

Identification and phylogenetic analysis of the leaf-galling nematode *Orrina phyllobia* affecting *Solanum elaeagnifolium* Cav. in Guanajuato, Mexico

Identificación y análisis filogenético del nematodo foliar *Orrina phyllobia* afectando *Solanum elaeagnifolium* Cav. en Guanajuato, México

Edgar Medina Gómez, Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana, Calzada del Hueso No. 1100, Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán, Distrito Federal, CP 0496, México; **Angel Ramírez Suárez***, Catedrático CONACYT-Centro Nacional de Metrología (CENAM), Km 4.5 Carretera a Los Cués, El Marqués, Querétaro, C.P. 76246, México; **Juventino Cuevas Ojeda**, Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, Estado de México, CP 56230, México; **Daniel Martínez Gómez**, Laboratorio de Microbiología, Universidad Autónoma Metropolitana, Calzada del Hueso No. 1100, Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán, Distrito Federal, CP 0496, México.*Correspondencia: angelasu75@huskers.unl.edu

Recibido: 11 de Enero, 2016

Aceptado: 28 de Marzo, 2016

Medina-Gómez E, Ramírez-Suárez A, Cuevas-Ojeda J y Martínez-Gómez D. 2016. Identificación y análisis filogenético del nematodo foliar *Orrina phyllobia* afectando *Solanum elaeagnifolium* Cav. en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fito patología* 34: 184-199

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1601-2](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1601-2)

Primera publicación DOI: 29 de Marzo, 2016.

First DOI published: March 29th, 2016.

Resumen. El trompillo *Solanum elaeagnifolium* es una maleza de importancia económica afectada por enemigos naturales que podrían ser empleados como agentes de control biológico. Se detectó al nematodo agallador *Orrina phyllobia* parasitando *S. elaeagnifolium* en San Luis de la Paz, Guanajuato. Se realizó la identificación morfotaxonomica

Abstract. The silver-leaf nightshade *Solanum elaeagnifolium* is an economic importance weed affected by natural enemies that would be used as biological control agent. The leaf-galling nematode *Orrina phyllobia* was detected parasitizing *S. elaeagnifolium* in San Luis de la Paz, Guanajuato. Morphotaxonomic and molecular analysis was performed on specimens extracted from foliar galls and distorted leaves. The morphometric values were in agreement with those reported by the original species description except with de Man ratios: *a* and *b*. The Polymerase Chain Reaction amplification products of two molecular markers ITS1-5.8S-ITS2 and the D2-D3 expansion segments of 28S gene were 850 and 900 bp respectively. The homology by BLASTING of the mexican population genetic sequences together with those from NCBI database showed 99% similarity with

y molecular de especímenes extraídos de agallas y deformaciones foliares. Los valores de las características morfológicas y morfométricas concordaron con los rangos reportados en la descripción original de la especie a excepción de los índices de Man: *a* y *b'*. Los productos de la amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa de dos marcadores moleculares ITS1-5.8S-ITS2 y los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S fueron 850 y 900 pb respectivamente. La homología por BLASTING de secuencias genéticas de la población mexicana junto con secuencias de la base de datos del NCBI mostró un 99 % de identidad con *Ditylenchus phyllobius* ($E=0.0$). La inferencia bayesiana de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosomal con secuencias de géneros y especies de anguinidos depositados en el GenBank indicó una clara afinidad de agrupamiento con *D. phyllobius*. La combinación de caracteres morfométricos y genéticos permitió confirmar la identidad de *Orrina phyllobia* afectando *S. elaeagnifolium* en México.

Palabras Clave: Biocontrol, nematodos, malezas, secuenciación, filogenia.

El trompillo, *Solanum elaeagnifolium* es una planta perenne de la familia Solanaceae, endémica del noreste de México y el sureste de EE.UU. (Texas y Florida) (Cuda *et al.*, 1988), se considera una planta invasora y se distribuye en casi todo el mundo (EPPO, 2007). Se considera a la región de Monterrey, Nuevo León, México, como centro de origen y evolución de esta planta con base a la gran diversidad, distribución y frecuencia de enemigos naturales que presenta (Wapshere, 1988). Es una maleza de importancia económica en varios cultivos sobre todo en agricultura intensiva del norte de la República Mexicana. También, se considera una especie ruderal como resultado de los habitats al-

Ditylenchus phyllobius ($E=0.0$). The bayesian inference of the ribosomal DNA marker ITS1-5.8S-ITS2 with sequences of genus and anguinid species uploaded in GenBank displayed a clear grouping affinity with *Ditylenchus phyllobius*. The combination of morphometric and genetic characters allowed to confirm the identity of *O. phyllobia* attacking *S. elaeagnifolium* in Mexico.

Key words: Biocontrol, nematodes, weeds, sequencing, phylogeny

The silver-leaf nightshade *Solanum elaeagnifolium* is a perennial plant from the Solanaceae family, endemic of northeast Mexico and southeast U.S.A. (Texas and Florida) (Cuda *et al.*, 1988); it is considered an invasive plant and it is distributed in almost all over the world (EPPO, 2007). The area of Monterrey, Nuevo Leon, Mexico is considered the center of origin and evolution of this plant, based on the huge diversity, distribution, and frequency of natural enemies it displays (Wapshere, 1988). It is a weed of economic importance in several crops, particularly in intensive agriculture in northern Mexico. It is also considered a ruderal species as a result of the habitats altered by human activity, and can be commonly found alongside roads, abandoned agricultural fields, and even in urban areas (Vibrans, 2009). Due to its capacity as pests and diseases reservoir, cultural management measures have been taken as part of the plant health regulation to restrict its establishment and spreading of insects and other phytophagous (DOF, 1997). Among the organisms associated to *S. elaeagnifolium* and that could be used as possible biological control agents, different orders and families of insects stand out, along with gall mites, and nematodes. The leaf-galling nematode *Orrina phyllobia* (Thorne,

terados por el hombre y comúnmente se puede encontrar en orillas de carreteras, campos de cultivo abandonados, inclusive en zonas urbanas (Vibrans, 2009). Debido a la capacidad que tiene como reservorio de plagas y enfermedades, se han establecido medidas de manejo cultural como parte de la regulación fitosanitaria para restringir su establecimiento y dispersión de insectos plaga y otros fitófagos (DOF, 1997). Dentro de los organismos asociados a *S. elaeagnifolium* y que pudieran ser utilizados como posibles agentes de control biológico destacan diferentes órdenes y familias de insectos, ácaros eriófidios y nematodos. El nematodo agallador foliar *Orrina phyllobia* (Thorne, 1934) Brzeski, 1981 fue reportado inicialmente como *Ditylenchus phyllobius* sin. *Nothanguina phyllobia* (Orr.) y está distribuido en el sur de EE.UU. y sur de la India afectando esta maleza (Brzeki, 1991). Es un parásito obligado e induce agallas sobre las hojas, por lo que puede utilizarse como un potencial método de control biológico de *S. elaeagnifolium* (Cuda *et al.*, 1988, Wapshere, 1988, Sforza y Jones, 2007, Kwong y Sagliocco, 2012). La identificación de *O. phyllobia* está basada principalmente en caracteres morfológicos de hembras y machos (Siddiqi, 2000, Subbotin y Riley, 2012), sin embargo, debido a que existe una gran variedad de especies de nematodos anguinidos que afectan las partes aéreas, es necesario confirmar su identidad mediante procedimientos de mayor precisión basados en su información genética. En México se carece de evidencia objetiva de la presencia de este nematodo afectando esta maleza por lo que en esta investigación se propuso identificar por morfotaxonomía, su confirmación molecular y la reconstrucción filogenética de poblaciones del nematodo agallador foliar *O. phyllobia* de Guanajuato, México.

