

## Primer reporte de *Meloidogyne enterolobii* parasitando tomate en Culiacán, Sinaloa, México\*

### First report of *Meloidogyne enterolobii* infesting tomato in Culiacan, Sinaloa, Mexico

José Ángel Martínez Gallardo<sup>1</sup>, Tomás Díaz Valdés<sup>1</sup>, Raúl Allende Molar<sup>2</sup>, Raymundo Saúl García Estrada<sup>2</sup> y José Armando Carrillo Fasio<sup>2§</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Sinaloa-Facultad de Agronomía. Carretera Culiacán-Eldorado, km 17.5. Culiacán, Sinaloa. Tel: 01 66 78 46 10 84. C. P. 80000. (jose\_angel\_13@hotmail.com; tdiaz10@gmail.com). <sup>2</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Carretera Culiacán-Eldorado, km 5.5. Culiacán, Sinaloa. Tel: 01 66 77 60 55 36. C. P. 80110. (rallende@ciad.mx; rsgarcia@ciad.mx; acarrillo@ciad.mx). <sup>§</sup>Autor para correspondencia: acarrillo@ciad.mx.

#### Resumen

Durante el ciclo hortícola 2012-2013, se observó la presencia de agallas en plantas de tomate cv Ramsés (alta resistente a *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*) cultivadas en suelo y en condiciones de malla sombra en Culiacán, Sinaloa. El objetivo del presente trabajo fue determinar qué especie de *Meloidogyne* estaba causando agallamiento en las raíces de las plantas. Se colectaron raíces agalladas, y se procedió a la identificación morfológica y molecular mediante PCR para las hembras extraídas de las raíces. Basados en características morfológicas, morfométricas y confirmación por PCR, el agente causal se identificó como *Meloidogyne enterolobii*.

**Palabras clave:** *Lycopersicon esculentum*, agricultura protegida, patogenicidad.

El tomate es uno de los cultivos hortícolas más importantes en el Noroeste de México. En Sinaloa, México, en el ciclo hortícola 2012-2013 se sembraron 13 785 hectáreas, de las cuales, 2 405 correspondieron a superficie protegida (malla sombra e invernadero).

Durante los últimos diez ciclos hortícolas, se ha observado la presencia de agallas radicales en diferentes híbridos comerciales de tomate. Sin embargo, en el ciclo 2012-

#### Abstract

During 2012-2013 horticultural cycle, the presence of galls was observed in tomato plants cv Ramses (high resistant to *M. incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*) grown in soil and shade mesh conditions in Culiacan, Sinaloa. The aim of this study was to determine which species of *Meloidogyne* was causing galls on the roots of plants. Galled roots were collected, and proceeded to the morphological and molecular identification by PCR for females extracted from the roots. Based on morphological, morphometric and confirmation by PCR, the causative agent was identified as *Meloidogyne enterolobii*.

**Keywords:** *Lycopersicon esculentum*, pathogenicity, protected agriculture.

Tomato is one of the most important vegetable crops in northwest Mexico. In Sinaloa, Mexico, in the horticultural cycle 2012-2013, 13 785 hectares were planted, of which 2 405 were for protected areas (shade and greenhouse mesh).

During the last ten horticultural cycles, there has been the presence of root galls on different commercial tomato hybrids. However, in the 2012-2013 cycle was observed in shade mesh conditions, damage of the nematode galls in

\* Recibido: noviembre de 2014  
Aceptado: febrero de 2015

2013, se observó en condiciones de malla sombra, el daño de agallamiento por nematodos en el híbrido de tomate indeterminado cv Ramsés, al cual lo reportan con alta resistencia al daño de las especies *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*.

Los síntomas causados por el daño de nematodos incluían achaparramiento de las plantas, presencia de agallas en la raíz y como consecuencia reducción en el rendimiento. Lo anterior indica que el daño a estas plantas podría estar causado por una especie de nematodo aún no detectada en la zona de estudio, por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue identificar la especie de nematodo agallador responsable de la enfermedad.

