



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**  
**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**PROGRAMA DE POSTGRADO EN FITOSANIDAD**

**FITOPATOLOGÍA**

**“IDENTIFICACIÓN INTEGRAL  
DE POBLACIONES DE  
*Ditylenchus dipsaci* s. s.  
EN MÉXICO”**

**LEONEL ROSAS HERNÁNDEZ**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**


**2018**


**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Leonel Rosas Hernández, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dr. Cristian Nava Díaz, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis IDENTIFICACIÓN INTEGRAL DE POBLACIONES DE Ditylenchus dipsaci s. s. EN MÉXICO

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 30 de julio de 2018

  
Firma del  
Alumno (a)

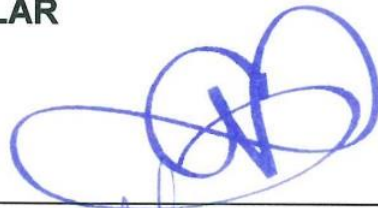
  
Dr. Cristian Nava Díaz  
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: IDENTIFICACIÓN INTEGRAL DE POBLACIONES DE *Ditylenchus dipsaci* s. s. EN MÉXICO, realizada por el alumno: Leonel Rosas Hernández, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS  
POSTGRADO EN FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO (A)



DR. CRISTIAN NAVA DÍAZ

ASESOR (A)



DR. JOSÉ ABEL LÓPEZ BUENFIL

ASESOR (A)



DRA. REYNA ISABEL ROJAS MARTÍNEZ

ASESOR (A)



DRA. DULCE ALEJANDRA ROUGON CARDOSO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Agosto 2018

# IDENTIFICACIÓN INTEGRAL DE POBLACIONES DE *Ditylenchus dipsaci* s. s. EN MÉXICO

Leonel Rosas Hernández, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2018

## RESUMEN

Durante 2013-2017, se colectaron y analizaron muestras de suelo agrícola, plantas de alfalfa y ajo con síntomas de amarillamiento y deformaciones en tejidos aéreos para una identificación integral de los nematodos involucrados. La identificación a nivel especie de cuatro poblaciones de nematodos (una de alfalfa y tres de ajo) incluyeron características morfológicas, medición de caracteres con microscopía de luz, microscopía electrónica de barrido y el análisis filogenético con 3 marcadores moleculares: ITS1-5.8S-ITS2, gen 28S del rRNA, *COI* del mtDNA. Basado en estas características se identificó a *Ditylenchus dipsaci* sensu stricto. El PCR-RFLP de la región ITS1-5.8S-ITS2, utilizando *RsaI*, produjo dos patrones de corte distintos (335, 280, 200, 132 pb y 335, 280, 132 pb) y el análisis estadístico a través del método de varianza mínima de Ward con 25 características morfométricas de hembras, permitieron la diferenciación de los patotipos alfalfa y ajo.

**Palabras clave:** *Ditylenchus dipsaci*, alfalfa, ajo, PCR-RFLP, *COI*, mtDNA, 28S, ITS, *RsaI*, Ward, varianza mínima.

**INTEGRAL IDENTIFICATION OF POPULATIONS OF *Ditylenchus dipsaci* s. s.  
FROM MEXICO**

Leonel Rosas Hernández, M. Sc.

Colegio de Postgraduados, 2018

**ABSTRACT**

During 2013-2017, soil and plant samples of alfalfa and garlic cultivars that showed foliage yellowing and deformations were collected and analyzed for an integral identification of nematodes. Identification at species level of four nematode populations (one of alfalfa and three of garlic) included morphological characteristics, characters measurement with light microscopy, scanning electron microscopy and a phylogenetic analysis using 3 molecular markers: ITS1-5.8S-ITS2, 28S gene of the rRNA, *COI* gene of the mtDNA. Based on these characteristics, *Ditylenchus dipsaci* sensu stricto was identified. PCR-RFLP analysis of the ITS1-5.8S-ITS2 region using *RsaI*, produced two different cutting patterns (335, 280, 200, 132 bp and 335, 280, 132 bp) and the statistical analysis using Ward minimum variance method with 25 morphometric characteristics of females, allowed us to differentiate alfalfa and garlic pathotypes.

**Key words:** *Ditylenchus*, *dipsaci*, alfalfa, garlic, PCR-RFLP, *COI*, mtDNA, 28S, ITS, *RsaI*, Ward, minimum variance.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento brindado y con el cual puede realizar mis estudios de maestría.

Al Dr. Cristian Nava, por compartir sus conocimientos sobre nematología agrícola, su dirección, sugerencias y su apoyo total para el desarrollo y conclusión del presente proyecto de investigación.

A los Drs. Reyna Isabel Rojas, Dulce Alejandra Rougón, José Abel López por la codirección, sus atinadas correcciones y sugerencias sobre el escrito de investigación.

Al Dr. Sergio Aranda, por su amistad y disponibilidad para fungir como Sinodal Interno y realizar la revisión del escrito.

Al Dr. José Abel López y a los M. en C. Gustavo Torres, María del Rocío Hernández y Japhet Torres por las facilidades otorgadas para el acceso, uso de equipos, materiales y reactivos del Laboratorio de Nematología agrícola del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, los cuales fueron indispensables para el desarrollo de esta investigación.

A la Biol. Salomé Alcasio por el entrenamiento recibido durante varios años sobre el área de diagnóstico molecular aplicado a nematodos fitopatógenos.

A los coordinadores centrales y al personal técnico de campo del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria quienes apoyaron en la logística, la colecta y envío de muestras para sus análisis.

A mis colegas y amigos de Fitopatología con quienes compartí no solo días sino conocimientos, alegrías y desventuras, y a todas aquellas personas que directa e indirectamente pusieron su granito de arena para alentarme a retomar y completar una etapa más de mi formación profesional.

A mi familia: mis padres: **Antonio Rosas** y **Paulina Hernández**, que aun estando lejos, siempre estuvieron alentándome para concluir esta meta. Deseo que este logro lo sientan también como propio; a mis hermanos: **Anita, Lauris, Tere** y **Beto**....nunca será demasiado tarde para cumplir nuestras metas y sueños.

## DEDICATORIA

Para ti *corazón*, **Janeth Lozano Galicia**, por elegirme para compartir esta aventura llamada vida, por alentarme a iniciar y concluir esta meta, por tu comprensión y apoyo infinitos y por la agradable compañía durante esas madrugadas de edición.

Para ti **Itzé..... *Mi amanecer personal!!!***

## CONTENIDO

RESUMEN .....	iv
ABSTRACT .....	v
AGRADECIMIENTOS .....	vi
DEDICATORIA.....	vii
LISTA DE CUADROS .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1.    Objetivo general.....	3
2.2.    Objetivos particulares .....	3
3. REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
3.1.    Importancia agrícola y económica .....	4
3.2.    Distribución geográfica .....	6
3.3.    Taxonomía de <i>Ditylenchus</i> y características de <i>D. dipsaci</i> .....	6
3.3.1    Morfología.....	6
3.3.1.1    Microscopía electrónica de barrido.....	7
3.3.1.2    Morfometría.....	7
3.4.    Variabilidad fisiológica .....	9
3.4.1    Patotipos y prueba de hospedantes diferenciales .....	9
3.5.    Identificación molecular .....	12
3.5.1    Análisis por PCR .....	12
3.5.2    Análisis por PCR-RFLP .....	13
3.5.3    Análisis por AFLP .....	14
3.6.    Manejo.....	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	17
4.1.    Localización de áreas de estudio y colecta de muestras .....	17
4.2.    Extracción de nematodos .....	18
4.3.    Identificación taxonómica.....	18
4.3.1    Morfología, morfometría y microscopía electrónica .....	19
4.3.2    Análisis estadístico .....	20
4.4.    Caracterización molecular .....	20
4.4.1    Extracción de DNA .....	20



4.4.2	Amplificación y análisis PCR-RFLP de la región ITS1-5.8S-ITS2 .....	21
4.4.3	Amplificación y secuenciación de la región ITS1-5.8S-ITS2, gen 28S rDNA, gen <i>COI</i> mtDNA y gen <i>Hsp90</i> .....	22
4.4.4	Análisis filogenético .....	23
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	25
5.1.	Extracción de especímenes.....	25
5.2.	Identificación taxonómica.....	25
5.2.1	Géneros de nematodos .....	25
5.2.2	Caracterización de poblaciones de <i>Ditylenchus</i> .....	27
5.2.2.1.	Morfología, morfometría y microscopía electrónica de barrido .....	27
5.2.2.2.	Análisis estadístico.....	36
5.3.	Caracterización molecular .....	41
5.3.1	PCR-RFLP de la región ITS1-5.8S-ITS2 .....	41
5.3.2	Análisis de secuencias .....	46
5.3.3	Filogenia de poblaciones .....	48
5.3.3.1	Región ITS1-5.8S-ITS2.....	48
5.3.3.2	Fragmentos de expansión D2-D3 del gen 28S rDNA.....	50
5.3.3.3	Gen <i>COI</i> del mtDNA.....	52
6.	CONCLUSIONES .....	54
7.	RECOMENDACIONES.....	55
8.	LITERATURA CITADA .....	56
	APÉNDICE.....	64
	APÉNDICE 1.....	64
	APÉNDICE 2.....	66

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Especies de plantas diferenciales a la inoculación de <i>Ditylenchus dipsaci</i> para diferenciación de razas (tomado de Sosa-Moss <i>et al.</i> , 1997). ....	11
<b>Cuadro 2.</b> Especies y cultivares de plantas con resistencia al nematodo del tallo y los bulbos.....	15
<b>Cuadro 3.</b> Hospedante, material y ubicación de muestras colectadas y procesadas en el presente estudio.....	17
<b>Cuadro 4.</b> Condiciones de PCR probadas para la amplificación parcial del gen <i>Hsp90</i> .....	23
<b>Cuadro 5.</b> Hospedante, material, ubicación y código asignado a las muestras positivas a <i>Ditylenchus</i> .....	25
<b>Cuadro 6.</b> Morfometría de poblaciones de <i>Ditylenchus dipsaci</i> extraídos de <i>Medicago sativa</i> y <i>Allium sativum</i> (media±desviación estándar y (rango)). ....	32
<b>Cuadro 7.</b> Patrones de restricción con 13 enzimas obtenidos por PCR-ITS-RFLP de poblaciones AlJal y Ajs.....	46
<b>Cuadro 8.</b> Composición de nucleótidos de secuencias ITS.....	46
<b>Cuadro 9.</b> Composición de nucleótidos de secuencias 28S.....	47
<b>Cuadro 10.</b> Composición de nucleótidos de secuencias <i>COI</i> .....	47

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Características morfológicas de *D. dipsaci* (tomado de Hooper, 1972)..... 8
- Figura 2.** Material vegetal colectado con síntomas de amarillamiento, deformación de hojas, tallos y necrosis de bulbos. A-D. Ajo; E. Alfalfa. .... 26
- Figura 3.** Morfología de la población AlJal. Hembra (A-B) y macho (C). A. Parte anterior mostrando el esófago; B y D. Terminación de la cola y C. Campo lateral con 4 líneas. Barras de escala: A, B y D= 20  $\mu$ m, C= 10  $\mu$ m. .... 28
- Figura 4.** Morfología de la población AjAgs. Hembra (A-C, E) y macho (D, F). A. Parte anterior mostrando el esófago; B, D y F. Terminación de la cola; C. Campo lateral con 4 líneas, E. Vulva y saco postuterino. Barras de escala: A, B, D-F= 20  $\mu$ m, C= 10  $\mu$ m. .... 29
- Figura 5.** Morfología de la población AjGto. Hembra (A-C) y macho (D). A. Parte anterior mostrando el esófago; B. Vulva y saco postuterino; C y D. Terminación de la cola. Barras de escala= 20  $\mu$ m. .... 30
- Figura 6.** Morfología de la población AjPue. Hembra (A-C) y macho (D). A. Parte anterior mostrando el esófago; B. Vulva y saco postuterino; C y D. Terminación de la cola. Barras de escala= 20  $\mu$ m. .... 31
- Figura 7.** MEB de la población AlJal. Hembra (A-D, F) y Macho (E). A. Campo lateral mostrando 4 incisuras equidistantes; B. Campo lateral mostrando 4 líneas continuas e internas discontinuas; D y E. Cola cónica; F. Vista de región anterior. Barras de escala: A, B, E= 10  $\mu$ m; D= 5  $\mu$ m; F= 2  $\mu$ m. .... 34
- Figura 8.** MEB de la población AjAgs. Hembra (A, D) y J2 (B, C). A y B. Campo lateral con 4 incisuras; C. Cola cónica; D. Vista de región anterior. Barras de escala: A= 5  $\mu$ m; B y C= 10  $\mu$ m; D= 1  $\mu$ m. .... 35
- Figura 9.** Correlaciones de variables originales con CP's en machos. 1= Longcuerpo; 2= Diamlabio; 3= Altlabio; 4= Estilete; 5= Longcono; 6= Longcolumna; 7= DGED; 8= Metacorpous; 9= Poroexcretor; 10= Cardia; 11= Anchomax; 12= LongEspícula; 13= Gobernáculo; 14= Longcola; 15= Diamnivelcloaca; 16=Longtesticulos; 17= a; 18= b; 19= c; 20= c'; 21= T(%). .... 37
- Figura 10.** Gráfico de dispersión CP1 vs CP2 en machos. Agrupamiento de especímenes en poblaciones. .... 37

<b>Figura 11.</b> Correlaciones de variables originales con CP's en hembras. 1= Longcuerpo; 2= Diamlabio; 3= Altlabio; 4= Estilete; 5= Longcono; 6= Longcolumna; 7= M; 8= DGED; 9= Anchomaxc; 10= Metacorp; 11= Poroexcretor; 12= Cardia; 13= Cabeza-vulva; 14= Vulva-ano; 15= Diamnvulva; 16= PUS; 17= Longcola; 18= Diamnano; 19= a; 20= b; 21= c; 22= c'; 23= V(%); 24=PUS/VA. ....	38
<b>Figura 12.</b> Gráfico de dispersión CP1 vs CP2 en hembras. Agrupamiento de especímenes en poblaciones. ....	38
<b>Figura 13.</b> Dendograma obtenido por el método de Ward de 22 características morfológicas evaluadas en machos de <i>Ditylenchus dipsaci</i> colectados de Aguascalientes (ajo), Guanajuato (ajo), Jalisco (alfalfa) y Puebla (ajo). ....	40
<b>Figura 14.</b> Dendograma obtenido por el método de Ward de 25 características morfológicas evaluadas en hembras de <i>Ditylenchus dipsaci</i> colectados de Aguascalientes (ajo), Guanajuato (ajo), Jalisco (alfalfa) y Puebla (ajo). ....	40
<b>Figura 15.</b> Amplificación de región ITS1-5.8S-ITS2. Marcador molecular 100pb (M); Control positivo <i>Ditylenchus dipsaci</i> Ajo (CP); Control negativo ALN (CN); AlJal (J) y AjAgs (A). ....	41
<b>Figura 16.</b> Patrones de restricción de especímenes individuales de las poblaciones AlJal (J) y AjAgs (A). Marcador molecular 100 pb (M); PCR sin digerir (SD): A). <i>HinfI</i> ; B). <i>RsaI</i> y C). <i>DraI</i> . ....	43
<b>Figura 17.</b> Patrones de restricción de especímenes individuales de las poblaciones AlJal (J) y AjAgs (A). Marcador molecular 100 pb (M); PCR sin digerir (SD): A). <i>PvuII</i> ; B). <i>TaqI</i> y C). <i>HhaI</i> . ....	44
<b>Figura 18.</b> Patrones de restricción de especímenes individuales de las poblaciones AlJal (J) y AjAgs (A). Marcador molecular 100 pb (M); PCR sin digerir (SD): A). <i>CfoI</i> ; B). <i>HaeIII</i> y C). <i>DdeI</i> . ....	44
<b>Figura 19.</b> Patrones de restricción de especímenes individuales de las poblaciones AlJal (J) y AjAgs (A). Marcador molecular 100 pb (M); PCR sin digerir (SD): A). <i>EcoRI</i> y B). <i>AluI</i> . ....	45
<b>Figura 20.</b> Patrones de restricción de especímenes individuales de las poblaciones AlJal (J) y AjAgs (A). Marcador molecular 100 pb (M); PCR sin digerir (SD): A). <i>SspI</i> y B). <i>SpeI</i> . ....	45
<b>Figura 21.</b> Relaciones filogenéticas de especies de <i>Ditylenchus</i> inferida con análisis Bayesiano de la región ITS del rRNA bajo el modelo HYK+G. Los valores de probabilidad posterior >70% son indicados en los clados. Patotipos de estudio diferenciadas con punto rojo. ....	49

- Figura 22.** Relaciones filogenéticas de especies de *Ditylenchus* inferida con análisis Bayesiano del gen 28S del rRNA bajo el modelo HYK+G. Los valores de probabilidad posterior >70% son indicados en los clados. Patotipos de estudio diferenciadas con punto rojo..... 51
- Figura 23.** Relaciones filogenéticas de especies de *Ditylenchus* inferida con análisis Bayesiano del gen COI del mtDNA bajo el modelo GTR+I+G. Los valores de probabilidad posterior >70% son indicados en los clados. Patotipos de estudio diferenciadas con punto rojo..... 53

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

**°C**= Grados centígrados

**a**= Longitud total del cuerpo/ancho máximo del cuerpo

**ACP**= Análisis de Componentes Principales

**AFLP**= Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados

**AjAgs**= Población Ajo de Aguascalientes

**AjGto**= Población Ajo de Guanajuato

**AjPue**= Población Ajo de Puebla

**AlJal**= Población Alfalfa de Jalisco

**ALN**= Agua libre de nucleasas

**b**= Longitud total del cuerpo/longitud del esófago

**BLASTN**= Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide

**c'**= Longitud de cola/ancho del cuerpo a nivel del ano/cloaca

**c**= Longitud total del cuerpo/longitud de cola

**cm**= Centímetro

**CNRF**= Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

**COI**= Citocromo Oxidasa I

**CP**= Componente principal

**DGED**= Desembocadura de la glándula esofágico-dorsal

**DNTP's**= Desoxirribonucleótidos trifosfato

**pb** =Pares de bases

**EPPO**= European and Mediterranean Plant Protection Organization

**g**= Gramo

**h**= Hora(s)

**Hsp90**= *Heat shock protein 90*

**IPPC**= International Plant Protection Convention

**ITS**= Espaciador Transcrito Interno

**kg**= Kilogramo

**Lha<sup>-1</sup>**= Litros por hectárea

**L**= Longitud total del cuerpo

**LFSV**= Ley Federal de Sanidad Vegetal

**M**= Molaridad

**MEB**= Microscopía electrónica de barrido.

**µl**= Microlitro

**mm**= Milímetro

**µM** = Micromolar

**µm**= Micrómetro

**min**= Minuto(s)

**mtDNA**= Ácido Desoxiribunucleico mitocondrial

**NAFA**= National Alfalfa & Forage Alliance

**NCBI**= National Center for Biotechnology Information

**mM** = Milimolar

**PCR**= Reacción en Cadena de la Polimerasa (siglas en Inglés).

**Psi**= Libra de fuerza por pulgada cuadrada

**PUS=** Saco postuterino

**RAPD=** Amplificación polimórfica aleatoria de DNA

**rDNA=** Ácido Desoxiribonucleíco ribosomal

**RFLP=** Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción

**rRNA=** Ácido Ribonucleíco ribosomal

**SAGARPA=** Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación

**SENASICA=** Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria

**seg=** Segundo (s)

**SIAP=** Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera

**SINAVEF=** Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria.

**s. s.=** Sensu stricto

**T=** Distancia entre la abertura cloacal y la parte más anterior del testículo con respecto al cuerpo expresado en porcentaje.

**TAF=** Trietanolamina-Alcohol-Formaldehido

**ton=** Toneladas

**U=** Unidades

**V=** Posición de la vulva respecto al extremo anterior del cuerpo expresada en porcentaje.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades en los vegetales son uno de los factores principales que limitan la productividad de los cultivos agrícolas en todas las regiones del mundo y su control depende del diagnóstico correcto y oportuno de los patógenos involucrados (Brathwaite y Sosa-Moss, 1995).

A nivel mundial, las pérdidas en la producción agrícola ocasionados por nematodos fitopatógenos son estimadas en millones de dólares (Subbotin y Riley, 2012; Qiao *et al.*, 2013). El nematodo del tallo y los bulbos *Ditylenchus dipsaci* es una de las especies de mayor importancia, debido a que puede ocasionar una reducción de la producción entre el 30% y hasta la pérdida total de la cosecha (Bello *et al.*, 1996). Este nematodo es muy peligroso para la agricultura ya que incluye 30 patotipos separados con base en hospedantes diferenciales y por tener un rango de hospedantes muy amplio (alrededor de 500 especies de plantas). Entre las de mayor importancia se encuentran: cebolla (*Allium cepa* L.), ajo (*Allium sativum* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), chícharo (*Pisum sativum* L.), alfalfa (*Medicago sativa* L.), haba (*Vicia faba* L.), zanahoria (*Daucus carota* L.), narciso (*Narcissus* spp.), jacinto (*Hyacinthus* spp.), maíz (*Zea mays* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.), fresa (*Fragaria* spp.), tulipán (*Tulipa* spp.), clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) y avena (*Avena sativa* L.). Por lo anterior, muchos países consideran a esta especie como cuarentenaria (EPPO, 2008). Diversas pruebas se han desarrollado para la aclaración del estatus taxonómico de los patotipos pero el problema continua sin resolverse (Janssen, 1994; Subbotin *et al.*, 2005; Qiao *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014).

*D. dipsaci* se considera como un complejo de especies con base en análisis moleculares, cariológicos y morfológicos realizados. Este complejo ha sido dividido en dos grupos: el primero contiene a las poblaciones diploides (“tamaño normal”) y nombradas como *D. dipsaci* sensu stricto, en donde se encuentran la mayoría de las poblaciones reportadas hasta ahora. En el segundo se encuentran las



poblaciones poliploides subagrupadas en: *Ditylenchus* spp. B (la raza gigante de *Vicia faba* = *D. gigas*; *Ditylenchus* sp. C = *D. weischeri*; y *Ditylenchus* sp. D, E y F asociadas a plantas de Fabaceae, Asteracea o Plantaginaceae (Subbotin y Riley, 2012; Jeszke *et al.*, 2015). Las poblaciones diploides mostraron relaciones filogenéticas muy cercanas y fueron clasificados como razas (Subbotin *et al.*, 2005).