En el mes de julio del 2015 se realizó un muestreo dirigido a plantas de *S. elaeagnifolium* con deformaciones o agallas en hojas (Figura 1) presentes

1934) Brzeski, 1981, was initially reported as *Ditylenchus phyllobius* sin. *Nothanguina phyllobia* (Orr.) and is distributed in southern U.S.A and southern India, affecting this weed (Brzeki, 1991). It is an obligate parasites and induces galls on the leaves, therefore it could be used as a potential method of biological control for *S. elaeagnifolium* (Cuda *et al.*, 1988; Wapshere, 1988; Sforza, 2007; Kwong and Sagliocco, 2012). The identification of *O. phyllobia* is based mainly on morphological characters of females and males (Siddiqi, 2000, Subbotin and Riley, 2012). However, due to the large existing number of anguinid nematodes that affect the aerial parts, it is necessary to confirm its identity using more accurate procedures based on their genetic information. In Mexico there is not enough evidence of the presence of this nematode affecting this weed, therefore this research set out to identify by morphotaxonomy, its molecular confirmation and the phylogenetic reconstruction populations of leaf-galling nematode *O. phyllobia* from Guanajuato, Mexico.

In July, 2015, *S. elaeagnifolium* plants with deformations or galls on leaves were sampled (Figure 1) in random maize plots (<5 ha) and specific points in urban areas such as highways and roadsides. A total of 12 samples were taken in the municipal area of San Luis de la Paz, Guanajuato, Mexico between coordinates: 21° 16' 24.39" N, 100° 29' 35.17" W, and 21° 18' 33.41" N, 100° 31' 39.32" W. Samples were kept in damp paper to preserve the humidity and the integrity of the specimens and kept in refrigeration at 4 °C ± 2. *S. elaeagnifolium* leaves with deformities and galls were dissected and incubated in sterile distilled water at 22 °C ± 2 to promote the emergence of the different biological stages (eggs, second-stage juveniles (J₂), males and females). For the morphological study, the nematodes (males and females) were transferred onto a drop of water on a



Figura 1. Síntomas causados por el nematodo agallador foliar *Orrina phyllobia* en trompillo *Solanum elaeagnifolium*. (A), (B) y (C) distorsión y agallamiento de hojas; (D) Agallamiento en la inflorescencia.

Figure 1. Symptoms caused by the leaf-galling nematode *Orrina phyllobia* in silver-leaf nightshade *Solanum elaeagnifolium*. (A), (B) and (C) leaf distorsion and galling; (D) Galling in inflorescence.

en parcelas aleatorias de maíz (< de 5 ha) y puntos localizados de zonas urbanas como orillas de carreteras y caminos. Se colectaron un total de 12 muestras en el municipio de San Luis de la Paz, Guanajuato, México entre las coordenadas geográficas: 21° 16' 24.39" N, 100° 29' 35.17" W y 21° 18' 33.41" N, 100° 31' 39.32" W. Las muestras se conservaron en papel humedo para conservar la humedad e integridad de los especímenes y mantenidas en refrigeración a 4 °C ± 2. Las hojas deformadas y con agallas de *S. elaeagnifolium* se disectaron e incubaron en agua destilada estéril a 22 °C ± 2 para

microscope slide, were heated with an alcohol burner and mounted in a 2 % water-agar medium (Esser, 1986). The specimens were examined in a Carl Zeiss compound microscope with a phase contrast adapted with a micrometer and a digital camera, measures were taken of the main morphometric characters of males and females. The following characters were considered: L=body length; stylet length, spicule, bursa, and gubernaculum, as well as the De Man ratio: a =body length/maximum body width; b =body length/oesophagous length; b' =body length/distance of the anterior region to

favorecer la emergencia de los diferentes estadios biológicos (huevos, juveniles de segundo estadio (J_2), machos y hembras). Para el estudio morfológico, los nematodos (machos y hembras) se transfirieron a una gota de agua sobre un porta objetos, se relajaron en calor con la ayuda de un mechero de alcohol y se montaron en medio agua-agar 2 % (Esser, 1986). Los especímenes se examinaron en un microscopio compuesto con contraste de fases Carl Zeiss adaptado con un micrómetro y cámara digital, se tomaron mediciones de los principales caracteres morfométricos de machos y hembras. Se consideraron los siguientes caracteres: L=longitud del cuerpo; longitud del estilete, espícula, bursa y gobernáculo así como los índices De Man: a =longitud del cuerpo/anchura máxima del cuerpo; b =longitud del cuerpo/longitud del esófago; b' =longitud del cuerpo/distancia de la región anterior al post corpus; c = longitud del cuerpo/longitud de la cola; c' =longitud de la cola/ancho del cuerpo a nivel del ano; V =distancia región anterior-vulva; V' =distancia de la región anterior a la vulva/región anterior al ano X 100. Se realizó una comparación morfotaxonomía de los valores obtenidos con los reportados por Brzeski, 1991; Nickle, 1991; Subbotin and Riley, 2012. Para la realización de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), machos y hembras se fijaron en solución formol-glicerol 8:2, por un periodo mínimo de 24 h y se realizaron cinco lavados con solución sorensen (cacodilato de sodio 0.1 M y pH=7.0) cada 15 min. En una campaña de extracción se colocaron 500 μ l de tetraóxido de osmium 1 % por 2 h, se decantó y se volvieron a efectuar cinco lavados con solución sorensen (Eisenback, 1985). Posteriormente se deshidrataron en gradientes de etanol (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 %). Se colocaron los especímenes en sobres de papel filtro y se introdujeron a una cámara de secado de punto crítico Quorum-Emitech K850 (Eisenback, 1986). Una vez terminado el proceso de secado se colocan los especímenes en discos porta

the post corpus; c = body length/anus level; c' =tail length/width of body at anus level; V =distance region anterior-vulva; V' =distance of region anterior to vulva/region anterior to the anus X 100. A morphotaxonomic comparison was carried out of the values reported by Brzeski, 1991; Nickle, 1991; Subbotin and Riley, 2012. To perform the Scanning Electron Microscopy (SEM), males and females were fixed in a formalin-glycerol solution 8:2 for a period of at least 24 h and washed five times with Sorensen's buffer (sodium cacodylate 0.1 M and pH=7.0) every 15 min. In an fume extraction, 500 μ l 1 % osmium tetroxide were placed and kept for 2 h; it was poured out and washed another five times with Sorensen's buffer (Eisenback, 1985). Later, they were dehydrated in gradients of ethanol (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 %). The specimens were placed in filter paper envelopes and placed in a Quorum-Emitech K850 critical point dryer (Eisenback, 1986). Once the drying process was completed, the specimens were placed on disc-shaped sample carriers and observed under a Zeiss Sigma VP scanning electron microscope.

The DNA extraction from individual J_2 , male and female specimens was carried out using the method proposed by Williams *et al.*, 1992 and Thomas *et al.*, 1997 using the specimens previously analyzed by morphotaxonomy. The nematodes were placed individually in 10 μ l of lysis buffer solution (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0.45 % Tween 20; 0.05 % gelatin) over a coverslip. The specimen was macerated with the tip of a micropipette with the aid of a stereoscopic microscope and the buffer extraction-nematode solution was mixed. The solution was recovered and transferred into a 200 μ l microcentrifuge tube and frozen at -40 °C for 30 min. After the time of freezing, samples were incubated at 65 °C for 1 h, shaking at least once, and then adding 0.1 μ l of Proteinase K (60 μ g/m) in the final 10-15 min. It was incubated at 95 °C for 15 min, to make the

muestra y se observaron en un microscopio de barrido marca Zeiss Sigma VP.

