

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA

Área de Diagnóstico Fitosanitario Laboratorio de Nematología

Protocolo de Diagnóstico:

Globodera pallida

(Nematodo del quiste blanco 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 *Globodera pallida*. 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	1
2.3. FLUJO DE TRABAJO	3
3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN.....	4
3.1. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE NEMATODOS	4
3.1.1. <i>Extracción de quistes a partir de suelo.....</i>	<i>4</i>
3.1.2. <i>Extracción de quistes a partir de raíces.....</i>	<i>5</i>
3.1.3. <i>Extracción de quistes a partir de tubérculos</i>	<i>5</i>
3.2. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MORFOMÉTRICA	6
3.2.1. <i>Preparaciones temporales</i>	<i>6</i>
3.2.2. <i>Preparaciones permanentes</i>	<i>7</i>
3.2.3. <i>Descripción morfológica y morfométrica</i>	<i>8</i>
3.2.3.1. <i>Confusión con otras especies</i>	<i>8</i>
3.2.4. <i>Interpretación de los resultados.....</i>	<i>9</i>
3.3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	9
3.3.1. <i>Extracción de DNA a partir de quistes.....</i>	<i>9</i>
3.3.2. <i>Extracción de DNA a partir de especímenes individuales (J2 o machos).....</i>	<i>11</i>
3.3.3. <i>Verificación de la calidad del DNA</i>	<i>12</i>
3.3.4. <i>PCR punto final.....</i>	<i>12</i>
3.3.4.1. <i>Ensayo con primers específicos.....</i>	<i>12</i>
3.3.4.2. <i>Ensayo con primers generales.....</i>	<i>13</i>
3.3.4.3. <i>Ensayos de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).....</i>	<i>15</i>
3.3.5. <i>Controles para las pruebas moleculares</i>	<i>16</i>
3.3.6. <i>Interpretación de resultados para los ensayos de PCR punto final</i>	<i>17</i>
3.4. IDENTIFICACIÓN DEL PATÓGENO	17
3.4.1. <i>Verificación mediante secuenciación.....</i>	<i>17</i>
4. REGISTROS	18
5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL.....	18
6. RECONOCIMIENTO	18
7. REFERENCIAS.....	19
8. ANEXOS.....	22
8.1. SÍNTOMAS Y CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	22
8.2. EXTRACCIÓN DE QUISTES POR APARATO DE FENWICK.....	23
8.3. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS MOLECULARES.....	24
8.4. TABLA DE CARACTERES MORFOMÉTRICOS	26
8.4.1. <i>Caracteres para J2.....</i>	<i>26</i>
8.4.2. <i>Caracteres para quistes.....</i>	<i>26</i>

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntomas y características morfológicas de <i>G. pallida</i>	22
Figura 2. Proceso de extracción de <i>G. pallida</i> a partir de suelo.	23
Figura 3. Ensayo de PCR con los primers específicos ITS5/PITSp4	24
Figura 4. Ensayo de PCR los primers generales TW81/AB28.	24
Figura 5. Patrón de digestión de la región ITS1-5.8S-ITS2	25
Figura 6. Amplificación del marcador presente en el gen 28S	25

III. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Caracteres morfológicos morfométricos para la separación de <i>G. pallida</i> y otras especies relacionadas.	9
Cuadro 2. Primers específicos para la detección de <i>G. pallida</i>	12
Cuadro 3. Preparación de la mezcla de reacción para los primers ITS5/PITSp4.	13
Cuadro 4. Programa del termociclador para el ensayo con los primers ITS5/PITSp4.....	13
Cuadro 5. Primers generales para detección de <i>G. pallida</i>	13
Cuadro 6. Preparación de la mezcla de reacción para los primers TW81/AB28	14
Cuadro 7. Programa del termociclador para el ensayo con los primers TW81/AB28.	14
Cuadro 8. Primers generales para detección de <i>G. pallida</i>	14
Cuadro 9. Preparación de la mezcla de reacción para los primers D2A/D3B.	15
Cuadro 10. Programa del termociclador para el ensayo con los primers D2A/D3B.	15
Cuadro 11. Preparación de la mezcla de reacción para los ensayos de análisis de longitud de fragmentos de restricción.	16

1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO

Describir los procedimientos y metodologías para la identificación de *Globodera pallida* mediante caracterización morfológica, morfométrica y técnicas moleculares. Está dirigido a técnicos especialistas fitosanitarios autorizados 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 del quiste blanco de la papa *Globodera pallida* es considerado como una de las principales limitantes en la producción de este tubérculo en zonas de clima templado. Presenta un rango de hospedantes limitado a papa (*Solanum tuberosum* L.), berenjena (*S. melongena* L.), jitomate (*S. lycopersicum* L.), dulcamara (*S. dulcamara* L.), belladona (*Hyoscyamus niger* L.) y experimentalmente en tabaco NC-95. Se encuentra distribuida en Sudamérica (Bolivia, Chile, Venezuela, Perú, Ecuador, Colombia), Centro y Norteamérica (Panamá, Canadá y EUA), África (Algeria, Tunisia), Oceanía (Nueva Zelanda) y en varios países de Europa (Subbotin et al., 2010). La detección de este nematodo en EUA constituyó una amenaza seria y las pérdidas fueron estimadas en 2.5 billones de dólares.

La importancia de este nematodo radica en su alto índice de reproducción, agresividad, a la dificultad para controlarlo una vez establecido en el campo y que no existen variedades resistentes (Skantar et al., 2007). Por ello, varios países a nivel mundial consideran a este patógeno dentro de sus regulaciones fitosanitarias con una clasificación de alto riesgo y como especie cuarentenaria. *G. pallida* tiene la capacidad de sobrevivir en ausencia de hospederos hasta 30 años como quiste y es fácilmente dispersado por el movimiento del suelo así como por material propagativo infestado (EPPO, 2017).

Esta especie no se encuentra presente en México por lo que es considerada como cuarentenaria y ha sido objeto de atención por parte de la SAGARPA con el objetivo de establecer las regulaciones necesarias para evitar su ingreso y dispersión en el territorio nacional.

