

Detection, identification and phylogenetic inference of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn) filipjev (Nematoda:Anguinidae) affecting alfalfa *Medicago sativa* L. in Jalisco, Mexico

DetECCIÓN, IDENTIFICACIÓN E INFERENCIA FILOGENÉTICA DEL NEMATODO DEL TALLO *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn) filipjev (Nematoda:Anguinidae) afectando alfalfa *Medicago sativa* L. en Jalisco, México

Leonel Rosas-Hernández, Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados. Km. 36.5 Carretera México- Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México. C.P. 56230, México; **Angel Ramírez-Suárez***, CONACYT-Centro Nacional de Metrología, Km 4.5 Carretera a Los Cués, El Marqués, Querétaro, C.P. 76246, México; **Salomé Alcasio-Rangel, José Abel López-Buenfil**, Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Dirección General de Sanidad Vegetal. SENASICA-SAGARPA, Km. 37.5 Carretera Federal México-Pachuca, Tecámac. Estado de México. C.P. 55740. México; **Edgar Medina-Gómez**, Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana, Calzada del Hueso No. 1100, Col. Villa Quietud, Coyoacán, Ciudad de México, C.P. 0496. México. *Autor para correspondencia: angelrasu75@huskers.unl.edu.

Recibido: 23 de Marzo, 2017.

Aceptado: 13 de Junio, 2017.

Rosas-Hernández L, Ramírez-Suárez A, Alcasio-Rangel S, López-Buenfil JA, Medina-Gómez E. 2017. Detection, identification and phylogenetic inference of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn) filipjev (Nematoda:Anguinidae) affecting alfalfa *Medicago sativa* L. in Jalisco, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 377-396.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1703-8

Primera publicación DOI: 24 de Julio, 2017.

First DOI publication: July 24, 2017.

Resumen. El monitoreo de plagas y enfermedades reglamentadas que afectan a los cultivos en México es importante para determinar su presencia

Abstract. Monitoring regulated pests and diseases that affect crops in Mexico is important to determine its presence and impact. With the purpose of supporting the National Phytosanitary Epidemiological Surveillance System activities, alfalfa plants from Atoyac, Jalisco showing stunting, shortened internodes, buds and leaves deformed as well as change leaf coloration, suspicious symptoms produced by foliar nematodes were analyzed. Roots, leaves + buds and stems tissues were analyzed separately. Classical taxonomy, molecular and phylogenetic analysis of two ribosomal DNA markers were performed on specimens detected. *Ditylenchus* genus specimens were detected and isolated only in leaves + buds and stems. The species identity

e impacto. Con la finalidad de colaborar con las actividades del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria, se analizaron plantas de alfalfa de Atoyac, Jalisco con acortamiento de entrenudos, deformación de brotes, hojas y decoloración de folíolos, síntomas sospechosos a infestaciones por nematodos foliares. Se analizaron por separado raíces, hojas + brotes y tallos. Se realizó la taxonomía tradicional, análisis molecular y filogenético de dos marcadores del ADN ribosomal de los nematodos detectados. Se aislaron especímenes del género *Ditylenchus* solo en hojas + brotes y tallos. La identidad de la especie según la morfotaxonomía de hembras y machos correspondió al nematodo del tallo *D. dipsaci*. El análisis PCR-RFLP de la región ITS1-5.8S-ITS2 mostró un patrón de restricción de 335, 280, 200 y 132 pb con la enzima *RsaI* y de 400 y 300 pb con *HinfI*. La alineación BLAST indicó un 99% de homología con *D. dipsaci* ($E=0.0$). La filogenia según el criterio de probabilidades posteriores bayesiano de ambos marcadores ubicó a la población mexicana de alfalfa en el grupo que incluye las poblaciones de *D. dipsaci sensu stricto*. A nuestro saber, este es el primer reporte de *D. dipsaci* afectando alfalfa en el occidente de México.

Palabras clave: Vigilancia fitosanitaria, taxonomía, filogenia, molecular, DNA ribosomal.

La alfalfa *Medicago sativa* L. es una planta forrajera con alto valor nutritivo en el sector bovino. En México, este cultivo es afectado por factores bióticos entre las que destacan el pulgón verde *Acyrtosiphon pisum* Harris, pulgón manchado *Therioaphis maculata* Buckton, trips *Frankliniella* spp., gusano soldado *Spodoptera exigua* Hübner, pudriciones de la base del tallo *Rhizoctonia solani* Kühn, antracnosis *Colletotrichum trifolii* Bain &

based on females and males morphotaxonomy belonged to the stem nematode *D. dipsaci*. The PCR-RFLP restriction pattern of ITS1-5.8S-ITS2 displayed by *RsaI* enzyme was 335, 280, 200, and 132 bp, while for the enzyme *HinfI* the pattern was 400 and 300 bp. The BLASTING alignment showed 99% homology with *D. dipsaci* ($E=0.0$). The phylogenetic reconstruction of both markers according the bayesian posterior probabilities criteria placed the alfalfa mexican population within the clade that includes several *D. dipsaci sensu stricto* populations. To our knowledge, this is the first report of *D. dipsaci* affecting alfalfa in western Mexico.

Key words: Phytosanitary surveillance, taxonomy, phylogeny, molecular, ribosomal DNA

Alfalfa *Medicago sativa* L. is a forage plant with a high nutritional value in the bovine sector. In Mexico, this crop is affected by biotic factors, among which highlight the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* Harris, the spotted alfalfa aphid *Therioaphis maculata* Buckton, trips *Frankliniella* spp., the beet armyworm *Spodoptera exigua* Hübner, rotting on the base of the stem *Rhizoctonia solani* Kühn, anthracnosis *Colletotrichum trifolii* Bain & Essary, Texas root rot *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert, crown rot (*Fusarium* spp.), all of which cause production losses (Chew, 2000; Lara and Jurado, 2014). Little is known about the problems caused by nematodes, although in other latitudes they are considered important problems, particularly the root-knot nematodes of the genus *Meloidogyne* (Griffin and Thyr, 1988; Westerdahl, *et al.*, 2006), lesion nematodes *Pratylenchus penetrans* (Cobb) Filipjev & Schuurmans Stekhoven (Thies *et al.*, 1992) and the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857)

Essary, pudrición texana *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert, pudrición de la corona (*Fusarium* spp.), entre otros, los cuales causan pérdidas de producción (Chew, 2000; Lara y Jurado, 2014). Poco se conoce de los problemas ocasionados por nematodos sin embargo, en otras latitudes son considerados como problemas importantes donde destacan los nematodos agalladores del género *Meloidogyne* (Griffin y Thyr, 1988; Westerdahl, *et al.*, 2006), lesionadores *Pratylenchus penetrans* (Cobb) Filipjev & Schuurmans Stekhoven (Thies *et al.*, 1992) y el nematodo del tallo *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev 1936 (Wood y Close, 1974; Boelter *et al.*, 1985; Milano de Tomasel y McIntyre, 2001; Perera *et al.*, 2009).

El nematodo del tallo *D. dipsaci* es considerado como uno de los problemas nematológicos más importantes en la agricultura de climas templados donde destacan los cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.), ajo (*Allium sativum* L.), cebolla (*A. cepa* L.), zanahoria (*Daucus carota* L.), tulipán (*Tulipa* spp.), trebol (*Trifolium* spp.), remolacha (*Beta vulgaris* L.) y alfalfa (*Medicago sativa* L.) (EPPO, 2008; Tenuta *et al.*, 2014). Es una especie con endoparasitismo obligado, polífago de partes aéreas y subterráneas de alrededor de 500 especies de plantas entre las que destacan hortalizas, cereales, leguminosas y ornamentales (Caubel y Pedron, 1976; Subbotin y Riley, 2012). Posee alrededor de 30 razas fisiológicas, muchas de ellas probablemente representando un complejo de especies difíciles de diferenciar debido a su gran similitud morfológica, cariotípica y molecular (Sturhan y Brzesky, 1991; Duncan y Moens, 2006).

El análisis del ADN ribosomal ha logrado dilucidar la situación taxonómica de *D. dipsaci* y se tiene evidencia de que está compuesta por al menos siete especies: 1. *D. dipsaci sensu stricto* (*s. s.*) que es la de mayor importancia por el número de cultivos que afecta; 2. *D. gigas*, conocido como nematodo

Filipjev 1936 (Wood and Close, 1974; Boelter *et al.*, 1985; Milano de Tomasel and McIntyre, 2001; Perera *et al.*, 2009).

The stem nematode *D. dipsaci* is considered one of the most important nematological problems in agriculture on temperate climates, standing out crops such as potato (*Solanum tuberosum* L.), garlic (*Allium sativum* L.), onion (*A. cepa* L.), carrot (*Daucus carota* L.), tulip (*Tulipa* spp.), clover (*Trifolium* spp.), beetroot (*Beta vulgaris* L.), and alfalfa (*Medicago sativa* L.) (EPPO, 2008; Tenuta *et al.*, 2014). It is a species with obligated endoparasitism, polyphagous of aerial and underground parts of around 500 species of plants, including vegetables, cereals, legumes, and ornamental plants (Caubel and Pedron, 1976; Subbotin and Riley, 2012). It has around 30 physiological races, most of which probably represent species complex that are difficult to differentiate due to their huge morphological, karyotypic and molecular similarity (Sturhan and Brzesky, 1991; Duncan and Moens, 2006).

