenes en una posición sinuosa para facilitar la observación clara de las características de diagnóstico distintivas.
- 4) Colocar un cubreobjetos sobre el medio de montaje y evitar la formación de burbujas. En caso de que se presenten, colocar la preparación dentro de una cámara húmeda por 30 minutos e identificar las preparaciones con los datos correspondientes de la muestra.
- 5) Observar la morfología en el microscopio compuesto con los objetivos de 10 a 100X, obtener las fotografías y la morfometría indicada en el Anexo 8.3.

Cuadro 1. Comparativo entre *D. destructor* y especies relacionadas (Hooper, 1973; Sturhan y Brzeski, 1991; Wendt *et al.*, 1995; Vovlas *et al.*, 2011; Subbotin y Riley, 2012; IPPC, 2016; EPPO, 2017).

Característica /Especie	<i>D. destructor</i>	<i>D. africanus</i>	<i>D. dipsaci</i> s.	<i>D. gigas</i>	<i>D. myceliophagus</i>
Longitud de hembras (mm)	0.69-1.89	1.014 (0.69-1.14)	1.1-1.7	1.6-2.29	0.9 (0.6-1.0)
Estilete (µm)	10-15	8-10 (8.9 ± 0.6)	9-12	11.5-13.0	7-10
Región glandular	Sobrepuesto dorsalmente	Sobrepuesto dorsalmente	No sobrepuesto	Ligeramente sobrepuesto	Sobrepuesto dorsalmente
# líneas campo	6	6	4	4	6
Posición de	73-90	79.3±1 (77-81)	79-86)	82 (79-82)	82.5 (74-90)
Longitud del saco post-uterino	2/3 - ¾ distancia vulva-ano	79.2 ± 21 (50-143)	½ distancia vulva-ano	81-150 µm. 2 veces el ancho del cuerpo	2-2 ¼ distancia vulva-ano
Longitud vulva-ano	1 3/4-2 1/3 la longitud de la	1 3/4-2 1/3 la longitud de la cola	1 3/4-2 ¼ longitud de la	1 3/4-2 ¼ longitud de la cola	2-2 ¼ longitud de la cola
Forma de la cola	Cónica, ligeramente curvada ventralmente	Cónica, ligeramente alargada en el último 3er cuarto	Cónica	Cónica	Ampliamente cónica
Punta de la cola	Punta finamente	Punta finamente redondeada	Punta aguda	Punta aguda	Punta finamente redondeada
Espícula (µm)	24-27	15-22	20-28	23.5-28	15-20
Long. cono/estilete	50 % aprox.	40 % aprox.	50 % aprox.	50 % aprox.	< 50 %

3.3.2.Preparaciones permanentes

Realizar la muerte-fijación de los nematodos con formol 4% o trietanolamina a 70°C y posteriormente, hacer la deshidratación gradual con glicerina de acuerdo con el método de Seinhorst (1959, 1962). Finalmente, elaborar las preparaciones permanentes utilizando glicerina deshidratada como medio de montaje y parafina grado histopatología como sellador. Considerar 4-6 ejemplares (machos, hembras y juveniles) por preparación.

Nota: las laminillas deben etiquetarse con los datos correspondientes de la muestra y conservarse como evidencia, junto con los valores morfométricos y las micrografías obtenidas.

3.3.3.Interpretación de resultados

En caso de que la comparación de los datos morfométricos se encuentren dentro de los rangos descritos en la literatura de referencia y el resultado por identificación tradicional corresponda como positivo a *D. destructor*, o si los ejemplares corresponden a *Ditylenchus* pero presentan características morfométricas diferentes a los descritos para *D. destructor*, es necesario realizar el diagnóstico molecular como se describe en el apartado 3.4. para la confirmación del resultado.

Si no se detectan nematodos correspondientes al género *Ditylenchus* se debe reportar el diagnóstico como negativo.

3.4. Identificación molecular

El análisis molecular de *D. destructor* es un procedimiento necesario para confirmar su identidad, complementando su diagnóstico y aportando mayor precisión y confiabilidad del resultado. Por lo anterior, es necesaria la amplificación de dos marcadores moleculares para resolver posibles controversias.