2.2. Información taxonómica (Handoo & Subbotin, 2018)

Nombre científico: *Globodera pallida* Stone, 1973
Sinónimos: *Heterodera pallida* Stone, 1973
Heterodera (Globodera) pallida Stone, 1973
Nematodo del quiste blanco de la papa (Español)

Nombres comunes:

Pale potato cyst nematode (Inglés)

Potato cyst nematode (Inglés)

Nématode blanc de la pomme de terre (Francés)

Posición taxonómica:

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

Phylum: Nematoda

Clase: Secernentea

Subclase: Diplogasteria

Orden: Tylenchida

Suborden: Hoplolaimina

Superfamilia: Hoplolaimoidea

Familia: Heteroderidae

Subfamilia: Heteroderinae

Género: *Globodera*

Especie: *Globodera pallida*

Con base a la filogenia de la Subunidad pequeña (SSU-18S) del rDNA (De Ley et al., 2006; Margullis y Chapman, 2010):

Dominio: Eukarya

Reino: Animalia

Phylum: Nematoda

Clase: Chromadorea

Subclase: Chromadoria

Orden: Rhabditida

Suborden: Hoplolaiminae

Superfamilia: Hoplolaimoidea

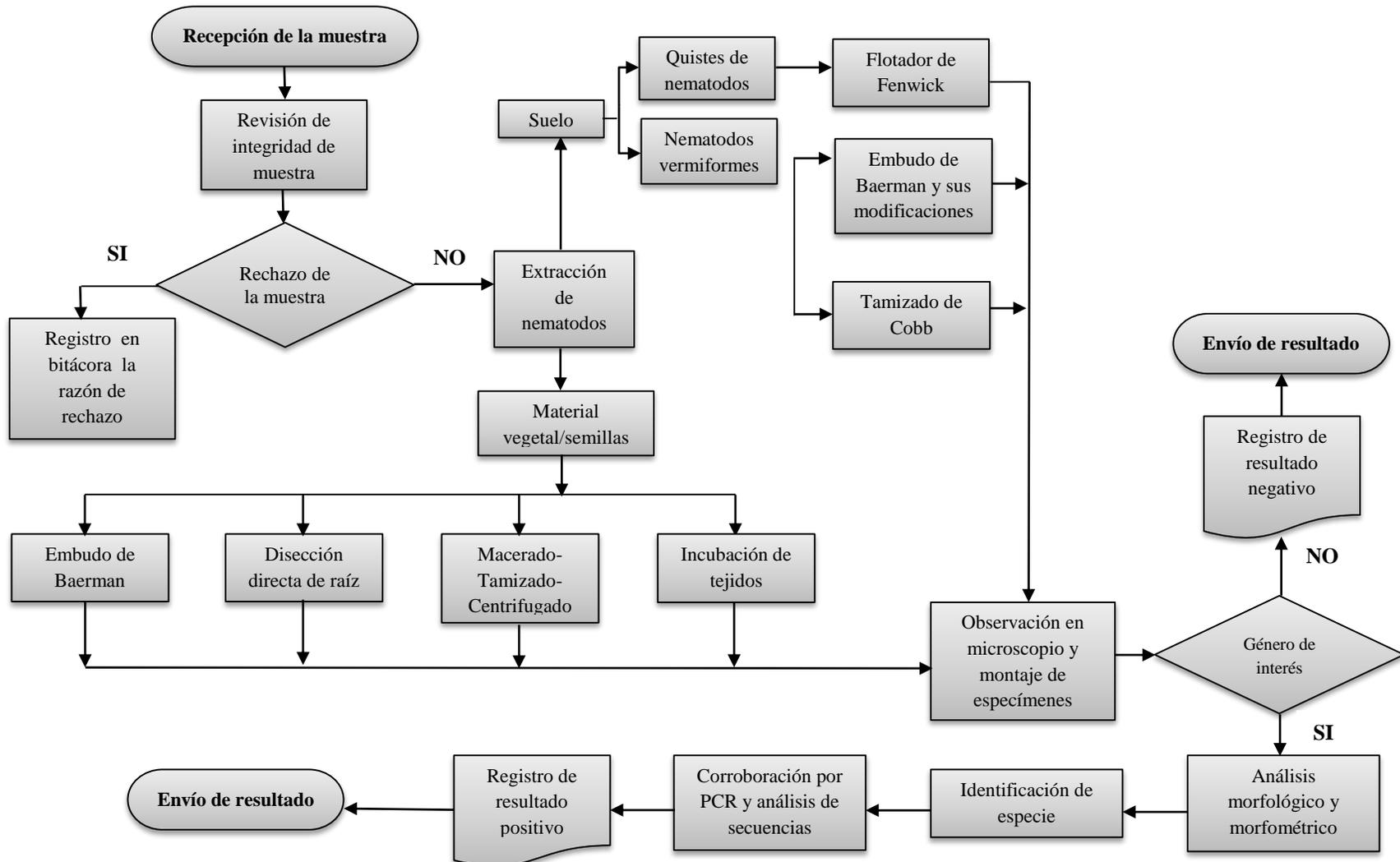
Familia: Heteroderidae

Subfamilia: Heteroderinae

Género: *Globodera*

Especie: *Globodera pallida*

2.3. Flujo de trabajo



3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Los nematodos enquistados son un grupo de fitopatógenos de importancia mundial debido a que tienen la capacidad de retener los huevos dentro del cuerpo de la hembra y está, al completar su ciclo de vida, se convierte en un quiste. Los J2 dentro de los huevos y estos dentro del quiste, pueden permanecer latentes hasta por 30 años, protegidos de condiciones adversas del ambiente o de la acción química de los plaguicidas (Subbotin et al., 2010).

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 mercancías de origen vegetal”, la muestra a analizar para nematodos consiste en 200 tubérculos.

3.1. Procedimiento de extracción de nematodos

En el caso de que la muestra no cumpla con las características requeridas o se encuentre en mal estado, se registran en la bitácora y se conservan las imágenes fotográficas correspondientes para justificar el motivo por el cual no pudo ser procesado.

3.1.1. Extracción de quistes a partir de suelo

La extracción de quistes a partir de suelo seco (Figura 2) se realiza por medio del Aparato de Fenwick. El método se basa en la propiedad de los quistes secos para flotar en el agua, debido al aire presente en su interior así como al tamaño y las diferencias de peso de las partículas (Bezooijen, 2006). El requisito fundamental es que el suelo esté completamente seco.

Procedimiento de acuerdo con el método de Bezooijen (2006) modificado:

- 1) Secar el suelo sobre papel a 23 ± 3 °C por el tiempo que sea necesario, evitando corrientes de aire.
- 2) Eliminar piedras y residuos vegetales que pudieran estar presentes.
- 3) Enjuagar con agua a presión, el flotador de Fenwick, la coladera de malla abierta y los tamices de 20, 60 y 100 mallas (850, 250 y 150 μ m, respectivamente) para evitar contaminación entre muestras.
- 4) Colocar el tapón al Aparato de Fenwick y ubicar los tamices en torre (de mayor a menor abertura) debajo de la salida de agua.

