



Detección molecular rápida del nematodo agallador *Meloidogyne incognita* en raíces de café (*Coffea arabica* L.)

Rapid molecular detection of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in coffee (*Coffea arabica* L.) roots

✉ Castillo-García, Huber^{1*}

¹Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto, Perú

Recibido: 04 May. 2024 | Aceptado: 04 Jul. 2024 | Publicado: 10 Jul. 2024

Autor de correspondencia*: hcastillog@alumno.unsm.edu.pe

Cómo citar este artículo: Castillo-García, H. (2024). Detección molecular rápida del nematodo agallador *Meloidogyne incognita* en raíces de café (*Coffea arabica* L.). *Revista Agrotecnológica Amazónica*, 4(2), e737. <https://doi.org/10.51252/raa.v4i2.737>

RESUMEN

El café es uno de los productos agrícolas más relevantes a nivel global, debido a su significativo impacto económico, social y ambiental, especialmente en los países productores como el Perú. En particular, la región de San Martín sobresale por su producción de 83425 toneladas de café pergamino en un área de 81000 hectáreas. Los nematodos agalladores de la raíz, especialmente del género *Meloidogyne*, son una amenaza significativa para el cultivo de café, afectando la absorción de agua y nutrientes de las plantas. La detección precisa y rápida de estos nematodos es crucial para su control efectivo. El objetivo se basó en la detección molecular rápida del nematodo agallador *Meloidogyne incognita* en raíces de café mediante PCR con los cebadores específicos MI-F y MI-R para amplificar una banda de 999 pb. El aislamiento de ADN permitió obtener concentraciones entre 59,1 a 39,4 ng/μL y en absorbancia rangos de 1,92 a 2,00, determinándose como una buena calidad de ADN. Este estudio se centra en la detección molecular de *M. incognita* en raíces de café. Estos resultados permiten una detección precisa y rápida de nematodos en café, y de esta manera poder tener un control de este patógeno a tiempo.

Palabras clave: ADN; biología molecular; cebadores específicos; fitoparásito

ABSTRACT

Coffee is one of the most relevant agricultural products globally, due to its significant economic, social and environmental impact, especially in producing countries such as Peru. In particular, the San Martín region stands out for its production of 83425 tons of parchment coffee in an area of 81000 hectares. Root-knot nematodes, especially of the genus *Meloidogyne*, are a significant threat to coffee cultivation, affecting plant water and nutrient uptake. Accurate and rapid detection of these nematodes is crucial for their effective control. The objective was based on the rapid molecular detection of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in coffee roots by PCR with the specific primers MI-F and MI-R to amplify a band of 999 bp. The isolation of DNA allowed concentrations between 59.1 to 39.4 ng/μL and absorbance ranges from 1.92 to 2.00, being determined as good quality DNA. This study focuses on the molecular detection of *M. incognita* in coffee roots. These results allow accurate and rapid detection of nematodes in coffee, and thus be able to control this pathogen in time.

Keywords: DNA; molecular biology; specific primers; phytoparasites



1. INTRODUCCIÓN

El café representa uno de los cultivos más significativos en los países que lo siembran, generando un impacto económico, social y ambiental (ICO, 2021). Perú se destaca como el principal productor mundial de café orgánico y certificado de comercio justo. Las zonas cafetaleras que se extienden a lo largo de las laderas orientales de los Andes, abarcando 17 de las 24 regiones del país, entre estas, la región de San Martín es una de las más importantes, produciendo 83425 toneladas de café pergamino en un área de 81000 hectáreas cosechadas. A pesar de estos volúmenes, la región ha registrado baja en la productividad y una caída en los estándares de calidad del cultivo en comparación con años anteriores (MINAGRI, 2020).

La disminución en la productividad y calidad del café en San Martín se debe a múltiples limitaciones, como la baja calidad agrológica de los suelos, la presencia de fitoparásitos y las prácticas agrícolas deficientes que impiden mantener altos niveles de producción sostenida (MINAGRI, 2020). Además, muchas parcelas de café se encuentran en localidades alejadas o de difícil acceso, lo que complica la implementación de programas de nutrición del cultivo y limitan el asesoramiento técnico necesario para mejorar las prácticas agrícolas (ICO, 2021). La falta de acceso a tecnologías avanzadas y la insuficiente capacitación agravan aún más los desafíos que enfrentan los agricultores de la región (FAO, 2019).