3.4.1. Extracción de DNA de juveniles, hembras y machos

La extracción del DNA puede llevarse a cabo utilizando especímenes individuales de cualquier estadio biológico o varios especímenes a la vez; sin embargo, es necesario asegurarse de que los nematodos correspondan a *D. destructor* mediante caracterización morfológica y morfométrica. Se sugiere emplear el método de extracción de DNA (lisis celular) propuesto por Williams et al. (1992) con algunas modificaciones:

- 1) Después de realizar el análisis morfométrico, recuperar los nematodos del medio de montaje agua-agar.

- 2) Colocar un espécimen en 13 μL de buffer de extracción (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 mM MgCl_2 , 50 mM KCl, 0.45 % Tween 20; 0.05 % gelatina y $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ de proteinasa K grado RNA) sobre un cubreobjetos limpio.
- 3) Macerar el nematodo (con una punta de micropipeta o aguja de insulina) bajo el microscopio estereoscópico.
- 4) Mezclar por pipeteo 4-6 veces y transferir la solución a un tubo de PCR de 200 μL y mantenerlo en hielo.
- 5) Congelar a -40°C por 30 min.
- 6) Pasado el tiempo de congelación, incubar inmediatamente los tubos a 65°C por una hora y mezclar con vortex, al menos, una vez durante este periodo.
- 7) Incubar a 95°C por 15 min (para inactivar a la proteinasa K).
- 8) Conservar a 4°C .
- 9) Dar un golpe de minicentrífuga para concentrar el producto.

3.4.2. PCR punto final

3.4.2.1. Ensayo con primers específicos

Para la detección de *D. destructor*, mediante la técnica de PCR punto final, se utilizan los primers específicos Des2-F/Des1-R que amplifican la región parcial del espacio transcrito interno 1 (ITS1), gen 5.8S y espacio transcrito interno 2 (ITS2) del rDNA (Marek et al., 2010). Se obtiene un producto de 470 pb aproximadamente. Con estos primers se detectan 6 de los 7 haplotipos descritos de *D. destructor*, excepto el haplotipo A (Subbotin et al., 2011).

Cuadro 2. Primers específicos para detección de *D. destructor*.

Tipo	Nombre del primer	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Sentido	Des2-F	-GTGCTTGTATTTGCGGTTGTG-	470
Antisentido	Des1-R	-TGCTAGGCCAAAGAGACAGC-	

Preparar la reacción de PCR punto final para el par de primers Des2-F/Des1-R de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Preparación de la mezcla de reacción para los primers Des2-F/Des1-R.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer PCR	10 X	1 X	2.5
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5
Primer Des2-F	10 µM	0.2 µM	0.5
Primer Des1-R	10 µM	0.2 µM	0.5
Taq DNA Pol	5 U/µL	1.5 U	0.3
DNA	-----	-----	5.0
Agua grado biología molecular	-	-	14.95
		Volumen final (µL)	25

Programar el termociclador de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Programa del termociclador para el ensayo con los primers Des2-F/Des1-R.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	2 minutos	1
Desnaturalización	94°C	30 segundos	30
Alineamiento	57°C	20 segundos	
Extensión	72°C Rampeo 0.5°C/seg	1 minuto	
Extensión final	72°C	7 minutos	1
Conservación	4°C	∞	

Los productos se deben correr durante 80 minutos a 90 V en un gel de agarosa al 1.4 % en Buffer TAE 1X (100 mL) teñido con 7 µL de GelRed™ Biotum u otro medio aceptable que permita la interpretación de los resultados.

3.4.2.2. Ensayo con primers generales

Mediante la amplificación de los segmentos de expansión D2 y D3 del gen 28S del rDNA de *D. destructor* utilizando los primers generales D2A y D3B (Courtright, 2000) se obtiene un producto de 850 pb. Este fragmento debe secuenciarse para efectos de corroboración de resultados positivos como se especifica en el apartado 3.5.

Cuadro 5. Primers generales para detección de *D. destructor*.