The ribosomal DNA analysis has allowed to elucidate the taxonomic situation of *D. dipsaci* and there is evidence of it being composed by at least seven species: 1. *D. dipsaci sensu stricto* (*s. s.*), which is the most important due to the wide number of crops it affects; 2. *D. gigas*, known as a “giant” nematode, due to its large size, and it affects *Vicia faba*; 3. *D. weischeri*, which affects *Cirsium arvense*; 4. *Ditylenchus* sp. D., which affects *Pilosella* spp.; 5. *Ditylenchus* sp. E., which affects *Crepis praemorsa*; 6. *Ditylenchus* sp. F., which affects *Leontodon autumnalis* and *Pilosella officinarum*; and 7. *Ditylenchus* spp. G., which affects *Plantago maritima* (Subbotin *et al.*, 2005; Kerkoud *et al.*, 2007; Marek *et al.*, 2010; Vovlas *et al.*, 2011; Jeszke *et al.*, 2014).

The physiological race is an intraspecific division that is set apart from other members of

“gigante” debido a su gran tamaño y afecta *Vicia faba*; 3. *D. weischeri*, que afecta *Cirsium arvense*; 4. *Ditylenchus* sp. D. que afecta *Pilosella* spp.; 5. *Ditylenchus* sp. E. afectando *Crepis praemorsa*; 6. *Ditylenchus* sp. F. afectando *Leontodon autumnalis* y *Pilosella officinarum*; y 7. *Ditylenchus* sp. G. afectando *Plantago maritima* (Subbotin *et al.*, 2005; Kerkoud *et al.*, 2007; Marek *et al.*, 2010; Vovlas *et al.*, 2011; Jeszke *et al.*, 2014).

La raza fisiológica es una división infraespecífica que se distingue de otros miembros de la misma especie por la patogenicidad que ocasiona en diferentes hospederos. Las razas de *D. dipsaci* s. s. coadyuvan en la amplia adaptabilidad de la especie a diversos climas y hospederos por lo que es considerado de importancia cuarentenaria por las agencias regulatorias fitosanitarias internacionales (Tenuta *et al.*, 2014).

La alfalfa es un hospedero que también es afectado por *D. dipsaci* donde es conocido como el nematodo de la Alfalfa ya que parasitan los brotes, tallos, hojas y pueden ocasionar defoliación y muerte de plántulas (Milano de Tomasel y McIntyre, 2001; Westerdahl, *et al.*, 2006). Al afectar la semilla botánica y vegetativa, representa un riesgo en la disseminación a zonas donde no se encuentra presente (Wood y Close 1974; Gray *et al.*, 1994; Milano de Tomasel y McIntyre, 2001).

Durante 2014, el Programa Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (ProVEF) del SENASICA-SAGARPA en Jalisco, México, realizó un muestreo en el cultivo de alfalfa seleccionando plantas que presentaban crecimiento reducido, acortamiento de entrenudos, deformación y decoloración de brotes y hojas. Estos síntomas son parecidos a los producidos por nematodos foliares en alfalfa (Evans *et al.*, 2008) pero en México no se tenía evidencia de su presencia por lo que se planteó el objetivo de determinar la identidad taxonómica y molecular de los nematodos detectados, así como sus afinidades filogenéticas.

the same species by the pathogenicity it causes in different hosts. Races of *D. dipsaci* s. s. contribute in the wide adaptability of the species to diverse climates and hosts, and is therefore considered of quarantine importance by international plant health regulation agencies (Tenuta *et al.*, 2014).

Alfalfa is a host also affected by *D. dipsaci*, where it is known as the alfalfa nematode, since sprouts, stems and leaves are infected and can cause defoliation and death of plantlets (Milano de Tomasel and McIntyre, 2001; Westerdahl, *et al.*, 2006). By affecting the botanical and vegetative seed, it is a risk for the dissemination to areas where it is not found (Wood and Close 1974; Gray *et al.*, 1994; Milano de Tomasel and McIntyre, 2001).

In 2014, the National Phytosanitary Epidemiological Surveillance Program (Programa Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria - ProVEF) of the SENASICA-SAGARPA in Jalisco, Mexico, carried out an alfalfa crop sampling by selecting plants with reduced growth, shortening of internodes, distortion and sprouts and leaves discolored. These symptoms are similar to those produced by foliar nematodes in alfalfa (Evans *et al.*, 2008), but in Mexico there was no evidence of its presence, hence the aim of determining the taxonomic and molecular identities of the nematodes found, as well as their phylogenetic affinities.

MATERIALS AND METHODS

Sampling of biological material

Sampling was carried out in the alfalfa crop var. Atoyac with a spraying irrigation system in Cuyacapan, Atoyac, Jalisco between coordinates 19.974489 °N - 103.5276407 °W. Seven samples of complete plants with roots, stems, sprouts, and

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo del material biológico

El muestreo se realizó en el cultivo de alfalfa var. Atoyac con sistema de riego por aspersión de la localidad Cuyacapan, Atoyac, Jalisco entre las coordenadas 19.974489° N - 103.5276407° W. Se colectaron siete muestras al azar de plantas completas con raíces, tallos, brotes y hojas con síntomas asociados a nematodos foliares.

Extracción de nematodos

Raíces y follaje de las muestras fueron disecadas de 1-2 cm separando raíces, hojas+brotes y tallos e incubadas por separado por 4 h en agua destilada estéril a 20±2 °C. Se realizó la inspección de los nematodos extraídos de los tejidos con un microscopio estereoscópico American Optical con aumentos 1-15X.

Identificación taxonómica

La determinación de la identidad de la especie asociada con el síndrome se llevó a cabo mediante taxonomía tradicional. Se realizaron las mediciones de los caracteres de diagnóstico, el cálculo de los Índices De Man y comparados con los valores de referencia de especies del género *Ditylenchus* mencionados por Hooper, 1972; Decker, 1969 y Sturhan & Brzeski 1991. Hembras y machos fueron anestesiados con calor de mechero de alcohol y posteriormente montados en agua-agar al 2% (Esser, 1986). Se tomaron fotografías con una cámara digital AxioCam ICc1 (Carl Zeiss) adaptada a un microscopio compuesto AxioStar Plus (Carl Zeiss). Las mediciones fueron realizadas con el programa AxioVision Rel 4.8 (Carl Zeiss).

leaves with symptoms related to foliar nematodes were collected randomly.

Extraction of nematodes

Roots and foliage of the samples were dissected 1-2 cm long, and separated on roots, leaves+sprouts and stems. Samples were incubated separately for 4 h in sterile distilled water at 20±2 °C. The nematodes extracted from the tissues were inspected using a stereoscopic American Optical microscope with magnifications 1-15X.

Taxonomic identification

The identity of the species related to the symptom was determined using traditional taxonomy. Measurements were taken of the diagnosis characteristics, as well as of the calculation of the De Man ratio Indices, and compared with the species reference values for the genus *Ditylenchus* mentioned by Hooper, 1972; Decker, 1969 and Sturhan & Brzeski 1991. Females and males were anesthetized with the heat from an alcohol burner and then placed on 2% water-agar (Esser, 1986). Photographs were taken using an digital AxioCam ICc1 (Carl Zeiss) digital camera adapted to an AxioStar Plus (Carl Zeiss) compound microscope. The measurements were performed using the program AxioVision Rel 4.8 (Carl Zeiss).

DNA extraction

DNA was extracted using the method proposed by Williams *et al.*, 1992 and Thomas *et al.*, 1997 using the specimens previously analyzed using traditional taxonomy. Nematodes were recovered individually from the mounting medium and placed in 10 µl of lysis buffer solution (10 mM Tris-HCl,

Extracción del ADN

La extracción de ADN se realizó a través del método propuesto por Williams *et al.*, 1992 y Thomas *et al.*, 1997 utilizando los especímenes previamente analizados por taxonomía tradicional. Los nematodos fueron recuperados individualmente del medio de montaje y colocados en 10 µl de solución amortiguadora de lisis (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.45% Tween 20; 0.05% gelatina) sobre un cubreobjetos limpio. Se maceró el espécimen con la punta de una micropipeta bajo el microscopio estereoscópico. Se transfirió la solución a un tubo de centrifuga de 200 µl y se congeló a -40 °C por 30 min. Se incubó a 65 °C por 1 h dando vortex al menos una vez y 0.1 µl de Proteinasa K (20 µg/ml) fue agregado faltando 10-15 min. Finalmente se incubó a 95°C por 15 min para inactivar la Proteinasa K y se conservó a -20 °C. Se utilizaron 5 µl del extracto crudo de ADN por cada reacción de PCR.