La extracción de ADN a partir de especímenes individuales de J_2 , machos y hembras se realizó a través del método propuesto por Williams *et al.*, 1992 y Thomas *et al.*, 1997 utilizando los especímenes previamente analizados por morfotaxonomía. Los nematodos se colocaron individualmente en 10 μ l de solución amortiguadora de lisis (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0.45 % Tween 20; 0.05% gelatina) sobre un cubreobjetos. Se maceró el espécimen con una punta de micropipeta con ayuda del microscopio estereoscópico y se mezcló la solución amortiguadora de extracción-nematodo. Se recuperó la solución y se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 200 μ l y congeló a -40 °C por 30 min. Pasado el tiempo de congelación, las muestras se incubaron a 65 °C por 1 h agitando al menos una vez y se agregó 0.1 μ l de Proteinasa K (60 μ g/m) en los últimos 10-15 min. Se incubó a 95 °C por 15 min para inactivar la Proteinasa K y se conservó a -20 °C. Para la reacción de la cadena de polimerasa (PCR) se amplificaron dos marcadores moleculares: 1. La región del ITS1-5.8S-ITS2 del ADN utilizando los iniciadores AB28 (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') (Joyce *et al.*, 1994) y TW81 (3'-ATATGCTTAAAGTTCAGCGGGT-5') (Howlett *et al.*, 1992). 2. La amplificación de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S con los iniciadores D2A (5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3') y D3B (3'-TCGGAAGGAAC-CAGCTACTA-5') (Nunn,1992). La reacción de la PCR para los iniciadores AB28 y TW81 se realizó en un volumen final de 50 μ l con los siguientes componentes: 5 μ l de solución amortiguadora de PCR 10X, 3 μ l de $MgCl_2$ 50 mM, 1 μ l mix de DNTP's 10 mM, 2 μ l de cada iniciador a 10 μ M, 0.5 μ l de Taq polimerasa 5 U/ μ l, 5 μ l de extracción de ADN y 31.5 μ l de H_2O libre de ADNAsas y ARNAsas.

Proteinase K inactiva, and stored at -20 °C. For the polymerase chain reaction (PCR), two molecular markers were amplified: 1. The region of the ITS1-5.8S-ITS2 of the rDNA using the primers AB28 (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') (Joyce *et al.*, 1994) and TW81 (3'-ATATGCTTAAAGTTCAGCGGGT-5') (Howlett *et al.*, 1992). 2. The amplification of the expansion segments D2-D3 of gene 28S with the primers D2A (5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3') and D3B (3'-TCGGAAGGAAC-CAGCTACTA-5') (Nunn,1992). The PCR reaction for primers AB28 and TW81 was carried out in a final volume of 50 μ l with the following components: 5 μ l of PCR buffer solution PCR 10X, 3 μ l of $MgCl_2$ 50 mM, 1 μ l mix of DNTP's 10 mM, 2 μ l of each primer 10 μ M, 0.5 μ l of Taq polymerase 5 U/ μ l, 5 μ l of DNA extraction, and 31.5 μ l of H_2O , free of DNAses and RNAses. The thermocycling conditions included an initial stage of denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 35 cycles of 95 °C for 0.45 min, 57 °C for 0.30 min, and 72 °C for 1.30 min, finishing with one cycle at 72°C for 5 min (Skantar *et al.*, 2007). The PCR reaction for primers D2A and D3B included 5 μ l of PCR buffer solution 10X, 3 μ l of $MgCl_2$ 50mM, 1 μ l mix of DNTP's 10mM, 2 μ l of each initiator 10 μ M, 0.5 μ l of Taq polymerase 5U/ μ l, 5 μ l of DNA extraction ADN and 31.5 μ l of H_2O , free of DNAses and RNAses. The conditions for the amplification were as follows: initial denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 35 cycles at 95 °C for 0.45 min, 55 °C for 0.45 min, and 72 °C for 1 min, and finally, one cycle at 72 °C for 5 min (Vovlas *et al.*, 2011). An i-Cycler (BIORAD) thermocycler was used for all reactions. The amplified products were analyzed by horizontal electrophoresis 1.4 % using agarose gels in a buffer solution 1X TAE, dyed with GelRed and visualized in a Gel Doc EZ (BIORAD) photodocumentation. The PCR products were sequenced using Sanger

Las condiciones de termociclaje incluyeron una etapa de desnaturalización inicial de 95 °C durante 3 min seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 0.45 min, 57 °C durante 0.30 min y 72 °C durante 1.30 min, y finalizando con un ciclo a 72 °C durante 5 min (Skantar *et al.*, 2007). La reacción de la PCR para los iniciadores D2A y D3B comprendió 5 µl de solución amortiguadora de PCR 10X, 3 µl de MgCl₂ 50mM, 1 µl mix de dNTP's 10mM, 2 µl de cada iniciador 10 µM, 0.5 µl de Taq polimerasa 5U/µl, 5 µl de extracción de ADN y 31.5 µl de H₂O libres de ADNAsas y ARNAsas. Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 95 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 0.45 min, 55 °C durante 0.45 min y 72 °C durante 1 min, y finalmente con un ciclo a 72 °C durante 5 min (Vovlas *et al.*, 2011). Se utilizó un termociclador i-Cycler (BIO-RAD) para todas las reacciones. Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis horizontal utilizando geles de agarosa al 1.4 % en solución tampón 1X TAE, teñidos con GelRed y visualizados en un fotodocumentador Gel Doc EZ (BIORAD). Los productos de la PCR fueron secuenciados mediante tecnología Sanger, ensamblados y editados con el programa CodonCode Aligner 4.2.7 (CodonCode Corporation, Centerville, Massachusetts). Durante la edición de los electroferogramas fue importante revisar manualmente los posibles errores en la lectura de las bases nitrogenadas de la secuencia de ADN y se eliminaron los iniciadores.

Obtenidas las secuencias de poblaciones mexicanas, se realizó la búsqueda de homología con secuencias del GenBank (NCBI), utilizando el algoritmo BLAST para comprobar si las secuencias generadas de los nematodos que causan agallas en *S. elaeagnifolium* pudieran ser similares o iguales a otras secuencias reportadas. Las secuencias de ambos marcadores moleculares de las poblaciones mexicanas junto con otras secuencias del GenBank se sometieron a una alineación múltiple con la op-

technology, assembled, and edited using the program CodonCode Aligner 4.2.7 (CodonCode Corporation, Centerville, Massachusetts). During the editing of the electroferograms, it was important to manually check for possible errors in the reading of the nitrogenated bases of the DNA sequence, and primers were eliminated.

Once the sequences were obtained for Mexican populations, the search was carried out for homology with sequences of GenBank (NCBI), using the BLAST algorithm to check if the sequences generated of the nematodes that cause galls in *S. elaeagnifolium* are similar or equal to other sequences reported. The sequences of both molecular markers of the Mexican populations and other GenBank were analyzed by multiple alignment with Clustal W (Thompson *et al.* 1994). The search for the best substitution model for both markers was performed with Mr Modeltest 2.3 (Nylander, 2004) and PAUP 4.0b10 (Swofford, 1998). The phylogenetic analysis for both markers was carried out using Bayesian inference with MrBayes v3.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003), with the model GTR+G, with a random starting tree and it was run with the Monte Carlo Markov Chain (MCMC) for 1x10⁶ generations, taking samples at intervals of 100. Two runs were performed for each analysis. After discarding burn-in samples and the evaluation of the convergence, the remaining samples were withheld for later analyses. The topologies were used to generate a 50% majority-rule consensus tree to determine the support values of the clades obtained. For both phylogenies, *Radopholus similis* (GQ281456) was used for region ITS1-5.8S-ITS2, and *Radopholus* spp. (HQ823572) for region D2D3 of the gene 28S as out groups. Phylogenetic trees were visualized using Fig Tree (Rambaut, 2009).