Tipo	Nombre del primer	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Sentido	D2A	-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-	850
Antisentido	D3B	-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-	

Preparar la reacción de PCR punto final para el par de primers D2A/D3B de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Preparación de la mezcla de reacción para los primers D2A/D3B.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μL)
Buffer PCR	10 X	1 X	2.5
MgCl₂	50 mM	3.0 mM	1.5
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5
Primer D2A	10 μM	0.4 μM	1.0
Primer D3B	10 μM	0.4 μM	1.0
Taq DNA Pol	5 U/μL	2.5 U	0.5
DNA	-----	-----	5.0
Agua grado biología molecular	-	-	13
Volumen final (μL)			25

Programar el termociclador de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Programa del termociclador para el ensayo con los primers D2A/D3B.

Etap	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 minutos	1
Desnaturalización	95°C	45 segundos	34
Alineamiento	55°C	45 segundos	
Extensión	72°C Rampeo 0.5°C/seg	1 minuto	
Extensión final	72°C	5 minutos	1
Conservación	4°C	∞	

Los productos se deben correr durante 80 minutos a 90 V en un gel de agarosa al 1.4% en Buffer TAE 1X (100 ml) teñido con 7μl de GelRed™ Biotum, u otro medio aceptable que permita la interpretación de los resultados.

3.4.2.3. Controles para las pruebas moleculares

En los ensayos de PCR punto final descritos en este protocolo es necesario incluir, por duplicado, los siguientes controles:

Control negativo: descarta falsos positivos y contaminación de la reacción. El volumen que ocuparía el DNA se reemplaza por agua grado biología molecular.

Control positivo: provee un patrón de referencia con el cual comparar los resultados positivos en las muestras. Utilizar DNA plasmídico de *D. destructor* que será proporcionado por el CNRF con previa solicitud de los laboratorios o personas interesadas.

3.4.3. Interpretación de resultados para los ensayos de PCR punto final

Los resultados serán válidos solamente bajo los siguientes criterios:

- Los controles negativos no deben de generar bandas en ningún ensayo de PCR.
- Los controles positivos con el par de primers Des2-F/Des1-R deben generar una banda de 470 pb (Figura 3).
- Los controles positivos con el par de primers D2A/D3B deben generar una banda de tamaño de 850 pb (Figura 4).
- Se considerará como resultado positivo aquellas muestras que amplifiquen los fragmentos de 470 y 850 pb con los primers Des2-F/Des1-R y D2A/D3B, respectivamente.
- El resultado es negativo si no existe amplificación del fragmento de 470 pb con los primers Des2-F/Des1-R.

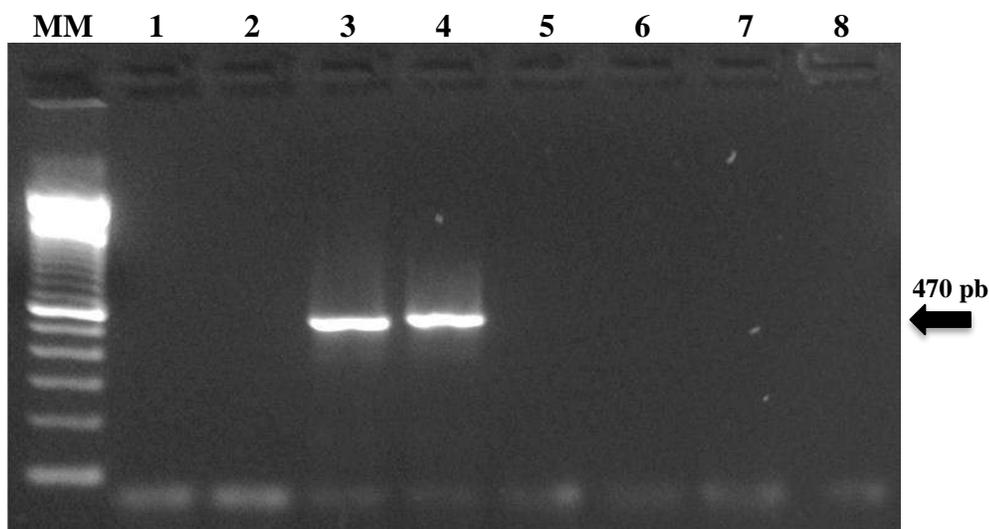


Figura 3. Ensayo de PCR con el par de primers específicos Des2-F y Des1-R: MM: Marcador molecular 100 pb (Invitrogen); 1 y 2: Control negativo; 3 y 4: DNA de *D. destructor*; 5-8: DNA de *D. dipsaci* s. s.: 5 y 6: Alfalfa; 7 y 8: Ajo.