Uno de los principales desafíos fitosanitarios que enfrenta la industria del café es la infestación por nematodos del género *Meloidogyne*, conocidos comúnmente como agalladores de la raíz (Jones et al., 2013). Estos parásitos inducen la formación de agallas en las raíces de las plantas de café, lo que interfiere significativamente con la absorción de agua y nutrientes, provocando una considerable disminución en el rendimiento y la calidad del cultivo (Elling, 2013). Se estima que la infección por nematodos puede reducir el rendimiento del café entre un 10 y 35%, llegando en algunos casos a ocasionar la destrucción total de las plantaciones (Lopez-Lima et al., 2015). No obstante, debido a la naturaleza perenne del café, es complejo determinar con precisión las pérdidas económicas asociadas a esta plaga. Al realizar estas estimaciones, es fundamental considerar no solo la reducción en la productividad, sino también el impacto en la vida útil de la plantación y los costos derivados de la sustitución de árboles no productivos (Saikai et al., 2023).

La necesidad de desarrollar métodos de detección precisos y rápidos para gestionar y controlar estos patógenos es, por lo tanto, esencial para asegurar la sostenibilidad de la producción de café (Campos & Villain, 2005). Tradicionalmente, la identificación de nematodos se ha basado en técnicas morfológicas y taxonómicas. Aunque efectivas, estas metodologías presentan limitaciones en términos de precisión y rapidez. Son procedimientos laboriosos que requieren un alto nivel de experiencia técnica para diferenciar entre especies de nematodos, lo cual puede resultar en diagnósticos erróneos (Coyne et al., 2009). En contraste, las técnicas de biología molecular han surgido como herramientas confiables para la correcta identificación de patógenos, incluyendo a los nematodos agalladores de la raíz (Chitambar et al., 2018).

Las técnicas basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) han revolucionado la detección de nematodos debido a su alta sensibilidad y especificidad (Holterman et al., 2009). Los beneficios de una detección correcta superan con creces estos obstáculos, ya que permiten una respuesta más rápida y efectiva a las infestaciones de nematodos, minimizando las pérdidas económicas y mejorando la sostenibilidad del cultivo (Janssen et al., 2016). En consecuencia, esta investigación tiene como objetivo la detección molecular rápida del nematodo agallador *M. incognita* en raíces de café (*Coffea arabica* L.).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el área de crecimiento vegetal del Laboratorio de Biología y Genética Molecular (LBGM), perteneciente a la Escuela Profesional de Agronomía de la Facultad de Ciencias Agrarias en la Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto, Perú.

Se recolectaron raíces de café con síntomas de nematodos agalladores en áreas de cultivo del distrito de Chazuta, provincia San Martín, Perú. Las muestras colectadas fueron rotuladas y transportadas al

Laboratorio de Biología y Genética Molecular (LBGM) para los análisis correspondientes. Las muestras fueron analizadas mediante el uso de un microscopio estereoscópico para determinar la presencia de masas de huevos nematodos agalladores (Figura 1A), con la intención de poder desarrollar y multiplicarlos para la extracción de ADN. Posterior a la confirmación de la presencia de los nematodos agalladores y sus respectivas masas de huevos, las raíces (Figura 1B) fueron lavadas con una solución de hipoclorito de sodio al 0,05%. Luego, se seccionaron las raíces en trozos de 10 centímetros aproximadamente y se licuaron por 3 veces con un intervalo de 30 seg cada una (Figura 1C). A continuación, se realizaron lavados con agua destilada estéril empleando 2 tamices, de 250 μm y 38 μm , colocados uno sobre otro. Luego se recolectó todo lo obtenido en el tamiz de 38 μm y se colocó en una placa Petri con maya metálica prefabricada, papel toalla y agua destilada (Figura 1D). En las placas se colocaron los huevos obtenidos y se mantuvieron durante 48 hrs para su eclosión de los huevos. Los juveniles (J_2) de *Meloidogyne* obtenidos se transfirieron a macetas con plántulas de tomate (Figura 1E) para su desarrollo y obtención de nematodos hembras (Figura 1F), durante un periodo de 3 meses en el vivero de la Facultad de Ciencias Agrarias.