The characteristics and morphotaxonomic values of females and males partially agrees with descriptions made by Brzeski (1991), and those reported by Subbotin and Riley (2012) for the leaf-

ción de Clustal W (Thompson *et al.* 1994). La búsqueda del mejor modelo de sustitución para ambos marcadores se realizó a través de Mr Modeltest 2.3 (Nylander, 2004) y PAUP 4.0b10 (Swofford, 1998). El análisis filogenético para los dos marcadores se llevó a cabo mediante inferencia bayesiana con MrBayes v3.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003), con el modelo GTR+G, con un árbol de arranque aleatorio y se corrió con la Cadena de Markov de Monte Carlo (MCMC) para 1×10^6 generaciones, tomando muestras a intervalos de 100. Dos corridas se realizaron para cada análisis. Después de desechar muestras burn-in y la evaluación de la convergencia, las muestras restantes se retuvieron para análisis posteriores. Las topologías se utilizaron para generar un árbol con la regla de la mayoría de consenso 50 % de probabilidades posteriores para determinar los valores de soporte de los clados obtenidos. Para ambas filogenias se utilizó *Radopholus similis* (GQ281456) para la región ITS1-5.8S-ITS2 y *Radopholus* spp. (HQ823572) para la región D2D3 del gen 28S como grupos externos. Los árboles filogenéticos se visualizaron utilizando Fig Tree (Rambaut, 2009).

Las características y valores morfotaxonomícos de hembras y machos coinciden parcialmente con las descripciones hechas por Brzeski (1991), y las reportadas por Subbotin y Riley (2012) para el nematodo agallador foliar *Orrina phyllobia* (= *Ditylenchus phyllobius*). **Hembra:** Cuerpo corto y recto 692 μm (637-785); cápsula cefálica plana en forma de tapón (Figura 2A y Fig. 2D), estilete pequeño 9 μm (8-9) con nódulos grandes; esófago alargado, ausencia del bulbo medio; glándula esofágica sobrepuesta al intestino; campo lateral con cuatro incisuras (Figura 2E); Ovario extendido, oocitos en una o dos filas; saco post-uterino corto; cola aguda con punta redondeada. **Macho:** Cuerpo corto y delgado 700 μm (672-737), estilete delicado 9 μm (8-9) con nódulos grandes; capsula ce-

galling nematode *Orrina phyllobia* (= *Ditylenchus phyllobius*). **Female:** Short and straight body 692 μm (637-785); flat cephalic capsule, in the shape of a capful (Figure 2A and Figure 2D), small stylet 9 μm (8-9) with large stylet knobs; elongated oesophagus, absence of metacarpus; esophageal gland overlapped with intestine; lateral field with four incisures (Figure 2E); extended ovary, oocytes in one or two rows; short post-uterine sac; pointed tail with rounded tip. **Male:** Short body and thin 700 μm (672-737), delicate stylet 9 μm (8-9) with large knobs; cephalic capsule very similar to that of the female (Figure 2B); short spicule 19.8 μm (18-21); sub-terminal bursa 58.3 μm (48-66); tail with projection with pointy ending (Figure 2F). Table 1 shows the morphometric identification of *O. phyllobia* population in the state of Guanajuato, Mexico and its comparison with the populations of *Ditylenchus phyllobius* from Arizona, U.S.A., cited by Nickle (1991) and the population from Texas, U.S.A. Brzeski (1991). There are differences in De Man ratios: *a* (body length/the greatest diameter of the body) and *b'* (body length/distance of esophageal gland to the anterior end of body when overlapped), since the Mexican population has higher values than those reported. The higher morphometric values can be due to analyzed specimens did not undergo the effect of any chemical fixating agent, since were only anesthetized with heat.

The amplification of ITS1-5.8S-ITS2 of the rDNA and expansion segments D2-D3 of the gene 28S produced a fragment of 850 bp and 900 bp, respectively, based on agarose gel electrophoresis (Figures 3 and 4). The search for homology using BLAST with NCBI sequences for the region ITS1-5.8S-ITS2 of the rDNA shows a 99 % de similarity ($E=0.0$) with *D. phyllobius* (AF363112), confirming the identity of the Mexican populations. Regarding the expansion segments D2-D3 of gene 28S, the number of genetic sequences of this group

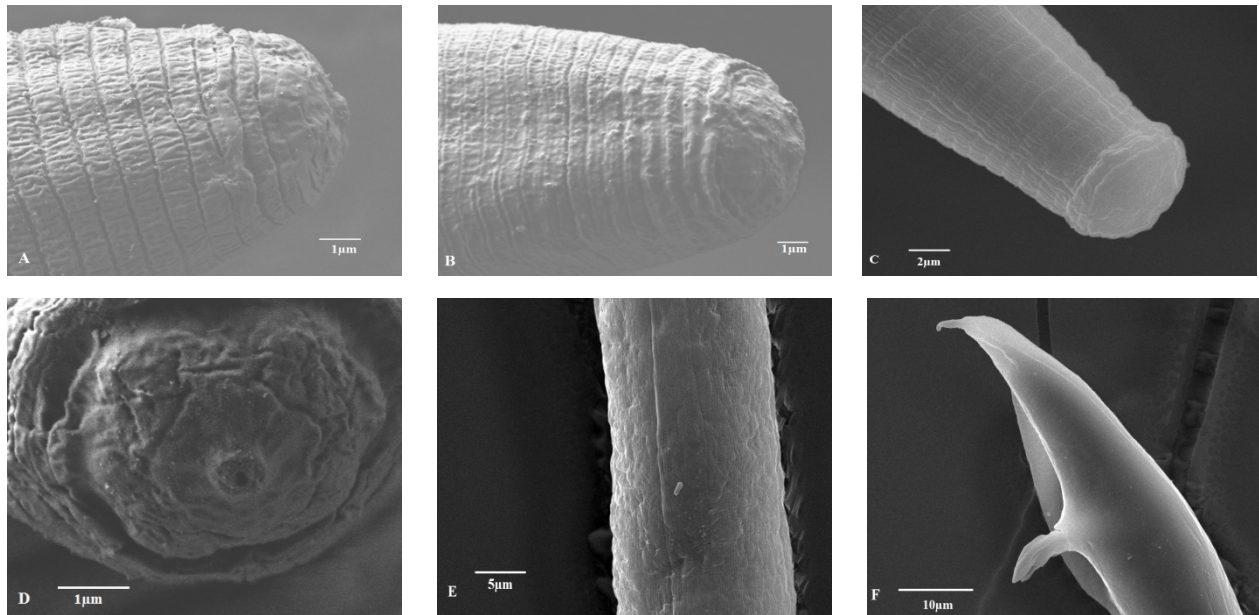


Figura 2. Imágenes en MEB de *Orrina phyllobia*; (A) Vista lateral de la cabeza de la hembra; (B) Vista lateral de la cabeza del macho; (C) Vista lateral de la cabeza del juvenil J₂; (D) Región labial de la hembra; (E) Campos laterales; (F) Cola del macho.