Actualmente, con la incorporación de métodos moleculares y el análisis integrativo de los caracteres anatómicos y medibles, se ha determinado que algunas poblaciones, inicialmente consideradas como patotipos corresponden a nuevas especies dentro del género (Vovlas *et al.*, 2011).

En México existen varios reportes de pérdidas ocasionadas por *D. dipsaci* que fluctúan del 30 al 100% de la cosecha total de ajo. La mayor incidencia de esta especie se presenta en los estados de Guanajuato, Aguascalientes, Puebla y Veracruz (SENASICA, 2013). En México no existen reportes de esta especie afectando alfalfa, pero si en Estados Unidos de América, Australia, Nueva Zelanda e Inglaterra (Whitehead, 1984; Perera *et al.*, 2009).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

Identificar y caracterizar, mediante la implementación de diversas técnicas y métodos, las poblaciones de *Ditylenchus* presentes en cultivos de alfalfa, ajo y cebolla de Aguascalientes, Jalisco, Guanajuato y Puebla en México.

### 2.2. Objetivos particulares

- Caracterizar morfológica y morfométricamente las poblaciones de *Ditylenchus* spp.
- Realizar análisis estadísticos de las características morfométricas para la separación de poblaciones del nematodo del tallo y los bulbos.
- Realizar pruebas moleculares (PCR, PCR-RFLPs y secuenciación) de las poblaciones para la posible diferenciación de patotipos.
- Realizar la filogenia de las poblaciones de *Ditylenchus* spp. con los marcadores ITS, 28S rRNA, gen *COI* del mtDNA y gen *Hsp90*.

### 3. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1. Importancia agrícola y económica

Uno de los factores de mayor importancia para garantizar un comercio internacional de productos agrícolas es minimizar los riesgos de diseminación de plagas y patógenos que no están presentes o que tienen una distribución restringida dentro y entre los países comerciantes (Brathwaite y Sosa-Moss, 1995). Un organismo patógeno se considera cuarentenario cuando no está reportada su presencia en el territorio nacional o en su caso, presenta una distribución restringida y se encuentra bajo control oficial y su establecimiento en una región con cultivos hospedantes ocasiona pérdidas económicas considerables (LFSV, 1994; IPPC, 2006). La presencia de una especie cuarentenaria en un país ocasiona problemas diversos, pero principalmente, la reducción en la producción resultando en una pérdida considerable de recursos financieros para los productores, aunada a una restricción de la movilización y una consecuente negativa para la exportación de los vegetales debido a las cuarentenas internacionales que se aplican por acuerdo entre los países integrantes de la International Plant Protection Convention (IPPC, 1998).

El nematodo del tallo y los bulbos *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936 es uno de los fitopatógenos más importantes a nivel mundial y se encuentra en la lista de organismos cuarentenarios de muchos países del mundo debido a que ataca cerca de 500 especies vegetales y causa problemas serios en ajo, cebolla, cereales, fresa, remolacha, zanahoria, entre otros cultivos; asimismo, puede infectar plantas ornamentales como narciso, jacinto y tulipán (Subbotin *et al.*, 2005; EPPO, 2008). *D. dipsaci* tiene hábitos endo y ectoparásito migratorio atacando partes aéreas, bulbos, rizomas y tubérculos de plantas y además muestra anhidrobiosis, que es un estado de latencia que le permite reducir su metabolismo al mínimo y sobrevivir a condiciones muy adversas, como la desecación total. Esta cualidad le permite diseminarse o transportarse a largas o cortas distancias, de

región a región y continente a continente (Wharton y Barrett, 1985; Subbotin y Riley, 2012).

Se conocen al menos 30 razas biológicas o patotipos del nematodo del tallo y los bulbos, las cuales han sido determinadas en base a sus hospedantes diferenciales (Hooper, 1972; Wendt *et al.*, 1993; Janssen, 1994).

Su umbral económico es muy bajo, densidades de población de únicamente 10 nematodos por 0.5 kg de suelo pueden resultar en pérdidas considerables (Subbotin y Riley, 2012). Griffith *et al.* (1997) reportaron que en cultivos de remolacha (*Beta vulgaris* L.) y tomate (*Solanum lycopersicum* L.) se han registrado pérdidas de hasta un 20%.

El cultivo del ajo en México es de gran importancia. En 2013 se obtuvieron 59,014.85 ton con un valor de producción cercano a 770 millones de pesos; entre los principales estados productores se encuentran Zacatecas, Guanajuato, Sonora y Aguascalientes (SAGARPA-SIAP, 2018). Diversos patógenos pueden causar enfermedades en este cultivo; sin embargo, las infestaciones del nematodo del tallo y los bulbos causan pérdidas considerables (Doucet y De Doucet, 1997). En México existen varios reportes de pérdidas ocasionadas por *D. dipsaci* que fluctúan del 30 al 100% de la cosecha total de ajo. En estados como Guanajuato, Aguascalientes, Puebla y Veracruz, se presenta la mayor incidencia de esta especie (SENASICA, 2013).

En el caso de alfalfa la producción nacional posiciona a México en el tercer lugar mundial con 31,270,804 ton. Chihuahua, Hidalgo y Guanajuato ocupan los tres primeros lugares en producción, respectivamente. El nivel productivo nacional de este forraje permite exportar más de 25 mil ton. principalmente hacia Estados Unidos de América (SIAP, 2017). No existen reportes de esta especie afectando alfalfa en México, pero si en Estados Unidos de América, Australia, Nueva Zelanda e Inglaterra (Whitehead, 1984; Perera *et al.*, 2009).

### **3.2. Distribución geográfica**

*D. dipsaci* tiene una distribución cosmopolita, pero prefiere zonas templadas (Europa y la región del Mediterráneo, Norte y Sur de África, Asia y Oceanía). No se ha reportado su establecimiento en regiones tropicales, excepto en elevaciones altas en donde el clima es templado. En Norteamérica (EUA, Canadá, México) causa graves pérdidas en alfalfa, trébol rojo (*Trifolium pratense* L.), ajo y cebolla y en Sudamérica (Brasil, Argentina) en ajo, cebolla y alfalfa (EPPO, 2008; CABI, 2015).

Existen varios reportes de su presencia en India (Hooper, 1972; Sturhan y Brzeski, 1991).

### **3.3. Taxonomía de *Ditylenchus* y características de *D. dipsaci***

#### **3.3.1 Morfología**

Los nematodos dentro del género *Ditylenchus* presentan cuerpo delgado o filiforme, no mayor a 2 mm, no curvado fuertemente cuando son relajados con calor, adultos delgados. Campo lateral con 4 o seis líneas (incisuras). Estilete pequeño con nódulos desarrollados, bulbo medio visible. Bulbo basal en forma de un saco elástico conteniendo las células glandulares del esófago. Ovario alargado, oocitos en una sola línea en la zona de maduración. Crustiformería en forma de cuadrícolumela, con 4 filas de 4-7 células en cada una; no más larga que la espermateca. Saco postuterino presente. Bursa adanal a subterminal, nunca envolviendo la punta de la cola. Colas alargadas-conoides a subcilíndricas o filiformes. Este género tiene más de 60 especies, la mayoría de hábitos micófagos y algunas fitopatógenas, como *D. africanus*, *D. angustus*, *D. arachis*, *D. destructor*, *D. dipsaci* y *D. gigas*. Las especies fitopatógenas inducen amarillamiento, achaparramiento y engrosamiento de tejidos vegetales pero no agallas (Subbotin y Riley, 2012; Skwiercz *et al.*, 2017).

### 3.3.1.1 Microscopia electrónica de barrido

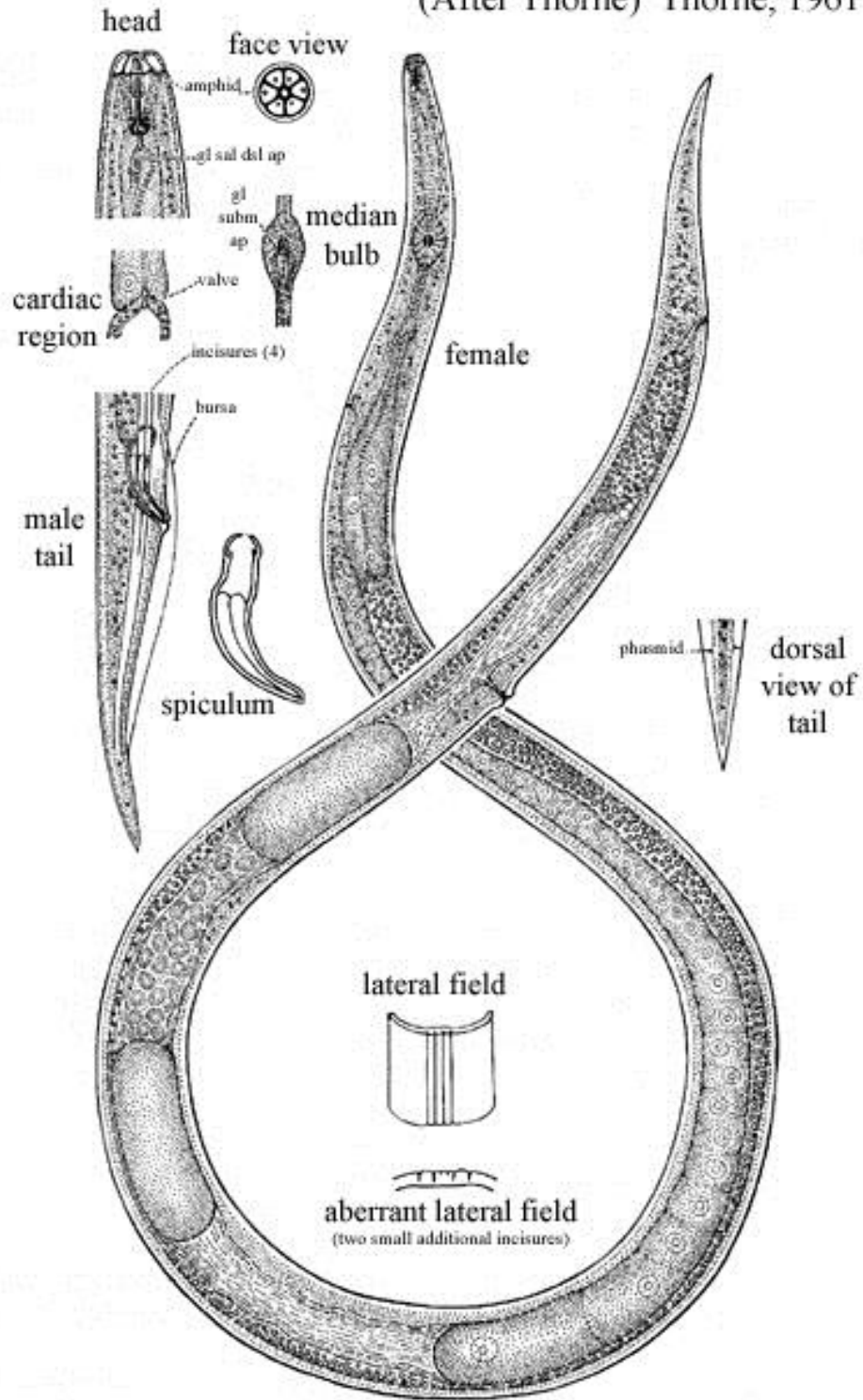
La característica morfológica del número de líneas en campo lateral es muy importante para la identificación del nematodo del tallo y los bulbos. Aunque es posible observarla en microscopia de luz, en muchas ocasiones se hace indispensable el procesamiento de los especímenes para microscopia electrónica de barrido que permite explorar a detalle características superficiales de los nematodos y determinar con precisión el número y disposición de las incisuras así como la arquitectura de la región cefálica y el extremo de la cola (Vovlas *et al.*, 2011; Skwiercz *et al.*, 2017).

### 3.3.1.2 Morfometría

Las especies del género *Ditylenchus* son complicadas para identificar por su alta similitud morfológica y su considerable variación biológica intraespecífica, por lo que precisa personal altamente entrenado para realizar las determinaciones (Zouhar *et al.*, 2007; Marek *et al.*, 2010).

De acuerdo con Sturhan y Brzeski (1991), *D. dipsaci* presenta las siguientes características e índices De Man (De Man, 1884): **Hembra:** L = 1.1 a 1.7 mm; a = 30.2 – 64; b = 6.0 – 8.8; c = 13.5 – 19.5; V = 79 – 86; estilete = 9 - 12  $\mu$ m. **Macho:** L = 1.0 a 1.5 mm; a = 35.4 – 53.5; b = 5.5 – 7.8; c = 12 – 17.3; estilete = 9 - 12  $\mu$ m; espículas = 20 – 28  $\mu$ m; gubernáculo = 8 – 11  $\mu$ m. El cuerpo de la hembra es casi recto cuando son muertas por calor. Región labial baja no estriada, ligeramente aplanada, casi continua con el resto del cuerpo. Campo lateral con cuatro líneas. Región glandular en forma de bulbo basal o sobrepuesto el intestino; vulva visible, un ovario anterior con oocitos generalmente con una y ocasionalmente con dos hileras; saco postuterino aproximadamente la mitad de la distancia de la vulva al ano, cola en ambos sexos cónica y siempre aguda (Figura 1).

*Ditylenchus dipsaci*  
 (After Thorne) Thorne, 1961



**Figura 1.** Características morfológicas de *D. dipsaci* (tomado de Hooper, 1972).

### 3.4. Variabilidad fisiológica

#### 3.4.1 Patotipos y prueba de hospedantes diferenciales

Diversos autores coinciden en que el nematodo del tallo y los bulbos incluye patotipos que difieren en preferencia a hospedantes y presentan diversos estados de especialización y reproducción, motivos por los cuales podrían representar especies diferentes (Sturhan y Brzeski, 1991). Los patotipos muestran una parcial o completa incompatibilidad reproductiva y un rango amplio de números cromosómicos,  $2n= 24$  a  $56$  (Wendt *et al.*, 1993; Subbotin *et al.*, 2005; Qiao *et al.*, 2013).

Sosa-Moss *et al.* (1997) describe una metodología para efectuar la prueba de hospedantes diferenciales para la determinación de patotipos de *D. dipsaci*:

- a) Realizar la extracción de los nematodos 24 h previas, a través de la incubación de los tejidos afectados. Pasar la suspensión de nematodos por un tamiz de 325 *mallaspulg*<sup>2</sup> (44  $\mu\text{m}$ ) para eliminar los individuos muertos.
- b) Concentrar los especímenes en agua limpia y mantenerlos vivos aireando la suspensión (bomba de acuario). No conservarlos por más de tres días. Si no se dispone de una bomba de acuario, es posible mantenerlos vivos cambiando el agua con frecuencia.
- c) Ajustar el volumen de agua para que la suspensión contenga  $100 \pm 10$  nematodos en 20  $\mu\text{l}$ ; realizar el conteo como mínimo en 5 ocasiones y obtener el promedio para reducir el error.
- d) Preparar una solución de metil-celulosa al 2%, mezclando 2 g de metil-celulosa en 100 ml de agua destilada (un día previo a la inoculación las plantas diferenciales). Evitando generar burbujas en el seno de la solución, la cual es muy espesa.



- e) Agregar a la suspensión de nematodos un volumen igual de metil-celulosa 2%; de esta manera en la dilución final habrá, por cada 20  $\mu$ l,  $50 \pm 5$  nematodos y contendrá metil-celulosa 1%. La metil celulosa incrementa mucho la densidad del agua y protege a los nematodos de la desecación, favoreciendo a que ingresen a los tejidos de las plantas a inocular.
- f) Inocular las plantas diferenciales. 30 plantas de alfalfa, trébol, haba, chícharo, avena y cardo (*Dipsacus fullonum* L.). Las habas y los cardos se inoculan en el axis de las primeras dos estípulas; la avena, en los coleóptilos, antes que se extienda la primer hoja; alfalfas, tréboles y cardo, en medio de las dos hojas cotiledonares. Es necesario sincronizar la inoculación de estas plantas, por lo cual es importante conocer su comportamiento fenológico.
- g) Inocular subdérmicamente los bulbos de cebolla, narciso, jacinto, tulipán y los tubérculos de papa a través de un orificio superficial y colocando 20  $\mu$ l; cubrir la herida con parafilm.
- h) Inocular los ajos cortando el ápice de los “dientes” y depositando la suspensión con nematodos en la herida.
- i) Transcurridos 45-60 días, observar la respuesta, periodo en el cual aproximadamente dos generaciones del nematodo se han desarrollado.
- j) Para conocer la identidad de la raza, comparar la reacción de las diferenciales con las presentadas en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Especies de plantas diferenciales a la inoculación de *Ditylenchus dipsaci* para diferenciación de razas (tomado de Sosa-Moss *et al.*, 1997).

Hospedante diferencia	RAZA (Patotipo)												
	Trébol rojo	Trébol blanco	Alfalfa	Centeno	Ajo	Papa	Cardo	Jacinto	Narciso	Tulipán	Haba raza gigante	Haba raza normal	
<i>Trifolium pratense</i> KHUN	++	-	-	-	-	-	-						
<i>Trifolium repens</i> AVA	-	++		-	-	-							
<i>Medicago sativa</i> EUROPA	-	-	++	-	-	-							
<i>Pisum sativum</i>	++		++		++	++	-				-		
<i>Solanum tuberosum</i>	-			+	+	++					-	+	
<i>Avena sativa</i>	-		-	++									
<i>Dipsacus fullonum</i>	-		-				++					++	
<i>Narcissus</i> spp.	-			-	-	-		-	++	++			
<i>Hyacinthus</i> spp.	-			-	-	-	++	-	++				
<i>Tulipa</i> spp.	-			-	-	-		-	++				
<i>Vicia faba</i> AGUA DULCE											++	++	
<i>Allium sativum</i>	-		-		++						-	++	
<i>Medicago sativa</i> VERTUS			-								-		
<i>T. pratense</i> QUIN	-												
<i>Vicia faba</i> IINRA 29H											-	(-) +	

++ = Alta reproducción.  
+ = Baja reproducción.

- = No reproducción  
(-) + = Reproducción escasa de algunas poblaciones

### 3.5. Identificación molecular

#### 3.5.1 Análisis por PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de gran utilidad en nematología y por su sensibilidad se han logrado buenos resultados cuando se analizan nematodos individuales, huevos e incluso sólo una porción del espécimen (Hopper *et al.*, 2005).

Varias técnicas basadas en la PCR y el análisis de secuencias nucleares han sido utilizadas para la identificación de organismos y el caso de nematodos fitopatógenos no ha sido la excepción. Los espaciadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) del rRNA situados entre la subunidad nuclear pequeña (gen 18S) y la subunidad larga (gen 28S) han sido utilizados para este propósito (Subbotin *et al.*, 2005; Qiao *et al.*, 2013; Jeszke *et al.*, 2013). Otras regiones que se han empleado para el estudio de las relaciones filogenéticas de especies de *Ditylenchus* son los fragmentos parciales: segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S del rRNA, Subunidad I del gen de la *Citocromo oxidasa* del DNA mitocondrial (*COI* mtDNA) y el gen *Heat shock protein 90* (*Hsp90*) (Vovlas *et al.*, 2011; Skwiercz *et al.*, 2017).

Las poblaciones de *D. dipsaci* que atacan ajo y cebolla son consideradas de la misma raza. Sin embargo, poblaciones aisladas de Ontario, E.U.A. analizadas por medio del rDNA y la secuenciación de ITS mostraron dos grupos con una variación genética significativa entre ellas y distintos de poblaciones de *Ditylenchus* obtenidas de bulbos de cebolla. Lo anterior se denominó como variación genética intra-racial entre poblaciones, posiblemente debido a que las poblaciones proceden de diferentes hospedantes o lugares (Qiao *et al.*, 2013).

### 3.5.2 Análisis por PCR-RFLP

El análisis mediante los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) muestra patrones variables de bandeo en productos de PCR de diferentes poblaciones o especies al digerirlos con endonucleasas o enzimas de restricción. Los RFLP de los amplificadores de la región ITS han sido aplicados para la diferenciación de especies y poblaciones de géneros como *Aphelenchoides*, *Bursaphelenchus*, *Nacobbus*, *Radopholus* y *Ditylenchus*. Las enzimas recomendadas son: *AluI*, *AvaI*, *Bsh1236I*, *BsuRI*, *CfoI*, *HinfI*, *MvaI*, *RsaI*, *PstI*, *DraI*, *MspI* y *PvuII* (Hopper *et al.*, 2005).

Wendt *et al.* (1993) al trabajar con especies de *Ditylenchus* mediante PCR-RFLP de la región ITS diferenció la raza gigante presente en *Vicia faba* L. de las razas normales del nematodo del tallo y los bulbos. *D. dipsaci* presentó el siguiente patrón de restricción: *AluI* (900 pb), *DdeI* (310, 290, 200 pb), *DraI* (340, 250 pb), *HaeIII* (900 pb), *HinfI* (440, 350, 150 pb), *PstI* (650, 400 pb), *RsaI* (450, 250, 140 pb) y *TaqI* (340, 230, 130 pb).

Ji *et al.* (2006) al analizar mediante PCR-RFLP la región ITS de especies de *Ditylenchus* observó el siguiente patrón de restricción en *D. dipsaci*: *RsaI* (580, 310, 270, 130 pb), *MspI* (350, 210, 150 pb), *HaeIII* (800 pb), *HinfI* (410, 320 pb) y *AluI* (400, 310 pb).

Un análisis PCR-RFLP fue realizado por Chizhov *et al.* (2010) durante la descripción de *D. weischeri* comparándola con *D. dipsaci* (cebolla y fresa). El amplificador de ITS fue digerido con enzimas de restricción y se observaron diferencias en patrones de bandeo con *Bsh1236I*, *HinfI*, *RsaI* y *TaqI*, logrando distinguir una especie de la otra. *D. dipsaci* produjo los siguientes patrones de restricción: *HinfI* (374, 281, 89 pb), *RsaI* (300, 264, 127, 61 pb) y *TaqI* (359, 208, 65, 51, 34 pb).