Amplificación por PCR del ADN ribosomal

Se utilizaron dos marcadores moleculares del ADN ribosomal: 1. La región ITS1-5.8S-ITS2 empleando los iniciadores AB28 (5'-GTT TCC GTA GGT GAA CCT GC-3') (Joyce *et al.*, 1994) y TW81 (5'-ATA TGC TTA AGT TCA GCG GGT-3') (Howlett *et al.*, 1992). 2. Los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S utilizando los iniciadores D2A (5'-ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG-3') y D3B (5'-TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA-3') (Ellis *et al.*, 1986; Courtright *et al.*, 2000). En ambos marcadores se utilizó ADN de *D. dipsaci* afectando ajo como control positivo.

Para la amplificación del ITS1-5.8S-ITS2, la reacción estuvo compuesta por solución amortiguadora de PCR 1X (Invitrogen), MgCl₂ 3 mM, Mix dNTP's 200 µM, iniciadores TW81 y AB28 a 0.4 µM,

pH 8.0, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.45% Tween 20; 0.05% gelatin) on a clean slide cover. The specimen was smashed using a micropipette tip under the stereoscopic microscope. The solution was transferred into a 200 µl centrifuge tube and frozen at -40°C for 30 min. It was incubated at 65°C for 1 h, vortexed at least once, and 0.1 µl of proteinase K (20 µg/ml) was added with 10-15 min remaining. Finally, it was incubated at 95 °C for 15 min to inactivate the Proteinase K and stored at -20 °C. For each PCR reaction, 5 µl of the crude DNA extract were used.

Amplification by PCR of ribosomal DNA

Two molecular markers of the ribosomal DNA were used: 1. ITS1-5.8S-ITS2 region, using primers AB28 (5'-GTT TCC GTA GGT GAA CCT GC-3') (Joyce *et al.*, 1994) and TW81 (5'-ATA TGC TTA AGT TCA GCG GGT-3') (Howlett *et al.*, 1992). 2. D2-D3 expansion segments of 28S gene, using primers D2A (5'-ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG-3') and D3B (5'-TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA-3') (Ellis *et al.*, 1986; Courtright *et al.*, 2000). For both markers, DNA from *D. dipsaci* affecting garlic was used as a positive control.

For the amplification of ITS1-5.8S-ITS2, the reaction was composed by PCR 1X (Invitrogen) buffer solution, MgCl₂ 3 mM, Mix dNTP's 200 µM, primers TW81 and AB28 at 0.4 µM, *Taq* Polymerase 2.5 U/µl and 5.0 µl DNA (crude extract). The PCR reactions took place in a total volume of 50 µl in an i-Cycler (BioRad) thermocycler with the following thermocycling program: initial denaturalization at 95 °C for 3 min, 34 denaturalization cycles at 95 °C for 45 s, annealing at 57 °C for 30 s, extension at 72 °C for 1.5 min, and finally, a final extension at 72 °C for 5 min (Skantar *et al.*, 2007).

The amplification components of the expansion segments D2-D3 of gene 28S were: PCR 1X

Taq Polimerasa 2.5 U/μl y 5.0 μl DNA (extracto crudo). Las reacciones de la PCR se realizaron en un volumen total de 50 μl en un termociclador i-Cycler (BioRad) con el siguiente programa de termociclaje: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, 34 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 45 s, anillamiento a 57 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 1.5 min, y finalmente una extensión final a 72 °C por 5 min (Skantar *et al.*, 2007).

Los componentes de amplificación de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S fueron: solución amortiguadora de PCR 1X (Invitrogen), MgCl₂ 3 mM, Mix dNTP's 200 μM, iniciadores D2A y D3B a 0.4 μM, *Taq* Polimerasa 2.5 U/μl y 5.0 μl ADN considerando un volumen final de 50 μl. Las condiciones de termociclaje fueron: desnaturalización inicial 95 °C por 3 min, 34 ciclos de desnaturalización 95 °C por 45 s, anillamiento 55 °C por 45 s, extensión a 72 °C por 1 min, y una extensión final 72 °C por 5 min (Marek *et al.*, 2010).

Los productos de PCR de ambos marcadores fueron corridos por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.4% teñido con GelRed (Biotium) y visualizados en un fotodocumentador Gel Doc EZ (BioRad).

PCR-RFLP's de la región ITS1-5.8S-ITS2

Los productos amplificados fueron digeridos con las enzimas de restricción *RsaI* y *HinfI*. El volumen final de reacción fue de 20 μl con los siguientes componentes: 2 μl de solución amortiguadora de digestión, 1 μl de la enzima, 10 μl de producto de PCR y 7 μl de agua destilada estéril grado biología molecular. Se incubaron las muestras a 37 °C por 3 h y se analizaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa ultrapura-1000 al 2.5% teñidos con GelRed (Biotium) y visualizados en el fotodocumentador Gel Doc EZ (BioRad).

(Invitrogen) buffersolution, MgCl₂ 3 mM, Mix dNTP's 200 μM, primers D2A and D3B at 0.4 μM, *Taq* Polymerase 2.5 U/μl and 5.0 μl DNA, considering a final volume of 50 μl. The thermocycling conditions were: initial denaturalization 95 °C for 3 min, 34 denaturalization cycles 95 °C for 45 s, annealing 55 °C for 45 s, extension at 72 °C for 1 min, and a final extension 72 °C for 5 min (Marek *et al.*, 2010).

The products of PCR from both markers were run by horizontal electrophoresis in 1.4% agarose gel stained with GelRed (Biotium) and visualized in a Gel Doc EZ (BioRad) photodocumenter.

PCR-RFLP's of the ITS1-5.8S-ITS2 region

The amplified products were digested with restriction enzymes *RsaI* and *HinfI*. The final reaction volume was 20 μl with the following components: 2 μl of digestion buffer solution, 1 μl of the enzyme, 10 μl of PCR product and 7 μl of sterile molecular biology grade water. Samples were incubated at 37 °C for 3 h and analyzed by horizontal electrophoresis in 2.5% ultrapure agarose gel-1000 stained with GelRed (Biotium) and visualized in the Gel Doc EZ (BioRad) photodocumenter.

Sequencing, bioinformatics, and phylogenetic analysis

The PCR products amplified were sequenced using the Sanger method at National Phytosanitary Reference Center, SENASICA-SAGARPA. The "forward" and "reverse" sequences were assembled and edited, and primer sequences were eliminated using the program CodonCode Aligner 4.2.7 (CodonCode Co.).

Both ribosomal markers underwent a BLAST to determine homology with NCBI sequences.

Secuenciación, bioinformática y análisis filogenético

Los productos amplificados por PCR fueron secuenciados por el método de Sanger en el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, SENASICA-SAGARPA. Las secuencias “forward” y “reverse” fueron ensambladas, editadas y las secuencias de iniciadores eliminadas mediante el programa CodonCode Aligner 4.2.7 (CodonCode Co.).

A los dos marcadores ribosomales se realizó un BLAST para determinar homología con secuencias del NCBI. El análisis filogenético se realizó con una alineación múltiple de 36 secuencias de ITS1-5.8S-ITS2, mientras que para los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S el alineamiento múltiple incluyó 28 secuencias de especies cercanamente relacionadas con CLUSTAL W 2.3 (Thompson *et al.*, 1997). Para ambas reconstrucciones se utilizó *D. destructor* como grupo externo. La búsqueda del mejor modelo de sustitución nucleotídica se realizó en Mr Modeltest 2.3 (Nylander, 2004) y PAUP 4 (Swofford, 1998). Para la inferencia bayesiana, se utilizó el programa MrBayes v.3.2 (Huelsenbeck y Ronquist 2001) mediante cuatro cadenas para 1,000,000 generaciones. En las cadenas de Markov se tomaron muestras a intervalos de 100 generaciones. Por cada análisis se ejecutaron dos corridas utilizando el modelo HKY+G para ambos marcadores. El primer 20% de los árboles muestreados fueron eliminados de todos los análisis y los árboles restantes fueron utilizados para calcular el árbol consenso por la regla de la mayoría del 50% y las probabilidades posteriores fueron calculadas para cada clado. Los árboles fueron visualizados con software FigTree v1.3.1 (Rambaut, 2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las plantas presentaron síntomas de reducción del crecimiento, acortamiento de entrenudos,

Phylogenetic analysis was carried out with a multiple alignment of 36 sequences of ITS1-5.8S-ITS2, whereas D2-D3 expansion segments of the gene 28S, multiple alignment included 28 sequences of species closely with the software CLUSTAL W 2.3 (Thompson *et al.*, 1997). For both phylogenetic reconstructions, *D. destructor* was used as an external group. The search for the best model of nucleotidic substitution was carried out on Mr Modeltest 2.3 (Nylander, 2004) and PAUP 4 (Swofford, 1998). For the Bayesian inference, the program used was MrBayes v.3.2 (Huelsenbeck and Ronquist 2001) with four chains for 1,000,000 generations. In the Markov chains, samples were taken at intervals of 100 generations. For each analysis, two runs were performed using the model HKY+G for both markers. The first 20% of the trees sampled were eliminated from all the analyses and the remaining trees were used to calculate the consensus tree by the rule of the majority of 50% and posterior probabilities were calculated for each clade. The trees were visualized using the software FigTree v1.3.1 (Rambaut, 2009).