- 5) Llenar el Aparato con agua hasta el cuello, colocar encima el colador de malla abierta y depositar sobre este 300 g de suelo.
- 6) Poner agua a flujo constante sobre el suelo hasta que en su totalidad atraviese de colador.
- 7) Lavar el material de flotación (quistes, materia orgánica, semillas de malezas, etc.) retenido en el tamiz de 20 mallas sobre los dos restantes y lo retenido en el tamiz de 60 lavarlo y transferirlo al tamiz de 100 mallas.
- 8) Colocar una tira de papel sanita dentro de un vaso de precipitados de 1 L y cuidadosamente agregar agua para adherir el papel a las paredes del vaso. Asegurarse que el nivel del agua sobrepase la mitad de la altura del papel.
- 9) Vaciar el material de flotación, recuperado en el tamiz de 100, cuidadosamente al vaso de precipitados con ayuda de una piceta con agua.
- 10) Agregar dos gotas de Tween 20 para romper la tensión superficial del agua y permitir que las partículas del material de flotación se desplacen y se adhieran a la superficie del papel.
- 11) Retirar lentamente el papel del vaso y extenderlo sobre una superficie plana (placa de acrílico o vidrio).
- 12) Secar por 20 min y proceder a su observación bajo el microscopio estereoscópico para la detección de quistes.

3.1.2. Extracción de quistes a partir de raíces

En muestras de raíz se puede realizar la extracción de quistes maduros mediante disección directa. Las raíces son separadas del suelo, de ser necesario, enjuagar cuidadosamente para evitar el desprendimiento de los quistes. Observando bajo el microscopio estereoscópico, se extraen individualmente los quistes con ayuda de pinzas y aguja de disección. El aislamiento de machos y los estadios juveniles (J2, J3 y J4) pueden llevarse a cabo mediante macerado-tamizado-centrifugado-flotación.

3.1.3. Extracción de quistes a partir de tubérculos

El material propagativo (semilla-tubérculo) y el tubérculo para consumo humano son las principales formas de dispersión de *G. pallida* por lo que es necesario analizar la totalidad de la muestra (200 y 400 tubérculos, respectivamente) mediante cepillado-lavado (SENASICA,

2008), haciendo énfasis en los puntos de crecimiento (ojos o yemas) (Carta et al., 2005). El procedimiento se describe a continuación:

- 1) Colocar todos los tubérculos en un recipiente y lavarlos individualmente con la ayuda de un cepillo de cerdas suaves y agua corriente, haciendo énfasis en los puntos de crecimiento debido a que en esos lugares es en donde pueden quedarse adheridas las partículas de suelo y los quistes.
- 2) Verter el producto del lavado (agua, suelo, restos de cutícula) sobre los tamices de 20, 60 y 100 mallas.
- 3) Descartar el producto retenido en el tamiz de 20, lavar y transferir el producto del tamiz de 60 sobre el de 100 mallas.
- 4) Colectar el producto retenido en el tamiz de 100 y transferirlo a un papel filtro colocado en un embudo con el objetivo de secar el material a temperatura ambiente.
- 5) Revisar el material retenido en el papel filtro bajo el microscopio estereoscópico.

3.2. Identificación morfológica y morfométrica

Es necesario realizar el análisis morfológico y morfométrico de al menos 10 quistes y 10 juveniles (J2) o machos para obtener una fuente de variación aceptable de acuerdo a los parámetros descritos en el punto 8.5, por lo cual es necesario realizar montajes temporales y permanentes.

3.2.1. Preparaciones temporales

La observación en el microscopio de los ejemplares J2 y machos se realiza por medio de montajes temporales de acuerdo con el procedimiento descrito a continuación:

- 1) Transferir los nematodos a una gota de agua destilada estéril sobre un portaobjetos, preferentemente, cóncavo.
- 2) Relajar a los ejemplares con calor sin matarlos, con la ayuda de un mechero de alcohol hasta que ya no presente movimiento.
- 3) Transferir 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.

- 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 y etiquetar las preparaciones con los datos de la muestra.
- 5) Observar los ejemplares bajo el microscopio compuesto, obtener los datos morfométricos y la evidencia fotográfica requerida en el punto 8.5.

3.2.2. Preparaciones permanentes

Las preparaciones permanentes se realizan con los quistes extraídos verificando bajo microscopio compuesto que las características de diagnóstico se encuentren claramente visibles.

Procedimiento de acuerdo con Van Bezooijen (2006):

- 1) Colocar una gota de agua sobre un portaobjetos limpio y transferir el quiste.
- 2) Cortar al quiste por la mitad con un bisturí o navaja, separando la región anterior para realizar las pruebas moleculares.
- 3) Transferir la región posterior a un portaobjetos con una gota de ácido láctico 45%.
- 4) Limpiar suavemente con un pescador de cerda gruesa el contenido interno del quiste, hasta lograr visualizar la región fenestral.
- 5) Delimitar, tanto como sea posible, el patrón fenestral, en forma de un cuadrado o rectángulo.
- 6) Enjuagar el corte dos a tres veces en glicerina pura deshidratada.
- 7) Transferir el corte, con ayuda de un pescador, a una gota de glicerina pura deshidratada.
- 8) Depositar el patrón fenestral al fondo de la gota de glicerina con la parte cóncava hacia la superficie del portaobjetos y colocar alrededor de la glicerina de tres a cuatro secciones pequeñas de parafina grado histopatología o un anillo de cera.
- 9) Colocar, con ayuda de una pinza, un cubreobjetos redondo (18 mm).
- 10) Sellar la laminilla colocándola sobre una placa térmica (85-90°C) y evitar burbujas de aire en la glicerina y parafina.

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

3.2.3. Descripción morfológica y morfométrica

La identificación morfológica de *G. pallida* puede iniciar desde la observación de la coloración de los quistes, los cuales son de color marrón oscuro a diferencia de *G. rostochiensis* que tiene una tonalidad marrón dorado. Las hembras en proceso de enquistarse presentan una coloración blanca, ligeramente amarillentas y finalmente, marrón claro a oscuro brillante (Figura 1d) (Subbotin et al., 2010).

Los caracteres morfométricos de *G. pallida* de acuerdo con Granek (1955), Green (1971), Greet (1972), Golden y Ellington (1972), Hesling (1973), Mulvey (1973), Hesling y Ellis (1974), Mulvey y Golden (1983) y Baldwin y Mundo-Ocampo (1991) son los siguientes:

Quiste: Longitud sin cuello: $579 \pm 70 \mu\text{m}$, ancho: $534 \pm 66 \mu\text{m}$, longitud del cuello: $188 \pm 20 \mu\text{m}$, diámetro de la fenestra: $24.5 \pm 5 \mu\text{m}$; distancia entre el ano y fenestra: $50 \pm 13.4 \mu\text{m}$; radio de Granek: 2.2 ± 1 ; número de estrías entre la fenestra y el ano: 8 a 20 (promedio 13); patrón de estrías sinuosas casi rectas (Figura 1b y c).