Figure 2. SEM images of *Orrina phyllobia*; (A) Side view of female's head; (B) Side view of male's head; (C) Side view of head of juvenile J₂; (D) Labial region of the female; (E) Lateral fields; (F) Tail of male.

fálica muy parecida a la de la hembra (Figura 2B); espícula corta 19.8 μm (18-21); bursa sub-terminal 58.3 μm (48-66); cola con proyección con terminación en punta (Figura 2F). El Cuadro 1 muestra la identificación morfométrica de la población de *O. phyllobia* del estado de Guanajuato, México y su comparación con las poblaciones de *Ditylenchus phyllobius* de Arizona, EE.UU., citado por Nickle (1991) y la población de Texas, EE.UU. Brzeski (1991). Existen diferencias en los índices: *a* (longitud del cuerpo/el diámetro mayor del cuerpo) y *b'* (longitud del cuerpo/distancia de las glándulas esofágicas al extremo anterior del cuerpo cuando está sobrepuesta) ya que la población mexicana posee valores más altos que los reportados. Los valores morfométricos relativamente más altos puede deberse a que los especímenes analizados no fueron

of anguinid nematodes in the NCBI database is very limited, although with the few that exist, a blasting was obtained with 78% similarity with Sequences from *Ditylenchus gallaeformans* (KF494346), a nematode that causes similar symptoms in weeds in tropical areas of the genus *Miconia* in Brasil and Costa Rica (Oliveira *et al.*, 2012). Although *D. gallaeformans* was the species with the highest similarity with sequences from Mexican *O. phyllobia* populations, the percentage of similarity was very low, and the only relation they have is that they belong to the family of Anguinidae and they cause alterations in the aerial sections of their hosts. The sequences of both molecular markers of the rDNA were deposited in the genetic database of the NCBI (GenBank) with access numbers KT192615 and KT192616 for ITS1-5.8S-ITS2 and KT192617

Cuadro 1. Características morfométricas comparativas de hembras y machos de *Orrina phyllobia* de la población de Guanajuato, México con especies reportadas por Nickle, (1991) y Brzeski, (1991). Todas las medidas están en μm , media (rango).
Table 1. Comparative morphometric characteristics of *Orrina phyllobia* females and males of the population from Guanajuato, Mexico with species reported by Nickle (1991) and Brzeski (1991). All measures are in μm , average (range).

Carácter	<i>Orrina phyllobia</i> (Guanajuato, México)		<i>Ditylenchus phyllobius</i> (Nickle, 1991)		<i>Ditylenchus phyllobius</i> (Brzeski, 1991)	
	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho
n	20	20	-	-	-	-
L	696.2 (637-785)	700 (672-737)	(590-840)	(670-800)	684 (592-838)	750 (672-799)
a	31.6 (22.5-39)	32.8 (30-36.8)	(20-32)	(27-34)	25 (20-32)	29 (27-34)
b	7.8 (7.5-10.1)	8.6 (8.1-9)	(7.4-10.5)	(7.0-9.7)	8.6 (7.4-10.5)	8.5 (7-9.7)
b'	7.7 (6.6-9.8)	8.4 (7.9-8.7)	(4.1-6.5)	(4.7-7.5)	5.5 (4.1-6.5)	5.8 (4.7-7.5)
c	18.3 (17-19.6)	20.4 (19.7-22.4)	(11.4-17.6)	(16.3-19.2)	14.6 (11.4-17.6)	18.1 (16.3-19.2)
c'	4.4 (3.5-5.6)	4 (3.7-4.5)	(2.9-4.5)	(2.5-3.1)	3.7 (2.9-4.5)	2.8 (2.5-3.1)
Estilete	9 (8-9)	9 (8-9)	(9-10)	(9-10)	(9-11)	(9-10)
Espícula	-	19.8 (18-21)	-	-	-	20.5 (19-22)
Bursa	-	58.3 (48-66)	-	-	-	-
Gubernáculo	-	-	-	-	-	-
V	79.2 (78-81)	-	(78-85)	-	81 (78-84)	-
V'	89.5 (85-92)	-	(85-89)	-	87 (85-89)	-

L=longitud del cuerpo; a=longitud del cuerpo/anchura máxima del cuerpo; b=longitud del cuerpo/longitud del esófago; b'= longitud del cuerpo/distancia de la región anterior al post corpus; c= longitud/longitud de la cola; c'= longitud de la cola/ancho del cuerpo a nivel del ano; V= distancia región anterior-vulva; V'= distancia de la región anterior a la vulva/región anterior al ano X 100 / L=body length; a=body length/maximum body width; b=body length/oesophagus length; b'= body length/distance of the anterior region to the post corpus; c= body length/tail length; c'= tail length/width of body at the level of the anus; V= distance region anterior-vulva; V'= distance of region anterior to vulva/región anterior to anus X 100.

sometidos al efecto de ningún agente químico fijador, y sólo fueron anestesiados en calor.

La amplificación de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr y segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S produjeron un fragmento de 850 pb y 900 pb, respectivamente basado en electroforesis en gel de agarosa (Figuras 3 y 4). La búsqueda de homología por BLAST con secuencias del NCBI para la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr muestra un 99 % de similitud ($E=0.0$) con *D. phyllobius* (AF363112) lo que confirma la identidad de las poblaciones mexicanas. Respecto a los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S, el número de secuencias genéticas de este grupo de nematodos anguinidos en la base de datos del NCBI es muy limitado sin embargo, con los pocos que existen se obtuvo un blasting de 78 % de similitud con secuen-

and KT192618 for the expansion segments D2-D3 of gene 28S as a contribution to the knowledge of Mexican population of this group of nematodes. The Bayesian phylogenetic reconstruction from the region ITS1-5.8S-ITS2 of a multiple alignment that included 37 sequences placed the Mexican *O. phyllobia* population in an independent clade with a support value of 96.96 % along with the American population of *D. phyllobius* (= *O. phyllobia*) AF363112 (Figure 5). This difference is due, in part, to the intraspecific variability between populations of the same species, and on the other hand, the sequenced region of the American *O. phyllobia* rDNA was partially different since it only included a partial fragment of the gene 18S, the region of the ITS1 and gene 5.8S. Regarding the inference of expansion segments D2-D3 of

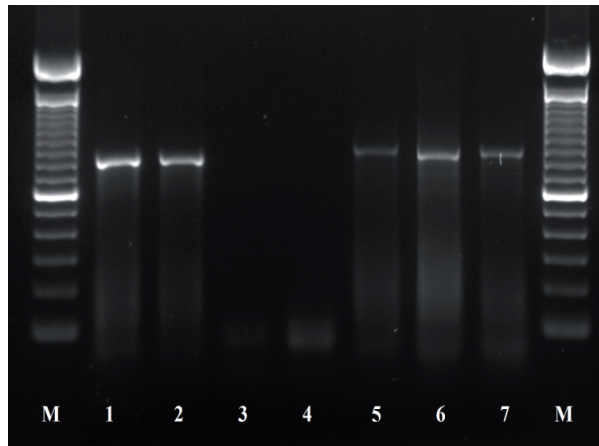


Figura 3. Productos de PCR usando los iniciadores AB28 y TW81; 1-2: Control (+) *Ditylenchus dipsaci*; 3-4 control (-) Agua destilada estéril; 5-7 población de *O. phyllobia*. M: Marcador molecular 100 pb.

Figure 3. PCR products using primers AB28 and TW81; 1-2: Control (+) *Ditylenchus dipsaci*; 3-4 control (-) Sterile distilled water; 5-7 population of *O. phyllobia*. M: Molecular marker 100 bp.

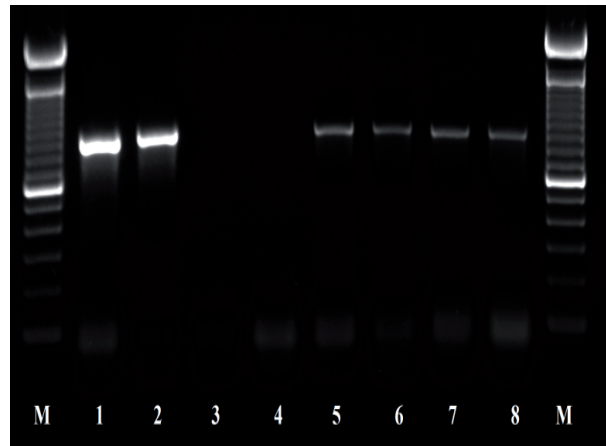


Figura 4. Productos de PCR usando los iniciadores D2A y D3B; 1-2: Control (+) *Ditylenchus dipsaci*; 3-4 control (-) Agua destilada estéril; 5-8 población de *O. phyllobia*. M: Marcador molecular 100 pb.