Se colectaron 20 sub muestras de suelo y raíces agalladas en cultivos de tomate cv Ramsés bajo malla sombra en el valle de Culiacán, las cuales se homogenizaron para formar una sola muestra (2 kg). La extracción de machos y juveniles se realizó mediante la técnica de tamiz-embudo (Cobb, 1918). Para extraer las hembras adultas de las raíces se utilizó la técnica de triturado de tejido radical y se procedió a su identificación a nivel género y especie. Los especímenes de hembras globosas, se sometieron a disección, para obtener patrones o modelos perineales. Cada uno de los patrones o modelos perineales que presentaron las hembras, se comparó con los ya reportados por Yang y Eisenback (1983).

Para la confirmación mediante técnicas moleculares de la identidad de *Meloidogyne* a nivel especie, se extrajeron 50 hembras con una aguja de disección y se depositaron en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL; posteriormente, se añadió una alícuota de 45 µL de buffer de lisis (NaOH 50mM), se sometió a lisis por calor a 95 °C por 10 min, se agregó una alícuota de 45 µL de Tris-HCl (pH 8) y se centrifugó por 3 min a 10000 rpm (Hu *et al.*, 2011); se recuperó el sobrenadante, para proceder con la PCR utilizando el par de iniciadores específicos Me-F (5'-AACTTTTGTGAAAGTGCCGCTG-3') y Me-R (5'-TCAGTTCAGGCAGGATCAACC-3'), que codifican un fragmento de la región rADN-IGS2 (Long *et al.*, 2006).

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando el sistema de PCR core systems 1 (Promega). El volumen total de la mezcla de reacción fue de 25 µL para todas las reacciones. El contenido de la mezcla de reacción fue: 10 ng de ADN genómico, 5 µL de buffer de PCR 10x, 3 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.5 µL de cada dNTP (10mM), 1 µL de cada iniciador, 0.2 µL de *Taq* polimerasa (5u/µL) y el resto de agua

the indeterminate hybrid tomato cv Ramsés, which report it with high resistance to damage of the species *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*.

The symptoms caused by nematode damage include stunting of the plants, the presence of root galls resulting reduction in yield. This indicates that, the damage to these plants could be caused by a nematode species not yet detected in the study area, therefore, the objective of this research was to identify the root-knot nematode species responsible for the disease.

We collected 20 sub samples of soil and roots galled in tomato cv Ramses under shade in the valley of Culiacan, which is homogenized to form a single sample (2 kg). The extraction of males and juveniles was performed by screen-funnel technique (Cobb, 1918). To remove adult females from the roots, we used the crushed-tissue technique and proceeded to identification, genus and species level. Globose females specimens were dissected, for perineal patterns or models. Each of the patterns or models presented perineal females as compared with those reported by Yang and Eisenback (1983).

For confirmation though molecular techniques of the identity of *Meloidogyne*, 50 females were extracted with a dissecting needle and placed in a microcentrifuge tube 1.5 mL; subsequently, an aliquot of 45 mL of lysis buffer (NaOH 50mM) was lysed by heating at 95 °C for 10 min, an aliquot of 45 mL of Tris-HCl (pH 8) was added and centrifuged for 3 min at 10 000 rpm (Hu *et al.*, 2011); the supernatant was recovered, to proceed with PCR using specific primers pair of Me-F (5'-AACTTTTGTGAAAGTGCCGCTG-3') and Me-R (5'-TCAGTTCAGGCAGGATCAACC-3'), encoding a portion of the region rDNA-IGS2 (Long *et al.*, 2006).

PCR reactions were performed using the PCR Core Systems system 1 (Promega). The total volume of the reaction mixture was 25 uL for all reactions. The content of the reaction mixture was: 10 ng of genomic DNA, 5 uL of 10 x PCR buffer, 3 uL of MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.5 l of each dNTP (10 mM), 1 uL of each primer, 0.2 uL *Taq* polymerase (5u/microL) and the rest of sterile nanopure water. DNA amplification was performed in a thermocycler (BIO-RAD T100) under the following amplification conditions: 94 °C for 2 min, 35 cycles of 94 °C for 30 s, 64 °C for 30 s, 68 °C for 1 min, followed by a final extension at 72 °C for 5 min.

An aliquot of the PCR product was visualized in a gel of 1% agarose, stained with 1 ml of ethidium bromide (10 mg mL<sup>-1</sup>), transillumination (Benchtop UV). The positive

nanopura estéril. La amplificación del ADN se llevó a cabo en un termociclador (BIO-RAD T100), bajo las siguientes condiciones de amplificación: 94 °C por 2 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 64 °C por 30 s, 68 °C por 1 min, seguidos de una extensión final a 72 °C por 5 min.