J2: Longitud del cuerpo: $486 \pm 2.8 \mu\text{m}$; ancho a nivel del poro excretor: $19.3 \pm 0.9 \mu\text{m}$; estilete: $23 \pm 1.0 \mu\text{m}$ con nódulos basales robustos proyectados hacia la región anterior (Figura 1d); cola: $51.1 \pm 2.8 \mu\text{m}$; ancho del cuerpo a nivel del ano: $12.1 \pm 0.4 \mu\text{m}$; longitud de región hialina de la cola: $26.6 \pm 4.1 \mu\text{m}$.

Machos: Longitud del cuerpo: $1200 \pm 100 \mu\text{m}$; ancho del cuerpo a nivel del poro excretor: $28.4 \pm 1.0 \mu\text{m}$; estilete: $27.5 \pm 1.0 \mu\text{m}$; DGED: $3.0 \pm 1.0 \mu\text{m}$; cola: $52 \pm 1.4 \mu\text{m}$; ancho del cuerpo a nivel de la cloaca: $13.5 \pm 2.1 \mu\text{m}$; espículas: $36.3 \pm 4.1 \mu\text{m}$, sin bursa.

3.2.3.1. Confusión con otras especies

Otras especies de *Globodera* pueden llegar a confundirse con *G. pallida* como *G. rostochiensis*, el complejo *G. tabacum* (*G. t. tabacum*, *G. t. virginiae*, *G. t. solanacearum*), *G. ellingtonae*, *G. achilleae* y *G. artemisiae*. Es importante señalar que únicamente *G. rostochiensis*, *G. pallida* y *G. ellingtonae* son parásitos en papa, sin embargo, las otras especies pueden ser parásitos de malezas y es posible encontrarlas en las áreas de cultivo. Las especies *G. achilleae* y *G. artemisiae* se encuentran presentes en países de Europa y no hay reportes de su presencia en Canadá, EUA y México. Por otro lado, *G. ellingtonae* se reportó en campos de papa en Oregon, EUA (Subbotin et al., 2010). Con la morfometría del patrón fenestral y de los J2 pueden discriminarse las especies antes mencionadas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Caracteres morfológicos morfométricos para la separación de *G. pallida* y otras especies relacionadas (Baldwin y Mundo-Ocampo, 1991; Handoo et al., 2012).

Especie	Nódulos del estilete en J2	No. de estrías en el espacio ano-fenestra vulvar	Radio de Granek (µm)
<i>G. rostochiensis</i>	Redondos	16-31(>14)	1.3-9.5 (> 3)
<i>G. pallida</i>	Robustos y ligeramente proyectados hacia la parte anterior	8-20 (< 14)	1.2-3.5 (<3)
<i>G. tabacum</i>	Ligeramente proyectados hacia la parte anterior	10-14	1-4.2 (< 2.8)
<i>G. achilleae</i>	Redondos	4-11 (< 10)	1.3-1.9 (1.6)
<i>G. artemisiae</i>	Redondos	-----	0.8-1.7 (1.0)
<i>G. ellingtonae</i>	Redondos y ligeramente proyectados hacia la parte anterior	13± 2.31 (10-18)	2.37 ± 0.37 (1-69 - 3.0)

3.2.4. Interpretación de los resultados

Una vez obtenidos los datos de morfología y morfometría, se procede a su análisis y comparación con los descritos en el punto 3.2.3., de encontrarse en los rangos para *G. pallida* se procede a la realización de las pruebas moleculares.

3.3. Identificación molecular

Se recomienda el uso de al menos dos marcadores moleculares. El diagnóstico molecular de *G. pallida* incluye la extracción de DNA, amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA, una región específica del ITS, el empleo del marcador molecular presente en el gen 28S (segmentos de expansión D2 y D3) y el análisis de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).

3.3.1. Extracción de DNA a partir de quistes

Antes de iniciar la extracción de DNA es importante confirmar que los quistes contengan masas de huevos viables para asegurar una extracción exitosa. En algunas ocasiones los huevos solo cuentan con el corion, sin J2 en su interior, lo que dificulta la extracción de DNA.

El procedimiento de acuerdo con Yu et al. (2011) con algunas modificaciones se describe a continuación:

- 1) Limpiar los residuos de suelo adheridos a los quistes y se colocan en tubos de microcentrífuga estériles de 1.5 mL. La extracción se puede realizarse incluso a partir de un solo quiste.

- 2) Adicionar 150 μ L de solución buffer de extracción (200 mM Tris-HCl, pH 8.0, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS) y centrifugar por 5 segundos.
- 3) Macerar con un pistilo estéril con la ayuda de un taladro manual en 3 o 4 pulsaciones de 6 seg.
- 4) Congelar a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min.
- 5) Volver a macerar con otro pistilo estéril antes de que descongele la solución.
- 6) Agregar 0.5 vol. de Acetato de Sodio pH 5.8 3 M.
- 7) Mezclar por inversión.
- 8) Incubar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min.
- 9) Descongelar y dar vortex.
- 10) Centrifugar a 18,539 g por 5 min.
- 11) Transferir el sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 mL.
- 12) Adicionar 1 vol. de isopropanol frío ($4 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- 13) Mezclar por inversión.
- 14) Incubar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min.
- 15) Centrifugar a 18,539 g por 15 min para precipitar el DNA.
- 16) Eliminar el sobrenadante teniendo cuidado de no perder la pastilla del DNA.
- 17) Lavar la pastilla con 200 μ L de etanol al 70 % a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 18) Centrifugar a 18,539 g por 5 min.
- 19) Eliminar el sobrenadante teniendo cuidado de no eliminar la pastilla del DNA.
- 20) Lavar la pastilla con 200 μ L de etanol al 70 % a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- 21) Centrifugar a 18,539 g por 5 min.
- 22) Eliminar el sobrenadante teniendo cuidado de no eliminar la pastilla del DNA.
- 23) Lavar la pastilla con 200 μ L de etanol al 100 % a -20 °C.
- 24) Centrifugar a 18,539 g por 5 min.
- 25) Eliminar el sobrenadante teniendo cuidado de no eliminar la pastilla del DNA.
- 26) Dejar secar la pastilla a temperatura ambiente (23 ± 2 °C).
- 27) Resuspender el DNA en 20 μ L en agua estéril libre de nucleasas y usar 5 μ L por reacción de PCR.

Nota: se transformaron 13,200 revoluciones por minuto (rpm) a fuerzas G (gravidades) descritos en Yu et al. (2011) para una centrifuga Eppendorf 5417c, rotor F 45-30-11 (radio 9.5 cm).