RESULTS AND DISCUSSION

All plants showed symptoms of growth reduction, shortening of internodes, and deformation of sprouts and leaves (Figure 1A) as well as decoloring of leaflets (albino leaves or “white flagging”) (Figure 1B). These symptoms, and particularly albino leaves, are similar to those caused by the stem nematode *D. dipsaci*, also been reported in the provinces of Alberta and British Columbia, Canada (Vrain and Lalik, 1983), and the states of Washington, Nevada, Utah, Alabama, and Wyoming, in the United States (Gray *et al.*, 1994).

In the incubation of roots, only free living nematodes were isolated, whereas in leaf, sprout and stem tissues, active specimens of the

deformación de brotes y hojas (Figura 1A) así como decoloración de folíolos (hojas albinas o “white flagging”) (Figura 1B). Estos síntomas y en particular las hojas albinas son similares a los ocasionados por el nematodo del tallo *D. dipsaci* los cuales también han sido reportados en las provincias de Alberta y Columbia Británica, Canadá (Vrain y Lalik, 1983), Washington, Nevada, Utah, Alabama y Wyoming, Estados Unidos de Norteamérica (Gray *et al.*, 1994).

En la incubación de raíces sólo se aislaron nematodos de vida libre mientras que en los tejidos de hojas, brotes y tallos se obtuvieron especímenes activos del género *Ditylenchus*. Si bien se detectaron nematodos vivos (~90-100/g de muestra), también se detectaron especímenes en anhidrobiosis (~15-20). Tomando en consideración que esta especie puede sobrevivir de esta forma en residuos de cosecha, semilla botánica y partículas de suelo, los especímenes pueden reactivarse y servir como fuente de inóculo para infecciones futuras o introducirse en zonas donde no se encuentre presente (Wharton y Barrett, 1985).

genus *Ditylenchus* were obtained. Although live nematodes were found (~90-100/g of sample), specimens were also found in anhidrobiosis stage (~15-20). Considering that this species can survive in this way on harvest residues, botanical seeds, and soil particles, the specimens may reactivate and serve as a source of inoculum for future infections or introduce itself into areas in which it was not previously present (Wharton and Barrett, 1985).

Taxonomic identification: The specimens found displayed the following characteristics: **Females:** thin body (Figure 2 A), cephalic area slightly flattened, glandular area with a slight or no overlap, muscular middle bulb with a well-defined valve. Small and weak stylet with well-developed nodules (Figure 2 B), post-uterine sac with a length $\frac{1}{2}$ of that between the vulva and the anus (Figure 2 D). **Males:** thin body (Figure 2 F), relatively smaller than females; simple spicules, moderate gubernaculum, and leptoderan bursa type that covers approximately 75% tail length (Figure 2 E). Both in females and males, a lateral field



Figura 1. Síntomas producidos por el nematodo del tallo *D. dipsaci* en alfalfa. A) Deformación de hojas brotes y acortamiento entrenudos. B) Decoloración de folíolos (“hojas albinas”).

Figure 1. Symptoms produced by the stem nematode *D. dipsaci* in alfalfa. A) Deformation of leaves, sprouts and shortening of internodes. B) Decoloring of leaflets (“albino leaves”).

Identificación taxonómica: Los especímenes detectados presentaron las siguientes características: **Hembras:** cuerpo delgado (Figura 2A), región cefálica baja ligeramente aplanada, región glandular sin sobreposición marcada o muy ligera, bulbo medio muscular con válvula bien definida. Estilete pequeño y débil con nódulos bien desarrollados (Figura 2B), saco post-uterino con una longitud de $\frac{1}{2}$ de la distancia entre la vulva y el ano (Figura 2D). **Machos:** cuerpo delgado (Figura 2F), relativamente más pequeños que las hembras; espículas y gubernaculum simple de tamaño moderados y con bursa tipo leptoderan que cubre aproximadamente el 75% de la cola (Figura 2E). Tanto en hembras como en machos se observó un campo lateral con cuatro incisuras (Figura 2C) y cola cónica aguda con terminación en punta de lápiz (Figuras 2A, E y F). Estas características morfológicas corresponden al género *Ditylenchus*. La morfometría y los Índices De Man obtenidos concuerdan con los valores de referencia reportados por Decker, 1969; Hooper, 1972 y Sturhan & Brzeski 1991 para el nematodo de la alfalfa *D. dipsaci* (Cuadro 1).

Identificación molecular: La amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 y segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S del DNA ribosomal produjeron un fragmento de aproximadamente 750 pb (Figura 3) y 800 pb, respectivamente (Figura 4), el cual coincide con el reportado por Subbotin *et al.*, 2005. Estas secuencias fueron depositadas en la base de datos del NCBI con los números de acceso KY348762, KY348763 y KY348764 para ITS1-5.8S-ITS2 y KY348765 para D2-D3 del gen 28S.

Digestión enzimática PCR-RFLPs: La digestión del producto de PCR de la región ITS1-5.8S-ITS2 con la enzima *RsaI* se produjeron 4 fragmentos: 335, 280, 200 y 132 pb (Figura 5) y con *HinfI* se obtuvieron dos fragmentos: 400 y 300 pb (Figura 6). El

was observed with four incisures (Fig. 2 C) and a sharp conical tail ending in the shape of a pencil tip (Figuras 2 A, E, and F). These morphological characteristics correspond to the genus *Ditylenchus*. The morphometry and De Man ratio obtained agree with the reference values reported by Decker, 1969; Hooper, 1972 and Sturhan & Brzeski 1991 for the alfalfa nematode *D. dipsaci* (Table 1).

Molecular identification: The amplification of ITS1-5.8S-ITS2 region and D2-D3 expansion segments of 28S gene of the ribosomal DNA produced a fragment of approximately 750 bp (Figure 3) and 800 bp, respectively (Figure 4), which coincides with that reported by Subbotin *et al.*, 2005. These sequences were deposited in the NCBI database with access numbers KY348762, KY348763, and KY348764 for ITS1-5.8S-ITS2 and KY348765 for D2-D3 of the gene 28S.

PCR-RFLPs enzymatic digestion: The digestion of the PCR product of ITS1-5.8S-ITS2 region with the enzyme *RsaI* produced four fragments: 335, 280, 200 and 132 bp (Figure 5) and with *HinfI*, two fragments were produced: 400 and 300 bp (Figure 6). The digestion pattern agreed with the one presented by the bulb nematode *D. dipsaci* in garlic for both enzymes (Subbotin *et al.*, 2003; Vovlas *et al.*, 2011). However, the digestion pattern for the nematode *D. dipsaci* found in alfalfa with the enzyme *RsaI* showed an additional fragment of 200 bp (Figure 5). This 200 bp fragment indicated the differentiation of the population of the nematode found in alfalfa in regard to the population that affects garlic.

Phylogenetic analysis. The search for homology by BLAST of the Mexican sequences of *D. dipsaci* found in alfalfa with sequences of the NCBI from both markers of the rDNA previously deposited in