Vovlas *et al.* (2011) reportó que mediante PCR-RFLP fue posible diferenciar a *Ditylenchus gigas* de *D. dipsaci* sensu stricto. Las poblaciones de *D. dipsaci* analizadas correspondieron a poblaciones aisladas de ajo, cebolla y betabel de España y encontraron los siguientes patrones de restricción: *Ddel* (520, 340 pb), *Rsal* (430, 280 pb), *Hinfl* (510, 350 pb), *PvuII* (960, 800 pb), *AluI* (420, 370 pb) y *PstI* (600, 380 pb).

### 3.5.3 Análisis por AFLP

El polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) es una técnica que proporciona una gran cantidad de información denominada “huella genética” y genera un mayor número de fragmentos polimórficos con la ventaja de ser altamente reproducible al compararla con la amplificación polimórfica aleatoria de DNA (RAPD) (Esquibet *et al.*, 2003). Los marcadores AFLP han sido exitosos para distinguir biotipos de insectos plaga y se han utilizado para conocer el polimorfismo intra e interespecífico de nematodos fitopatógenos (Marché *et al.*, 2001).

Mediante el análisis morfológico, bioquímico, molecular y citológico se logró determinar que la raza gigante que se observaba afectando a *Vicia faba*, correspondía a una especie diferente, nombrándose como *Ditylenchus gigas* en relación a la gran longitud del cuerpo de los especímenes (Subbotin *et al.*, 2005; Vovlas *et al.*, 2011).

### 3.6. Manejo

Considerando que la semilla utilizada para la siembra de ajo consiste en bulbillos /dientes esta es la principal vía de diseminación de los nematodos en las regiones de cultivo. Por esta razón, la semilla para plantado a utilizar deberá estar libre del nematodo del tallo y los bulbos (Hernández-Juárez *et al.*, 2015).

El patotipo cebolla de *D. dipsaci* s. s. tiene la capacidad de infectar algunas variedades de lechuga (*Lactuca sativa* L.), ajo, apio (*Apium graveolens* L.), chícharo, cebollín (*Allium schoenoprasum* L.), frijol, poro (*A. ampeloprasum* var. *porrum* (L.) J. Gay), belladona (*Atropa belladonna* L.) entre otros, por lo que el control mediante la rotación de cultivo debe realizarse con cultivos no hospedantes como el maíz, así como eliminar la maleza durante tres años para reducir al mínimo las densidades de población del nematodo (Janssen, 1994; Becker y Westerdahl, 2018).

En alfalfa, trébol rojo, trébol blanco, haba, avena y centeno (*Secale cereale* (L.) M. Bieb.) se han desarrollado materiales resistentes a este nematodo que se indican en el Cuadro 2 (modificado de McDonald y Nicol, 2005).

**Cuadro 2.** Especies y cultivares de plantas con resistencia al nematodo del tallo y los bulbos.

Cultivo / Especie	Cultivar	País
Alfalfa	Vertus	Suecia
	Nova	Australia
	Washoa Lahontan	Estados Unidos de América
Trébol blanco Tolerante	Line G49	Nueva Zelanda
	Sebeda	Nueva Zelanda
	Alice	Reino Unido
Centeno	Ottersum	Países bajos
Haba	INRA29	Francia
Trébol rojo	Souk el Arba Rharb	Reino Unido
Avena	Anita	Bélgica
	Bettong	Australia
Avena / <i>Avena ludoviciana</i>	Cc 4346	Reino Unido

En Estados Unidos de América, a través de la National Alfalfa & Forage Alliance (NAFA), se han generado variedades de alfalfa con diferentes niveles de resistencia al nematodo del tallo y los bulbos. Algunas variedades que presentan una resistencia superior a 50% son: FSG 329, Magnagrace II, Octane, 54Q29, 54VR70, 4010BR, 4020MF, 4040HY, 6401N, 6427R, AFX469, AmeriStand 415NT RR, AmeriStand 427TQ, AmeriStand 445NT, Camas, Denali 41.10RR, DK40-16, GrandStand II, 55Q27, 55Q28, Shockwave BR, Stockpile, RRALF 4R200, Nimbus, MasterPiece II, LG5R300. Archer III, RR Nemastar, Premium, entre otros (NAFA, 2018).

Actualmente, no existen variedades de ajo con resistencia a *D. dipsaci*. Respecto al control químico, Becker y Westerdahl (2018) indican que la aplicación de 1,3-Dicloropropeno o Metam sodio (preplantación) y Oxamyl (después de plantado) pueden ser efectivos. Así mismo, Hernández-Juárez *et al.* (2015) bajo condiciones de laboratorio, probaron alternativas orgánicas contra el nematodo del tallo y los bulbos y determinaron que el quitosan a dosis de 4  $Lha^{-1}$  presentó un control del 97.5% de la población inicial de nematodos.

Es importante realizar estudios a fondo para dilucidar a través de la combinación de técnicas y métodos, la identidad de las distintas poblaciones de *D. dipsaci* presentes en cultivos de alfalfa y ajo en Aguascalientes, Jalisco, Guanajuato, y Puebla, México.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Localización de áreas de estudio y colecta de muestras

Con el objetivo de coleccionar plantas con síntomas inducidos por el nematodo del tallo y los bulbos se realizaron recorridos en zonas de producción de ajo, cebolla y alfalfa en los estados de Aguascalientes, Querétaro, Guanajuato, Jalisco y Puebla durante 2013 a 2017. Para este fin se contó con el apoyo del personal operativo del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (SINAVEF) de la Dirección General de Sanidad Vegetal, el cual fue previamente capacitado y se elaboró un folleto resaltando los síntomas a buscar y los cuidados en la toma de muestras (Apéndice 1).

Se colectó el material vegetal con síntomas típicos, se etiquetó (Cuadro 3) y trasladó al Laboratorio de Nematología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) para su análisis.

**Cuadro 3.** Hospedante, material y ubicación de muestras colectadas y procesadas en el presente estudio.

Hospedante	Material	Latitud	Longitud	Estado
Maíz	Suelo	20.6166	-100.2167	Querétaro
Maíz	Plántulas	20.5166	-100.2167	Querétaro
Ajo (orgánico)	Suelo (Postcosecha)	22.1247	-102.2430	Aguascalientes
Ajo	Suelo (Postcosecha)	22.1220	-102.2548	Aguascalientes
Ajo	Suelo (Postcosecha)	22.1239	-102.2554	Aguascalientes
Ajo	Bulbos	22.2983	-102.2189	Aguascalientes
Alfalfa	Plantas	19.9728	-103.5279	Jalisco
Ajo	Plantas	20.4747	-100.6155	Guanajuato
Cebolla	Plantas	20.3809	-101.7729	Guanajuato
Ajo	Plantas	20.4578	-100.9925	Guanajuato
Ajo	Bulbos	ND	ND	Tetela de Ocampo, Puebla



#### **4.2. Extracción de nematodos**

Se homogenizaron las muestras de suelo de 2 kg y 100 g se utilizaron para la extracción de especímenes. Se cortaron partes vegetales de plantas sintomáticas (tallos, hojas) en secciones de 1-2 cm de largo y se utilizaron 100 g para realizar la extracción. Ambos tipos de muestras se procesaron por la técnica del embudo de Baermann (Baermann, 1917) y mediante macerado-tamizado-centrifugado (Coolen y D'Herde, 1972; Coolen, 1979).

#### **4.3. Identificación taxonómica**

Se depositó una alícuota de 5-10 ml del extracto de las muestras, de manera individual, en caja Petri pequeña para ser examinada bajo microscopio estereoscópico y compuesto.

La identificación de los nematodos del género *Ditylenchus* se llevó a cabo utilizando las características descritas por Subbotin y Riley (2012).

### 4.3.1 Morfología, morfometría y microscopía electrónica

Para realizar la determinación de la especie, los nematodos identificados como *Ditylenchus* de cada población fueron muertos y fijados con TAF o Formol 4% a 70°C y posteriormente deshidratados con glicerina (Seinhorst, 1962). Se realizaron montajes permanentes de hembras y machos utilizando glicerina deshidratada como medio de montaje y parafina de histopatología como agente sellador. Los especímenes se observaron en un microscopio compuesto Nikon Eclipse Ni-U (Nikon Instruments) y los caracteres morfométricos de 26 individuos (hembras y machos) de cada población fueron obtenidos utilizando los objetivos 10, 40, 60 y 100X. Las fotografías se obtuvieron con una cámara digital Spot Idea 5MP (Diagnostic Instruments) montada sobre el microscopio compuesto y digitalizadas con el programa Spot Basic Imaging 5.2 (Diagnostic Instruments). Los caracteres e índices De Man fueron capturados en un archivo Excel (Apéndice 2). Después de confirmar la identidad de los nematodos, se procesó una muestra por microscopía electrónica de barrido. Para ello, los nematodos se lavaron con agua destilada estéril, se colocaron en un tubo eppendorf y se trasladaron al laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. La cantidad de agua del tubo se redujo al mínimo antes de adicionar Glutaraldehído 3% en amortiguador de fosfatos Sorensen pH 7.2, 0.1M por 48 h. Después se realizaron 2 lavados de 10 min cada uno con amortiguador de fosfatos Sorensen para eliminar los residuos del fijador y efectuar la postfijación con Tetraóxido de Osmio 0.25% en agua por 2 h. Después de la postfijación los nematodos se lavaron dos veces con agua desionizada por 30 min. Se llevó a cabo una deshidratación seriada con etanol 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% durante 20 min en cada fase y finalmente dos pasos por etanol 100% de 20 min. En estos dos últimos pasos, los nematodos se transfirieron a un microtamiz de 40 µm donde se realizó el secado de punto crítico en el equipo Samdri-780A, suministrando  $CO_2$  líquido lentamente a 1075 Psi a 31°C. Finalmente, los especímenes se recubrieron con oro por 15 min con el equipo JEOL JFC-1100 Ion Sputter. La observación de caracteres y las fotografías se obtuvieron con el microscopio electrónico JEOL JSM-6390.

### **4.3.2 Análisis estadístico**

Con los datos numéricos de los caracteres observados (Apéndice 2) se calcularon parámetros estadísticos: rango, media y desviación estándar de cada una de las poblaciones y fueron contrastadas con los valores reportados de *D. dipsaci* por Hooper (1972), Decker (1969) y Sturhan y Brzeski (1991).

Para conocer las relaciones entre las poblaciones y el efecto de las variables morfométricas obtenidas, se aplicó el análisis de componentes principales (ACP) con el programa R v3.5. El objetivo del ACP es sintetizar o reducir el número de variables de un conjunto al mínimo, perdiendo la menor cantidad de información posible (Dallas, 2000). Se ha demostrado que el ACP es de utilidad para separar poblaciones con características muy similares.

También se efectuó el análisis de agrupamiento de Ward (Ward, 1963) o de varianza mínima mediante el programa SAS v9, con el objetivo de obtener el agrupamiento de las poblaciones tratando de lograr la máxima homogeneidad en cada grupo o cluster y la mayor diferencia entre ellos.

## **4.4. Caracterización molecular**

### **4.4.1 Extracción de DNA**

Las extracciones de DNA se llevaron a cabo utilizando nematodos individuales previamente identificados morfológicamente como *D. dipsaci* de cada una de las poblaciones colectadas. Los adultos se lavaron en agua destilada estéril y posteriormente, se colocaron en 13 µl de buffer de extracción de DNA (Williams *et al.*, 1992) sobre un cubreobjetos nuevo y bajo microscopio estereoscópico. El nematodo fue macerado con una punta de micropipeta. La mezcla fue homogenizada y transferida a un tubo de PCR estéril, llevándose a congelación a -40°C por 30 min y luego fue incubado inmediatamente a 60°C por una hora y después a 95°C por 15 min para inactivar a la proteinasa K, conservándose a 4°C.

#### 4.4.2 Amplificación y análisis PCR-RFLP de la región ITS1-5.8S-ITS2

El DNA extraído fue utilizado para amplificar la región ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA utilizando los iniciadores AB28 (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') y TW81 (5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3') propuestos por Howlett (1992) y Joyce *et al.* (1994), respectivamente. La mezcla de reacción de PCR se preparó en un volumen final de 25 µl, conteniendo 3.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1X Buffer de PCR, 200 µM dNTP's, 0.4 µM de cada iniciador, 1.25 U de Taq polimerasa, 5 µl de DNA y agua libre de nucleasas hasta 25 µl, esperando un fragmento de ~750 pb. Control positivo y negativo fueron considerados y tres extracciones individuales de DNA por población fueron amplificadas. El control positivo de *D. dipsaci* de cultivo de ajo fue facilitado por el CNRF. El control negativo consistió en agua libre de nucleasas (ALN). La amplificación se realizó en un termociclador T100 (Bio-Rad, Laboratories) con el programa siguiente: desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, 35 ciclos con desnaturalización a 95°C por 45 seg, anillamiento a 57°C por 30 seg, extensión a 72°C por 1.5 min y extensión final a 72°C por 5 min (Ramírez-Suárez, 2014). El producto de PCR se colocó en gel de agarosa 1.4% teñido con 7 µl de Gel Red (Biotium Implements®) en 100 ml de buffer TAE1X. La electroforesis se corrió a 90 voltios por 80 min. El gel se visualizó en un transiluminador Gel Doc Z System (Bio-Rad, Laboratories) y analizado con el programa Image Lab 5.0 (Bio-Rad, Laboratories) para la obtención del tamaño del fragmento amplificado. Para realizar el PCR-RFLP, 10 µl del producto amplificado fueron digeridos con cada una de las enzimas de restricción: *RsaI*, *HinfI*, *AluI*, *EcoRI*, *DraI*, *HhaI*, *TaqI*, *SspI*, *PvuII*, *DdeI* (*Invitrogen*<sup>TM</sup>) y *HaeIII*, *SpeI*, *CfoI* (Promega Corporation®) atendiendo las recomendaciones de los fabricantes. Las digestiones se realizaron a 37°C por 2.5 h en un termociclador T100 (Bio-Rad, Laboratories) y separadas en gel de agarosa ultrapura (*Invitrogen*<sup>TM</sup>) 3% teñido con 7 µl de Gel Red (Biotium Implements®) a 90 voltios por 80 min. La visualización del patrón de digestión se realizó a través del equipo Gel Doc Z System (Bio-Rad, Laboratories) y analizado con el programa Image Lab 5.0 (Bio-Rad, Laboratories) para la obtención del peso de cada banda observada. Producto de PCR sin digerir fue considerado como control.

#### 4.4.3 Amplificación y secuenciación de la región ITS1-5.8S-ITS2, gen 28S rDNA, gen *COI* mtDNA y gen *Hsp90*

Las extracciones de DNA de los nematodos fueron enviadas para amplificación y secuenciación a la empresa Macrogen ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)) en Seul, Korea del Sur. Para la región ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA, utilizando los iniciadores AB28 (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') y TW81 (5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3') con las condiciones de amplificación siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, 35 ciclos con desnaturalización a 95°C por 45 seg, anillamiento a 57°C por 30 seg, extensión a 72°C por 1.5 min y extensión final a 72°C por 5 min, esperando un fragmento ~750 pb (Ramírez-Suárez, 2014).

La amplificación de gen 28S del rDNA tuvo como objetivo amplificar los segmentos de expansión D2-D3 con los iniciadores D2A (5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3') y D3B (5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3') esperando un fragmento de ~800 pb. Las condiciones de amplificación consistieron en: desnaturalización inicial de 95°C por 3 min, 35 ciclos con desnaturalización a 95°C por 45 seg, anillamiento a 57°C por 45 seg, extensión de 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 5 min (Ramírez-Suárez, 2014).

La amplificación de *COI* del mtDNA se efectuó con los iniciadores COI-F1 (5'-CCTACTATGATTGGTGGTTTTGGTAATTG-3') y COI-R2 (5'-GTAGCAGCAGTAAATAAGCACG-3') utilizando el programa de amplificación siguiente: desnaturalización inicial a 94°C por 2 min, 30 ciclos con desnaturalización a 94°C por 30 seg, anillamiento a 45°C por 15 seg, extensión a 72°C por 1 min y con una extensión final a 72°C por 10 min, esperando un fragmento amplificado de ~850 pb (Kanzaki y Futai, 2002).

El gen *Hsp90* fue amplificado parcialmente con los iniciadores degenerados U83 (5'-AAYAARACMAAGCCNTYTGGAC-3') y L1110 (5'-TCRCARTT VTCCATGATRAAVAC-3') propuestos por Skantar y Carta (2004), esperando un fragmento de ~300 pb. Fueron probadas tres programas de amplificación (Cuadro 4):

**Cuadro 4.** Condiciones de PCR probadas para la amplificación parcial del gen *Hsp90*.

Programa	Condiciones de amplificación	Referencias
A	94°C por 10 min, 35 ciclos: 94°C por 20 seg, 65°C por 5 seg, 60°C por 5 seg, 55°C por 5 seg, 50°C por 5 seg, 68°C por 1 min y extensión final a 68°C por 15 min.	(Skantar y Carta, 2004)
B	95°C por 5 min, 38 ciclos: 95°C por 30 seg, 53°C por 30 seg, 68°C por 1 min y 68°C por 15 min.	(Madani <i>et al.</i> , 2011)
C	94°C por 4 min, 35 ciclos: 94°C por 30 seg, 56°C por 45 seg, 72°C por 1 min y 72°C por 5 min.	(Hasjihassani y Tenuta, 2017)

En la condición C el iniciador L1110 fue reemplazado por el primer Dipsaci\_hsp90R (5'-GWGTTAWATAACTTGGTCRGC-3') el cual fue propuesto por Madani *et al.* (2015).

Las secuencias de las regiones analizadas fueron visualizadas, editadas manualmente y obtenida la secuencia consenso utilizando el programa MEGA7 (Kumar *et al.*, 2015). Así mismo, con la finalidad de conocer la variación o diferencia entre poblaciones, fue obtenida la composición de nucleótidos de las secuencias por región amplificada.

#### 4.4.4 Análisis filogenético

Las secuencias de las regiones ITS, segmentos de expansión D2-D3 28S del rDNA y *COI* del mtDNA fueron comparadas, de manera individual, con las secuencias depositadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante el programa BLASTN (Altschul *et al.*, 1997) y compiladas en formato fasta para la reconstrucción filogenética. Las secuencias a considerar como grupo de comparación u outgroup de cada región fueron elegidas de acuerdo a trabajos anteriores de caracterización de especies de *Ditylenchus* (Vovlas *et al.*, 2011; Skwiercz *et al.*, 2017).

Posteriormente, el conjunto de secuencias fueron alineadas usando MUSCLE con parámetros por defecto. Los conjuntos de secuencias fueron analizadas mediante inferencia bayesiana (BI) usando MrBayes v3.1.2 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001). El modelo de sustitución de nucleótidos de DNA se obtuvo utilizando el programa JModeltest v2.1.10 (Posada, 2008) con la Información del Criterio Akaike. El análisis BI para cada gen se inició con un árbol aleatorio y se ejecutó con cuatro cadenas para  $1.0 \times 10^6$  generaciones. Las cadenas de Markov fueron muestreadas en intervalos de 200 generaciones. Se realizaron dos corridas para cada análisis. Después de descartar las muestras quemadas y evaluar la convergencia, las muestras restantes se conservaron para un análisis más detallado. Las topologías fueron utilizadas para generar un árbol consenso de la regla de mayoría del 50%. Las probabilidades posteriores fueron dadas a los clados apropiados. Los árboles filogenéticos fueron visualizados utilizando el programa FigTree v1.4.3.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Extracción de especímenes

Las muestras presentaron síntomas como amarillamiento, necrosis de hojas, deformación de bulbos y acortamiento de entrenudos (Figura 2).

Se observó que la técnica de extracción del embudo de Baermann presentó la ventaja de que los especímenes obtenidos se encontraban vivos y muy activos a diferencia de cuando se aplicó la técnica de macerado-tamizado-centrifugado con la que se obtuvieron especímenes tanto vivos como muertos.

### 5.2. Identificación taxonómica

#### 5.2.1 Géneros de nematodos

Se realizó la revisión de los extractos correspondientes bajo microscopio estereoscópico y con base a Mai y Mullin (1996) y Subbotin y Riley (2012) la identificación de los géneros correspondieron a: *Aphelenchoides*, *Aphelenchus*, *Dorylaimus*, *Helicotylenchus*, *Mononchus* y *Rhabditis*. En el Cuadro 5 se ilustran las muestras con presencia de *Ditylenchus*. Fueron asignados códigos para diferenciación de las poblaciones.

**Cuadro 5.** Hospedante, material, ubicación y código asignado a las muestras positivas a *Ditylenchus*.

Hospedante	Material	Latitud	Longitud	Ubicación	CodigolD
Alfalfa	Plantas	19.9728	-103.5279	Atoyac, Jal.	AlJal
Ajo	Bulbos	22.2983	-102.2189	Tepezalá, Ags.	AjAgs
Ajo	Plantas	20.4578	-100.9925	Cortazar, Gto.	AjGto
Ajo	Bulbos	ND	ND	Tetela de Ocampo, Pue.	AjPue





**Figura 2.** Material vegetal colectado con síntomas de amarillamiento, deformación de hojas, tallos y necrosis de bulbos. A-D. Ajo; E. Alfalfa.