Una alícuota del producto de PCR se visualizó, en un gel de agarosa al 1%, teñido con 1  $\mu$ L de bromuro de etidio (10 mg mL<sup>-1</sup>), en un transiluminador (Benchtop UV). La respuesta positiva se definió como una banda visible de 256 pb. Adicionalmente, se evaluó la densidad de población de *Meloidogyne* en el suelo colectado y se realizó una prueba para confirmar la patogenicidad de los nematodos sobre el cv Ramsés.

La prueba de patogenicidad se realizó en 30 plántulas de tomate cv Ramsés de 4 semanas de edad, en macetas que contenían 5 kg de sustrato formado por suelo (estéril) y fibra de coco en relación 3:1, a las que se les aplicó una dosis de inóculo de 15 larvas por 100 g de suelo. En plantas testigo solo se agregó agua destilada. Las plantas se mantuvieron dentro de un invernadero a 28 °C y 70% de HR, se regaron cuando fue necesario y se aplicó una dosis de fertilizante (10 meq L<sup>-1</sup> de NO<sub>3</sub>, 1.5 meq L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 meq L<sup>-1</sup> de SO<sub>4</sub>, 8 meq L<sup>-1</sup> de K, 6 meq L<sup>-1</sup> de Ca y 5 meq L<sup>-1</sup> de Mg) al inicio del experimento.

La población de nematodos en la muestra colectada fluctuó entre 300 y 315 larvas por cada 100 g de suelo. Los juveniles (J2) se caracterizaron por ser vermiformes anillados, con extremos ahusados, de 406.3-469.9  $\mu$ m de largo. Los machos son vermiformes, ligeramente anillados hacia adelante y redondeados de la parte posterior, de tamaño variable, donde el estilete osciló entre 21.3 y 24.9  $\mu$ m. Las hembras son anilladas con campos laterales blancos y de forma piriforme, de tamaño variable. La relación entre la distancia de la cabeza al poro excretor osciló de 4.1 a 4.5  $\mu$ m, ubicándose a nivel del metacorpus. La longitud del estilete fue de 13.0-17.8  $\mu$ m. Los patrones perineales fueron de ovoides a redondeados, con el arco moderadamente alto y redondeado. Las características morfológicas y morfométricas coinciden con lo reportado por la EPPO en 2011, para *M. enterolobii* (Yang y Eisenback, 1983) o su sinónimo *M. mayaguensis* (Rammah y Hirschmann, 1988).

En los ensayos de patogenicidad, la formación de agallas y síntomas de daño por nematodos fue observado a los 45 días después de la inoculación. Se realizó la extracción de nematodos, se confirmaron las características morfológicas y la identificación por PCR se realizó en hembras del nematodo tomadas directamente de las agallas formadas,

response was defined as a visible band of 256 bp. Additionally, the population density of *Meloidogyne* in the collected soil was evaluated and a test was performed to confirm the pathogenicity of nematodes on cv Ramsés.

The pathogenicity test was performed in 30 tomato seedlings cv Ramsés 4 weeks old, grown in pots containing 5 kg of substrate formed of soil (sterile) and coir in 3: 1 ratio, which was applied one inoculum dose of 15 larvae per 100 g soil. In control plants, only distilled water was added. The plants were kept in a greenhouse at 28 °C and 70% RH, watered when necessary and a dose of fertilizer was applied (10 meq L<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub>, 1.5 meq L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 meq L<sup>-1</sup> of SO<sub>4</sub>, 8 meq L<sup>-1</sup> of K, 6 meq L<sup>-1</sup> of Ca and 5 meq L<sup>-1</sup> of Mg) at the start of the experiment.

The nematode population in the sample collected fluctuated between 300 and 315 larvae per 100 g of soil. The juveniles (J2) were characterized as vermiform ringed with tapered ends, 406.3-469.9 microns long. The males are vermiform, ringed forward and slightly rounded back, resizable, where the stylus ranged between 21.3 and 24.9 microns. Females are ringed with white lateral fields and piriform shape, resizable. The relationship between the distances from head to excretory pore ranged from 4.1 to 4.5  $\mu$ m, settling at metacorpus level. The length of the stylet was 13.0-17.8 microns. Perineal patterns were ovoid to rounded with rounded moderately high arc. The morphological and morphometric characteristics are similar to those reported by EPPO in 2011 to *M. enterolobii* (Yang and Eisenback, 1983) or its synonym *M. mayaguensis* (Rammah and Hirschmann, 1988).