3.3.2. Extracción de DNA a partir de especímenes individuales (J2 o machos)

Este método de extracción de DNA (lisis celular) fue originalmente propuesto por Williams et al. (1992) a partir de nematodos fijados con formalina y posteriormente modificado por el CNRF. El procedimiento consiste en:

- 1) Después de realizar el análisis morfométrico, recuperar los nematodos del medio de montaje agua-agar.
- 2) Colocar un espécimen en 13 μ L de buffer de extracción (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.45 % Tween 20; 0.05 % gelatina, Proteinasa K grado RNA 60 μ g/mL) 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 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 una vez durante este periodo.
- 7) Incubar a 95 °C por 15 min (para inactivar a la proteínasa K).
- 8) Conservar a 4 °C.
- 9) Dar un golpe de minicentrífuga para concentrar el producto.

3.3.3. Verificación de la calidad del DNA

Para el caso de la extracción de DNA total por el método de Yu et al. (2011), es importante que al finalizar el proceso de extracción se verifique la calidad y cantidad del DNA obtenido; para ello, se puede utilizar un espectrofotómetro modelo NanoDrop 2000c de Thermo Scientific™ (seguir las instrucciones del manual del fabricante para su uso) u otro equipo con la misma funcionalidad.

La calidad óptima del DNA está dada por la absorbancia $A_{260/280} = 1.8 - 2.0$ y $A_{260/230} = 2.0 - 2.2$. Para verificar su integridad es necesario cargar 5 μL de DNA y visualizar mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1 %. Se recomienda usar un marcador de masas para estimar la cantidad de DNA extraído (Tapia-Tussell et al., 2009).

3.3.4. PCR punto final

La amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA y su análisis RFLP, así como el empleo del marcador molecular presente en el gen 28S (segmentos de expansión D2 y D3), este último con fines de secuenciación, pueden ser aplicados para la identificación molecular de *G. pallida*.

3.3.4.1. Ensayo con primers específicos

La utilidad práctica del marcador molecular ITS en la caracterización y diagnóstico de especies de nematodos de importancia cuarentenaria ya ha sido demostrada. Este procedimiento está basado en los estudios realizados por Bulman y Marshall (1997) y Skantar et al. (2007) con algunas modificaciones (Cuadro 2).

Cuadro 2. Primers específicos para la detección de *G. pallida*.

Tipo	Nombre del primer	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Sentido	ITS5	5-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3	265
Antisentido	PITSp4	5'-ACAACAGCAATCGTCGAG-3'	

1) Preparar la reacción de PCR punto final de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Preparación de la mezcla de reacción para los primers ITS5/PITSp4.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer PCR	10 X	1 X	2.5
MgCl ₂	50 mM	3.0 mM	1.5
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5
Primer ITS5	10 µM	1.0 µM	2.5
Primer PITSp4	10 µM	1.0 µM	2.5
Taq DNA Pol	5 U/µL	2.5 U	0.25
DNA	-----	-----	5.0
Agua grado biología molecular	-----	-----	10.25
Volumen final			25

2) A continuación, programar el termociclador de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 4:

Cuadro 4. Programa del termociclador para el ensayo con los primers ITS5/PITSp4.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	2 minutos	1
Desnaturalización	94 °C	30 segundos	34
Alineamiento	60 °C	30 segundos	
Extensión	72 °C Rampeo a 0.5 °C/seg	45 segundos	
Extensión final	72 °C	5 minutos	1

3) Los productos de PCR deben correrse 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 método adaptable que permita la interpretación de los resultados.

3.3.4.2. Ensayo con primers generales

La detección de *G. pallida* puede realizarse mediante la amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA utilizando los primers TW81 y AB28 (Joyce et al., 1994; Howlett et al., 1992; Skantar et al., 2007).

Cuadro 5. Primers generales para detección de *G. pallida*.

Tipo	Nombre del primer	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Sentido	TW81	-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-	980
Antisentido	AB28	-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-	

1) Preparar la reacción de PCR punto final de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Preparación de la mezcla de reacción para los primers TW81/AB28

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer PCR	10 X	1 X	5.0
MgCl ₂	50 mM	3.0 mM	3.0
dNTP's	10 mM	0.2 mM	1.0
Primer TW81	10 µM	0.4 µM	2.0
Primer AB28	10 µM	0.4 µM	2.0
Taq DNA Pol	5U/ µl	2.5 U	0.5
DNA	-----	-----	5.0
Agua grado biología molecular	-----	-----	31.5
Volumen final			50

2) A continuación, programar el termociclador de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 4:

Cuadro 7. Programa del termociclador para el ensayo con los primers TW81/AB28.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	3 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	45 segundos	35
Alineamiento	53 °C	30 segundos	
Extensión	72 °C Rampeo a 0.5 °C/seg	90 segundos	
Extensión final	72 °C	5 minutos	1

3) 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.

La amplificación de los segmentos de expansión D2 y D3 del gen 28S del rDNA de *G. pallida* puede realizarse con los primers D2A y D3B (Courtright et al., 2000) se obtiene un producto de 800 pb.

Cuadro 8. Primers generales para detección de *G. pallida*.

Tipo	Nombre del primer	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Sentido	D2A	-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-	800
Antisentido	D3B	-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-	

- 1) Preparar la reacción de PCR punto final para el par de primers D2A/D3B de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 9.

Cuadro 9. 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
MgCl ₂	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

- 2) Programar el termociclador de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Programa del termociclador para el ensayo con los primers D2A/D3B.

Etapa	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 a 0.5 °C/seg	1 minuto	
Extensión final	72 °C	5 minutos	1
Conservación	4 °C	∞	

- 3) 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.

3.3.4.3. Ensayos de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

El fragmento amplificado de 980 pb obtenido con los primers AB28 & TW81 es digerido de manera independiente con las enzimas de restricción *RsaI* y *AluI* (Invitrogen®) como se describe a continuación:

- 1) Etiquetar los tubos de microcentrífuga de 200 µL con los datos de la muestra y de la enzima de restricción correspondiente.

- 2) Descongelar los buffers y la enzima a utilizar.
- 3) Considerar 20 μL como volumen final en la siguiente proporción: 7 μL de agua destilada estéril libre de DNAsas y RNAsas, 2 μL del buffer de la enzima (10X), 1 μL de la enzima (10 U/ μL), 10 μL del producto de PCR.
- 4) Incubar los tubos a 37 °C en un termociclador por 2.5 h.
- 5) Correr los productos digeridos mediante electroforesis horizontal. Utilizando un gel de agarosa ultrapura-1000 2.5 % y considerar dos controles positivos: producto de PCR no digerido y control positivo digerido.

Cuadro 11. Preparación de la mezcla de reacción para los ensayos de análisis de longitud de fragmentos de restricción.

Reactivos	Volumen (μL)
Agua grado biología molecular	7
Buffer de la enzima (10X)	2
Enzima (10U/ μL)	1
Producto de PCR	10
Volumen final	20

Los patrones de restricción de *G. pallida* con las enzimas *RsaI* y *AluI* son, en ambos casos, de dos fragmentos: 600, 380 pb y 550, 380 pb, respectivamente (Figura 5).