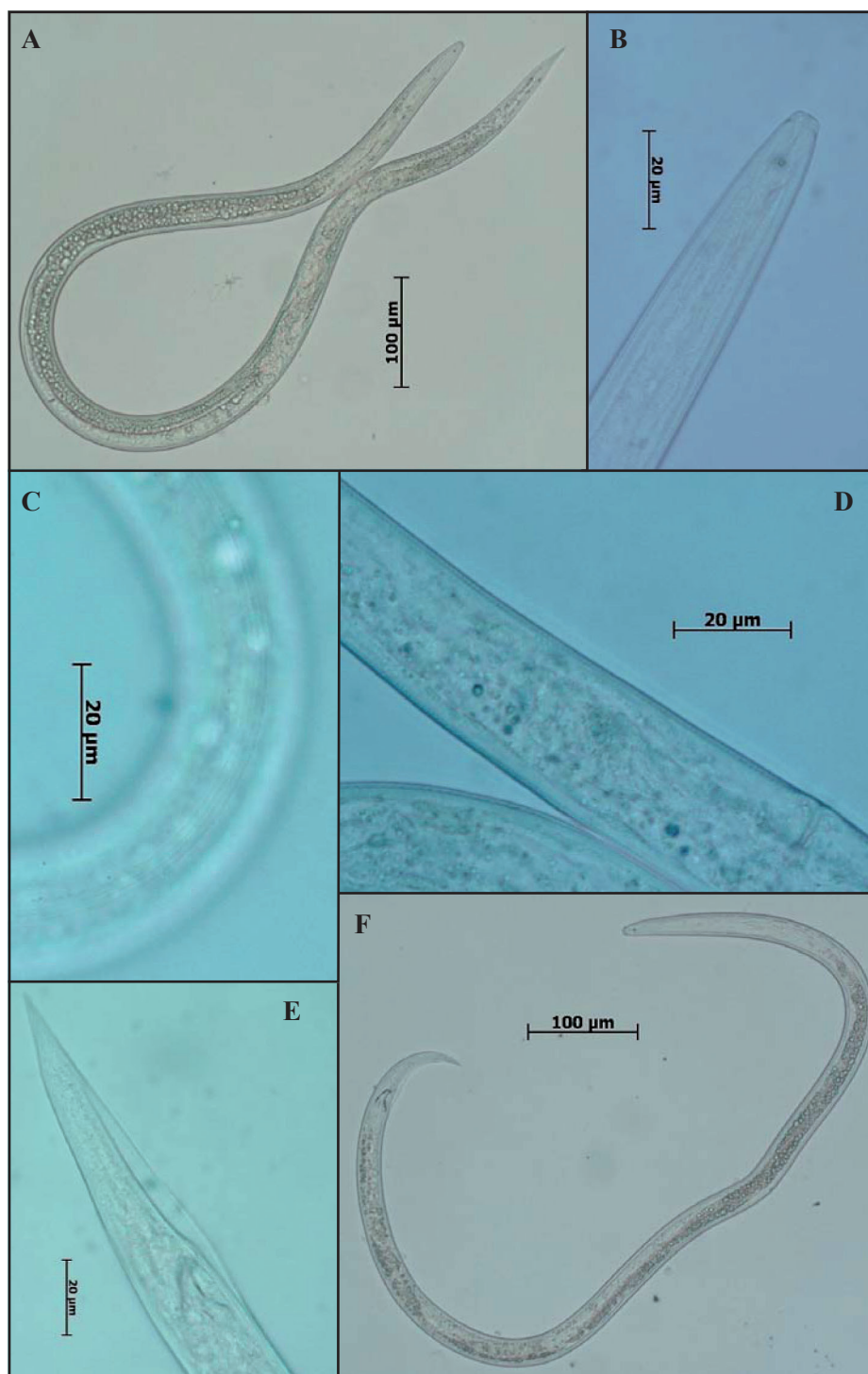


Figura 2. Micrografías de caracteres de diagnóstico para nematodos detectados en alfalfa. A) hembra, B) región anterior y estilete, C) Cuatro campos laterales, D) saco post-uterino, E) cola aguda y bursa *leptoderan.*, y F) macho.

Figure 2. Micrographs of diagnosis characteristics for nematodes found in alfalfa. A) female, B) anterior end and stylet, C) Four lateral fields, D) post-uterine sac, E) sharp conical tail ending and *leptoderan* bursa type, F) male.

Cuadro 1. Morfometría de especímenes de *Ditylenchus* detectados en plantas de alfalfa. Todos los valores están dados en mm excepto V y T, los cuales están dados en porcentaje. Promedio ± Desviación estandar, y valores mínimos-máximos.

Table 1. Morphometry of *Ditylenchus* found in alfalfa plants. All values are expressed in mm except V and T, which are expressed as percentages. Average ± Standard deviation and minimum-maximum values.

xCaracter morfométrico/ Índices De Man	yValores de especímenes detectados en Alfalfa		yValores de referencia para <i>D. dipsaci</i> (Hopper, 1972; Decker, 1969); Sturhan & Brzeski 1991)	
	♀ n=10	♂ n=15	♀	♂
L	1190.4±123.6 (1056.7-1418.0)	1109.4±101.5 (957.3-1260.0)	1000 - 1700	1000 - 1500
Ancho máximo cuerpo	30.8±2.2 (28.0-34.6)	27.0±2.3 (23.6-30.0)	*	*
Longitud estilete	10.1±0.5 (9.5-10.8)	9.9±0.2 (9.5-10.1)	10-13	9-12
Long esófago	172.3±17.8 (134.3-219.4)	178.4±20.4 (153.4-215.0)	*	*
Longitud cola	90.1±12.4 (77.3-111.1)	85.7±4.3 (80.1-93.1)	95-105	*
Longitud saco post-uterino (PUS)	63.9±11.5 (46.9-82.5)	-	1/2 la distancia vulva-ano	-
Distancia vulva-ano	143.6±23.4 (94.2-176.4)	-	1 3/4-2 1/4 la longitud de la cola	-
Long. región cefálica-vulva	952.6±90.5 (844.2-1154.8)	-	*	-
Relación entre long. de vulva-ano/long. PUS	2.3±0.5 (1.7-3.2)	-	2.0	-
Longitud espícula	-	21.4±1.9 (19.1-24.0)	-	20-28
Longitud gubernáculo	-	7.5±1.0 (6.4-9.0)	-	8-11
Long. de cloaca a parte más alejada del testículo.	-	672.1±116.2 (491.9-801.4)	-	*
<i>a</i>	38.7±3.2 (33.4-46.4)	41.2±2.3 (38.0-43.7)	30.2-64	35.4-53.5
<i>b</i>	7.0±0.7 (6.0-8.4)	6.3±0.7 (5.5-7.4)	6.0-8.8	5.5-7.8
<i>c</i>	13.3±1.0 (11.1-15.3)	12.9±1.0 (11.9-14.7)	13.3-19.5	12-17.3
V	80.0±1.2 (78.9-82.2)	-	79-86	-
T	-	61.0±11.2 (39.0-69)	-	65-72

xL=longitud del cuerpo; a=L/ancho máximo del cuerpo; b=L/longitud esófago; c=L/longitud cola; V = distancia de la región anterior a la vulva/L x 100; T=Distancia desde la cloaca a la parte más alejada del testículo/L x100. / L=Total body length; a=L/Greatest body width; b=L/ Oesophagus length; c=L/tail length; V = Anterior end-vulva length/L x 100; T=Distance from cloaca to anterior-most part of testis/L x100.

♀ = Hembras, ♂ = Machos / ♀ = Females, ♂ = Males

y- = No aplica, * = Valor no disponible en literatura. / y- = Not applicable, * = Value not available in literature.

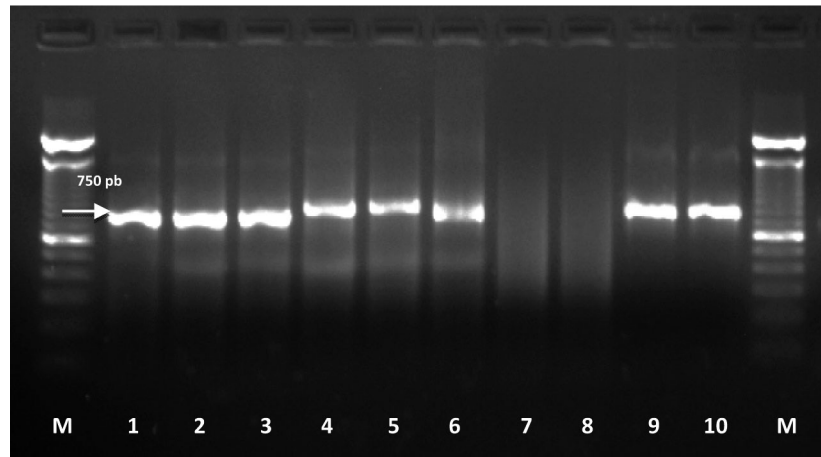


Figura 3. Amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA de *D. dipsaci* detectado en alfalfa. M: marcador molecular de 100 pb; 1-6: amplificado a partir de extracción individual de DNA de *D. dipsaci*; 7 y 8: controles negativos (agua estéril grado biología molecular); 9 y 10: controles positivos de *D. dipsaci* (ajo) amplificando en un fragmento de 750 pb.

Figure 3. Amplification of rDNA ITS1-5.8S-ITS2 region of *D. dipsaci* found in alfalfa. M: 100 bp molecular marker; 1-6: amplified from the individual DNA extraction of *D. dipsaci*; 7 and 8: negative controls (molecular biology grade sterile water); 9 and 10: positive controls for *D. dipsaci* (garlic) amplifying a fragment of 750 bp.

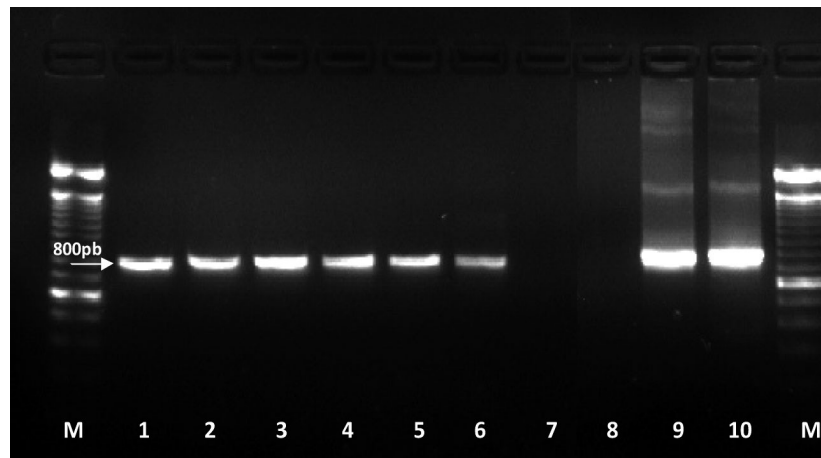


Figura 4. Amplificación de segmentos de expansión D2 y D3 del gen 28S del rDNA. M: marcador molecular de 100 pb; 1-6: amplificado a partir de extracción individual de DNA de *D. dipsaci*; 7 y 8: controles negativos (agua estéril grado biología molecular); 9 y 10: controles positivos de *D. dipsaci* (ajo) amplificando en un fragmento de 800 pb.