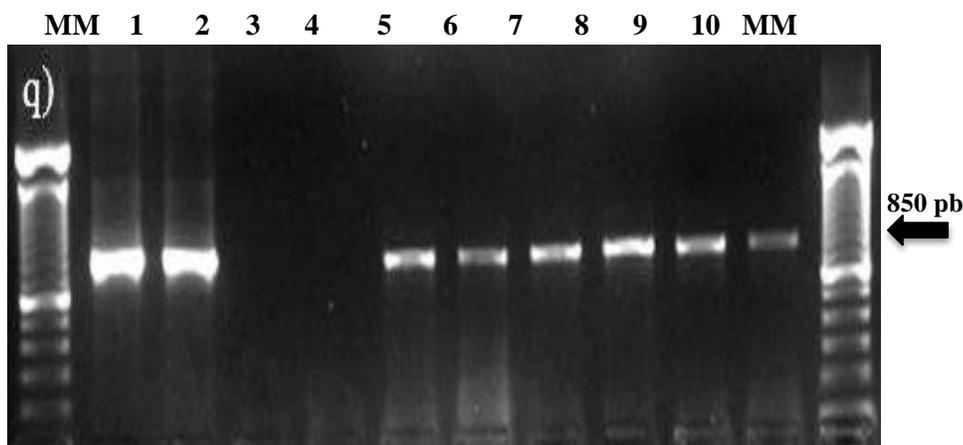


Figura 4. Ensayo de PCR con el par de primers generales D2A y D3B: MM: Marcador molecular 100 pb (Invitrogen); 1 y 2: Control positivo (DNA plasmídico *D. destructor*); 3 y 4: Control negativo; 5-10: DNA de *D. destructor*.

3.5. Identificación del patógeno

Considerando el estatus cuarentenario de *D. destructor*, para reportar una identificación positiva de este nematodo debe sustentarse con las siguientes pruebas: caracterización morfológica-morfométrica y las amplificaciones positivas de los ensayos de PCR punto final con los primers Des2-F/Des1-R y D2A/D3B.

3.6. Verificación mediante secuenciación

Se recomienda secuenciar los fragmentos obtenidos en los ensayos de PCR punto final con los primers Des2-F/Des1-R y D2A/D3B. El análisis molecular de nematodos fitopatógenos con, al menos, dos marcadores provee de un diagnóstico molecular robusto (Subbotin et al., 2005; Vovlas et al., 2011).

- 1) Enviar los productos de PCR a secuenciar, atendiendo las especificaciones para el envío de muestras de la institución a la que se solicita el servicio.
- 2) Obtenida la secuencia, ingresar a la herramienta de alineamiento Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).
- 3) Insertar la secuencia de interés y realizar el alineamiento con los parámetros predeterminados.
- 4) Revisar cuidadosamente las especies que aparecen en la parte superior de la tabla, el porcentaje de cobertura e identidad (debe tender hacia el 100 %), el valor de E (debe tender a cero) (Benson et al., 2013). Verificar quién depositó la secuencia debido a existen muchas

que han sido incorrectamente identificadas, por lo que en ocasiones el resultado obtenido, aún con 100 % de cobertura e identidad, no resulta totalmente concluyente.

4. REGISTROS

En caso de obtener un resultado positivo a *D. destructor*, se deben conservar:

- Los datos de rastreabilidad de la muestra, registros y las evidencias físicas y digitales sobre el diagnóstico de este nematodo.
- Las preparaciones permanentes con especímenes debidamente etiquetadas.
- Conservar el DNA extraído a -40 °C.
- Resguardar el material vegetal positivo, que no fue utilizado, en su empaque original, bajo refrigeración a 4 °C, correctamente etiquetado, durante 3 meses posterior al diagnóstico.

En caso de obtener un resultado negativo, inactivar y desechar el material vegetal.

5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL

Correo: lab.nematologia@senasica.gob.mx

Teléfono: 01 (52) 55 5905 1000, **Ext.** 51420 y 51429.