3.3.5. Controles para las pruebas moleculares

En todos los ensayos de PCR punto final descrito 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 se comparan los resultados positivos de las muestras. Utilizar DNA plasmídico de *G. pallida* que será proporcionado por el CNRF previa solicitud de los laboratorios o personas interesadas.

En el caso del análisis RFLP es necesario incluir:

Control positivo en la digestión: Permite tener un patrón de referencia para verificar el proceso de digestión y comparar las bandas. Digerir el control positivo amplificado.

Control positivo en la electroforesis de la digestión: Ofrece una referencia del tamaño y número de fragmentos digeridos. Se incluye la digestión del producto de PCR del control positivo con los primers TW81/AB28.

Control positivo en la electroforesis de la digestión: Permite la comparación del fragmento obtenido y la eficiencia de la enzima de restricción sobre los productos de PCR.

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

Los resultados serán válidos solamente bajo los siguientes criterios:

- El control negativo no debe de generar bandas en ningún ensayo de PCR.
- El control positivo para el ensayo de PCR con el par de primers ITS5/PITSp4 debe de generar una banda de tamaño de 265 pb aproximadamente (Figura 3).
- El control positivo para el ensayo de PCR con el par de primers TW81/AB28 debe de generar una banda de tamaño de 980 pb aproximadamente (Figura 4) y su digestión con las enzimas *RsaI* y *AluI* deben generar dos fragmentos: 600, 380 pb y 550, 380 pb, respectivamente (Figura 5).
- El control positivo para el ensayo de PCR con el par de primers D2A/D3B debe de generar una banda de 800 pb (Figura 6).
- Se consideran como resultados positivos aquellas muestras que amplifiquen el fragmento de 980 pb con los primers TW81/AB28 y su digestión corresponda a los observados en los controles positivos.
- Para los primers específicos ITS5/PITSp4 se considera como resultado positivo aquellas muestras que amplifiquen el fragmento de 265 pb.
- El resultado es negativo si no hay amplificación de productos en los pesos correspondientes a los primers utilizados, o si el patrón de digestión no corresponde a los fragmentos esperados.

3.4. Identificación del patógeno

Considerando el estatus cuarentenario de *G. pallida*, para reportar una identificación positiva de este nematodo debe sustentarse con las siguientes pruebas: caracterización morfológica-morfométrica y la amplificación positiva del ensayo de PCR punto final con los primers generales, sus respectivas digestiones enzimáticas y la amplificación positiva del ensayo de PCR punto final con los primers específicos ITS5/ PITSp4.

3.4.1. Verificación mediante secuenciación

Se recomienda secuenciar los fragmentos obtenidos en los ensayos de PCR punto final con los primers ITS5/PITSp4, TW81/AB28 y D2A/D3B. El análisis molecular de nematodos fitopatógenos, con al menos dos marcadores, provee de un diagnóstico molecular robusto (Subbotin et al., 2010; 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 *G. pallida* 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 Zárate).

7. REFERENCIAS

- Baldwin, J. G. and Mundo-Ocampo, M. (1991). Heteroderinae, cyst- and non-cyst-forming nematodes. In: Nickle, W. R. (Ed.). *Manual of Agricultural Nematology*. Marcel Dekker, New York, USA. pp. 275-362.
- Benson, A. D., Mark, C. K. C., Karsch-Mizrachi I., Lipman, J. D., Ostell, J., and Sayers, W. E. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research* 41: 36-42.
- Bulman, S. R., and Marshall, J. W. (1997). Differentiation of Australasian potato cyst nematode (PCN) populations using the polymerase chain reaction (PCR). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 25, 123–129.
- Carta, L. K., Handoo, Z. A., Powers, T. O., Miller, S. A. Pérez-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 fresh water nematodes. In: Eyualem-Abebe, Andrásy, I. and Traunspurger, W. (Eds.). *Freshwater nematodes, Ecology and Taxonomy*. (pp. 3-30). Wallingford, UK, CABI Publishing.
- EPPO. (2017). PM 7/40 (4) *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. EPPO Bulletin 47 (2), 174–197.
- Golden, A. M., and Ellington, D. M. S. (1972). Redescription of *Heterodera rostochiensis* (Nematoda: Heteroderidae) with key and notes on closely related species. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 39, 64-78.
- Granek, L. (1955). Additional morphological differences between the cyst of *Heterodera rostochiensis* and *Heterodera tabacum*. *Plant Disease Reporter*, 39, 716-718.
- Green, C. D. (1971). The morphology of the terminal area of the round-cyst nematodes S.G. *Heterodera rostochiensis* and allied species. *Nematologica* 17, 34-46.
- Greet, D.N. (1972). Electrophoresis and morphometrics of the round cyst nematode. *Annals of Applied Biology*, 71, 283-286.
- Handoo, Z. A., Carta, L. K., Skantar, A. M. and Chitwood, D. J. (2012). Description of *Globodera ellingtonae* n. sp. (Nematoda: Heteroderidae) from Oregon. *Journal of Nematology*, 44 (1), 40–57.
- Handoo, Z. A. and Subbotin, S. A. (2018) Taxonomy, identification and principal species En: Perry, R. N., Moens, M. and Jones, J. T. (Eds.) *Cyst Nematodes* (pp. 365-398). Oxfordshire, UK: CAB International.
- Hesling, J. J. (1973). The estimation of Granek's ratio in round cyst *Heterodera*'s. *Nematologica*, 19, 119-120.

- Hesling, J. J. and P. R. Ellis. 1974. The fenestralia of *Heterodera rostochiensis* and *H. pallida*. *Nematologica*, 20, 43-51.
- Howlett, B. J., Brownlee, A. G., Guest, D. I., Adcock, G. J., and McFadden, G. I. (1992). The 5S ribosomal RNA gene is linked to large and small subunit ribosomal RNA genes in the oomycetes, *Phytophthora virginiae*, *P. cinnamomi*, *P. megaspera* f. sp. *glycinae* and *Saprolegnia ferax*. *Current Genetics*, 22, 455–461.
- Joyce, S. A., Reid, A., Driver, F., and Curran, J. (1994). Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to identification of entomopathogenic nematodes. in A. M. Burnell, R.-U. Ehlers and J. P. Masson, (Eds.) *COST 812 Biotechnology. Genetics of Entomopathogenic Nematode-Bacterium complexes: proceedings of Symposium and Workshop, St. Patrick's College, Maynooth, Co.* (pp. 178–187). Kildare, Ireland and National reports.
- Margullis, L. and Chapman, J. (2009). *Kingdoms and domains. An illustrated guide to the phyla of life on earth*. London, UK. Academic Press.
- Mulvey, R. H. and A. Golden M. (1983). An illustrated key to the cyst forming genera and species of Heteroderidae in the Western hemisphere with species morphometrics and distribution. *Journal of Nematology* 11, 159-176.
- Mulvey, R.H. (1973). Morphology of the Terminal area of White Females and Cysts of the Genus *Heterodera* (s. g. *Globodera*). *Journal of Nematology*. 5, 303-311.
- Siddiqui, M. R. (2000). *Tylenchida: parasites of plants and insects*. CABI Bioscience, St Albans, UK. 2nd edition. 835 p.
- Skantar, A. M., Handoo, Z. A., Carta, L. K., and Chitwood, D. J. 2007. Morphological and molecular identification of *Globodera pallida* associated with potato in Idaho. *Journal of Nematology*, 39: 133–144.
- Subbotin, S. A., Mundo-Ocampo, M. and Baldwin, J. G. (2010). Systematics of cyst nematodes (Nematoda: Heteroderinae). Vol 8A. In: Hunt, D. and Perry, R. N., (Eds). *Nematology monographs and perspectives*. Koninklijke Brill NV, Leiden, The Netherlands.
- Tapia-Tussell, R., Magaña G. J., Cortes, V. A., Higerá, C. I. y Pérez-Brito, D. (2009). Protocolos para la detección molecular de fitopatógenos y organismos genéticamente modificados. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Mérida, Yucatán, México.
- 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.