Figure 4. Amplification of D2-D3 expansion segments of 28S gene. M: 100 bp molecular marker; 1-6: amplified from the individual DNA extraction of *D. dipsaci*; 7 and 8: negative controls (molecular biology grade sterile water); 9 and 10: positive controls for *D. dipsaci* (garlic) amplifying a fragment of 800 bp.

patrón de digestión coincide con el presentado por el nematodo de los bulbos *D. dipsaci* en ajo para ambas enzimas (Subbotin *et al.*, 2003; Vovlas *et al.*, 2011) sin embargo, el patrón de digestión del

the GenBank displayed a 99% homology ($E=0.0$) with *D. dipsaci* sequences from different hosts and areas.

The topology of the phylogenetic tree obtained

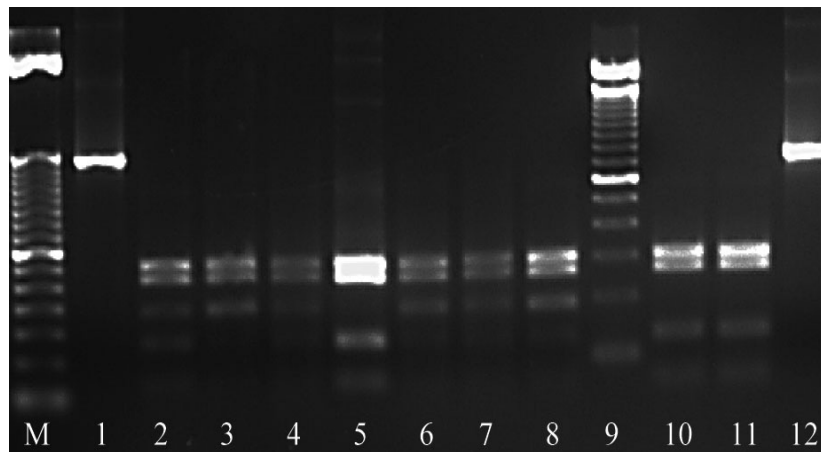


Figura 5. Digestión enzimática de la región ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA con la enzima *RsaI*. M: marcador molecular de 50 pb; 1 y 12: Producto de PCR sin digerir; 2-4, 6-8: Patrón de restricción 335, 280, 200 y 132 pb, de *D. dipsaci* en alfalfa. 5, 10 y 11: Control positivo de *D. dipsaci* (ajo) patrón de restricción 335, 280 y 132 pb; 9: marcador molecular 100 pb.
Figure 5. Enzymatic digestion of ITS1-5.8S-ITS2 region of the rDNA with the enzyme *RsaI*. M: 50 bp molecular marker; 1 and 12: Undigested PCR product; 2-4, 6-8: Restriction pattern 335, 280, 200 and 132 bp of *D. dipsaci* in alfalfa. 5, 10 and 11: Positive control of *D. dipsaci* (garlic) restriction pattern 335, 280 and 132 bp; 9: 100 bp molecular marker.

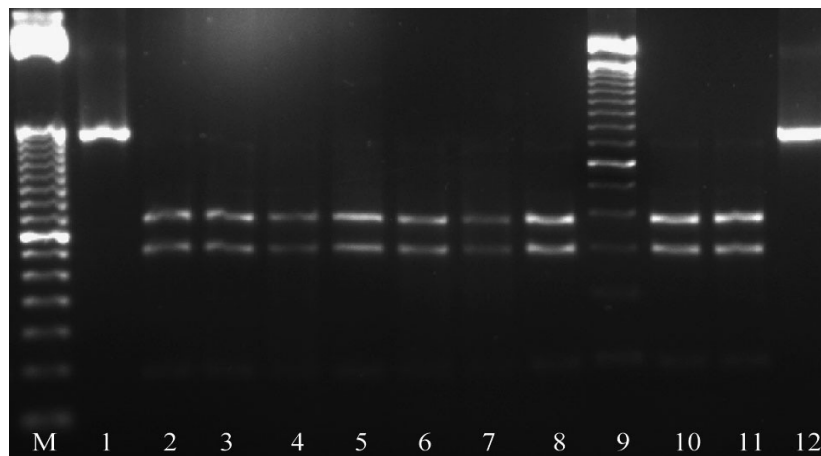


Figura 6. Digestión enzimática de la región ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA con la enzima *HinfI*. M: marcador molecular de 50 pb; 1 y 12: Producto PCR sin digerir; 2-8: Patrón de restricción 400 y 300 pb, 9: marcador molecular 100 pb. 10 y 11: Patrón de restricción de *D. dipsaci* s.s.(ajo) de 400 y 300 pb.
Figure 6. Enzymatic digestion of ITS1-5.8S-ITS2 region of rDNA with the enzyme *HinfI*. M: 50 bp molecular marker; 1 and 12: Undigested PCR product; 2-8: Restriction pattern 400 and 300 bp, 9: 100 bp molecular marker. 10 and 11: Restriction pattern for *D. dipsaci* s.s.(garlic) of 400 and 300 bp.

nematodo *D. dipsaci* detectado en alfalfa con la enzima *RsaI* mostró un fragmento adicional de 200 pb (Figura 5). Este fragmento de 200 pb indicó la

with marker ITS1-5.8S-ITS2 positioned *D. dipsaci* in two large groups, based on karyotypic differences: the diploid and the polyploid. The

diferenciación de la población del nematodo detectado en alfalfa respecto a la población que afecta ajo.

Análisis filogenético. La búsqueda de homología por BLAST de las secuencias mexicanas de *D. dipsaci* detectadas en alfalfa con secuencias del NCBÍ de ambos marcadores del rDNA previamente depositadas en el GenBank mostraron un 99% de homología ($E=0.0$) con secuencias de *D. dipsaci* de diferentes hospederos y regiones.

La topología del árbol filogenético obtenido con el marcador ITS1-5.8S-ITS2, posicionó a *D. dipsaci* en dos grandes grupos basados en diferencias cariotípicas: el diploide y el poliploide. La población mexicana de *D. dipsaci* en alfalfa, se agrupó en el clado *sensu stricto* diploide de *D. dipsaci* (Figura 7) donde se observa una baja diversidad haplotípica y poca variación intraespecífica. Si bien las poblaciones mexicanas se agrupan en un clado bien definido, es evidente la presencia de haplotipos diferentes de *D. dipsaci* en alfalfa. En este clado se ubican casi todas las razas fisiológicas de *D. dipsaci* basadas en los hospedantes que afecta. Un agrupamiento parecido fue observado con el marcador D2-D3 del gen 28S en ambos marcadores (Figura 8). Esta topología es similar a la reportada para miembros de la familia Anguinidae utilizando diferentes marcadores del rDNA (Subbotin *et al.*, 2003; Subbotin *et al.*, 2005; Castillo *et al.*, 2007; Jeszke *et al.*, 2014; Qiao *et al.*, 2016).

CONCLUSIONES

En México, *D. dipsaci* afecta ajo y cebolla en las principales zonas productoras de estas aliáceas (Tenente, 1996; SENASICA, 2013). Estudios realizados con hospederos diferenciales para la determinación de razas, afirman que tales poblaciones

Mexican population of *D. dipsaci* in alfalfa was grouped in the clade *sensu stricto* *D. dipsaci* diploid (Figure 7), which shows a low haplotype diversity and little intraspecific variation. Although Mexican populations are grouped in a well-defined clade, the presence of different *D. dipsaci* haplotypes in alfalfa is evident. This clade get together almost all the physiological races of *D. dipsaci* based on the hosts affected. A similar grouping was observed with marker D2-D3 of the gene 28S (Figure 8). This topology is similar to that reported for members of the Anguinidae family using different rDNA markers (Subbotin *et al.*, 2003; Subbotin *et al.*, 2005; Castillo *et al.*, 2007; Jeszke *et al.*, 2014; Qiao *et al.*, 2016).

CONCLUSIONS

In Mexico, *D. dipsaci* affects garlic and onion plants in the main geographic areas that produce these alliacous crops (Tenente, 1996; SENASICA, 2013). Studies carried out on differential hosts for the determination of races, claim that such correspond to the “garlic race” (Aguilera, 1994). The pathogenic variability of *D. dipsaci* manifested in several races is well-known based on the host it affects, and therefore, based on the host and the PCR-RFLP restriction pattern obtained with the endonuclease *RsaI*, it is possible to indicate that the foliar nematode *D. dipsaci* found in this host could be the “alfalfa race,” since this race only affects, and reproduces in *Medicago sativa* plants (Webster, 1967; Sturhan and Brzesky, 1991; Riggs, 1991). It is necessary to carry out studies of differential hosts in the populations that affect alfalfa and use genomic tools as high throughput sequencing (Next Generation Sequencing) to obtain useful molecular markers for the differentiation of the *D. dipsaci* races in Mexico.