6. RECONOCIMIENTO

El presente documento es la modificación al protocolo escrito por el Dr. Ángel Ramírez Suárez; fue revisado, actualizado y complementado por el Grupo DiaFi (Leonel Rosas Hernández), el Laboratorio de Nematología (Japhet Torres López); y editado por el Grupo DiaFi (Ariana Guadalupe Robles Zárata).

El DNA de *D. destructor* utilizado en este protocolo fue facilitado por el Dr. Qing Yu, investigador de Agriculture and Agri-Food en Canadá.

7. REFERENCIAS

- Benson, A. D., Mark, C. K. C., Karsch-Mizrachi I., Lipman, J. D., Ostell, J., Sayers, W. E. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41, 36-42.
- Carta, L. K., Handoo, Z. A., Powers, T. O., Miller, S. A. Péres-Zubiri, R., and Ramírez-Suárez, A. (2005). Guidelines for isolation and identification of regulated nematodes of potato (*Solanum tuberosum* L.) in North America. *Rev. mex. Fitopatol*, 23 (2), 211-222.

- Courtright, E. M., Wall, D. H., Virginia, R. A. Frisse, L. M., Vida, J. T. and Thomas, W. K. (2000). Nuclear and mitochondrial DNA sequence diversity in the Antarctic nematode *Scottinema lindsayae*. *Journal of nematology*, 32 (2), 143-153.
- De Ley, P., Decraemer, W. and Eyualem-Abebe. (2006). Introduction: Summary of present knowledge and research addressing the ecology and taxonomy of freshwater nematodes. In: Eyualem-Abebe, Andrásy, I. and W. Traunspurger (Eds.), *Freshwater nematodes ecology and taxonomy*. (pp. 3-30). Wallingford, UK: CABI Publishing.
- EPPO. (2017). PM 7/87 (2) *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus dipsaci*. EPPO Bulletin 47 (3): 401–419.
- Hooper, D. J. (1972). *Ditylenchus destructor*. CIH Descriptions of Plant-parasitic Nematodes No. 21. CAB International, Wallingford, UK.
- Hooper, D. J., Hallman, J. and Subbotin, S. (2005). Methods for extraction, processing and detection of plant and soil nematodes. In: Luc, M., R. A. Sikora and J. Bridge (Eds.), *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. 2nd edition. (pp. 53-86). Wallingford, UK: CABI Publishing.
- IPPC. (2016). ISPM27: Diagnostics protocols for regulated pests. DP 8: *Ditylenchus dipsaci* and *Ditylenchus destructor*. 32 p.
- Marek M., Zouhar, M., Douda, O., Mazakova, J. and Rysanek, P. (2010). Bioinformatics-assisted characterization of the ITS1-5.8S-ITS2 segments of nuclear rRNA gene clusters, and its exploitation in molecular diagnostics of European crop parasitic nematodes of the genus *Ditylenchus*. *Plant Pathology*, 59, 931–943.
- Margulis, L. and Chapman, J. (2009). *Kingdoms and domains. An illustrated guide to the phyla of life on earth*. London, UK. Academic Press.
- NAPPO. (2011). Regional standard for phytosanitary measures (RSPM). RSPM 3, Movement of potatoes into a NAPPO member country. 51 p.
- Seinhorst, J. W. (1959). A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica*, 4, 67-69.
- Seinhorst, J. W. (1962). On the killing, fixation and transferring to glycerin of nematodes. *Nematologica*, 8, 29-32.
- SIAP. (2018). Atlas agroalimentario 2012-2018. SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). México. 215p.
- Siddiqi, M. R. (2000). *Tylenchida: Parasites of plants and insects*. 2nd edition. London, UK. CABI Publishing.
- Sturhan, D. and Brzeski, M. W. (1991). Stem and bulb nematodes, *Ditylenchus* spp. In: W. R. Nickle (Ed.), *Manual of agricultural nematology*. (pp. 423–464). New York, USA: Marcel Dekker, Inc.
- Subbotin, S. A and Riley, I. T. (2012). Stem and gall nematodes. In: Manzanilla-López, R. H. and N. Marbán-Mendoza, (Eds). *Practical Plant Nematology*, BBA, México. pp: 521-577.