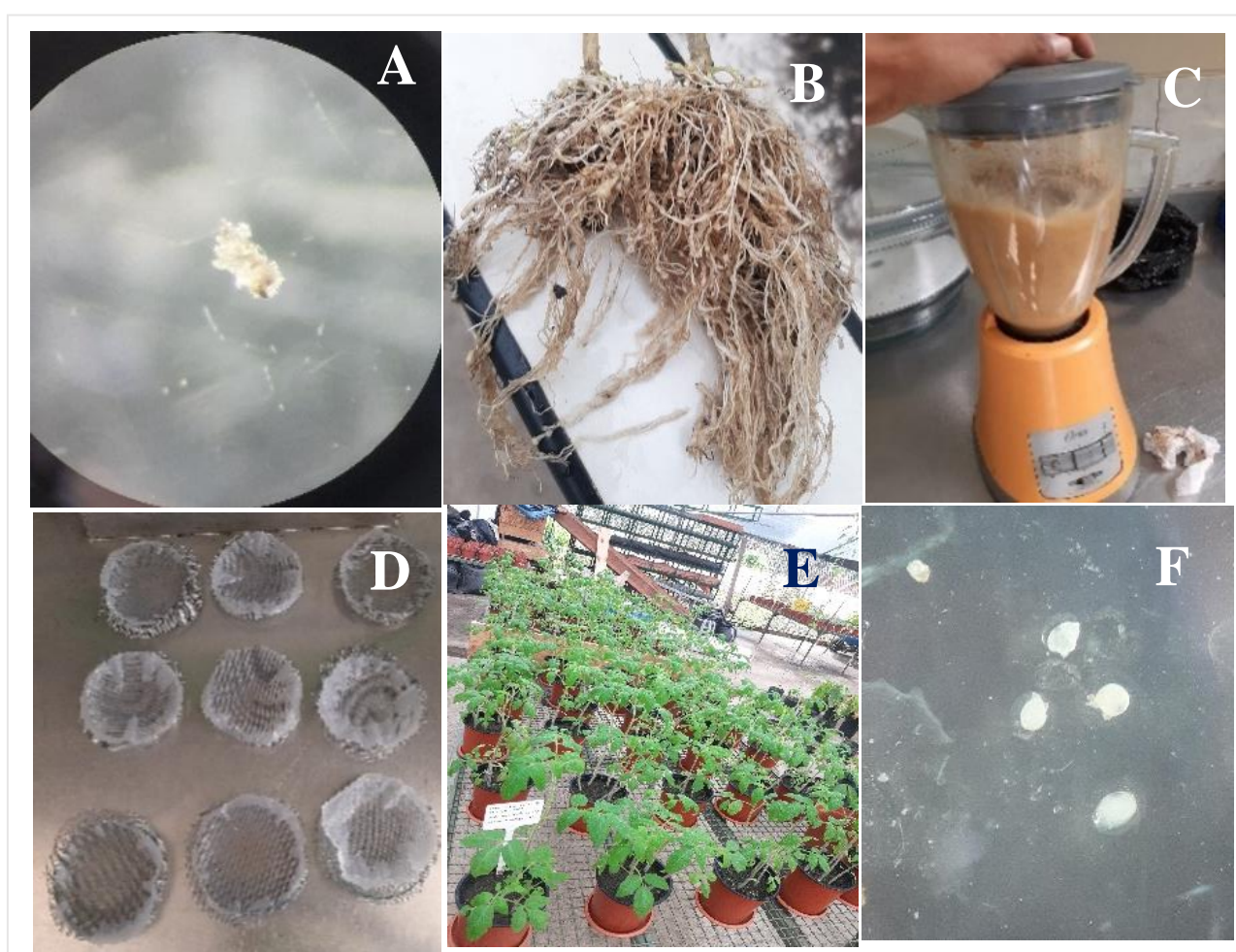


Figura 1. Proceso de aislamiento e identificación de *M. incognita*. A) Masas de huevos. B) Raíces con nódulos. C) Licuado de raíz. D) Placas para la eclosión de huevos. E) Plántulas de tomate con nematodos. F) Nematodos hembras