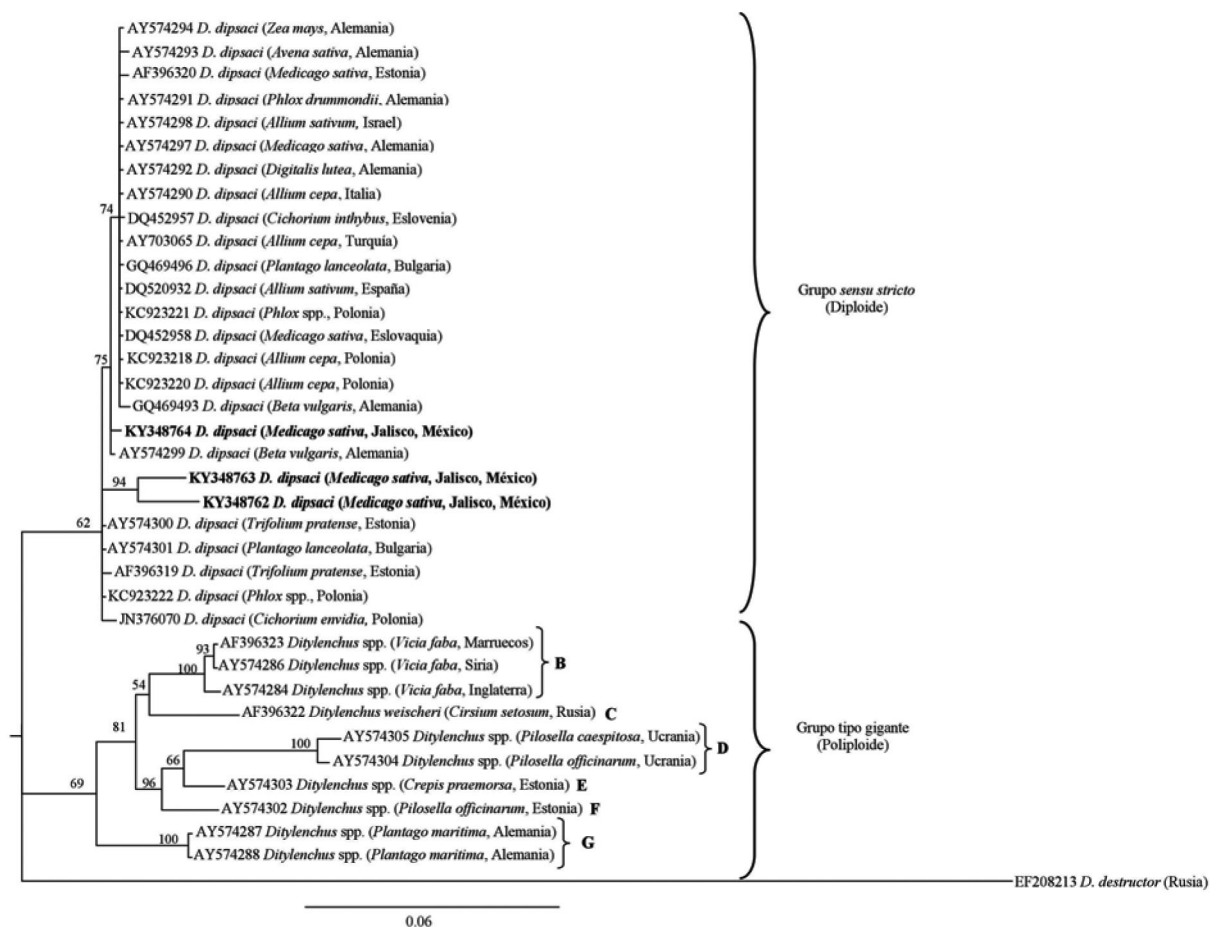


Figura 7. Reconstrucción filogenética bayesiana de secuencias de la región ITS1-5.8S-ITS2 de la población mexicana de *D. dipsaci* detectado en alfalfa. Árbol consenso de probabilidades superiores al 50% generados a partir del modelo complejo: HKY + G, con otras secuencias de anguinidos depositadas en el GenBank. Valores de soporte son indicados en cada una de los clados.

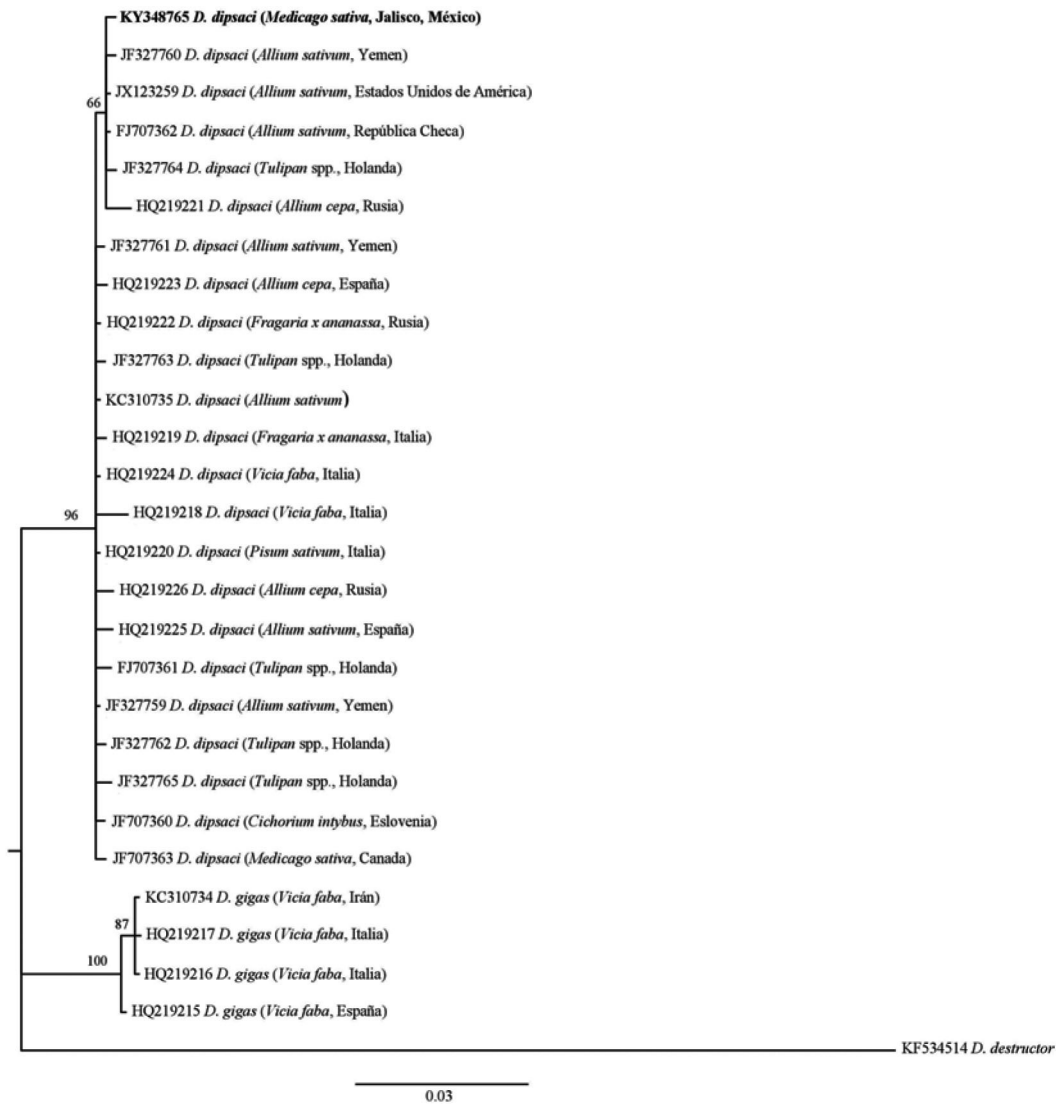
Figure 7. Bayesian phylogenetic reconstruction of ITS1-5.8S-ITS2 region sequences from Mexican population of *D. dipsaci* found in alfalfa. Superior probability consensus tree 50% generated from the complex model: HKY + G, with other anguinid sequences deposited in GenBank. Support values are indicated in each one of the clades.

corresponden a la “raza ajo” (Aguilera, 1994). Es conocida la gran variabilidad patogénica de *D. dipsaci* manifestada en varias razas en base al hospedero que afecta por ello, con base al hospedante y al patrón de restricción PCR-RFLP obtenido con la endonucleasa *RsaI* se puede indicar que el nematodo foliar *D. dipsaci* detectado en este hospedante

ACKNOWLEDGEMENTS

Special thanks to the National Phytosanitary Epidemiological Surveillance Program (ProVEF) of the SENASICA-SAGARPA in Jalisco, Mexico for its support during the collection of samples.

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



**Figura 8.** Reconstrucción filogenética bayesiana de secuencias de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S de la población mexicana de *D. dipsaci* detectado en alfalfa. Árbol consenso de probabilidades superiores al 50% generados a partir del modelo complejo: HKY + G, con otras secuencias de anguinidos depositadas en el GenBank. Valores de soporte son indicados en cada una de los clados.