## 5.2.2 Caracterización de poblaciones de *Ditylenchus*

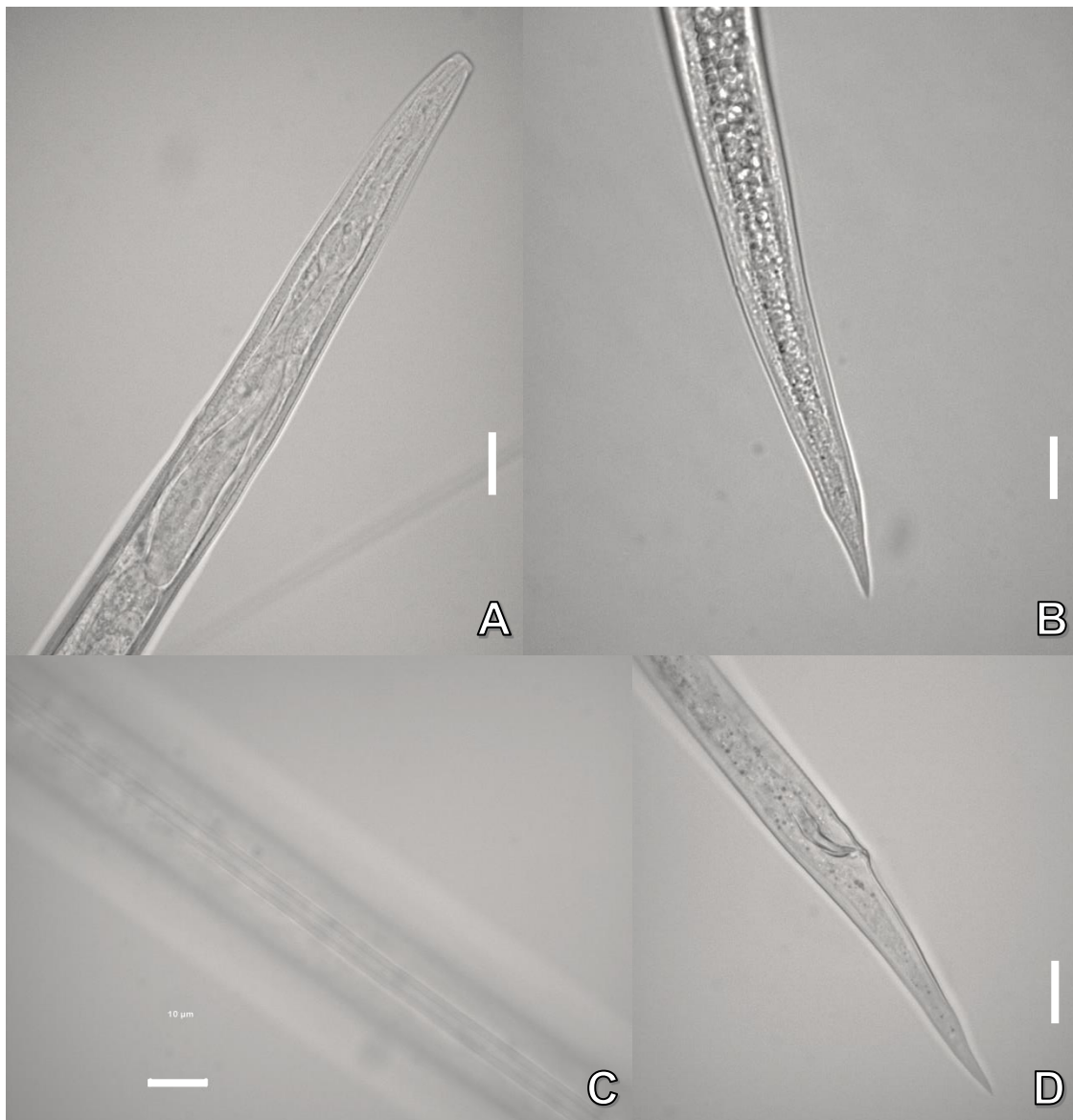
### 5.2.2.1. Morfología, morfometría y microscopía electrónica de barrido

Los nematodos (hembras y machos) analizados, de las cuatro poblaciones, mostraron características morfológicas similares y se describen a continuación. Las hembras con región cefálica moderadamente desarrollada, estilete pequeño, débil con nódulos bien desarrollados, bulbo medio con válvula definida, región glandular sin sobreposición, un ovario funcional, vulva localizada en el extremo posterior al 75-85%, saco posuterino (PUS) la mitad de la distancia entre la vulva y el ano (50%). Los machos presentaron las mismas características que las hembras a excepción del tamaño, éstos se observaron relativamente más pequeños; espículas y gubernáculo simple de tamaño moderados y con bursa que cubrió 75% de la cola (bursa leptoderan). Con ayuda de microscopía de luz en ambos sexos se lograron distinguir 4 líneas en el campo lateral (Figura 3-6). Los caracteres de diagnóstico y los índices De Man obtenidos para la identificación de la especie se reportaron en el Cuadro 6.

La morfometría de referencia para *D. dipsaci* sensu stricto únicamente menciona 12 caracteres de diagnóstico. Considerando los estudios recientes sobre descripción de nuevas especies de *Ditylenchus* (Vovlas *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2013; Esmaeili *et al.*, 2016; Skwiercz *et al.*, 2017) las poblaciones del presente trabajo fueron analizadas mediante 28 caracteres lo cual ofrece un mayor sustento científico a las determinaciones realizadas.

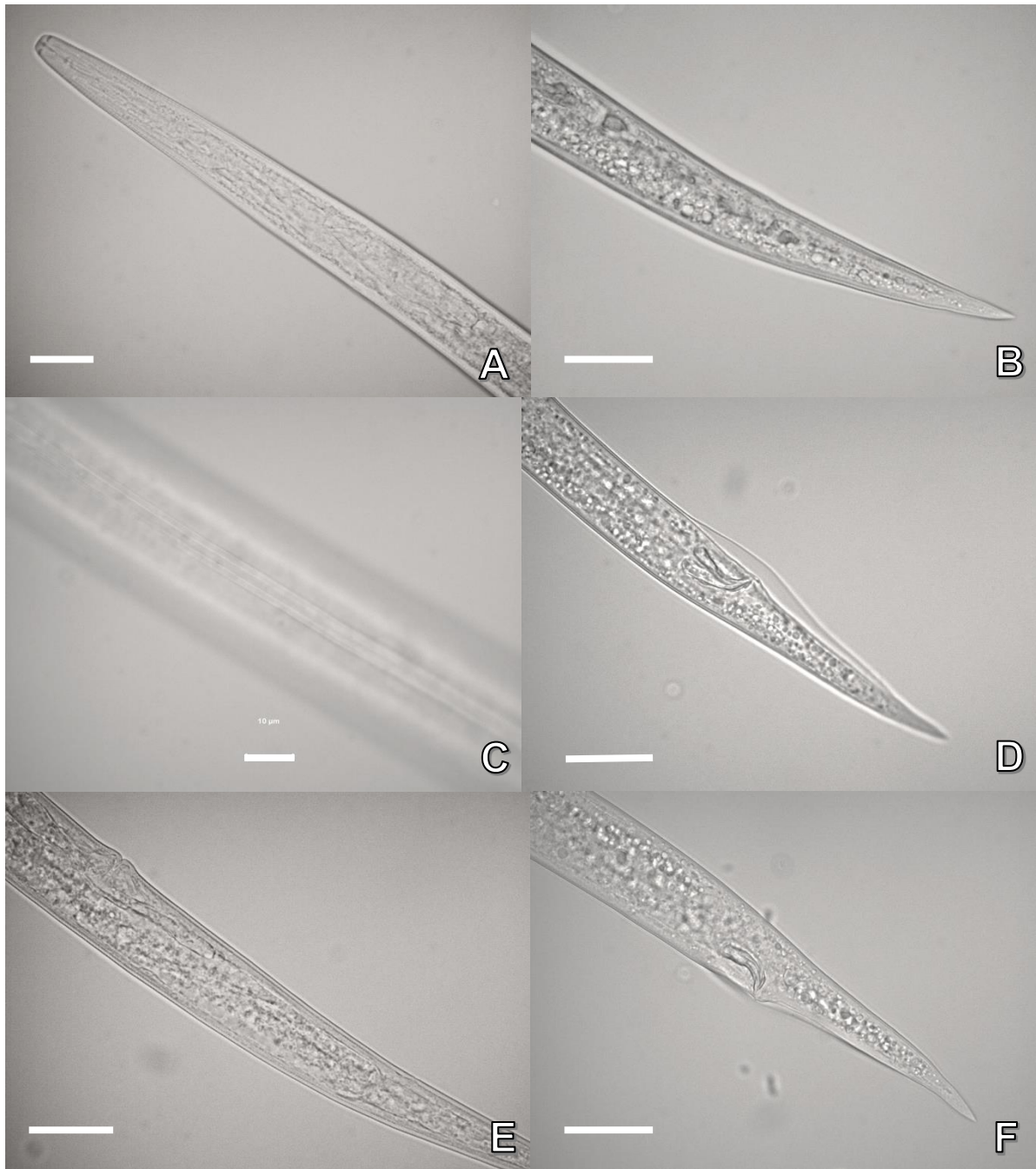
En general, la morfología y morfometría de las poblaciones concuerdan con los reportadas por Hooper (1972), Decker (1969) y Sturhan y Brzeski (1991) para *D. dipsaci* s.s. Es importante hacer notar que la población AlJal, aislada de alfalfa, presentó los valores menores de rango en hembras respecto a los reportados en los caracteres de longitud de cuerpo, estilete, cola, PUS, c y V ( 739.6-1383.1 vs 1000-1700; 9.2-12 vs 10-13; 60-113.2 vs 95-105; 23.5-63 vs 50; 5.0-8.5. vs 6.0-8.8; 10.7-16.4 vs 13.3-19.5; 76.6-80.7 vs 79-86, respectivamente). En los machos se observaron

diferencias en longitud de cuerpo, estilete, b, c y T (877.8-1321.5 vs 1000-1500; 7.6-10.4 vs 9-12; 5.0-8.5 vs 5.7-7.8; 10.7-16.4 vs 12-17.3; 48.0-76.8 vs 65-72, respectivamente). Esta variabilidad pueden ser originada con base a las diferencias del valor nutricional del hospedante, competencia por sitios (Dropkin, 1988) o bien por los patrones de crecimiento alométrico (Hunt y Palomares-Rius, 2012). En diversos estudios se ha reportado esta variabilidad de caracteres de *D. dipsaci* en poblaciones con diferente hospedante y origen (Aftalion y Cohn, 1990; Chizhov *et al.*, 2010; Tenutla *et al.*, 2014; Esmaeili *et al.*, 2016).

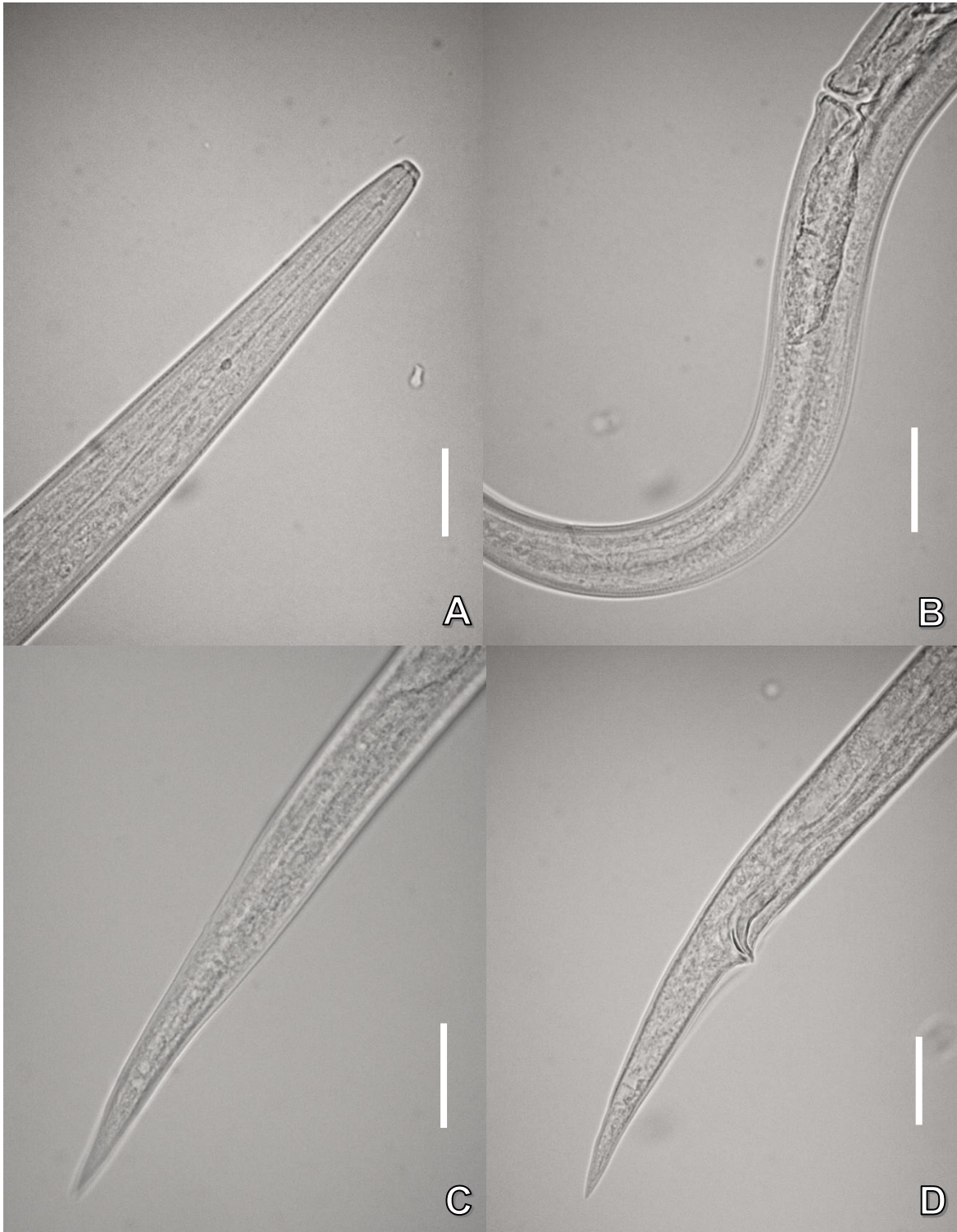


**Figura 3.** Morfología de la población AIJal. Hembra (A-B) y macho (C). A. Parte anterior mostrando el esófago; B y D. Terminación de la cola y C. Campo lateral con 4 líneas. Barras de escala: A, B y D= 20  $\mu$ m, C= 10  $\mu$ m.

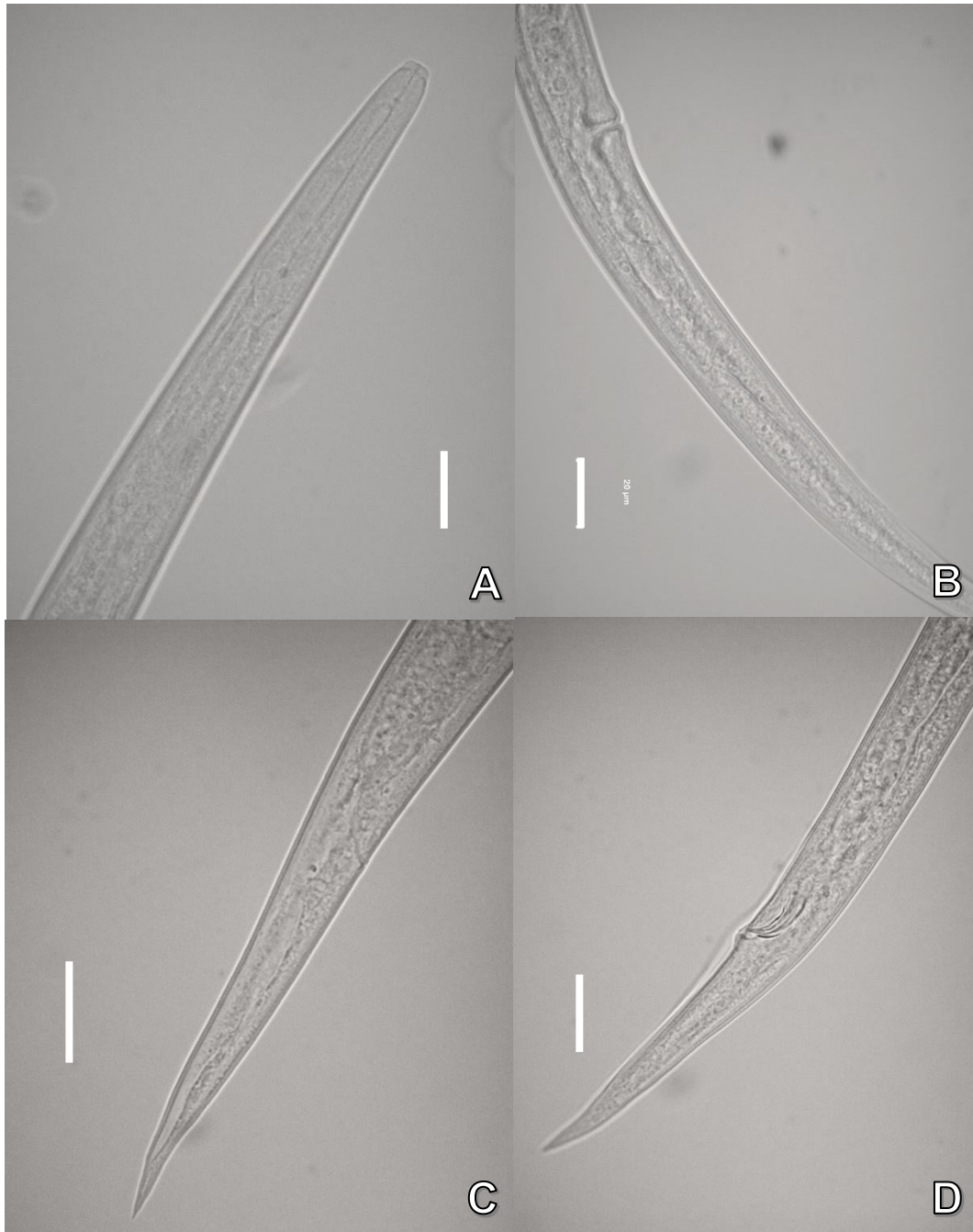




**Figura 4.** Morfología de la población AjAgs. Hembra (A-C, E) y macho (D, F). A. Parte anterior mostrando el esófago; B, D y F. Terminación de la cola; C. Campo lateral con 4 líneas, E. Vulva y saco postuterino. Barras de escala: A, B, D-F= 20 µm, C= 10 µm.



**Figura 5.** Morfología de la población AjGto. Hembra (A-C) y macho (D). A. Parte anterior mostrando el esófago; B. Vulva y saco postuterino; C y D. Terminación de la cola. Barras de escala= 20  $\mu$ m.



**Figura 6.** Morfología de la población AjPue. Hembra (A-C) y macho (D). A. Parte anterior mostrando el esófago; B. Vulva y saco postuterino; C y D. Terminación de la cola. Barras de escala= 20  $\mu$ m.

**Cuadro 6.** Morfometría de poblaciones de *Ditylenchus dipsaci* extraídos de *Medicago sativa* y *Allium sativum* (media±desviación estándar y (rango)).