In pathogenicity tests, galling and nematode injury symptoms was observed at 45 days after inoculation. Nematode extraction was performed, and the morphological identification by PCR was performed in female nematode taken directly from the formed galls confirmed, thus, confirming the pathogenicity of *M. enterolobii*. In control plants no damage was observed by nematode. The experiment was repeated under the same conditions and similar results were obtained.

Although, *M. enterolobii* has been detected in several countries including Congo, Ivory Coast, Malawi, Senegal, South Africa, USA, Brazil, Costa Rica, Cuba, Guatemala, Martinique, Trinidad and Tobago, Venezuela and France, and in crops like: *Capsicum annuum* L., *Citrullus lanatus* L., *Coffea arabica* L., *Glycine max* L., *Ipomoea batatas* L., *Solanum lycopersici* L., *Nicotiana tabacum* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Psidium vulgaris* L., *Psidium guajava* L., *Solanum melongena* L. and

lo que confirmó la patogenicidad de *M. enterolobii*. En las plantas control no se observó ningún daño por nematodo. El experimento fue repetido bajo las mismas condiciones y se obtuvieron resultados similares.

Aunque *M. enterolobii* ha sido detectado en diversos países como: Congo, Costa de Marfil, Malawi, Senegal, Sudáfrica, Estados Unidos de América, Brasil, Costa Rica, Cuba, Guatemala, Martinica, Trinidad y Tobago, Venezuela y Francia, y en cultivos como: *Capsicum annuum* L., *Citrullus lanatus* L., *Coffea arabica* L., *Glycine max* L., *Ipomea batatas* L., *Solanum lycopersici* L., *Nicotiana tabacum* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Psidium vulgare* L., *Psidium guajava* L., *Solanum melongena* L. y plantas ornamentales, en México solamente existe el reporte de Ramírez *et al.* (2014) quienes identificaron a *M. enterolobii* causando daños en el cultivo de sandía en el estado de Veracruz.

## Conclusiones

El agente causal del agallamiento en plantas de tomate cv. Ramsés es *Meloidogyne enterolobii*. Hasta donde conocemos este es el primer reporte de *M. enterolobii* afectando plantas de tomate en el valle de Culiacán.

## Agradecimientos

Al fondo C003V, Programa de Estímulos a la Innovación (PEI), CONACYT modalidad PROI1, solicitud: 217682. Desarrollo de un paquete tecnológico para el manejo integral de nematodos fitopatógenos en el cultivo del tomate.

ornamental plants, in Mexico there is only reports by Ramírez *et al.* (2014) who identified *M. enterolobii* causing damage on watermelon cultivated in the State of Veracruz.

## Conclusions

The causal agent of galls on tomato plants cv. Ramses is *Meloidogyne enterolobii*. To our knowledge this is the first report of *M. enterolobii* affecting tomato plants in the valley of Culiacan.

*End of the English version*



## Literatura citada

- Cobb, N. 1918. Estimating the nematode population of soil. Department of Agriculture of EU. 1:1-48.
- Hu, M.; Zhuo, K. and Liao, J. 2011. Multiplex PCR for the simultaneous identification and detection of *Meloidogyne incognita*, *M. enterolobii* and *M. javanica* using DNA extracted directly from individual Galls. *Phytopathology*. 101:1270-1277.
- Long, H.; Liu, H. and Xu, H. 2006. Developmet of a PCR diagnostic for the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii*. *Acta Phytopathologica Sinica*. 36:109-115.
- Ramírez-Suárez, A.; Rosas-Hernández, L.; Alcasio-Rangel, S. and Powers, T. O. 2014. First report of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* parasitizing watermelon from Veracruz, Mexico. *Plant Dis*. 98:428.
- Rammah, A. and Hirschmann, H. 1988. *Meloidogyne mayaguensis* n. sp. (*Meloidogynidae*), a root-knot nematode from Puerto Rico. *J. Nematol.* 20:58-69.
- Yang, B. and Eisenback J. 1983. *Meloidogyne enterolobii* n. sp. (*Meloidogynidae*), a root-knot nematode parasitizing pacara carpod tree in China. *J. Nematol.* 15(3):381-391.