El ADN genómico de los nematodos se extrajo empleando 10 hembras individuales, estas se obtuvieron de las raíces de cada planta de tomate y mediante el método de bromuro de Cetiltrimetilamonio Bromuro (CTAB) propuesto por Doyle & Doyle (1987), con ligeras modificaciones. Los nematodos se colocaron en un tubo (500 μL), se añadió 300 μL de la solución CTAB al 2% y se inició a triturar hasta obtener una solución uniforme. Posteriormente se añadió 10 μL de proteinasa K y se incubaron las muestras en baño maría a 60° C durante 4 hrs. Transcurrido el tiempo establecido, se añadió 1 mL de cloroformo y se centrifugó a 8000 rpm durante 5 min. Se colectó el sobrenadante y se añadió 700 μL de isopropanol. Las

muestras fueron conservadas en frío (-20 °C) durante 8 hrs. Luego las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 min y se observó el pellet (sedimento de ADN). El pellet fue lavado en dos ocasiones con etanol al 70% y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min. El pellet se secó a temperatura ambiente y posteriormente se resuspendió con 30 µL de agua grado molecular. Las muestras fueron cuantificadas en un espectrofotómetro NanoDrop OneC y posteriormente almacenadas a -20 °C hasta su uso.

La amplificación por PCR se realizó utilizando los cebadores específicos de la región amplificada caracterizada por secuencia (SCAR), Los cebadores específicos MI-F GTGAGGATTCAGCTCCCCAG y MI-R ACGAGGAACATACTTCTCCGTCC (Qing-peng et al., 2004), de un tamaño esperado de 999 pb (pares de bases). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 10 µL de solución, 1X tampón de PCR, dNTPs 0.2 mM, MI-F 0.4 mM, MI-R 0.4 mM, enzima Taq 0,025 U/µL y se completó el volumen de la solución con agua grado molecular. El programa de amplificación por PCR incluyó una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, temperatura de hibridación a 64 °C durante 30 seg y elongación a 72 °C durante 1 min, seguida de una extensión final a 72 °C durante 5 min. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se observaron bajo iluminación UV.

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

En general, se encontró una prevalencia del 100% de *M. incognita* en raíces de café en todas las muestras analizadas del distrito de Chazuta, provincia San Martín, San Martín, Perú. Esto se comprobó mediante la observación en el microscopio estereoscópico y la detección molecular rápida por PCR. Las características que presentaron las hembras adultas fueron: el cono del estilete estaba curvado dorsalmente, y la porción anterior del cono era cilíndrica mientras que la posterior era cónica. El proceso de extracción de ADN fue exitoso teniendo una cantidad aceptable y buena calidad para el proceso de PCR (Tabla 1). Esto se entiende porque las longitudes de onda de absorbancia de 260 nm y 280 nm son utilizadas para evaluar la pureza del ADN. Una relación de 1,7 a 2,0 se considera pura para el ADN y una relación de absorbancia más baja puede indicar la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes que tienen una absorbancia cercana a los 280 nm. La relación de absorbancia a 260 y 230 nm se puede utilizar como una medida secundaria de la pureza del ADN. En este caso, una relación de ~2,0 se considera pura. Si la relación es inferior a este rango esperado, puede indicar que hay contaminantes en la muestra que absorben a 230 nm (Lucena-Aguilar et al., 2016).

Tabla 1.

Cuantificación y determinación de calidad de ADN extraído de nematodos

Muestra	ng/µL	A260/280	A260/230
M1	59,1	1,94	1,96
M2	40,4	1,92	2,00
M3	39,4	1,93	1,97
M4	54,9	1,95	1,98

Los resultados del PCR permitieron obtener bandas cercanas a 1000 pb (Figura 2), correspondientes al tamaño esperado que corresponden a los cebadores específicos MI-F y MI-R para amplificar una banda de 999 pb que confirmó la especie *M. incognita*. Los nematodos formadores de agallas en las raíces (*M. incognita*) son las plagas de nematodos más importantes en el mundo, tanto por su amplia distribución como por el alto número de familias y especies vegetales que se ven afectadas (Gelpud Chaves et al., 2011). Esta especie de parásitos vegetales obligados tienen la capacidad de infectar casi todas las plantas vasculares, tanto en agricultura protegida, en invernaderos o en el campo. Aunque tienen una amplia selección de cultivos hospedantes, los cultivos económicamente más importantes son tomate, papa y tubérculos (Wesemael et al., 2011). En este trabajo se demostró que también afecta a los cultivos de café en el distrito de Chazuta.