- Subbotin, S. A., Deimi, A. M., Zheng, J. and Nhizhov, V. N. (2011). Length variation and repetitive sequences of Internal Transcribed Spacer of ribosomal RNA gene, diagnostic and relationships of populations of potato rot nematode *Ditylenchus destructor* Thorne 1945 (Tylenchida: Anguinidae). *Nematology*, 13(7), 773-785.
- Thorne, G. (1961). *Principles of nematology*. New York, USA: McGraw-Hill Book Co. Inc.
- van Bezooijne, J. (2006). *Methods and techniques for nematology*. The Netherlands: Wageningen. Recuperado de: <http://nematologia.com.br/wp-content/uploads/2014/03/>.
- Vovlas, N., Troccoli, A., Palomares-Rius, J. E., De Luca, F., Liébanas, G., Landa, B. B., Subbotin, S. A. and Castillo, P. (2011). *Ditylenchus gigas* n. sp. parasitizing broad bean: a new stem nematode singled out from the *Ditylenchus dipsaci* species complex using a polyphasic approach with molecular phylogeny. *Plant Pathology*, 60, 762-775.
- Wendt, C. D., Swart, A., Vrain, T. C., and Webster, J. M. (1995). *Ditylenchus africanus* sp. n. from South Africa; a morphological and molecular characterization. *Fundamentals of Applied Nematology* 18, 241-250.
- Williams, B. D., Schrank, B., Huynh, C., Shownkeen, R. and Waterston, R. H. (1992). A genetic mapping system in *Caenorhabditis elegans* based on polymorphic sequence-tagged sites. *Genetics*, 131, 609-624.

Forma recomendada de citar:

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2018). Protocolo de Diagnóstico: *Ditylenchus destructor* (Nematodo de la pudrición de la papa) [Versión 1.0]. Tecámac, México: Autor.