Figure 4. PCR products using primers D2A and D3B; 1-2: Control (+) *Ditylenchus dipsaci*; 3-4 control (-) Sterile distilled water; 5-8 population of *O. phyllobia*. M: Molecular marker 100 bp.

cias de *Ditylenchus gallaeformans* (KF494346), un nematodo que ocasiona síntomas similares en maleza de zonas tropicales del género *Miconia* en Brasil y Costa Rica (Oliveira *et al.*, 2012). Si bien *D. gallaeformans* fue la especie que más similitud tuvo con las secuencias de las poblaciones mexicanas de *O. phyllobia*, el porcentaje de similitud fue muy bajo y la única relación de parentesco que tienen es que ambos, pertenecen a la familia Anguinidae y que ocasionan alteraciones en las partes aéreas de sus hospedantes. Las secuencias de ambos marcadores moleculares del ADNr se depositaron en la base de datos genético del NCBI (GenBank) con números de acceso KT192615 y KT192616 para ITS1-5.8S-ITS2 y KT192617 y KT192618 para los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S como aportación al conocimiento de las poblaciones mexicanas de este grupo de nematodos. La reconstrucción filogenética bayesiana a partir

the gene 28S, multiple alignment included 21 sequences. The data set included 807 nucleotidic characters. Because there are no sequences of this molecular marker in GenBank for this nematode, the Mexican *O. phyllobia* population and GenBank sequences of other species of anguinids formed independent groups with high support values (Figure 6). It is important to highlight that with both molecular markers, *O. phyllobia* concentrates on a monophyletic clade (high support value of 100%) and is phylogenetically related to *Ditylenchus destructor* and *D. arachidis* (ITS1-5.8S-ITS2) and to *D. gallaeformans* (D2-D3), all members of the Anguinidae family (Figures 5 and 6). These results coincide with those by Doua *et al.*, 2013.

Sequences of the region ITS1-5.8S-ITS2 of the rDNA helped to genetically confirm the identity of Mexican *O. phyllobia* populations as the causal agent of leaf galling in *S. elaeagnifolium*, taking as

de la región ITS1-5.8S-ITS2 de un alineamiento múltiple que incluyó 37 secuencias ubicó a la población mexicana de *O. phyllobia* en un clado independiente con un valor de soporte de 96.96 % junto con la población americana de *D. phyllobius* (= *O. phyllobia*) AF363112 (Figura 5). Esta diferen-

a reference the American *D. phyllobius* sequence (Powers *et al.*, 2001).

Although there is evidence of *O. phyllobia* being a prospective biological control agent for the silver-leaf nightshade, there is also the possibility that it affects other species of native solanaceae and

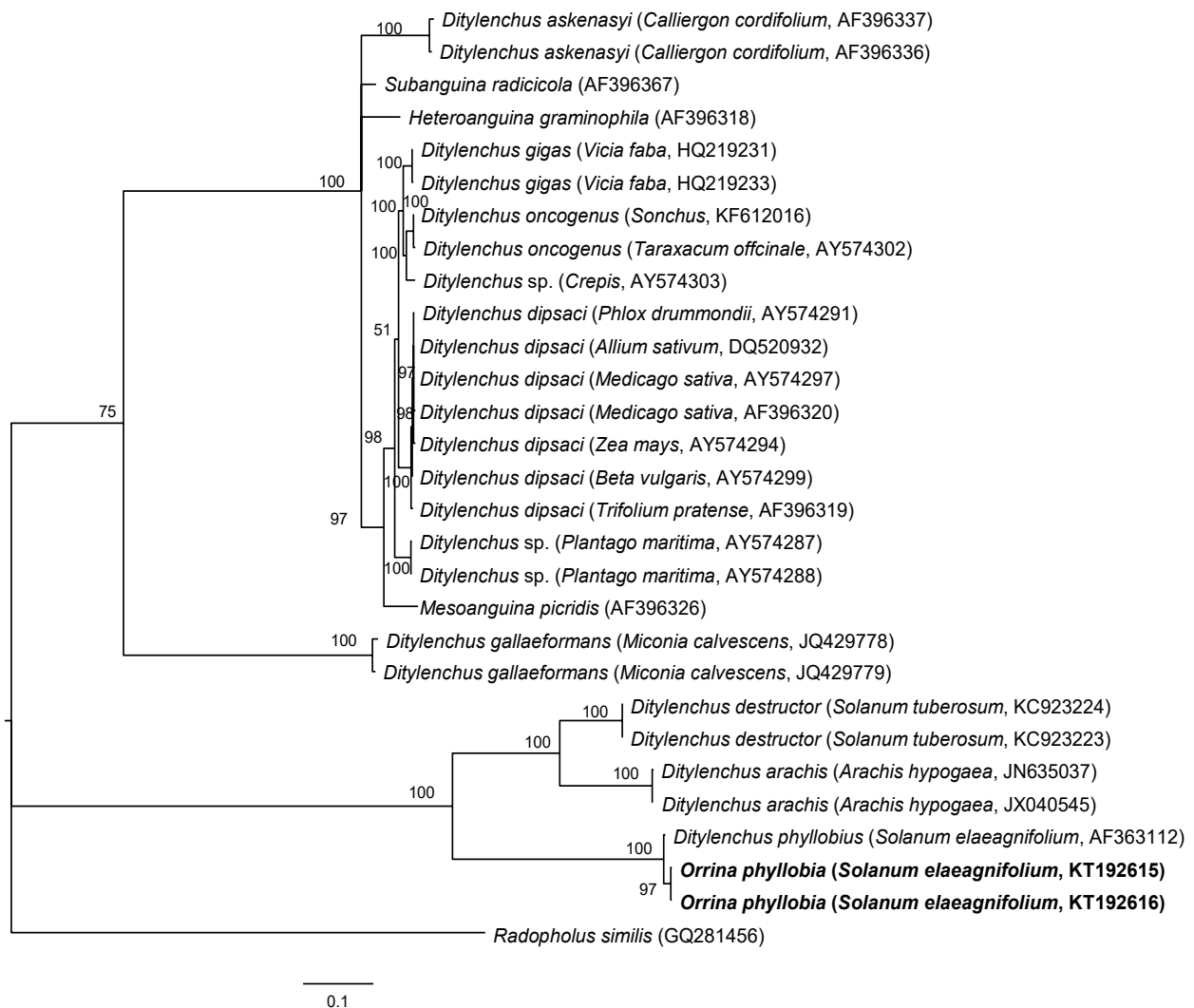


Figura 5. Inferencia bayesiana de nematodos afectando *S. elaeagnifolium*. Árbol consenso de probabilidades superiores al 50 % de la alineación de secuencias de ITS1-5.8S-ITS2 generados a partir del modelo complejo: GTR + G con secuencias de anguinidos depositadas en el GenBank.