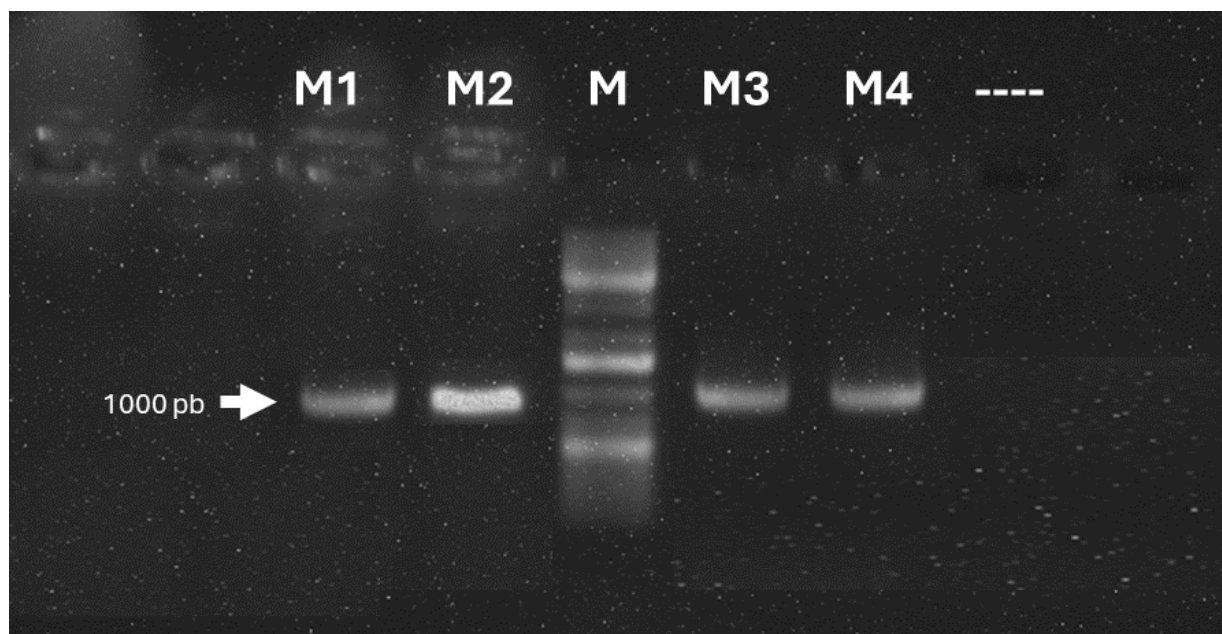


Figura 2. Productos de PCR obtenidos a partir de ADN genómico de nematodos. M1, M2, M3 y M4 corresponden a las muestras de nematodos. M corresponde a la escalera de ADN 1kb. ---- corresponde al control negativo (agua)

Los resultados permiten demostrar la capacidad de los métodos moleculares para la detección precisa y rápida de nematodos en café. Idealmente, una técnica de diagnóstico no debería limitarse a la disponibilidad de un estadio de desarrollo particular (huevos, juveniles o adultos) y debería requerir un pequeño número de individuos para proporcionar una identificación confiable de una especie dentro de un corto período de tiempo. El proceso de PCR cumple con estos requisitos ya que permite la amplificación de cantidades diminutas de ADN que pueden extraerse de nematodos individuales, huevos o juveniles. Como los estadios infectivos o J₂ de *Meloidogyne* está fácilmente disponible en el suelo en cualquier laboratorio de análisis, la identificación de esta etapa es más aplicable para realizar la caracterización de especies (Ye et al., 2015).

CONCLUSIONES

Se logró la detección molecular rápida del nematodo agallador *M. incognita* en raíces de café mediante PCR con los cebadores específicos MI-F y MI-R para amplificar una banda de 999 pb. El aislamiento de ADN permitió obtener concentraciones entre 59,1 a 39,4 ng/μL y en absorbancia rangos de 1,92 a 2,00, determinándose como una buena calidad de ADN. Estos resultados permiten una detección precisa y rápida de nematodos en café, y de esta manera tener un mejor control de este patógeno a tiempo.

FINANCIAMIENTO

El autor no recibió patrocinio para llevar a cabo este estudio-artículo.