POBLACIÓN n=26	AlJal		AjAgs		AjGto		AjPue		<i>D. dipsaci</i> s.s.*	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
Longitud cuerpo	1033.3±177.5 (739.6-1383.1)	1115.8±110.4 (877.8-1321.5)	1252.3±89.6 (1086.4-1435.6)	1193.7±102.7 (957.2-1390.5)	1361.5±179.1 (1002.9-1684)	1351.8±89.2 (1143.4-1569.1)	1414.7±105.6 (1186.2-1590.6)	1355.7±92.8 (1216.4-1520.2)	1000-1700	1000-1500
Diámetro labio	6.3±0.7 (4.2-7.2)	5.9±1.0 (4.2-7.4)	6.8±0.4 (6.0-7.4)	6.3±0.6 (4.4-7.4)	6.6±0.4 (5.9-7.2)	6.2±0.4 (5.3-6.8)	6.6±0.3 (5.9-7.3)	6.4±0.3 (5.8-6.9)	ND	ND
Altura labio	2.3±0.3 (1.9-2.8)	2.2±0.4 (1.5-2.8)	2.4±0.3 (1.7-2.9)	2.3±0.3 (1.6-2.9)	2.8±0.7 (2.3-3.3)	2.7±0.2 (2.5-3.2)	2.7±0.2 (2.2-3.0)	2.5±0.3 (2.1-3.1)	ND	ND
Estilete	10.3±0.7 (9.2-12.0)	9.3±0.7 (7.6-10.4)	11.3±0.6 (10.4-12.6)	11.6±0.6 (10.6-13)	12.2±0.6 (11-13.3)	12.3±0.5 (11.1-13.3)	12.2±0.5 (11.1-12.9)	11.8±0.7 (10.4-13)	10-13	9-12
Columna estilete	4.4±0.9 (3.0-7.6)	4.8±0.5 (3.8-5.7)	5.8±0.6 (4.5-6.7)	5.9±0.8 (4.2-7.7)	5.4±0.6 (4.1-6.5)	5.5±0.7 (4.0-6.6)	5.6±0.7 (4.1-7.1)	5.3±0.5 (4.2-6.5)	ND	ND
Cono estilete	4.6±0.5 (3.7-5.7)	4.5±0.6 (3.5-5.8)	5.4±0.7 (4.3-7.0)	5.4±0.8 (4.4-7.1)	6.7±0.6 (4.8-7.8)	6.7±0.6 (5.4-7.9)	6.5±0.7 (5.5-8.5)	6.4±0.6 (5.2-7.5)	ND	ND
M (cono*100/estilete)	44.4±5.5 (33.9-57.6)	51.0±4.6 (40.9-60.2)	47.7±5.2 (41-59)	51.3±6.6 (38.5-63.1)	54.6±4.6 (42.5-63.4)	54.3±4.8 (47.6-64.6)	52.9±5.4 (44.5-66.4)	54.3±3.9 (46.1-63.8)	ND	ND
DGED	1.7±0.2 (1.3-2.1)	1.7±0.3 (1.1-2.2)	1.9±0.2 (1.5-2.3)	1.8±0.2 (1.4-2.3)	1.8±0.2 (1.5-2.2)	2.0±0.3 (1.5-2.4)	2.0±0.2 (1.7-2.6)	1.9±0.2 (1.5-2.4)	ND	ND
Cabeza-metacarpus	66.2±11.2 (54-110)	67.8±5.9 (52.7-80.2)	66.5±3.8 (58.9-74.3)	65.8±4.2 (59-73.6)	75.3±2.7 (70.8-80.5)	76±3.4 (67.4-81.5)	72.2±4.8 (60.8-80.6)	74±3.9 (67.2-86.5)	ND	ND
Cabeza-poro excretor	118.4±18.6 (91.3-170)	125.3±25.3 (71.7-197.3)	136±12.6 (112.7-166.2)	137.8±13.1 (111.1-163.8)	153.5±10.4 (137.8-184.5)	151.6±11.6 (131.5-175.4)	155.5±10.5 (139.5-188.3)	154.3±10.9 (125.7-175.2)	ND	ND
Cabeza-cardia	167.5±35.4 (118-238.9)	175±26.9 (120.3-251.2)	175.4±10.5 (155.4-192.4)	173.2±15.3 (140.9-210.5)	192.1±10.5 (173.3-216.4)	195.3±11.3 (168.4-219.4)	201.7±10.9 (175.4-222.7)	199.9±18.2 (153.4-240.5)	ND	ND
Ancho máx cuerpo	27.6±4.9 (22.8-42.9)	26.7±3.6 (20.2-32.7)	33.6±3.8 (27.4-40.9)	29.6±3.7 (22.4-37.6)	33.3±3.4 (28.2-40)	29.1±2.7 (25.3-34.8)	35.3±4.6 (29.3-48.1)	29.3±3.1 (25.8-36.9)	ND	ND
Cabeza a vulva	803.1±147.2 (564.2-1072.3)	NA	1011.3±76.1 (866.6-1169.3)	NA	1106.5±173.4 (768.1-1407.1)	NA	1157±89.8 (972.7-1324.8)	NA	ND	NA
Ancho nivel vulva	26.5±5.4 (21.3-42.0)	NA	31.2±3.5 (24.1-38.5)	NA	30.7±2.1 (27.3-34.6)	NA	32.8±4.3 (25.3-45)	NA	ND	NA
PUS	40.0±13.1 (23.5-63.0)	NA	51.1±4.7 (44-58.5)	NA	65.4±11.9 (39.1-91.5)	NA	69±9.7 (54.4-92.8)	NA	½ DVA	NA
Distancia vulva-ano	134.6±25.0 (103.5-205.7)	NA	145.9±14 (117.9-180.7)	NA	157.8±24 (120.1-215)	NA	163.7±18.7 (124.7-208.6)	NA	1 ¼-2 ¼ long. cola	NA
Long. cola	79.4±12 (60.0-113.2)	82.9±7.9 (67.3-102)	87.8±6.7 (78.2-111.2)	83.1±6.5 (65.5-95.3)	90.7±10.2 (75.3-114.6)	85.8±7.6 (71.4-100.3)	95.7±9.4 (78.8-115.2)	93.9±6.0 (78.8-109)	95-105	ND
Ancho nivel ano/cloaca	16.1±2.1 (11.7-22)	18.3±2.9 (11.2-23.7)	18.7±1.6 (15.9-22.8)	20±2.2 (16.8-24.6)	19.4±2.4 (15.5-26.6)	19.8±1.8 (16.7-24.8)	17.6±1.4 (14.9-20.5)	19.9±1.4 (18.1-23.9)	ND	ND
Long espícula	NA	22.2±3.2 (15.4-27.2)	NA	23.8±1.4 (21.4-27.2)	NA	25.3±2.6 (19.1-30.4)	NA	26.5±1.6 (22.8-29.7)	NA	20-28
Long gubernáculum	NA	7.8±1.1 (6.1-10.6)	NA	7.2±0.9 (5.9-9.1)	NA	8.8±1.2 (6.2-11)	NA	8.6±1.2 (5.8-10.8)	NA	8-11
Long testículos	NA	708±114.3 (481.7-945.5)	NA	674.8±73.1 (452.2-796.4)	NA	835.2±100.2 (657.1-1104.4)	NA	780.4±82.3 (649.1-991.8)	NA	ND
a	37.2±4.9 (30.8-48.7)	41.1±6.1 (29.2-57.8)	37±3.2 (30.6-44.1)	40±4.0 (31.9-48.3)	40.6±6.1 (30.2-54.5)	46.2±4 (39.9-53)	39.6±4.1 (32.6-47.2)	45.8±5.1 (38-53.7)	30.2-64	35.4-53.5
b	6.2±0.8 (5.0-8.5)	6.2±1.2 (3.5-10.0)	7.1±0.6 (6.2-9.0)	6.9±0.5 (5.8-8.0)	7.1±1 (5.4-8.9)	6.9±0.4 (6.2-7.7)	7.0±0.5 (5.8-7.8)	6.7±0.8 (5.6-9.5)	6.0-8.8	5.5-7.8
c	13.0±1.3 (10.7-16.4)	13.4±1.2 (11.3-16.0)	14.2±1.0 (12.9-16.6)	14.3±1.0 (12.5-16.3)	14.9±2.4 (15.5-26.6)	15.7±1.1 (13.7-17.7)	14.7±1.3 (13.3-17.2)	14.4±1.0 (12.9-16.3)	13.3-19.5	12-17.3
c'	4.9±0.6 (4.1-6.0)	4.4±0.8 (3.0-7.1)	4.7±0.4 (4.1-5.5)	59.2±4.8 (48.2-67.3)	4.6±0.8 (2.8-6.1)	4.3±0.5 (3.4-5.8)	5.4±0.6 (4.6-7.0)	4.7±0.4 (4.0-5.6)	ND	ND
V (%)	77.8±2.3 (72.6-80.7)	NA	80.8±1.7 (75.2-83.2)	NA	81.6±3.3 (75.7-87.6)	NA	81.8±1.1 (79.7-83.8)	NA	79-86	NA
PUS/DVA(%)	29.8±8.9 (20-54.9)	NA	34.8±3.9 (26.6-40.6)	NA	41±7.7 (28.8-56.6)	NA	42±5.2 (35.3-55.9)	NA	ND	NA
T (%)	NA	63.8±6.2 (48.0-76.8)	NA	56.4±6.1 (47.2-70.0)	NA	61.8±5.9 (51.9-73)	NA	57.5±5.0 (47.4-70)	NA	65-72

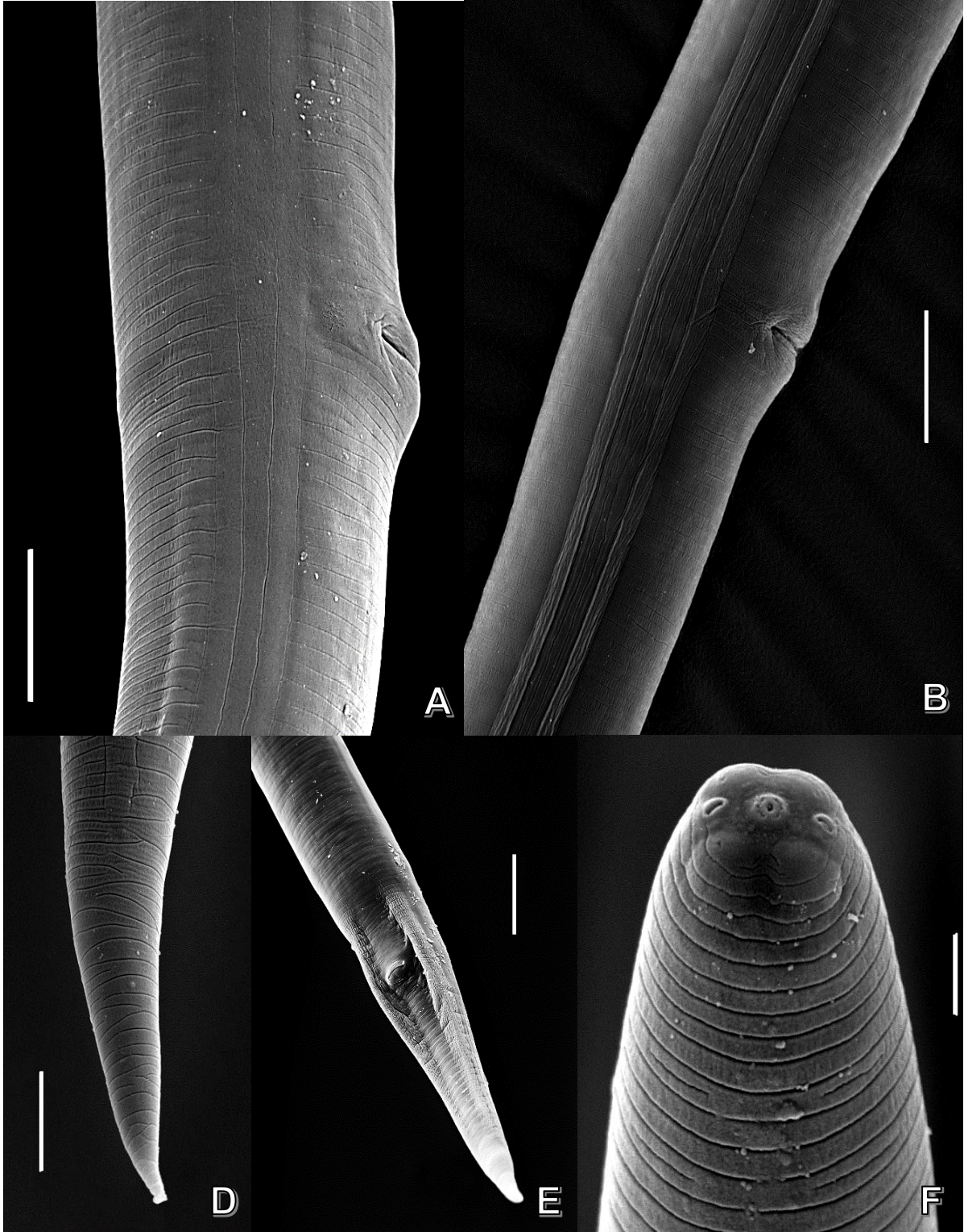
\* Hopper (1972); Decker (1969); Sturhan y Brzeski (1991)

Únicamente las poblaciones AlJal y AjAgs fueron procesadas para microscopía electrónica debido a que en las restantes el número de nematodos obtenidos fue mínimo y la totalidad de los mismos se utilizaron en el análisis morfológico y morfométrico.

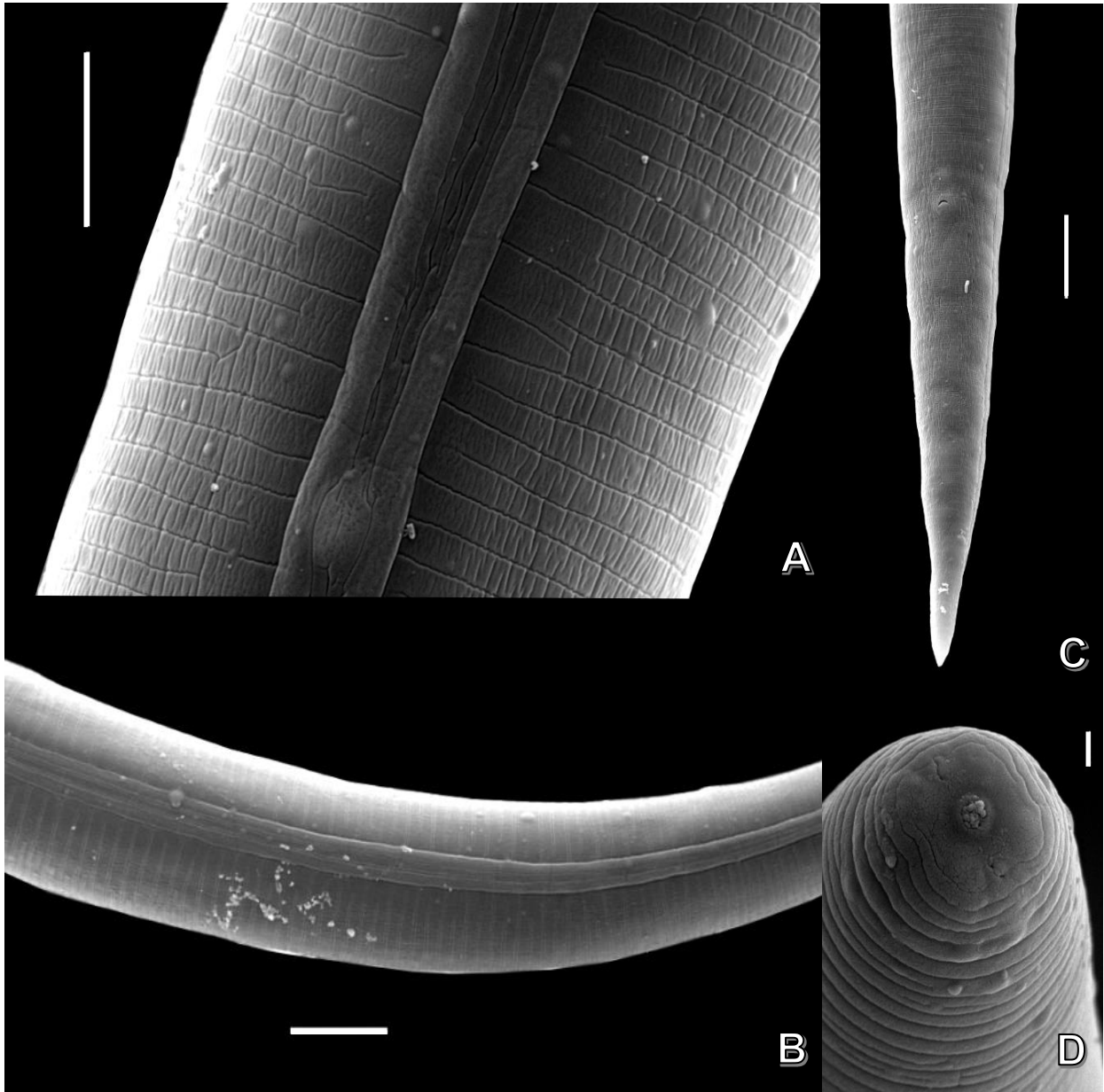
En los especímenes de ambas poblaciones se observaron 4 líneas equidistantes en el campo lateral (Figura 7A) lo cual concuerdan con lo reportado para *D. dipsaci* por Hooper (1972), Decker (1969) y Sturhan y Brzeski (1991). Sin embargo, en algunos casos, se observaron 4 líneas continuas y líneas discontinuas internas localizadas en diferentes zonas a lo largo del cuerpo (Figura 8B). Thorne (1961) describió estas variaciones en una población de *D. destructor* de remolacha azucarera en la que observó 11 líneas, las 5 líneas aparentes correspondieron a las 5 crestas de los arcos formados. De acuerdo con Hunt y Palomares-Rius (2012) la zona del cuerpo en donde el número de líneas se ha determinado más estable es el nivel medio lateral del cuerpo.

Se obtuvieron fotografías de los extremos anterior y posterior. Se observó una región cefálica aplanada, en forma cuadrangular, no separada del resto del cuerpo, estoma en forma de poro abierto localizado en la parte media de un pequeño disco oral, ligeramente elevado y circular. Aberturas amfiales claramente visibles (Figura 7F y 8D). La cola conoide alargada con término finamente redondeado (Figura 7D-E y 8C).





**Figura 7.** MEB de la población AJJal. Hembra (A-D, F) y Macho (E). A. Campo lateral mostrando 4 incisuras equidistantes; B. Campo lateral mostrando 4 líneas continuas e internas discontinuas; D y E. Cola cónica; F. Vista de región anterior. Barras de escala: A, B, E=10  $\mu\text{m}$ ; D=5  $\mu\text{m}$ ; F=2  $\mu\text{m}$ .

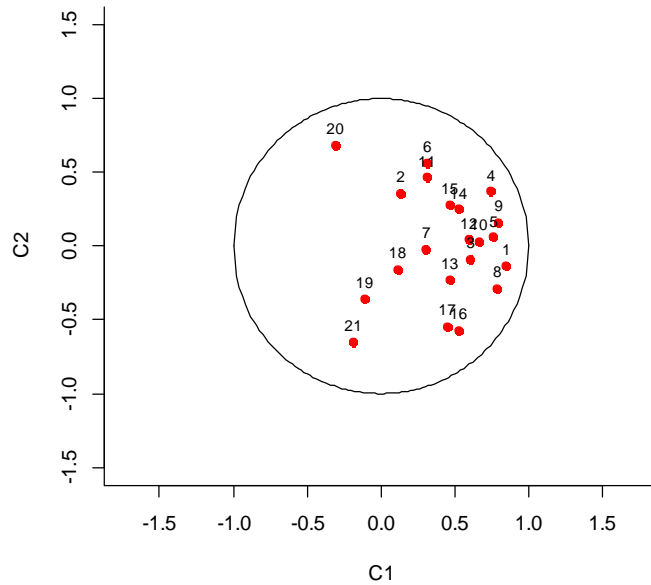


**Figura 8.** MEB de la población AjAgs. Hembra (A, D) y J2 (B, C). A y B. Campo lateral con 4 incisuras; C. Cola cónica; D. Vista de región anterior. Barras de escala: A=5  $\mu$ m; B y C=10  $\mu$ m; D=1  $\mu$ m.

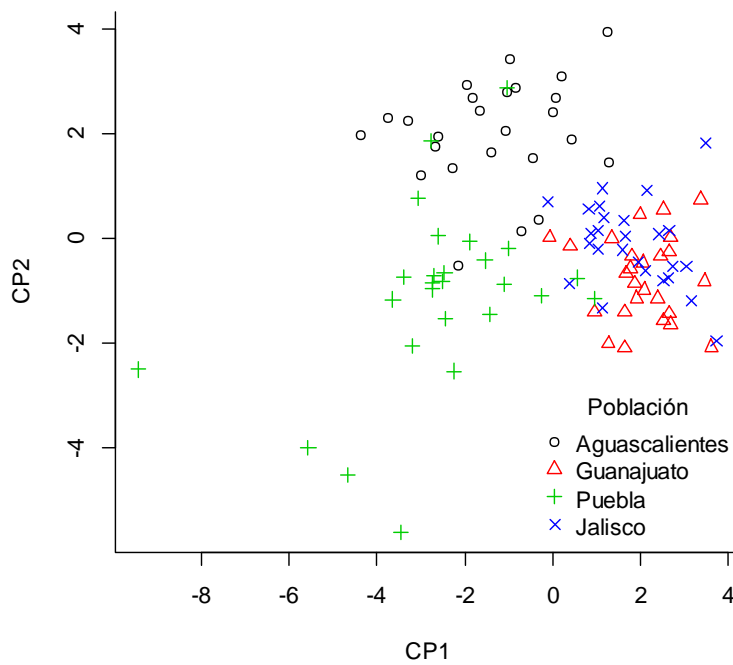
### 5.2.2.2. Análisis estadístico

En el cuadro 6 se observan los parámetros estadísticos calculados para cada población.

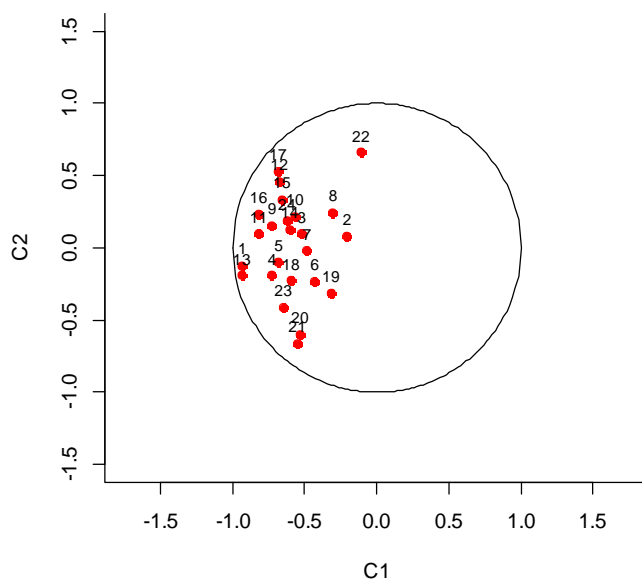
El Análisis de Componentes Principales (ACP) se realizó de manera separada con base al sexo de los especímenes de las cuatro poblaciones con 22 y 25 caracteres medidos (machos y hembras, respectivamente). En machos se observó que la mayoría de las variables presentaron una correlación positiva tanto con CP1 como con CP2 (Diamlabio, Altlabio, Estilete, Longcono, Longcolumna, PoroExcretor, Cardia, Anchomaxc, Longespícula, Longcola, Diamnivecloaca). Las variables Longitudcuerpo, DGED, Metacarpus, Gobernáculo, Longtesticulos, a y c' presentaron una correlación positiva únicamente con CP1. La variable c presentó correlación positiva con CP2 mientras que b y T (%) se observaron con correlación negativa (Figura 9). Cuando las hembras fueron sometidas al ACP se observó que las variables Diamlabio, Altlabio, M, DGED, Anchomaxc, Metacarpus, PoroExcretor, Cardia, Cabeza-vulva, Diamnvulva, PUS, Longcola, c' presentaron una correlación positiva con el CP2. Las variables restantes presentaron una correlación negativa para ambos componentes (Figura 11). En ninguno de los gráficos de dispersión (hembras o machos), se observaron diferencias fenéticas discretas entre las poblaciones. Los agrupamientos formados claramente presentaron solapamiento entre ellos (Figura 10 y 12), a diferencia de cuando el ACP se ha utilizado para la separación de variedades o especies de vegetales (Varela y Souki, 2013; Zapata *et al.*, 2017). Diversos autores han descrito la problemática de la identificación y clasificación de nematodos fitopatógenos empleando morfología y morfometría debido a que esas características pueden ser influenciadas por factores ambientales como la temperatura y el hospedante (Barraclough y Blackith, 1962). En *D. dipsaci* se ha observado una gran variabilidad biológica intra-específica (Sturhan y Brzeski, 1991) lo cual concuerda con lo observado en las poblaciones en estudio y sugiere la necesidad de implementar metodologías moleculares para, en caso posible, lograr la diferenciación de las mismas.