Figure 5. Bayesian inference of nematodes affecting *S. elaeagnifolium*. A 50% majority-rule consensus tree of the sequences aligned of ITS1-5.8S-ITS2 generated from the complex model: GTR + G with sequences of anguinids deposited in GenBank.

cia se debe en parte a la variabilidad intraespecífica existente entre poblaciones de la misma especie y por otro lado a la región secuenciada del ADN de *O. phyllobia* de E.E.U.U. ya fue parcialmente diferente pues sólo incluyó un fragmento parcial del gen 18S, la región del ITS1 y el gen 5.8S. En lo que respecta a la inferencia de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S, el alineamiento múltiple incluyó 21 secuencias. El conjunto de datos incluyó 807 caracteres nucleotídicos. Debido a que no existen secuencias de este marcador molecular en GenBank para este nematodo, la población mexicana de *O. phyllobia* y las secuencias del GenBank de otras especies de anguinidos formaron agrupaciones independientes con un valores altos de soporte (Figura 6). Es importante destacar que con ambos marcadores moleculares, *O. phyllobia* se concentra en un clado monofilético (alto valor de soporte 100 %) y está relacionada filogenéticamente con *Ditylenchus destructor* y *D. arachidis* (ITS1-5.8S-ITS2) y con *D. gallaeformans* (D2-D3) todos, miembros de la familia Anguinidae (Figura 5 y 6), resultados que coinciden con los reportados por Douda *et al.*, 2013.

Las secuencias de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN permitieron confirmar genéticamente la identidad de poblaciones mexicanas de *O. phyllobia* como el agente causal del agallamiento foliar de *S. elaeagnifolium*, utilizando como referencia la secuencia de *D. phyllobius* de EE.UU. (Powers *et al.*, 2001).

Si bien existe evidencia de *O. phyllobia* como un prospecto agente de control biológico para el trompillo, también existe la posibilidad de que pueda afectar algunas otras especies de solanáceas nativas y algunas cultivadas como la berenjena *Solanum melongena* (Field *et al.*, 2009). Se sugiere para estudios futuros determinar cuál es el comportamiento de *O. phyllobia* al ser inoculado en diferentes especies cultivadas para determinar la

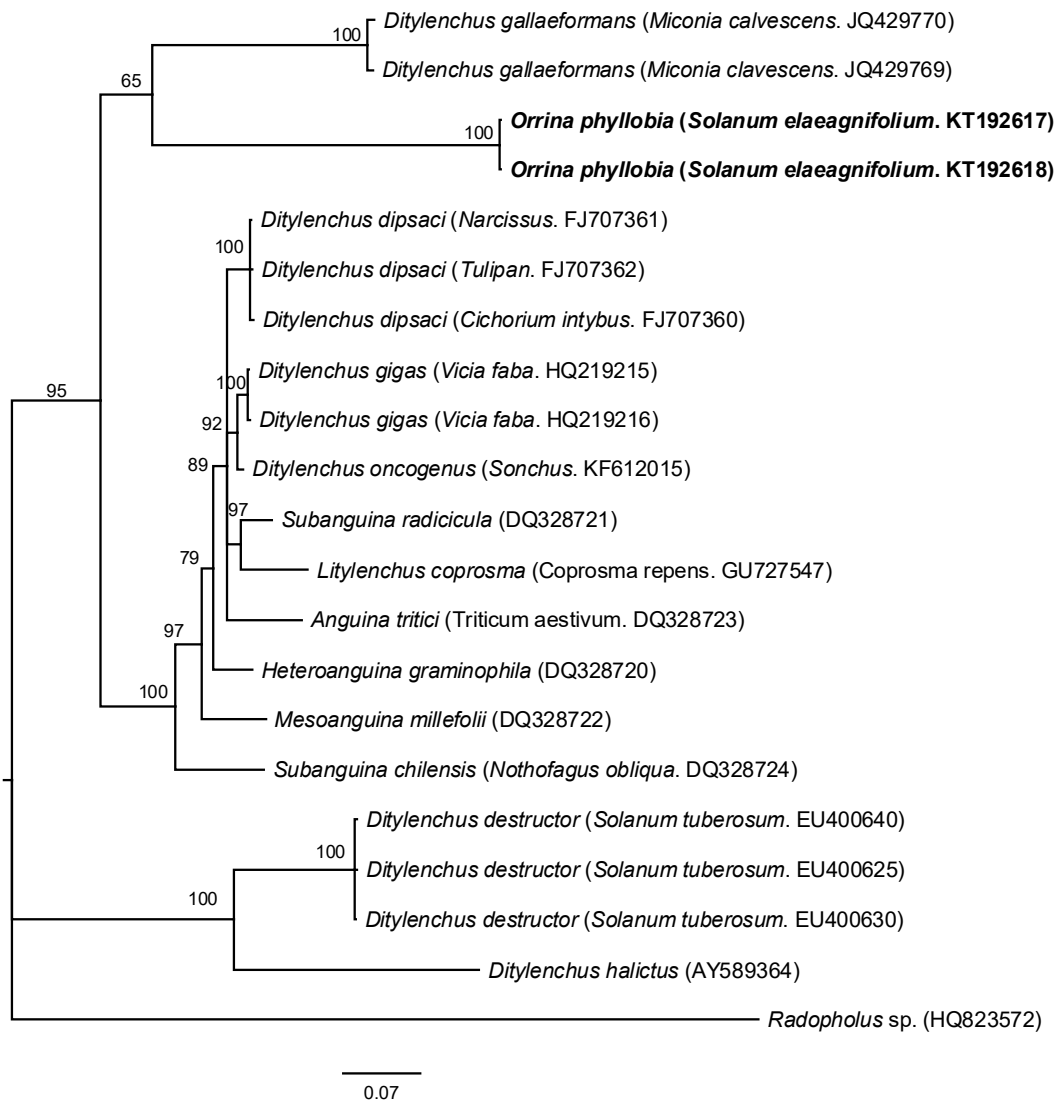
other crops such as eggplant *Solanum melongena* (Field *et al.*, 2009). For future studies, we suggest determining the behavior of *O. phyllobia* when inoculated in different crop species to determine the host range. The use of taxonomy with an integrated perspective for the identification of nematodes in *S. elaeagnifolium* was highly important, since it strengthened the benefits of traditional taxonomy. The morphotaxonomic and molecular study helped determine the presence of the foliar nematode *Orrina phyllobia* attacking silver-leaf nightshade *Solanum elaeagnifolium*, a weed of economic and ruderal importance in the municipal area of San Luis de la Paz, Guanajuato, Mexico.

ACKNOWLEDGEMENTS

Our sincere gratitude goes to the Nematology Laboratory of the National Phytosanitary Reference Center (CNRF) of the General Plant Health Department, SENASICA-SAGARPA for having granted the support and helping us carry out and execute this project. To MSc. Jessica Berenice Valencia Luna and MSc. Ariana Guadalupe Robles Zárate of the Area of Electronic Microscopy of the CNRF. This research is part of the Master's Degree thesis of the first author.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

gama de hospedantes. El empleo de la taxonomía con un enfoque integrativo para la identificación de nematodos en *S. elaeagnifolium* fue de gran importancia ya que fortaleció las bondades de la taxonomía tradicional. El estudio morfotaxonomico y molecular permitió determinar la presencia del nematodo foliar *Orrina phyllobia* atacando trompillo *Solanum elaeagnifolium*; maleza de importancia económica y ruderal en el municipio de San Luis de la Paz, Guanajuato, México.



**Figura 6.** Inferencia bayesiana de secuencias de nematodos afectando *S. elaeagnifolium*. Árbol consenso de probabilidades superiores al 50 % de la alineación de los segmentos de expansión D2-D3 generados a partir del modelo complejo: GTR + G con secuencias de anguinidos depositadas en el GenBank.

**Figure 6.** Bayesian inference of sequences of nematodes affecting *S. elaeagnifolium*. A 50% majority-rule consensus tree of the expansion segments D2-D3 generated from the complex model: GTR + G with sequences of anguinids deposited in the GenBank.