- 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.
- Yu, H., Chronis D., Lu, S. and Wang, X. (2011). *Chorismate mutase*: an alternatively spliced parasitism gene and a diagnostic marker for three important *Globodera* nematode species. *European Journal of Plant Pathology* 129: 89-102.

Forma recomendada de citar:

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2018). Protocolo de Diagnóstico: *Globodera pallida* (Nematodo del quiste blanco de la papa) [Versión 1.0]. Tecámac, México: Autor.

8. ANEXOS

8.1. Síntomas y características morfológicas

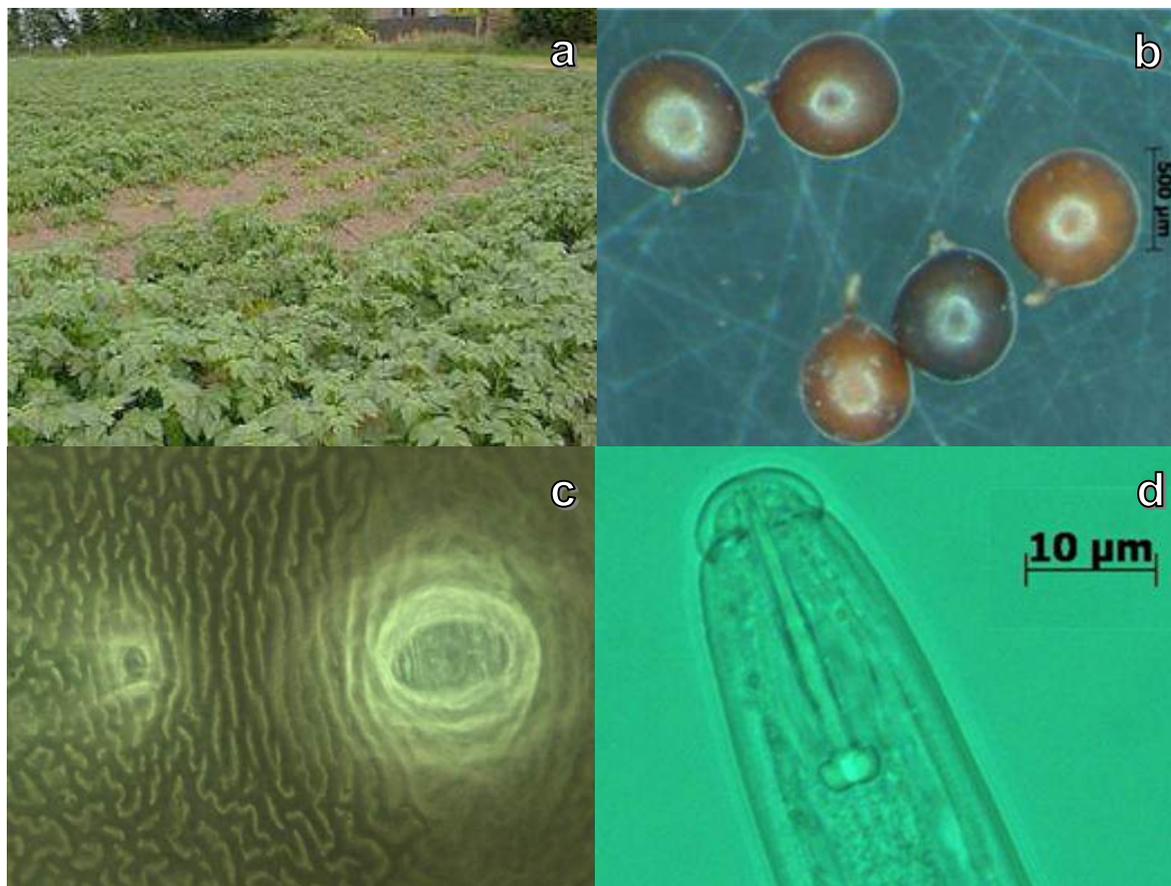


Figura 1. Síntomas y características morfológicas de *G. pallida*. a). Áreas con reducción de crecimiento de plantas atacadas por nematodos enquistados; b). Quistes de *G. pallida* observados bajo microscopio estereoscópico; c). Corte fenestral; d). Detalle de parte anterior de J2, observar forma y orientación de nódulos del estilete.

8.2. Extracción de quistes por Aparato de Fenwick



Figura 2. Proceso de extracción de *G. pallida* a partir de suelo. a) Aparato de Fenwick; b y c) Colecta de material de flotación; d-g) Recuperación de material de flotación y quistes; h) Material de flotación recuperado en papel sanita; i) Quistes detectados en material de flotación.

8.3. Resultados de los ensayos moleculares

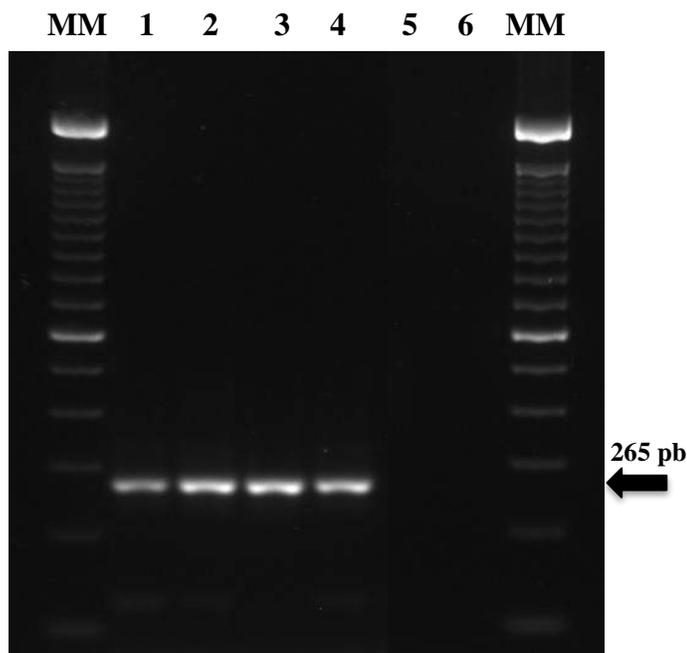


Figura 3. Ensayo de PCR con los primers específicos ITSS5/PITSp4. MM: Marcador molecular 100 pb (Invitrogen); 1 y 2: DNA de *G. pallida*; 3 y 4: Control positivo de *G. pallida* (DNA plasmídico); 5 y 6: Control negativo.