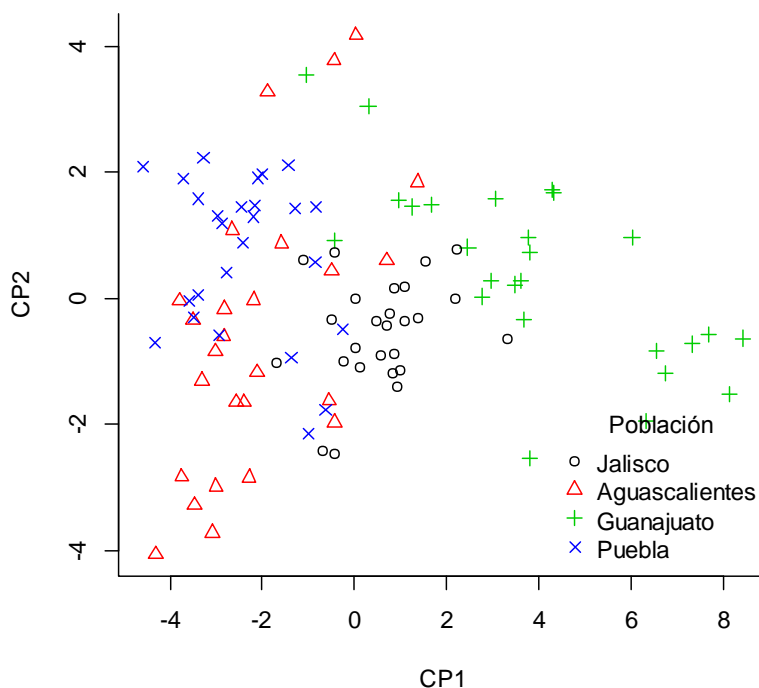
**Figura 9.** Correlaciones de variables originales con CP's en machos. 1= Longcuerpo; 2= Diamlabio; 3= Altlabio; 4= Estilete; 5= Longcono; 6= Longcolumna; 7= DGED; 8= Metacorpus; 9= Poroexcretor; 10= Cardia; 11= Anchomax; 12= LongEspícula; 13= Gobernáculo; 14= Longcola; 15= Diamnivelcloaca; 16=Longtestículos; 17= a; 18= b; 19= c; 20= c'; 21= T(%).



**Figura 10.** Gráfico de dispersión CP1 vs CP2 en machos. Agrupamiento de especímenes en poblaciones.



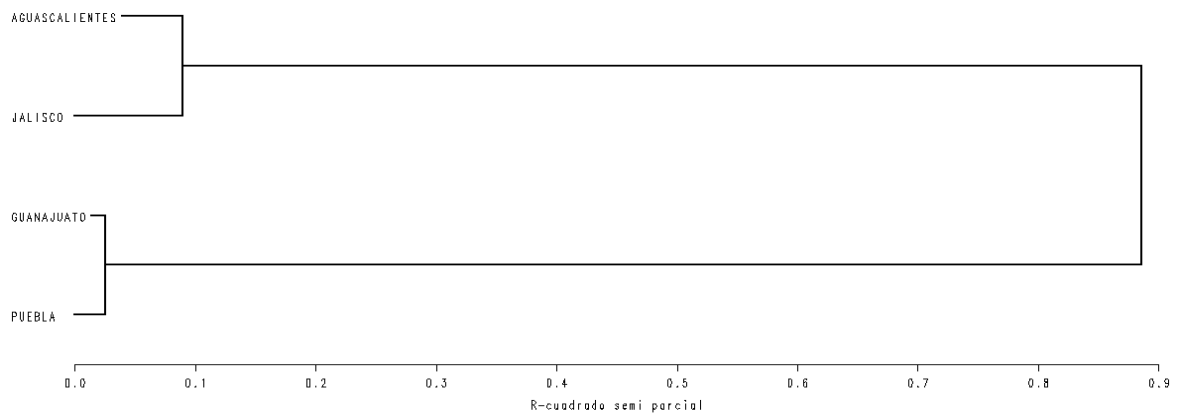
**Figura 11.** Correlaciones de variables originales con CP's en hembras. 1= Longcuerpo; 2= Diamlabio; 3= Altlabio; 4= Estilite; 5= Longcono; 6= Longcolumna; 7= M, 8= DGED; 9= Anchomaxc; 10= Metacorpus; 11= Poroexcretor; 12= Cardia; 13= Cabeza-vulva; 14= Vulva-ano; 15= Diamnvulva; 16= PUS; 17= Longcola; 18= Diamnanao; 19= a; 20= b; 21= c; 22= c'; 23= V(%); 24=PUS/VA.



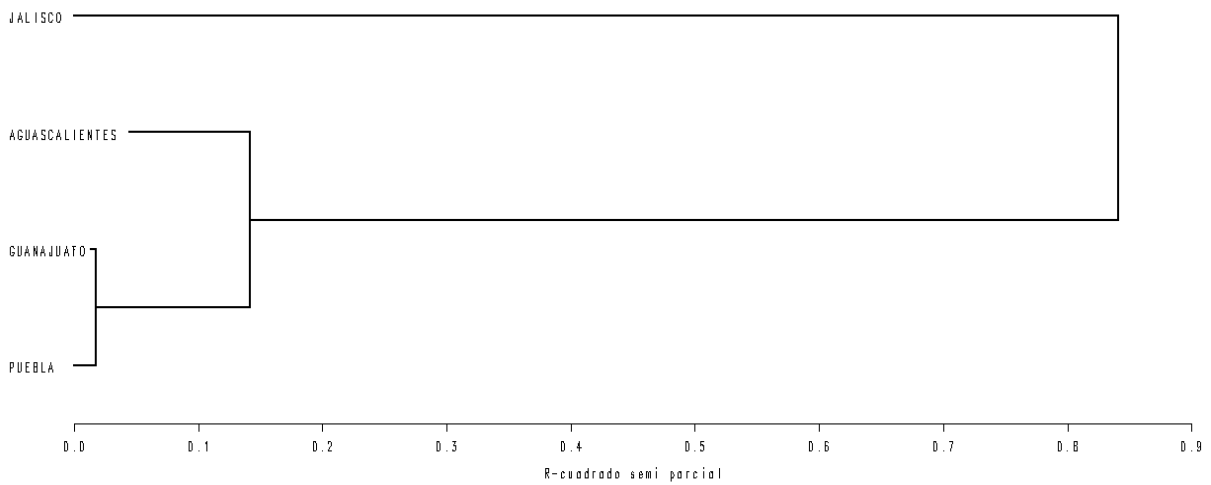
**Figura 12.** Gráfico de dispersión CP1 vs CP2 en hembras. Agrupamiento de especímenes en poblaciones.

Al realizar el análisis de conglomerados de las poblaciones mediante el método de varianza mínima de Ward se obtuvieron dos dendrogramas: En el dendrograma de machos (Figura 13) se muestra que las poblaciones formaron dos grupos distintos: AjAgs-AIJal y AIGto-AjPue. Lo que se esperaba era que las poblaciones se agruparan de acuerdo al hospedante (grupo 1 (ajo): AIGto-AjPue-AjAgs y grupo 2 (alfalfa): AIJal), sin embargo, no se observó este comportamiento.

En el dendrograma de hembras (Figura 14), el agrupamiento de las poblaciones fue diferente al de los machos. La población AIJal formó un grupo separado de las restantes y las dos poblaciones más parecidas entre sí fueron AjPue y AjGto, formando posteriormente un grupo mayor junto con AjAgs. Esto concuerda con nuestra hipótesis original que planteaba una agrupación de acuerdo al hospedante del cual fue obtenida la población, al menos en el caso específico de hembras.



**Figura 13.** Dendrograma obtenido por el método de Ward de 22 características morfológicas evaluadas en machos de *Ditylenchus dipsaci* colectados de Aguascalientes (ajo), Guanajuato (ajo), Jalisco (alfalfa) y Puebla (ajo).



**Figura 14.** Dendrograma obtenido por el método de Ward de 25 características morfológicas evaluadas en hembras de *Ditylenchus dipsaci* colectados de Aguascalientes (ajo), Guanajuato (ajo), Jalisco (alfalfa) y Puebla (ajo).

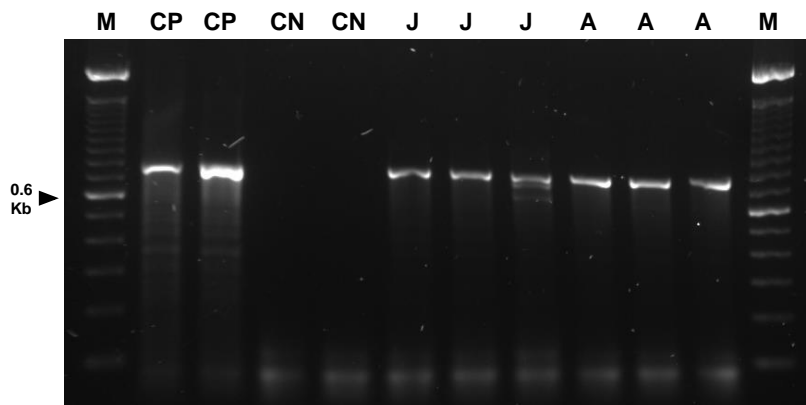
### 5.3. Caracterización molecular

Por las razones descritas en la sección de microscopía electrónica, el estudio molecular fue realizado únicamente a las poblaciones AlJal y AjAgs.

#### 5.3.1 PCR-RFLP de la región ITS1-5.8S-ITS2

El producto de PCR obtenido de la región ITS1-5.8S-ITS2 fue de 743 pb (Figura 15). Sin embargo, se observó que los amplificados también presentaron fragmentos inespecíficos, incluso en los controles positivos. Debido a la limitada disponibilidad de reactivos y al tiempo, la estandarización de la PCR para evitar lo mencionado anteriormente, no se llevó a cabo.

Los patrones de restricción para las poblaciones AlJal y AjAgs son mostrados en las figuras 16-20. En el cuadro 7 se observa un resumen de los patrones originados por población y por enzima endonucleasa.



**Figura 15.** Amplificación de región ITS1-5.8S-ITS2. Marcador molecular 100 pb *Invitrogen™* (M); Control positivo *Ditylenchus dipsaci* Ajo (CP); Control negativo ALN (CN); AlJal (J) y AjAgs (A).

Del conjunto de enzimas de restricción utilizadas, únicamente *RsaI* mostró utilidad para diferenciar AlJal de AjAgs. Aunque los patrones fueron similares, en AlJal se observó un fragmento extra de 210 pb a diferencia de la digestión en AjAgs (334, 291, 210, 143 pb vs 334, 291, 143 pb, respectivamente).



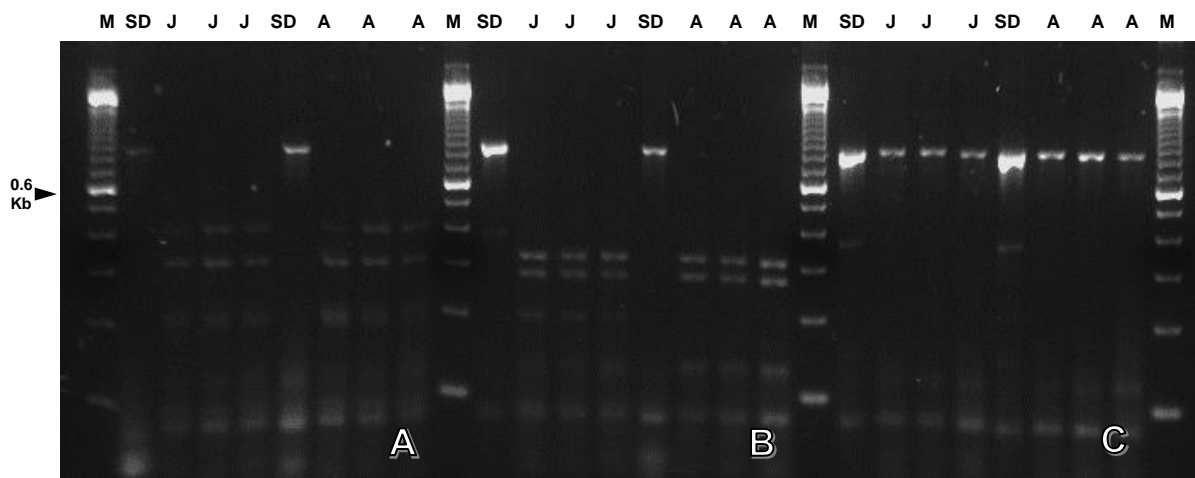
Los patrones de restricción con *Hinfl*, *Rsal*, *HaeIII* (Figura 16A, B y 18B) mostraron ligeras diferencias respecto a los reportados para *D. dipsaci* por Wendt *et al.* (1993), Ji *et al.* (2006) y Chizhov *et al.* (2010). Una explicación a estas diferencias es la concentración de agarosa utilizada durante la electroforesis. En este estudio, se utilizaron geles al 3% (con base a las recomendaciones del fabricante) y en los estudios arriba mencionados, la concentración fluctuó de 0.5-1.5%. A mayor concentración de agarosa, la porosidad del gel disminuye y dificulta la movilidad del DNA, sin embargo, la ventaja es que se obtiene una mayor resolución de las bandas (Chory y Pollard, 2003). Así mismo, en la investigación por Wendt *et al.* (1993) los iniciadores para amplificar la región ITS de la población de alfalfa fueron diferentes a los utilizados en el presente estudio por lo que el fragmento amplificado fue mayor (800 pb).

Con *TaqI* los patrones obtenidos (Figura 17B) se observaron muy diferentes a los reportados por Wendt *et al.* (1993), Chizhov *et al.* (2010) y Tenuta *et al.* (2014): 277, 210 pb vs 340, 230, 130 pb; 359, 208, 65, 51, 34 pb y 350, 190 pb, respectivamente). Lo anterior puede explicarse por la diferencia en los patotipos examinados, la concentración de los geles de electroforesis (alfalfa- ajo al 3% vs alfalfa al 0.5-1,5%; fresa-cebolla al 1%; ajo al 1%, respectivamente) los primers y el tamaño del amplificado obtenido (743 vs 800 pb).

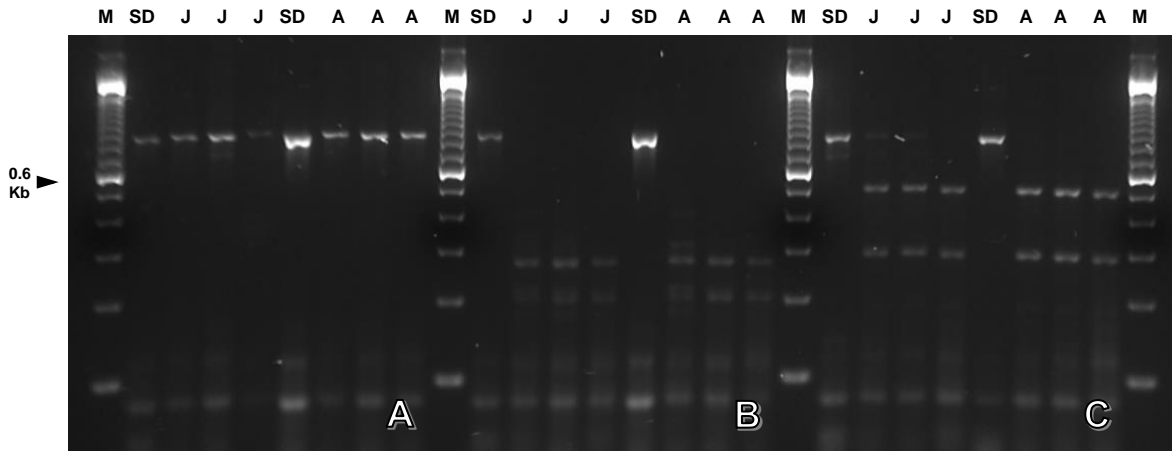
El patrón observado con *DdeI* (Figura 18C) no concordó con lo reportado por Wendt *et al.* (1993) (306, 230 pb vs 310, 290, 200 pb) a pesar de que los patotipos estudiados coinciden con la alfalfa como hospedante; sin embargo, el gel de electroforesis fue diferente en ambos estudios (3% vs 0.7-1.5%) y como se mencionó en párrafos anteriores, Wendt *et al.* (1993) obtuvo un amplificado de mayor tamaño.

Con la enzima *AluI*, lo obtenido en las poblaciones analizadas (Figura 19B) concuerda con lo reportado por Wendt *et al.* (1993) al no digerir el amplificado; sin embargo, Ji *et al.* (2006) encontraron que la digestión originó dos bandas (400, 310 pb). Lo anterior puede ser explicado al considerarse el origen geográfico y el hospedante de las poblaciones en ese estudio.

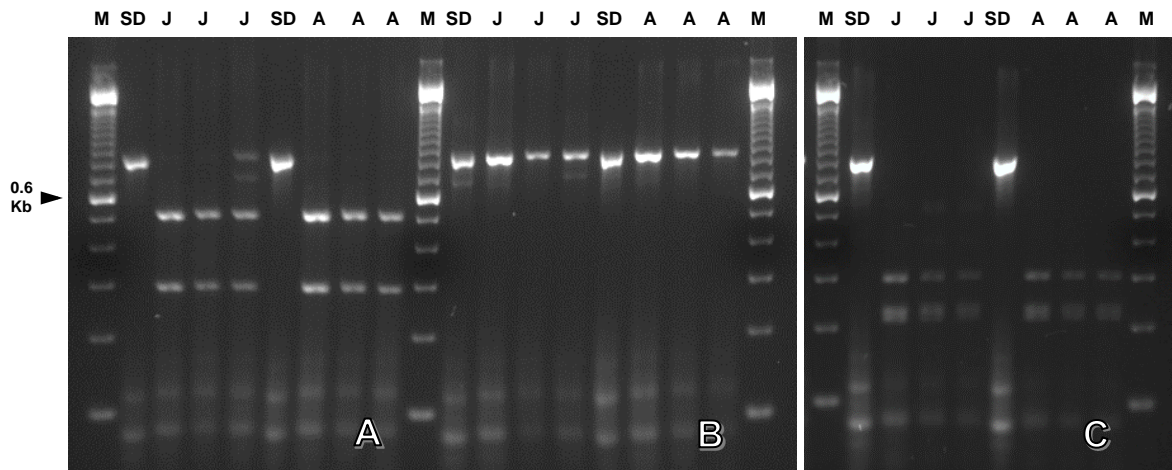
Al comparar el patrón de digestión para la enzimas *DdeI*, *RsaI*, *HinfI*, *PvuII* y *AluI* obtenidos con los reportados por Vovlas *et al.* (2011), se observaron inconsistencias en relación al tamaño y número de bandas para cada enzima; incluso en el caso particular de *PvuII* y *AluI* en el presente estudio no se observó digestión sobre el fragmento amplificado; sin embargo, Vovlas *et al.* (2011) obtuvieron 2 bandas en cada enzima: *AluI* (420, 370 pb) y con *PvuII* (900, 800 pb). Algo similar ocurre al comparar los resultados con los reportados por Tenuta *et al.* (2014) en donde obtuvieron para *HinfI*: 370, 280 pb y con *RsaI*: 290, 270, 110 pb. Debido a que la región ITS amplificada en ambos estudios fue utilizando los mismos iniciadores, la digestión con las mismas enzimas y considerando que las poblaciones analizadas coinciden en el mismo hospedante, la diferencia en patrones de bandeado demuestra la gran variabilidad genética existente entre los patotipos del nematodo del tallo y los bulbos con base a su origen geográfico.



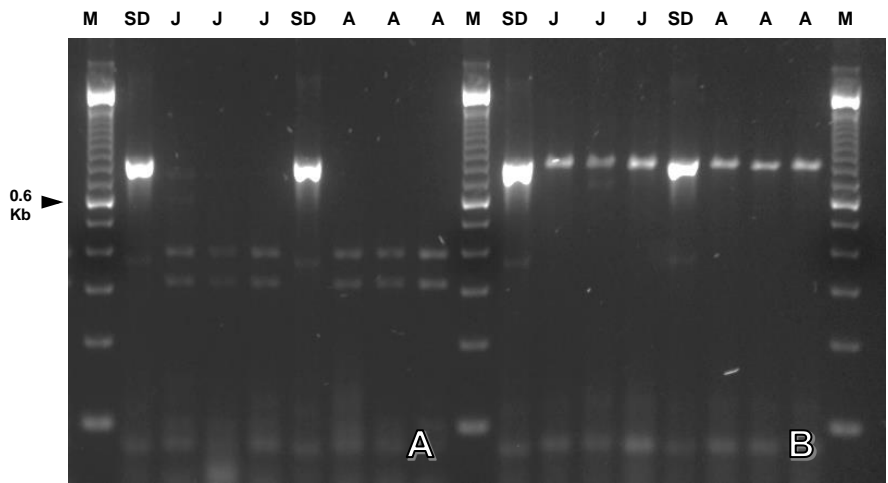
**Figura 16.** Patrones de restricción de especímenes individuales de las poblaciones AJJal (J) y AJAgs (A). Marcador molecular 100 pb *Invitrogen<sup>TM</sup>* (M); PCR sin digerir (SD): A). *HinfI*; B). *RsaI* y C). *DraI*.



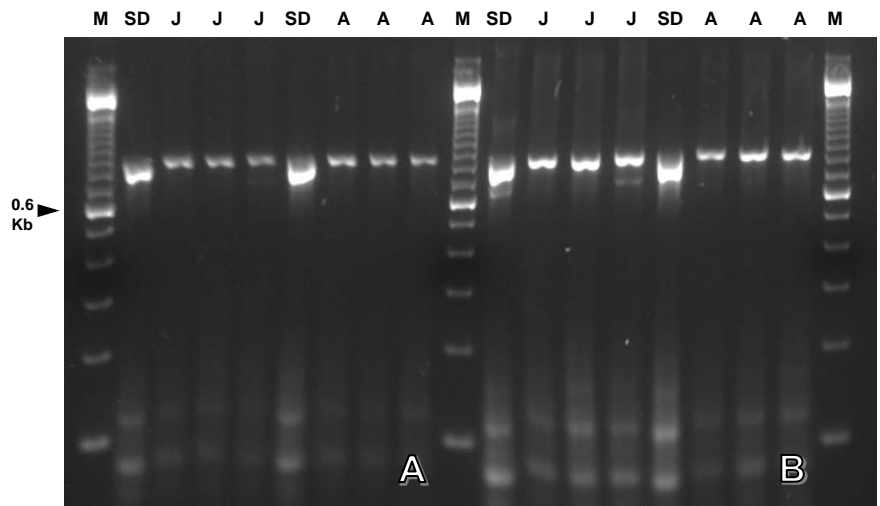
**Figura 17.** Patrones de restricción de especímenes individuales de las poblaciones AJJal (J) y AjAgs (A). Marcador molecular 100 pb *Invitrogen<sup>TM</sup>* (M); PCR sin digerir (SD): A). *PvuIII*; B). *TaqI* y C). *HhaI*.