CONFLICTO DE INTERESES

No existe ningún tipo de conflicto de interés relacionado con la materia del trabajo.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Conceptualización, curación de datos, análisis formal, investigación, metodología, supervisión, validación, redacción - borrador original, y redacción - revisión y edición: Castillo-García, H.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Campos, V. P., & Villain, L. (2005). Nematode parasites of coffee and cocoa. En *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture* (pp. 529–579). CABI Publishing.
<https://doi.org/10.1079/9780851997278.0529>
- Chitambar, J. J., Westerdahl, B. B., & Subbotin, S. A. (2018). *Plant Parasitic Nematodes in California Agriculture* (pp. 131–192). https://doi.org/10.1007/978-3-319-99585-4_6
- Coyne, D. L., Fourie, H. H., & Moens, M. (2009). Current and future management strategies in resource-poor farming. En *Root-knot nematodes* (pp. 444–475). CABI.
<https://doi.org/10.1079/9781845934927.0444>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*, 19(1), 11–15.
- Elling, A. A. (2013). Major Emerging Problems with Minor Meloidogyne Species. *Phytopathology*, 103(11), 1092–1102. <https://doi.org/10.1094/PHTO-01-13-0019-RVW>
- FAO. (2019). *The State of Food and Agriculture - 2019*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/state-of-food-agriculture/2019/pt/>
- Gelpud Chaves, C., Mora Marcillo, E., Salazar González, C., & Betancourth Garcia, C. (2011). Susceptibilidad de genotipos de Solanum spp. al nematodo causante del nudo radical Meloidogyne spp. (chitwood). *Acta Agronómica*, 60(1), 50–67.
https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/21157
- Holterman, M., Karssen, G., van den Elsen, S., van Megen, H., Bakker, J., & Helder, J. (2009). Small Subunit rDNA-Based Phylogeny of the Tylenchida Sheds Light on Relationships Among Some High-Impact Plant-Parasitic Nematodes and the Evolution of Plant Feeding. *Phytopathology*, 99(3), 227–235.
<https://doi.org/10.1094/PHTO-99-3-0227>
- ICO. (2021). *Coffee Development Report 2021*. <https://www.ico.org/documents/cy2022-23/coffee-development-report-2021.pdf>
- Janssen, T., Karssen, G., Verhaeven, M., Coyne, D., & Bert, W. (2016). Mitochondrial coding genome analysis of tropical root-knot nematodes (Meloidogyne) supports haplotype based diagnostics and reveals evidence of recent reticulate evolution. *Scientific Reports*, 6(1), 22591.
<https://doi.org/10.1038/srep22591>
- Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G. J., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G. K., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J. E., Wesemael, W. M. L., & Perry, R. N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14(9), 946–961.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12057>
- Lopez-Lima, D., Sánchez-Nava, P., Carrion, G., Espinosa de los Monteros, A., & Villain, L. (2015). Corky-root symptoms for coffee in central Veracruz are linked to the root-knot nematode Meloidogyne paranaensis, a new report for Mexico. *European Journal of Plant Pathology*, 141(3), 623–629.
<https://doi.org/10.1007/s10658-014-0564-9>
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 14(4), 264–270.
<https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>
- MINAGRI. (2020). *Análisis de la producción de café en el Perú*. Ministerio de Agricultura y Riego.
- Qing-peng, M., Hai, L., & Jian-hua, X. (2004). PCR Assays for Rapid and Sensitive Identification of Three

- Major Root-Knot Nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 34(3), 204–210. <http://zwblxb.magtech.com.cn/EN/Y2004/V34/I3/204>
- Saikai, K. K., Oduori, C., Situma, E., Njoroge, S., Murunde, R., Kimenju, J. W., Miano, D. W., Haukeland, S., & Coyne, D. (2023). Biocontrol-based strategies for improving soil health and managing plant-parasitic nematodes in coffee production. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1196171>
- Wesemael, W., Viaene, N., & Moens, M. (2011). Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Europe. *Nematology*, 13(1), 3–16. <https://doi.org/10.1163/138855410X526831>
- Ye, W., Zeng, Y., & Kerns, J. (2015). Molecular Characterisation and Diagnosis of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.) from Turfgrasses in North Carolina, USA. *PLOS ONE*, 10(11), e0143556. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143556>