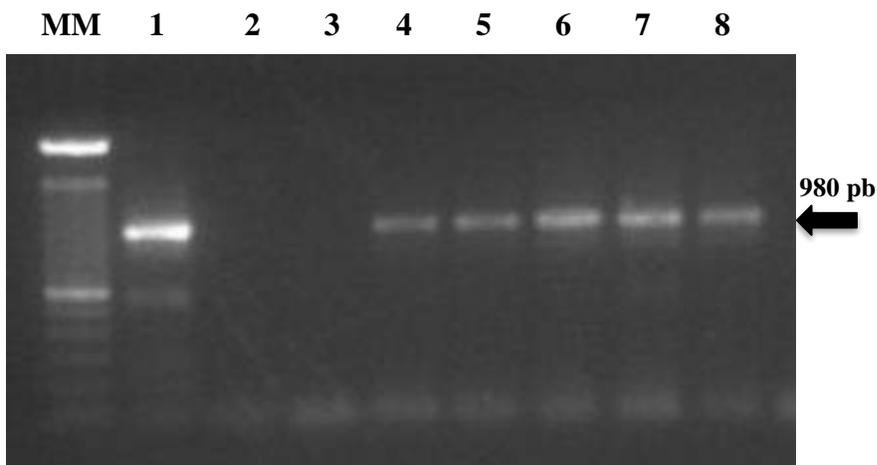


Figura 4. Ensayo de PCR los primers generales TW81/AB28. MM: Marcador molecular 100 pb (Invitrogen); 1: Control positivo de *G. pallida* (DNA plasmídico); 2 y 3: Control negativo; 4-8: DNA de *G. pallida*.

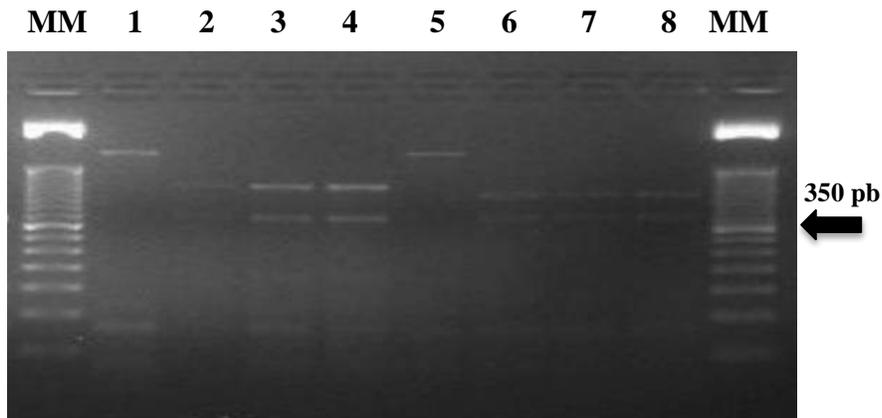


Figura 5. Patrón de digestión de la región ITS1-5.8S-ITS2. MM: Marcador molecular 50 pb (Invitrogen); 1 y 5: Control positivo (PCR sin digerir); 2,3 y 6,7: Digestiones de *G. rostochiensis*; 4 y 8: Control positivo (PCR digerido): 1-4: *RsaI*; 5-8: *AluI*.

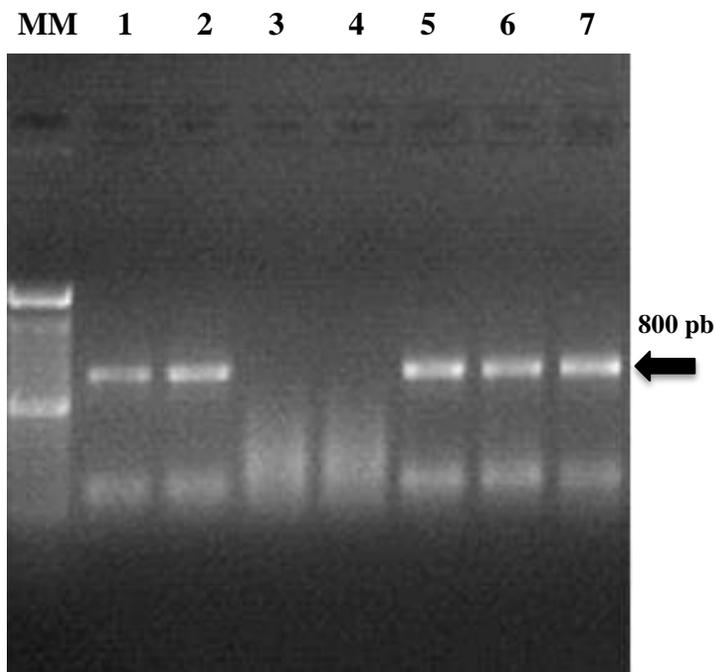


Figura 6. Amplificación del marcador presente en el gen 28S. MM. Marcador molecular 100 pb (Invitrogen); 1-2: Control positivo de *G. pallida* (DNA plasmídico); 3-4: Control negativo; 5-7: DNA de *G. pallida*.

8.4. Tabla de caracteres morfométricos

8.4.1. Caracteres para J2

Característica	1	2	3..	..10	Promedio	Rango	Des. est
Long. cuerpo (L)							
Ancho del cuerpo a la altura del poro excretor (ACPE)							
Long. región cefálica (LRC)							
Long. del estilete (LE)							
Long. de la cola (LC)							
Ancho de la cola a nivel del ano (ACNA)							
Long. Región hialina de la terminal de la cola (LRHTC)							

8.4.2. Caracteres para quistes

Característica	1	2	3..	..10	Promedio	Rango	Des. est
Long. del cuerpo excluyendo el cuello (L)							
Ancho del cuerpo (AC)							
Distancia del ano a la orilla de la fenestra (DAF) (AC)							
Diámetro de la fenestra (LF)							
No. de estrías entre vulva-ano (NEVA)							
Radio de Granek							