**Figura 18.** Patrones de restricción de especímenes individuales de las poblaciones AJJal (J) y AjAgs (A). Marcador molecular 100 pb *Invitrogen<sup>TM</sup>* (M); PCR sin digerir (SD): A). *CfoI*; B). *HaeIII* y C). *DdeI*.



**Figura 19.** Patrones de restricción de especímenes individuales de las poblaciones AlJal (J) y AjAgs (A). Marcador molecular 100 pb *Invitrogen<sup>TM</sup>* (M); PCR sin digerir (SD): A). *EcoRI* y B). *AluI*.



**Figura 20.** Patrones de restricción de especímenes individuales de las poblaciones AlJal (J) y AjAgs (A). Marcador molecular 100pb *Invitrogen<sup>TM</sup>* (M); PCR sin digerir (SD): A). *SspI* y B). *SpeI*.

**Cuadro 7.** Patrones de restricción obtenidos con 13 enzimas por PCR-ITS-RFLP de las poblaciones AIJal y Ajgs.

Enzima de restricción	Población	
	AIJal	AjAgs
Hinfl	416, 324, 210	4160, 324, 210
Rsal	334, 290, 210, 143	334, 290, 143
Dra	SD	SD
PvuIII	SD	SD
TaqI	277, 211	277, 211
HhaI	534, 303, 195	534, 303, 195
CfoI	530, 300	530, 300
HaeIII	SD	SD
DdeI	306, 230	306, 230
EcoRI	412, 327	412, 327
AluI	SD	SD
SspI	SD	SD
SpeI	SD	SD

SD= Sin digestión

### 5.3.2 Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas de la región ITS de las poblaciones AIJal y AjAgs fueron de una longitud de 682 y 692 pb, respectivamente. Al obtener la composición de nucleótidos (Cuadro 8) se observaron porcentajes muy similares en ambas poblaciones.

**Cuadro 8.** Composición de nucleótidos de secuencias ITS.

Población	T (U)	C	A	G	Longitud (pb)
AIJal	30.2	21.7	23.5	24.6	682
AjAgs	29.9	21.8	23.4	24.9	692

Referente al gen 28S, los fragmentos de las poblaciones AlJal y AjAgs mostraron 717 y 734 pb de longitud, respectivamente. La composición de nucleótidos en ambas poblaciones fue muy similar (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Composición de nucleótidos de secuencias 28S.

Población	T (U)	C	A	G	Longitud (pb)
AlJal	24.7	21.2	22.5	31.7	717
AjAgs	24.9	20.8	22.6	31.6	734

Los tamaños de los fragmentos amplificados ITS y 28S concuerdan con los obtenidos por Subbotin *et al.* (2005).

Las secuencias del gen *COI* fueron de 217 y 213 pb para AlJal y AjAgs, respectivamente. La composición de nucleótidos mostró valores similares excepto en citosina y adenina, en las cuales se observaron diferencias mayores (Cuadro 10).

**Cuadro 10.** Composición de nucleótidos de secuencias *COI*.

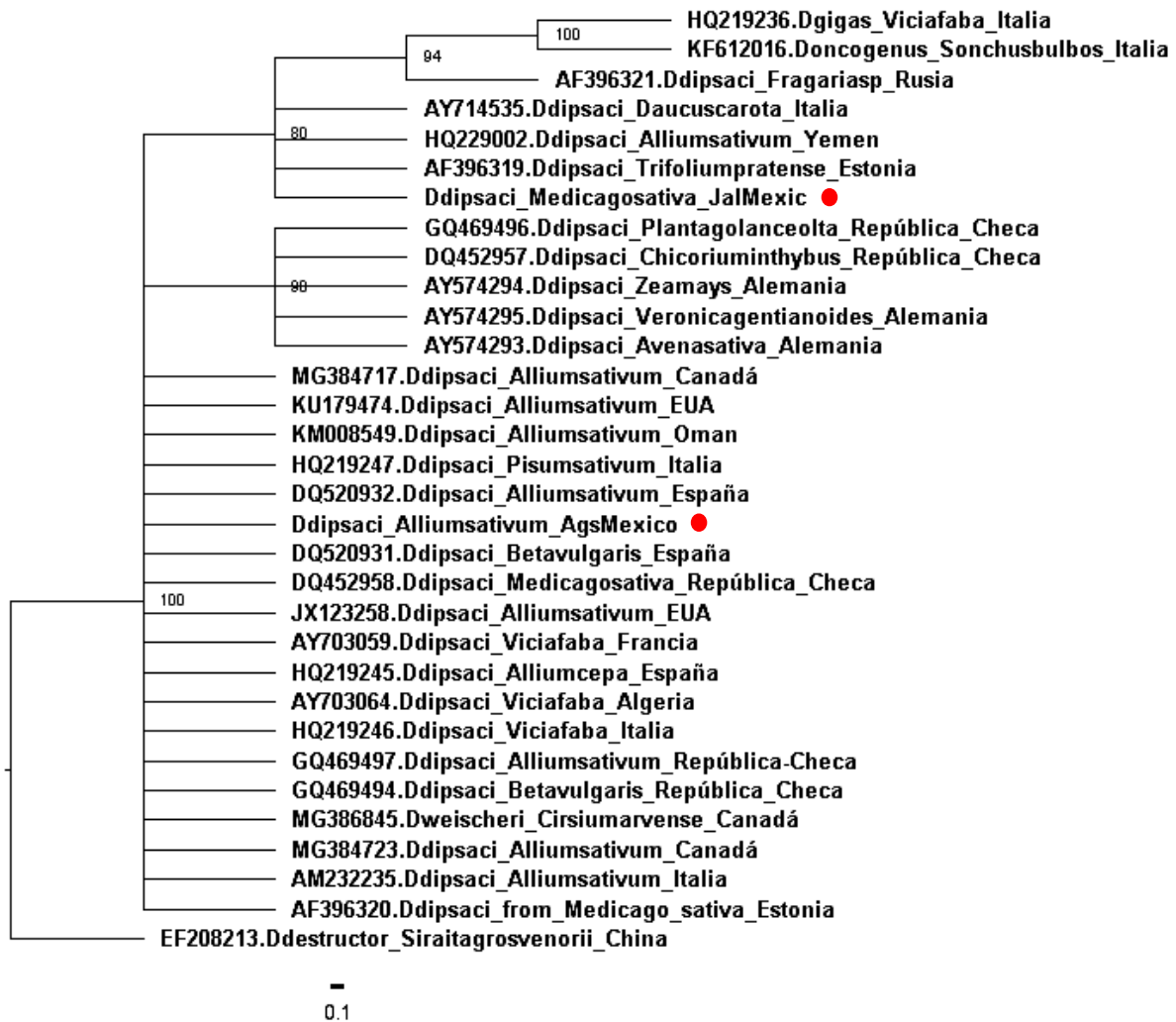
Población	T (U)	C	A	G	Longitud (pb)
AlJal	42.4	24	12.9	20.7	217
AjAgs	42.3	23.5	13.6	20.7	213

Respecto al gen *Hsp90*, a pesar de haber probado diferentes condiciones de amplificación e iniciadores (mencionados en la sección Materiales y métodos) no fue posible la obtención de fragmentos de ninguna de las dos poblaciones.

### 5.3.3 Filogenia de poblaciones

#### 5.3.3.1 Región ITS1-5.8S-ITS2

El alineamiento inició con 78 secuencias obtenidas del NCBI, de las cuales fueron descartadas aquellas que presentaron nucleótidos indeterminados (Y, R, N, etc.), que carecieron de datos (origen u hospedante) y secuencias duplicadas. El archivo de alineamiento final presentó 32 secuencias, dos de las poblaciones en estudio y una como grupo de comparación, con una longitud de 602 pb. El modelo de sustitución HKY+G fue utilizado en MrBayes obteniendo el árbol filogenético de mayoría de consenso (Figura 21). Las poblaciones mexicanas de ajo y alfalfa se ubicaron en el clado sensu stricto de *D. dipsaci* en donde se encuentran todos los patotipos de esta especie, por lo que filogenéticamente ambas poblaciones mexicanas corresponde a *Ditylenchus dipsaci* s. s. Se observó variación intraespecífica. La topología del árbol obtenido concuerda con los descritos en otras investigaciones de nematodos Aguinidos (Subbotin *et al.*, 2005; Jeszke *et al.*, 2013; Qiao *et al.*, 2016) y mostró también la existencia de haplotipos del nematodo del tallo y los bulbos.

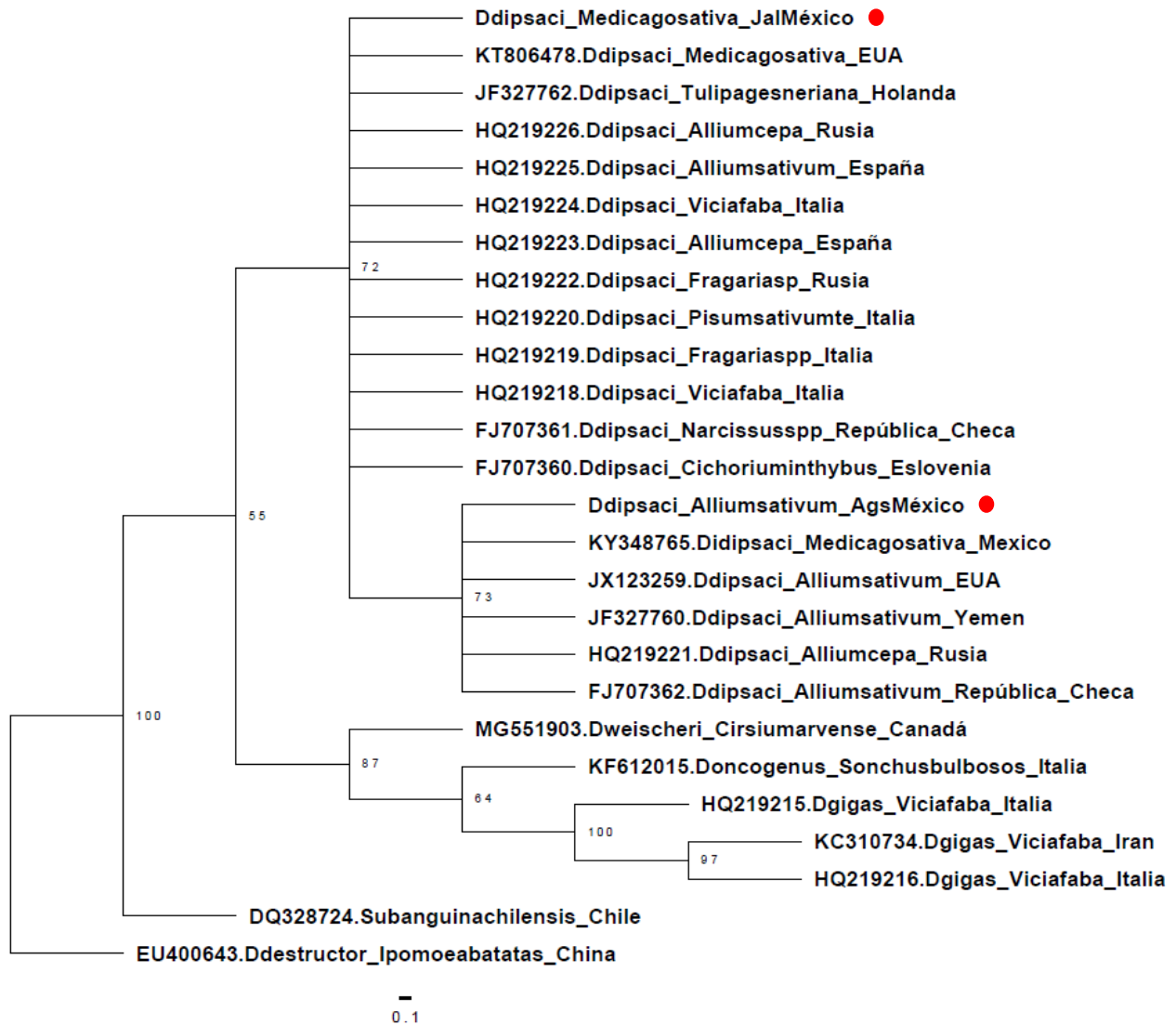


**Figura 21.** Relaciones filogenéticas de especies de *Ditylenchus* inferida con análisis Bayesiano de la región ITS del rDNA bajo el modelo HYK+G. Los valores de probabilidad posterior >70% son indicados en los clados. Patotipos de estudio diferenciadas con punto rojo.



### 5.3.3.2 Fragmentos de expansión D2-D3 del gen 28S rDNA

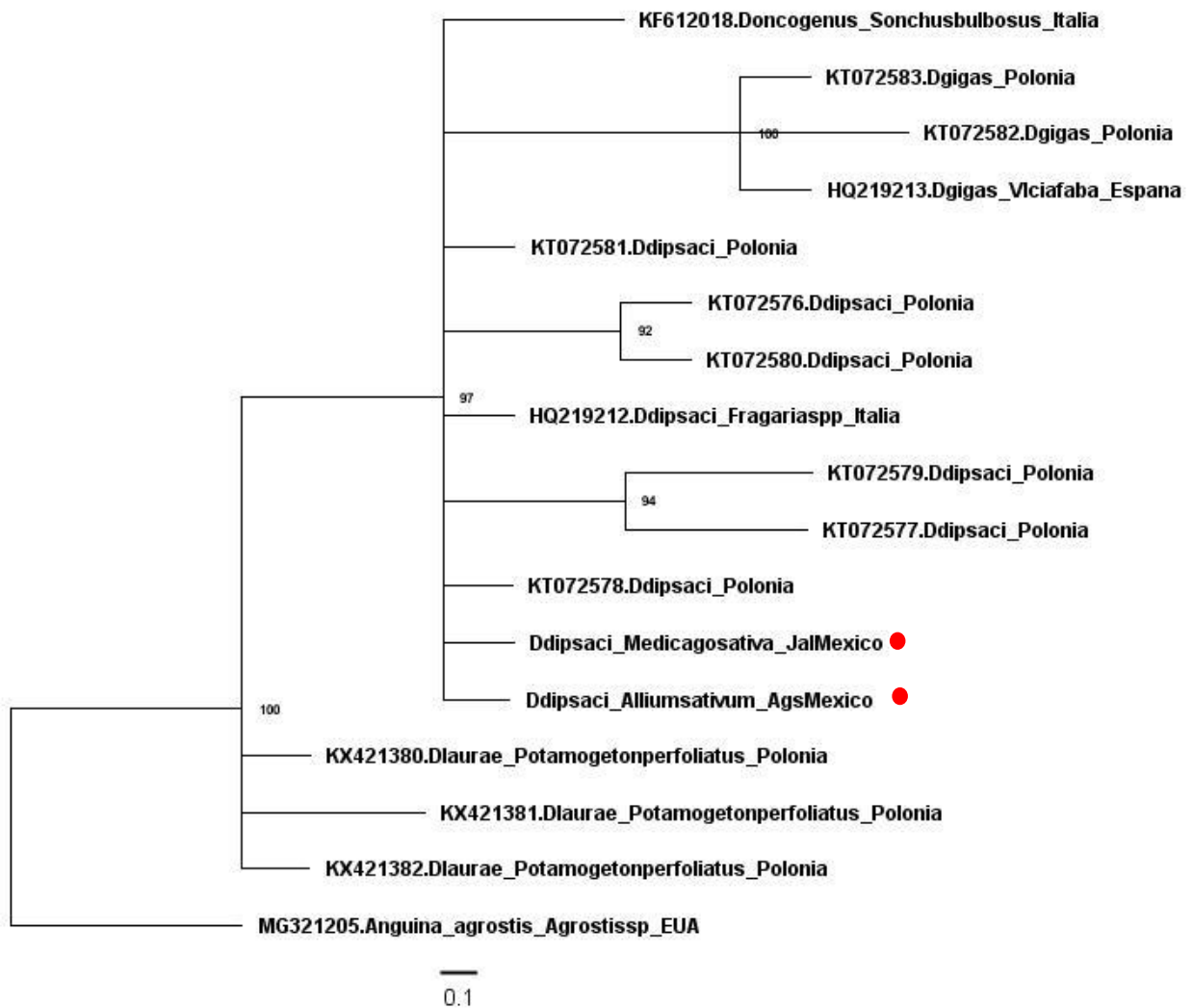
Se obtuvieron 50 secuencias del NCBI, 21 fueron descartadas por presentar nucleótidos indeterminados (Y, R, N, etc.), carecieron de datos (origen y hospedante) o consistieron en secuencias duplicadas. Las restantes 32 secuencias, incluidas dos de las poblaciones en estudio y una como grupo de comparación, formaron el alineamiento final con una longitud de 602 pb. El modelo de sustitución HKY+G fue utilizado en MrBayes obteniendo el árbol filogenético de mayoría de consenso mostrado en la figura 22. Similar a lo observado en la filogenia mediante ITS, el gen 28S mostró que ambas poblaciones mexicanas se ubicaron en el clado sensu stricto de *D. dipsaci*, presentando variación intraespecífica especialmente con los patotipos de ajo. La topología del árbol obtenido concuerda con los reportados en otros trabajos de nematodos Aguinidos (Subbotin *et al.*, 2005; Vovlas *et al.*, 2011; Qiao *et al.*, 2016). La inferencia filogenética con el marcador molecular 28S permite la identificación, de manera precisa, de las poblaciones mexicanas de *Ditylenchus* en *D. dipsaci* sensu stricto y la separación de estas con otras especies como *D. gigas*, *D. oncogenus* y *D. weischeri*.



**Figura 22.** Relaciones filogenéticas de especies de *Ditylenchus* inferida con análisis Bayesiano de la región 28S del rDNA bajo el modelo HYK+G. Los valores de probabilidad posterior >70% son indicados en los clados. Patotipos de estudio diferenciadas con punto rojo.

### 5.3.3.3 Gen COI del mtDNA

Se observaron pocas secuencias de *Ditylenchus* con este marcador disponibles en NCBI por lo que 14 secuencias fueron obtenidas. Al alineamiento se agregó una secuencia del grupo de comparación y dos correspondientes a las poblaciones en estudio. El alineamiento final consistió de 17 secuencias con una longitud 201 pb. El modelo de sustitución nucleotídica que mejor ajustó al conjunto de secuencias fue TPM3uf. Sin embargo, éste no se encontró disponible en MrBayes y fue utilizado el modelo GRT+I+G sugerido por Ronquist *et al.* (2011) debido a que está basado en el promedio ponderado de los mejores modelos de sustitución. Se obtuvo un árbol filogenético de mayoría de consenso cuya topología se muestra en la figura 23. Ambas poblaciones mexicanas se observaron en el mismo clado en donde se ubicaron otras poblaciones de *D. dipsaci*, presentando variación intraespecífica. Este marcador molecular es de gran utilidad para la inferencia y reconstrucción filogenética de especies de nematodos debido a que sitios específicos de los genes del mtDNA tienen tasas de evolución 10 veces más rápidas que los genes nucleares originando polimorfismos acumulativos de secuencias (Hopper *et al.*, 2005; Skwiercz, *et al.*, 2017)



**Figura 23.** Relaciones filogenéticas de especies de *Ditylenchus* inferida con análisis Bayesiano del gen *COI* mtDNA bajo el modelo GTR+I+G. Los valores de probabilidad posterior >70% son indicados en los clados. Patotipos de estudio diferenciadas con punto rojo.

## 6. CONCLUSIONES

Con base a las características morfológicas, morfométricas observadas mediante microscopía de luz y a través de microscopía electrónica de barrido, las poblaciones del nematodo del tallo y los bulbos extraídos de alfalfa (Jalisco) y ajo (Aguascalientes, Guanajuato y Puebla) corresponden a *Ditylenchus dipsaci* sensu stricto.

Al realizar el estudio estadístico con 25 características morfométricas, el análisis de componentes principales fue ineficiente para agrupar separadamente las 4 poblaciones analizadas lo cual demuestra la gran variabilidad intra-específica del nematodo del tallo y los bulbos. Sin embargo, el método de varianza mínima de Ward logró separar las poblaciones, únicamente de hembras, con base a sus hospedantes.

El análisis de PCR-RFLP de la región ITS de las poblaciones AlJal y AjAgs utilizando la enzima *RsaI* permitió diferenciar entre los patotipos alfalfa y ajo de *Ditylenchus dipsaci*.

El análisis molecular y la inferencia filogenética de las poblaciones AlJal y AjAgs de *Ditylenchus* spp., mediante el uso de los marcadores: segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S, la región ITS-5.8S-ITS2 del rDNA y el gen parcial *COI* del mtDNA permitieron confirmar la identificación taxonómica como *Ditylenchus dipsaci* sensu stricto.

## 7. RECOMENDACIONES

Es necesario realizar la estandarización de la PCR para amplificar la región ITS de *D. dipsaci* y evitar fragmentos inespecíficos o dímeros.

Verificar la repetibilidad y consistencia del análisis PCR-ITS-RFLP con las endonucleasas utilizadas en este estudio con otras poblaciones de ajo, alfalfa e incluir otros patotipos del nematodo del tallo y los bulbos.

Para efectos de registros históricos sobre detecciones de *Ditylenchus dipsaci* en México, es necesario considerar estudios de morfología, morfometría, MEB y técnicas moleculares como PCR-RFLP, secuenciación y filogenia de los marcadores genéticos *COI* y *Hsp90*, los cuales son de mayor utilidad para la reconstrucción filogenética y la diferenciación de especies.

Estudios sobre transcriptómica del nematodo del tallo y los bulbos podrían proveer información suficiente para discriminar, con base a la determinación de efectores, los diferentes patotipos existentes en México.

Es de gran importancia desarrollar e implementar un protocolo para el cultivo *in vitro* de *Ditylenchus dipsaci* con el objetivo de contar con una fuente genéticamente homogénea e ilimitada de especímenes para los diferentes análisis a efectuar.