**AGRADECIMIENTOS**

Se agradece al Laboratorio de Nematología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) de la Dirección General de Sanidad Vegetal, SENASICA-SAGARPA por haber otorgado los apoyos y las facilidades para la realización y

ejecución de este proyecto. A la M. en C. Jessica Berenice Valencia Luna y la M. en C. Ariana Guadalupe Robles Zárate del área de Microscopia Electrónica del CNRF. Esta investigación es parte de la tesis de maestría del primer autor.

## LITERATURA CITADA

- Brzeski M. W. 1991. Review of the genus *Ditylenchus* Filipjev, 1936 (Nematoda: Anguinidae). *Revue de Nematologie* 14: 9–59. Disponible en línea: [http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins\\_textes/fan/40309.pdf](http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/fan/40309.pdf)
- Cuda, J. P., P. E. Parker, R. A. Goodson, and J. L. Gillmore. 1988. Evaluation of *Ditylenchus phyllobius* (Tylenchida: Anguinidae) as a potential biological control agent for *Solanum viarum* and *Solanum tampicense* (Solanaceae). *Nematropica* 28:107-111. Disponible en línea: <http://journals.fcla.edu/nematropica/article/view/64208/61876>
- DOF. 1997. Norma oficial mexicana NOM-026-FITO-1995. Por la que se establece el control de plagas del algodón. México. 13 p. Disponible en línea: [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4893843&fecha=10/09/1997](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4893843&fecha=10/09/1997)
- Douda O., Marek, M., Zouhar, M. and Rysanek, P. 2013. Insights into the structure and phylogeny of the 28S rRNA expansion segments D2 and D3 of the plant-infecting nematodes from the genus *Ditylenchus* (Nematoda: Anguinidae). *Phytopathologia Mediterranea* 52:84-97. Disponible en línea: <http://www.fupress.net/index.php/pm/article/view-File/11334/12198>
- Eisenback J. D. 1985. Techniques for preparing nematodes for scanning electron microscopy. pp:79-105. In: Barker, K. R., Carter, G. G. and Sasser, J. N. (eds.). *An advanced treatise on Meloidogyne*. Volume II: Methodology. A cooperative publication of the Department of Plant Pathology and the United States Agency for International Development. North Carolina State University Graphics, Raleigh, North Carolina, U.S.A. 223p. Disponible en línea: <https://www.researchgate.net/publication/234111942>
- Eisenback, J. D. 1986. A comparison of techniques useful for preparing nematodes for scanning electron microscopy. *Journal of Nematology* 18:479–487. Disponible en línea: <http://journals.fcla.edu/jon/article/view/69163/66823>
- EPPO. 2007. *Solanum elaeagnifolium* Cav. Data sheets on quarantine pests. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 37: 236–245. Disponible en línea: [http://www.eppo.int/QUARANTINE/data\\_sheets/plants/Solanum\\_elaeagnifolium\\_DS.pdf](http://www.eppo.int/QUARANTINE/data_sheets/plants/Solanum_elaeagnifolium_DS.pdf)
- Esser R. P. 1986. A water agar face technique. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 53: 254-255. Disponible en línea: <http://bionames.org/bionames-archive/issn/0018-0130/53/254.pdf>
- Field R. P., Kwong R. M., and Sagliocco, J. L. 2009. Host specificity of *Ditylenchus phyllobius*, a potential biological control agent of silver-leaf nightshade (*Solanum elaeagnifolium* Cav.) in Australia. *Plant Protection Quarterly* 24:141-144. Disponible en línea: <http://www.cabdirect.org/abstracts/20093353119.html>
- 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. Disponible en línea: <https://www.researchgate.net/publication/21682896>
- Joyce S. A., Reid A., Driver F., and Curran J. 1994. Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to the identification of entomopathogenic nematodes. Pp:178-187. In: Burnell A. M., Ehlers, R-U, and Masson J-P. (eds). *Biotechnology: Genetics of entomopathogenic nematodes-bacterium complexes*. Luxembourg: DG XII. European Commission Public. 277p.
- Kwong, R. M. and Sagliocco, J.L. 2012. *Solanum elaeagnifolium* Cav. – silverleaf nightshade. Pp.555-562. In: M. H. Julien, R. E. C. McFadyen and J. M. Cullen. (eds). *Biological control of weeds in Australia*. CSIRO Publishing. Collingwood, Australia. 619p.
- Nickle WR. 1991. *Manual of agricultural nematology*. CRC Press. 1064p.
- Nunn GB. 1992. *Nematode molecular evolution*. Ph.D. dissertation, University of Nottingham, UK.
- Nylander JAA. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. Disponible en línea: <https://github.com/nylander/MrModeltest2>
- Rambaut A. 2009. FigTree. v1.3.1. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/>
- Robinson A. F., Orr C. C., and Heintz C. E. 1978. Distribution of *Nothanguina phyllobia* and its potential as a biological control agent of silverleaf nightshade. *Journal of Nematology* 10: 361–366. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2617918/>
- Ronquist F. and Huelsenbeck J. P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574. Disponible en línea: <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/19/12/1572.long>
- Siddiqi M. R. 2001. *Tylenchida: parasites of plants and insects*. 2nd edition. CABI Bioscience publishing, Wallingford, UK. 835p.
- Sforza R. and Jones, WA. 2007. Potential for classical biocontrol of silverleaf nightshade in the Mediterranean Basin. *EPPO Bulletin* 37:156–162. Disponible en línea: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2338.2007.01109.x>
- Skantar A. M., Handoo Z. A., Carta L. K., and Chitwood D. J. 2007. Morphological and molecular identification of *Globodera pallida* associated with potato in Idaho. *Journal of Nematology* 39:133-144. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2586493/>
- Subottin, S. A. and Riley I. T. 2012. Stem and gall forming nematodes. Pp.:521-577. In: Manzanilla-López, R. H. and Marbán-Mendoza, N. (eds.). *Practical Plant Nematology*. Biblioteca Básica de Agricultura (BBA). Montecillo, Texcoco, Estado de México. México. 883p.
- Swofford DL. 1998. PAUP\*. *Phylogenetic analysis using parsimony (\*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. Disponible en línea: [http://paup.csit.fsu.edu/Command\\_ref\\_v2.pdf](http://paup.csit.fsu.edu/Command_ref_v2.pdf)
- Thomas W. K., Vida J. T., Frisse L. M., Mundo M., and Baldwin, J. G. 1997. DNA sequences from formalin-fixed nematodes: Integrating molecular and morphological appro-

- aches to taxonomy. *Journal of Nematology* 29:250-254. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2619797/>
- Thompson J. D., Higgins D. G., and Gibson T. J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7984417>
- Vibrans H. 2009. Malezas de México. CONABIO. Fecha de consulta 08 diciembre del 2015. Disponible en línea: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/2inicio/home-malezas-mexico.htm>
- Vovlas N., Troccoli A., Palomares-Rius J. E., De Luca F., Liebanas G., Landa B. B., Subbotin S. A., and Castillo P. 2011. *Ditylenchus gigas* n. sp. parasitizing broad bean: A new stem nematode singled out from the *Ditylenchus dipsaci* species complex using a polyphasic approach with molecular phylogeny. *Plant Pathology* 60:762-775. Disponible en línea: <http://www.readcube.com/articles/10.1111%2Fj.1365-3059.2011.02430.x>
- Wapshere, A. J. 1988. Prospects for biological control of silverleaf nightshade, *Solanum elaeagnifolium*, in Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* 39:187-97. Disponible en línea: doi:10.1071/AR9880187
- Williams B. D., Schrank B., Huynh C., Shownkeen R., and Waterston R. H. 1992. A genetic mapping system in *Caenorhabditis elegans* based on polymorphic sequence-tagged sites. *Genetics* 131:609-624. Disponible en línea: <http://www.genetics.org/content/genetics/131/3/609.full.pdf>