8. ANEXOS

8.1. Síntomas

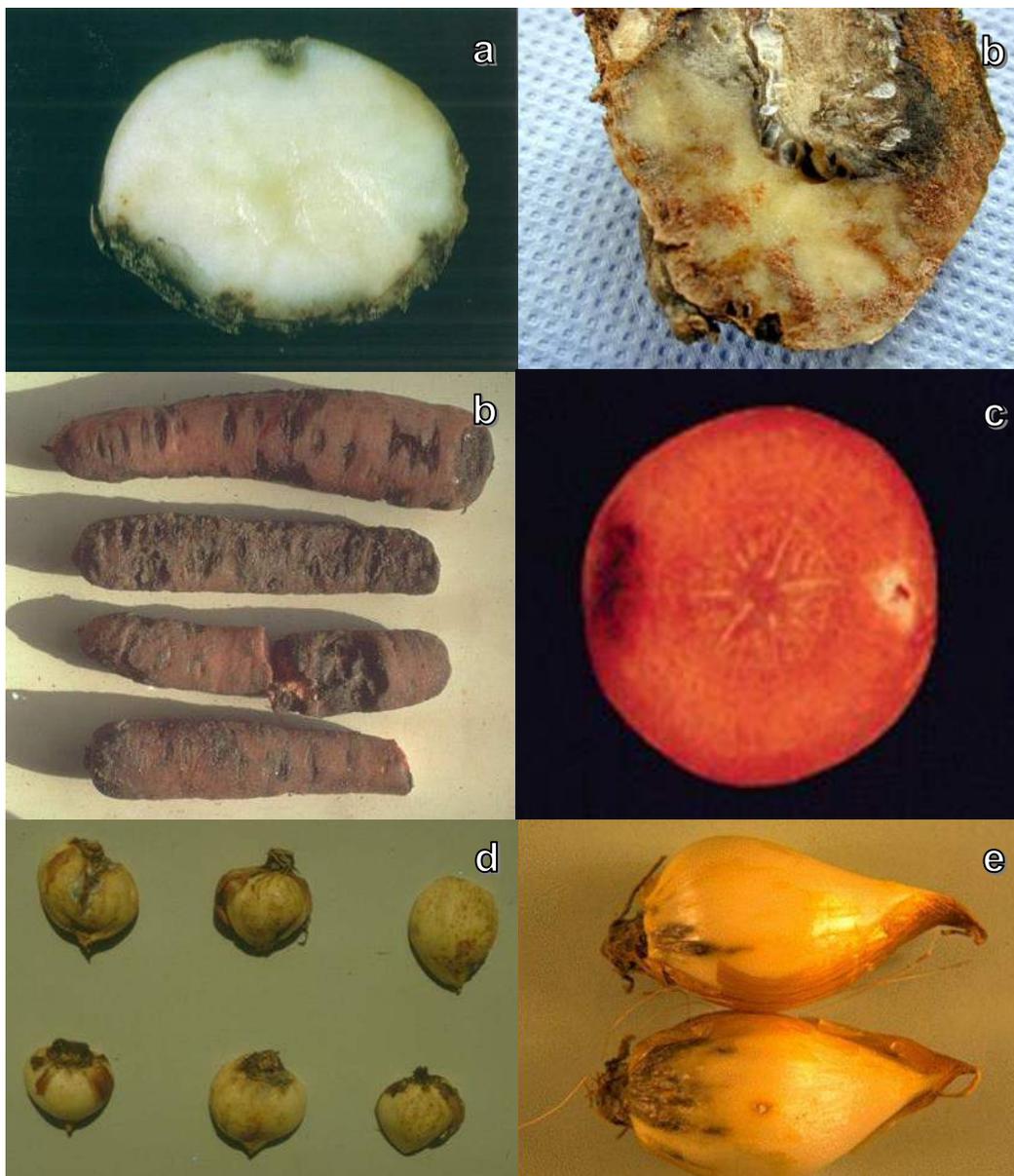


Figura 5. Síntomas en vegetales inducidos por *D. destructor*: a). Cambios de coloración de tejido en papa; b). Agrietamiento y pudrición seca en tubérculos; c) Daños superficiales en zanahoria; d) Corte transversal con manchas blanquecinas en zanahoria; d y e). Lesiones marrones sobre bulbos y cormos de ornamentales. *Créditos de imágenes:* a y b: www.gd.eppo.int; c y f: www7.inra.fr; d: www.eppo.int; y e: www.smartsite.ucdavis.edu.

8.2. Extracción de nematodos por macerado-tamizado-centrifugado-flotación



Figura 6. Procedimiento de extracción de nematodos: a). Macerado de muestra en licuadora; b). Vertido de macerado sobre tamices; c). Lavado y tamizado de muestra; d). Colecta de tamizado 450 mallas; e). Mezcla de tamizado con caolín; f). Centrifugado; g). Agregando solución azucarada, y h). Decantado y lavado de extracto de nematodos.

8.3. Tabla de caracteres morfométricos para diagnóstico

8.3.1. Caracteres para hembras

Característica	1	2	3..	..10	Prom	Rango	Des. est
Long. de cuerpo							
Diámetro de labio							
Altura de labio							
Long. de estilete							
Columna del estilete							
Cono del estilete							
M (cono*100/estilete)							
DGED							
Cabeza-metacarpus							
Cabeza-poro excretor							
Cabeza-cardia							
Cabeza-extremo posterior glándula del esófago							
Ancho máximo del cuerpo							
Cabeza-vulva							
Saco post-uterino (PUS)							
Vulva-ano (V-A)							
V-A/PUS							
Cola							
Ancho del cuerpo a nivel del ano							
% posición de vulva (V)							
<i>a</i>							
<i>b</i>							
<i>b'</i>							
<i>c</i>							
<i>c'</i>							

8.3.2. Caracteres para machos

Característica	1	2	3..	..10	Prom.	Rango	Des. est
Long. de cuerpo							
Diámetro de labio							
Altura de labio							
Long. de estilete							
Columna del estilete							
Cono del estilete							
M (cono*100/estilete)							
DGED							
Cabeza-metacarpus							
Cabeza-poro excretor							
Cabeza-cardia							
Cabeza-extremo posterior glándula esófago							
Ancho máximo de cuerpo							
Cola							
Ancho del cuerpo a nivel de la cloaca							
Espícula							
Gubernáculo							
Long. testículos							
% posición testículos (T)							
<i>a</i>							
<i>b</i>							
<i>b'</i>							
<i>c</i>							
<i>c'</i>							