## 8. LITERATURA CITADA

- Aftalion, B. and E. Cohn. 1990. Characterization of two races of the stem and bulb nematode (*Ditylenchus dipsaci*) in Israel. *Phytoparasitica* 18(3): 229-232.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miler and D. J. Lipman. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nuc Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Baermann, G. 1917. Ein einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) Larven in Erdproben. *Geneesk. Tijdschr. Nederlandsch-Indië* 57: 131-137.
- Barraclough, R. and R. E. Blackith. 1962. Morphometric relationships in the genus *Ditylenchus*. *Nematologica* 8: 51-58.
- Becker, J. O. and B. B. Westerdahl. 2018. UC IPM Pest Management Guidelines: Onion and Garlic. UC ANR Publication 3453. <http://ipm.ucanr.edu/PMG/r584200111.html>.
- Bello, A., M. Escuer y M. Pastrana A. 1996. Nematodos fitoparásitos y su control en ambientes mediterráneos. Capítulo 34. *En: Patología vegetal*. Llácer, G.; López, M. M.; Trapero, A. y Bello, A. (eds). Sociedad Española de Fitopatología. España.
- Brathwaite, C. W. D. y C. Sosa-Moss. 1995. Introducción al diagnóstico de las enfermedades de las plantas. IICA. Diagnóstico fitosanitario I. 1ª Edición. 78p.
- CABI, 2015. Crop Protection Compendium. CAB International, Wallingford, UK, 2007. Consultado en línea 20 abril de 2018. <http://www.cabi.org/compendia/cpc/>
- Chizhov, V. N., B. A. Borisov and S. A. Subbotin. 2010. A new stem nematode, *Ditylenchus weischeri* sp. n. (Nematoda: Tylenchida), a parasite of *Cirsium arvense* (L.) Scop. in the central region of the non-chernozem zone of Russia. *Russ. J, Nematol.* 18: 95-102.
- Chory, J. and J. D. J. Pollar. 2003. Resolution and recovery of small dna fragments. *In: Current Protocols in Molecular Biology*. Ausubel, F. M., R. E. Kingston, D. D.

- Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl. (eds). John Wiley & Sons, Inc. Supplement 47: 2.7.1-2.7.8.
- Coolen, W. A and C. J. D'Herde. 1972. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Ghent State Agriculture Research Centre. Merelbeke, Belgium.
- Coolen, W. A. 1979. Methods for the extraction of *Meloidogyne* spp. and other nematodes from roots and soil. In: Lamberti, F. and C. E. Taylor. (eds). Root-knot nematodes (*Meloidogyne* species) Systematics, biology and control. Academic Press, London, pp. 317-329.
- Dallas, E. J. 2000. Métodos multivariados aplicados al análisis de datos. Brooks Cole Publishing. Kansas State University. E.U.A. 561p.
- De Man, J. G. 1884. Die frei in der reinen Werde und im süßen Wasser lebenden Nematoden der niederländischen Fauna. Leiden, The Netherlands, pp. 1-206.
- Decker, H. 1969. Phytonematologie. VEB DeutscherL and wirtschaftsverlag. Berlin, Deutschland.
- Doucet, M. E. and De Doucet, M. M. A. 1997. Nematodes and agriculture in continental Argentina. Annu. Rev. Fundam. Appl. Nematol. 20(6):521-539.
- Dropkin, V. H. 1988. The concept of race in phytonematology. Ann. Rev. Phytopathol. 26: 145-161.
- EPPO, 2008. *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus dipsaci*. EPPO Bulletin. 38(3):363–373.
- Esmaeili, M., R. Heydari, P. Castillo and J. E. Palomares-Rius. 2016. Molecular and morphological characterisation of *Ditylenchus persicus* n. sp. (Nematoda: Anguinidae) from Kermanshah province, western Iran. Nematology 00(0):1-13.
- Esquibet, M., E. Grenier, O. Plantard, F. A. Andaloussi and G. Caubel. 2003. DNA polymorphism in the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*: development of diagnostic markers for normal and giant races. Genome 46: 1077-1083.
- Griffith, G., R. Cook and K. Mizen. 1997. *Ditylenchus dipsaci* infestation of *Trifolium repens* L. Temperature effects, seedling invasion and a field survey. J Nematol. 20(2):180-189.



- Hasjihassani, A. and M. Tenuta. 2017. The Occurrence of stem and bulb nematode on garlic in Southern Manitoba, Canada in 2005. *Disease Highlights*. CPDS. 97:229-232.
- Hernández-Juárez., A., M. Cepeda-Siller, G. Gallegos-Morales, J. Chacón-Hernández, S. Ordáz-Silva y A. González-Ruíz. 2015. Actividad nematicida de productos orgánicos comerciales, contra *Ditylenchus dipsaci* (Tylenchida: Anguinidae) bajo condiciones de laboratorio. *Rev. Mex. Cienc. Agric.* 11: 2247-2252.
- Hooper, D. J. 1972. *Ditylenchus dipsaci*. Description of Plant Parasitic Nematodes. Set 1, No. 14. CIH.
- 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 vignae*, *P. cinnamomi*, *P. megaspera* f. sp. *glycinae* and *Saprolegnia ferax*. *Current Genetics*. 22:455–461.
- Huelsenbeck, J. P. and F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. 17:754-755.
- Hunt, D. J. and J. E. Palomares-Rius. 2012. General morphology and morphometrics of plant-parasitic nematodes. *In*: Manzanilla-López R. E. and Marbán-Mendoza N. (eds). *Practical Plant Nematology*, BBA, México. pp: 25-64.
- International Plant Protection Convention (IPPC). 2006. International Standards For Phytosanitary Measures 1. Phytosanitary principles for the protection of plants and the application of phytosanitary measures in international trade. 14p.
- International Plant Protection Convention (IPPC). 1998. International Standards For Phytosanitary Measures. SPM 8: Determination fo pest status in an area. 12p.
- Janssen, J. W. G. 1994. The relevance of races in *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev, the stem nematode. *Fundam. Appl. Nematol* 17(5): 469-473.
- Jeszke A.; M. Budziszewska, R. Dobosz, A. Stachowiak, D. Protasewicz, P. Wieczorek and A Obrepalska-Stepłowska. 2013. A comparative and phylogenetic study of the *Ditylenchus dipsaci*, *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus gigas* populations occurring in Poland. *J. Phytopathol* 162: 61-67.

- Ji, L., Wang, L. C. Wang, X. L. Yang, G. M. Huang and M. S. Lin. 2006. PCR-RFLP patterns for differentiation of three *Ditylenchus* species. J. Nanjing Agric. Univ. 29(3): 39-43.
- Kanzaki, N. and K. Futai. 2002. A PCR primer set for determination of phylogenetic relationships of *Bursaphelenchus* species within the *xylophilus* group. Nematology 4: 35-41.
- Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura. 2015. MEGA7: Molecular evolutionary genetics versión 7.0 for bigger datasets. Mol. Biol. Evol. 33(7): 1870-1874.
- Ley Federal de Sanidad Vegetal (LFSV). 1994. Publicación: DOF 05/01/1994.
- Madani, M., M. Tenuta, V. N. Chizhov and S. A. Subbotin. 2015. Diagnostics of stem and bulb nematodes, *Ditylenchus weischeri* and *D. dipsaci* (Nematoda: Anguinidae), using PCR with species-specific primers. Can. J. Plant Pathol. 37(2): 212-220.
- Madani, M., L. Ward and S. De Borer. 2011. *Hsp90* gene, an additional target for discrimination between the potato cyst nematodes, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*, and the related species, *G. tabacum tabacum*. Eur. J. Plant Pathol. 130: 271-285.
- Mai, W. F. and P. G. Mullin. 1996. Plant-parasitic nematodes: a *Pictorial key to genera*. 5th. Ithaca, Comstock Pub. Associates, Cornell University Press. 277 p.
- Marché, L., S. Valette, E. Grenier and D. Mugniéry. 2001. Intra-specific DNA polymorphism in the tobacco cyst nematode complex (*Globodera tabacum*) characterized by AFLP. Genome 44: 941–946.
- Marek, M., M. Zouhar, O. Douda, J. Mazakkova and P. Rysánek. 2010. Bioinformatic-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.
- McDonald, A. H and J. M. Nicol. 2005. Nematodes parasites of cereals. In: Luc, M., R. A. Sikora and J. Bridge. (eds). Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. 2<sup>nd</sup> edition CAB International. Egham, UK. pp: 131-191.

- National Alfalfa & Forage Alliance (NAFA). 2018. Pest resistance ratings for alfalfa varieties. NAFA. EUA. 8p.
- Oliveira, R. D. L., A. M. Santin, D. J. Seni, A. Dietrich, L. A. Salazar, S. A. Subbotin, M. O. Mundo, R. Goldenberg and R. W. Barreto. 2013. *Ditylenchus gallaeformans* sp. n. (Tylenchida: Anguinidae) a neotropical nematode with biocontrol potential against weedy Melastomataceae. *Nematology* 15: 179-196.
- Perera, M. R., S. P. Taylor, V. A. Vanstone and M. G. K. Jones. 2009. Protein biomarkers to distinguish oat and lucerne races of the stem nematode, *Ditylenchus dipsaci* with quarantine significance for Western Australia. *Nematology* 11: 555-563.
- Posada, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1253-1256.
- Qiao, Y., M. Zaid, A. Badiss, B. Hughes, M. J. Celetti and Q. Yu. 2013. Intra-racial genetic variation of *Ditylenchus dipsaci* isolated from garlic in Ontario as revealed by random amplified polymorphic DNA analysis. *Can. J. Plant Pathol.* 35(3): 346-353.
- Qiao, Y., Q. Yu, A. Badiss, M. A. Zaidi, E. Ponomareva, Y. Hu and W. Ye. 2016. Paraphyletic genus *Ditylenchus* Filipjev (Nematoda, Tylenchida) corresponding to the *D. triformis* group and the *D. dipsaci*-group scheme. *ZooKeys* 568: 1-12.
- R Core Team 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Ramírez-Suárez, A. 2014. Nematodos de importancia cuarentenaria en papa para México (Protocolos de diagnóstico). SAGARPA-SENASICA. CNRF. 81p.
- Ronquist, F., J. Hueslsenbeck and M. Teslenko. 2011. MrBayes 3.2 Manual: Tutorials and model summaries. USA. 172p.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2018. [www.sagarpa.gob.mx/quienesomos/datosabiertos/siap](http://www.sagarpa.gob.mx/quienesomos/datosabiertos/siap).
- Seinhorst, J. W. 1962. On the killing, fixation and transferring to glycerin of nematodes. *Nematologica* 8: 29-32.

- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidas Agroalimentaria). 2013. Nematodo del tallo y bulbos *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn, 1857). Dirección General de Sanidad Vegetal-Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México, D. F. Ficha técnica No. 18. 24p.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2017. Atlas agroalimentario 2017. SAGARPA-SIAP. Ciudad de México, México. 231p.
- Skantar, A. M. and Carta, L. K. 2004. Molecular characterization and phylogenetic evaluation of the *Hsp90* gene from selected nematodes. *J. Nematol.* 36(4):466-480.
- Skwiercz, A. T., F. W. Kornobis, G. Winiszewska, A. Przybylska, A. Obrepalska-Stepłowska, M. Gawlak and S. A. Subbotin. 2017. *Ditylenchus laurae* sp. n (Tylenchida: Anguinidae) from Poland-a new species of the *D. dipsaci* complex associated with a water plant, *Potamogeton perfoliatus* L. *Nematology* 19: 197-209.
- Sosa-Moss, C., F. Perdomo R., C. W. D. Brathwaite and J. J. Salazar C. 1997. Manual de técnicas para el diagnóstico de las enfermedades de las plantas. IICA. Diagnóstico Fitosanitario II. México. pp: 99-138.
- Sturhan, D. and M. W. Brzeski. 1991. Stem and bulb nematodes, *Ditylenchus* spp. In: Nickle, W. R. (ed). *Manual of Agricultural Nematology*. Pp 423–464. Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- Subbotin, S. A. and I. T. Riley. 2012. Stem and gall forming nematodes. In: Manzanilla-López, R. E. and Marbán-Mendoza, N. (eds). *Practical Plant Nematology*, BBA, México. pp: 521- 577.
- Subbotin, S. A., M. Madani, E. Krall, D. Sturhan and M. Moens. 2005. Molecular diagnostics, taxonomy and phylogeny of stem nematode *Ditylenchus dipsaci* species complex based on the sequences of the internal transcribed spacer-rDNA. *Phytopathology* 95(11): 1308-1315.
- Tenuta, M., M. Madani, S. Briar, O. Molina, R. H. Gulden and S. A. Subbotin. 2014. Occurrence of *Ditylenchus weischeri* and not *D. dipsaci* in field pea harvest samples and *Cirsium arvense* in the Canadian Prairies. *J. Nematol.* 46: 376- 384.

- Varela, C. y M. E. Souki. 2013. Relaciones fenéticas y clave taxonómica para diferenciar las especies del género *Cedrela* (Meliaceae) en Venezuela. *Caldasia* 35(2): 281-292.
- Vovlas, N., A. Troccoli, J. E. Palomares-Rius, F. De Luca, G. Liébanas, B. B. Landa, S. A. Subbotin and P. Castillo. 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 Pathol.* 60: 762-775.
- Ward, J. H. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Amer. Statist. Assoc.* 58: 236-244.
- Wendt, K. R., T. C. Vrain and J. M. Webster. 1993. Separation of three species of *Ditylenchus* and some host races of *D. dipsaci* by restriction fragment length polymorphism. *J. Nematol.* 25(4): 555-563.
- Wharton D. A. and J. Barrett. 1985. Ultrastructural changes during recovery from anabiosis in the plant parasitic nematode *Ditylenchus*. *Tissue and Cell* 17(1): 79–96.
- Whitehead, A. G. 1984. Interaction of three lucerne cultivars and eleven English isolates of stem nematode (*Ditylenchus dipsaci*) “lucerne race”. *Plant Pathology* 33: 33-37.
- Williams, B. D., B. Schrank, C. Huynh, R. Shownkeen, and R. H. Waterston. 1992. A genetic mapping system in *Caenorhabditis elegans* based on polymorphic sequence-tagged sites. *Genetics* 131:609-624.
- Zapata, N., L. Barrett y V. L. Finot. 2017. Caracterización y clasificación botánica de veintidos líneas de maní (*Arachis hipogaea* L.) evaluadas en la provincial de Nube, Chile. *Chilean J. Agric. Sci.* 33(3): 202-212.
- Zhang, S. L., G. K. Liu, T. Janssen, S. S. Zhang, S. Xiao, T. Li, M. Couvreur and W. Bert. 2014. A new stem nematode associated with peanut pod rot in China: morphological and molecular characterization of *Ditylenchus arachis* n. sp. (Nematoda: Anguinidae). *Plant Pathol.* 63: 1193-1206.

Zouhar, M., M. Marek, O. Douda, J. Mazáková and P. Rysánek. 2007. Conversion of sequence-characterized amplified region (SCAR) bands into high-throughput DNA markers based on RAPD technique for detection of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* in crucial plants hosts. Plant soil. Environ. 53(3): 97-104.



# APÉNDICE 1

El cultivo, variedad, coordenadas geográficas, nombre del predio, fecha de colecta son algunos de los datos indispensables para la identificación de las muestras y deberán ser incluidos los demás requeridos en la hoja de *Solicitud de Diagnóstico Fitosanitario*.

## Consideraciones importantes sobre la colecta, manejo y envío de muestras

- ♦ Evitar la colecta y envío de material vegetal completamente muerto (necrótico).
- ♦ No exponer material colectado a temperaturas superiores a 25°C.
- ♦ Transportar muestras dentro de hieleras, preferentemente con geles refrigerantes.
- ♦ El envío al laboratorio para su análisis debe realizarse como máximo dentro de 24 horas posteriores a su colecta en campo.
- ♦ Enviarlas al Área de Recepción de Muestras del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria con domicilio en Carretera Federal México-Pachuca km 37.5, Tecámac Estado de México. C.P. 55740.



## REFERENCIAS:

- EPPO, 2008. *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus dipsaci*. EPPO Bulletin 38: 363-373.
- Hooper, D. J. 1972. *Ditylenchus dipsaci*. CIH. Description of Plant Parasitic Nematodes. Set 1, No. 14.
- Ramírez-Suárez, A. 2015. Nematodos de Importancia Cuarentenaria en Papa para México (Protocolos de diagnóstico). Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 81 p. Fecha de consulta: 12 de enero de 2016.

Responsable: Ing. Leonel Rosas Hernández.  
rosas.leonel@colpos.mx



Colegio de Postgraduados  
Postgrado en Fitopatología  
Carretera México-Texcoco Km. 36.5  
Montecillo, Texcoco, Estado de México. C.P. 56230.

**Muestreo para diagnóstico del nematodo de los bulbos y tallos *Ditylenchus dipsaci***



## APÉNDICE 1. Continuación.

El nematodo de los bulbos y tallos *Ditylenchus dipsaci* es un nematodo de importancia económica en México y cuarentenaria en diversos países del mundo. Cultivos como ajo, alfalfa, cebolla, papa, haba, pueden ser afectados ocasionando pérdidas de entre el 10-30%. Conocer su distribución dentro del territorio nacional es una tarea primordial para el establecimiento de medidas fitosanitarias para su control.

### SINTOMAS

**Hojas:** El tejido afectado presenta amarillamiento, se deforma como enrollamiento, necrosis (ajo, cebolla)(fig.1. A-C). En alfalfa, las hojas presentan deformación, reducción de tamaño y en ocasiones se observa hojas "albinas" o también llamadas hojas "bandera" (fig. 1. E y F, fig.2. G).

**Bulbos:** Bulbos afectados presenta un crecimiento reducido, tanto en ajos como en cebollas (fig.1. A y B). Deformación de "dientes" es observado en ajo (fig.1. D).

**Tallos:** En alfalfa, los tallos presentan acortamiento de entrenudos (achaparramientos) (fig1. D).

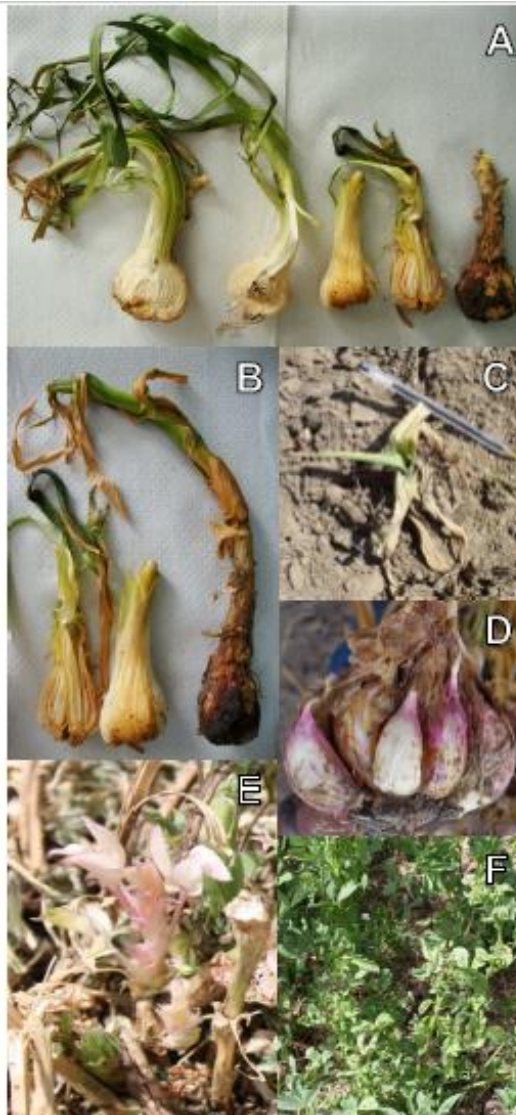


Figura 1. Síntomas: A-B. Cebolla. Hojas y bulbos deformes, necróticos y con crecimiento reducido; Alfalfa: C. Hojas albinas o "bandera", D. Deformación de hojas y entrenudos cortos; Papa: E. Pudrición y necrosis de tubérculo.



Figura 2. Síntomas: Alfalfa: A. Acortamiento de entrenudos y deformación de hojas. B y C. Panorámicas de predios afectados, nótese áreas sin plantas o con crecimiento reducido.

### COLECTA DE MUESTRAS

**Material necesario:** GPS, pala, bolsas de plástico 5kg, marcadores indelebles, bolígrafo, libreta de campo, navaja, hielera, gel refrigerante.

**Procedimiento:** Al realizar recorridos de campo sobre cultivos de ajo, cebolla y alfalfa y detectar plantas con síntomas como los descritos anteriormente, se realizará la colecta de material vegetal:

- 3-5 plantas de ajo o cebolla.
- 5-10 tallos con hojas de alfalfa.



## APÉNDICE 2

	MACHOS												
n	1	2	3	4	5	6	...	....	22	23	24	25	26
L													
Diámetro del labio													
Altura de labio													
Longitud de estilete													
Longitud de columna del estilete													
Longitud del cono del estilete													
M (cono*100/longitud del estilete)													
DGED													
Cabeza a centro de metacarpus													
Cabeza poro excretor													
Cabeza a cardia													
Ancho del cuerpo													
Long. De espícula													
Gubernáculum													
Long. De cola													
Ancho a nivel de cloaca													
Longitud de testículos													
a													
b													
c													
c'													
T													

## APÉNDICE 2. Continuación.

n	HEMBRAS										
	1	2	3	4	5	6.....	.....22	23	24	25	26
L											
Diámetro del labio											
Altura de labio											
Longitud de estilete											
Longitud del cono del estilete											
Longitud de columna del estilete											
M (cono*100/longitud del estilete)											
DGED											
Ancho del cuerpo											
Cabeza a centro de metacarpus											
Cabeza poro excretor											
Cabeza a cardia											
Cabeza vulva											
Distancia vulva-ano (VA)											
Ancho del cuerpo a nivel de											
Vulva											
PUS											
Long. de cola											
Ancho a nivel del ano											
a											
b											
c											
c'											
V											
PUS/VA (%)											