**Figure 8.** Bayesian phylogenetic reconstruction of D2-D3 expansion segments of 28S gene sequences from Mexican population of *D. dipsaci* found in alfalfa. Superior probability consensus tree 50% generated from the complex model: HKY + G, with other anguinid sequences deposited in GenBank. Support values are indicated in each one of the clades.

podría tratarse de la “raza alfalfa” debido a que esta raza únicamente afecta y se reproduce en plantas de *Medicago sativa* (Webster, 1967; Sturhan y Brzesky, 1991; Riggs, 1991). Es necesario realizar

estudios de hospedantes diferenciales de la población que afecta alfalfa y hacer uso de herramientas genómicas como tecnologías de secuenciación de masiva (Next Generation Sequencing) para obtener

marcadores moleculares que sean de utilidad para la diferenciación de las razas de *D. dipsaci* presentes en nuestro país.

#### AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Programa Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (ProVEF) del SENASICA-SAGARPA en Jalisco, México por el apoyo durante las actividades de colecta de muestras.

#### LITERATURA CITADA

- Aguilera AWH. 1994. Identificación de razas del nematodo *Ditylenchus dipsaci* presentes en México. Tesis Profesional, UAM-X. 21 p.
- Boelter RH, Gray FA and Delaney RH. 1985. Effect of *Ditylenchus dipsaci* on Alfalfa mortality, winterkill, and yield. *Journal of Nematology* 17:140-144. <http://journals.fcla.edu/jon/article/viewFile/65631/63299>
- Castillo P., Vovlas N., Azpilicueta A., Landa B.B. and Jiménez-Díaz R.M. 2007. Host-parasite relationships in fall-sown sugar beets infected by the stem and bulb nematode, *Ditylenchus dipsaci*. *Plant Disease* 91:71-79. <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PD-91-0071>
- Caubel G. and Pedron D. 1976. Distribution géographique du nématode des tiges *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn) Fil., en culture de légumineuses fourragères. *Sciences Agronomiques Rennes* 8:183-188.
- Courtright EM, Wall DH, Virginia RA, Frisse LM, Vida JT and Thomas WK. 2000. Nuclear and mitochondrial DNA sequence diversity in the antarctic nematode *Scottinema lindsayae*. *Journal of Nematology* 32: 143-153. <http://journals.fcla.edu/jon/article/view/67138/64806>
- Chew MYI. 2000. Enfermedades de la Alfalfa. Pp: 47-57. In: Núñez HG, Chew MYI, Reyes JI y Godina GHJ (eds.). Producción y utilización de la alfalfa en la zona norte de México. INIFAP Centro de Investigación Regional Norte Centro. México. 102 p. <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/1938/produccionyutilizaciondelaalfalfaenlazonanortedemexico.pdf?sequence=1>
- Duncan WL and Moens M. 2006. Migratory endoparasitic nematodes. Pp: Perry RN and Moens M. (eds.). 144-166. In: *Plant Nematology*. CABI, UK. 541p.
- Decker H. 1969. *Phytonematologie*. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin, Germany. 526p.
- Esser RP. 1986. A water agar en face technique. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 53:254-255. Disponible en línea: <http://bionames.org/bionames-archiv/issn/0018-0130/53/254.pdf>
- Ellis RE, Sulston JE and Coulson AR. 1986. The rDNA of *C. elegans*: Sequence and structure. *Nucleic Acids Research* 14:2345-2364. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC339662/pdf/nar00274-0410.pdf>
- Evans K., Israelsen C. and Pace M. 2008. Alfalfa Stem Nematode. Utah State University Extension and Utah Plant Pest Diagnostic Laboratory. Utah, USA. 3 p. Disponible en línea: <https://utahpests.usu.edu/upddl/files-ou/factsheet/alfalfa-stem-nematode08.pdf>
- Gray FA, Williams JL, Griffin GD and Wilson TE. 1994. Distribution in the Western United States on alfalfa and cultivar Reaction to mixed populations of *Ditylenchus dipsaci* and *Aphelenchoides ritzemabosi*. *Journal of Nematology* 26:705-719. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2619569/pdf/705.pdf>
- Griffin GD and Thyr BD. 1988. Interaction of *Meloidogyne hapla* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis* on alfalfa. *Phytopathology* 78:421-425. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1988Articles/Phyto78n04\\_421.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1988Articles/Phyto78n04_421.PDF)
- Hooper DJ. 1972. *Ditylenchus dipsaci*. CIH. Description of Plant Parasitic Nematodes. Set 1, No. 14.
- Howlett BJ, Brownlee AG, Guest DI, Adcock GJ, and McFadden GI. 1992. The 5S ribosomal RNA gene is linked to large and small subunit ribosomal RNA genes in the oomycetes, *Phytophthora vignae*, *P. cinnamomi*, *P. megasperma* f. sp. *glycinae* and *Saprolegnia ferax*. *Current Genetics* 22: 455-461. DOI:10.1007/BF00326410
- Huelsensbeck J and Ronquist F. 2001. MrBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
- Jeszke A, Budziszewska M, Dobosz R, Stachowiak A, Protasiewicz D, Wiczorek P and Obrepalska-Stęplowska A. 2014. A comparative and phylogenetic study of the *Ditylenchus dipsaci*, *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus gigas* populations occurring in Poland. *Journal of Phytopathology* 162: 61-67. DOI: 10.1111/jph.12161
- Joyce SA, Reid A, Driver F and Curran J. 1994. Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to identification of entomopathogenic nematodes. Pp:178-187. In: Burnell AM, Ehlers RU. and Masson JP. (eds.). COST 812 Biotechnology Genetics of Entomopathogenic Nematode-Bacterium Complexes. Proceedings of Symposium & Workshop, St. Patrick's College, Maynooth, County Kildare, Ireland.
- Kerkoud M, Esquibet M, Plantard O. et al., 2007. Identification of *Ditylenchus* species associated with Fabaceae seeds based on a specific polymerase chain reaction of ribosomal DNA-ITS regions. *European Journal of Plant Pathology* 118: 323-332. DOI: 10.1007/s10658-006-9092-6
- Lara MCR, y Jurado GP. 2014. Paquete tecnológico para producir alfalfa en el estado de Chihuahua. Centro de Investigación Regional Norte Centro, INIFAP. Chihuahua, México. 48 p. Disponible en línea: [http://siproduce.sifupro.org.mx/seguimiento/archivero/8/2013/anales/anu\\_2413-25-2014-05-6.pdf](http://siproduce.sifupro.org.mx/seguimiento/archivero/8/2013/anales/anu_2413-25-2014-05-6.pdf)
- Marek M, Zouhar M, Douda O, Mazakova J. and Rysanek P. 2010. Bioinformatics-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: 931-934. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2010.02322.x



- Milano de Tomasel MC, and McIntyre GA. 2001. Distribution and biology of *Ditylenchus dipsaci* and *Aphelenchoides ritzemabosi* in alfalfa grown in Colorado. *Nematropica* 31:11–16. Disponible en línea: <http://journals.fcla.edu/nematropica/article/view/69608/67268>
- Nylander J. 2004. MrModeltest 2.3. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Perera M, Taylor S, Vanstone V and Jones M. 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. <https://doi.org/10.1163/138855409X12465362560557>
- Qiao Y, Yu Q, Badiss A, Zaidi MA, Ponomareva E, Hu Y, and Ye W. 2016. Paraphyletic genus *Ditylenchus* Filipjev (Nematoda, Tylenchida), corresponding to the *D. trifurmis*-group and the *D. dipsaci*-group scheme. *ZooKeys* 568: 1–12. DOI: 10.3897/zookeys.568.5965
- Rambaut A. 2009. FigTree. v1.3.1. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/>.
- Riggs RD. 1991. Resistance-breaking races of plant parasitic nematodes. Pp. 827-854. In: Manual of Agricultural Nematology. Nickle, W. R. (Ed.). Marcel Dekker Inc. New York, USA. 1025 p.
- SENASICA, 2013. Nematodo de los tallos y de los bulbos (*Ditylenchus dipsaci* Kühn 1857). Dirección General de Sanidad Vegetal-Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México. Ficha Técnica No. 18. 24 p. Disponible en línea: <http://www.cesaveson.com/files/docs/campanas/FTNo.18nematododeltalloydelosbulbos2.pdf>
- Skantar AM, Handoo ZA, Carta LK, and Chitwood DJ. 2007. Morphological and molecular identification of *Globodera pallida* associated with potato in Idaho. *Journal of Nematology* 39:133-144. Disponible en línea: <https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/990/Skantar%20Chitwood%20Idaho%20Globodera%20pallida%202007reduced.pdf>
- Sturhan D and Brzeski MW. 1991. Stem and bulb nematodes, *Ditylenchus* spp. Pp. 423–464. In: Nickle WR (ed.). Manual of Agricultural Nematology. Marcel Dekker, Inc., New York (USA). 1064 p.
- Swofford D. 1988. PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4.0b8a. Sunderland, MA: Sinauer.
- Subbotin SA, Madani M, Krall EL, Sturhan D and Moens M. 2003. Identification and phylogenetic relationships within the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* complex (Tylenchida: Anguinidae) as inferred from analysis of the ITS-rDNA sequences. *Journal of Nematology* 35:365. Disponible en línea: <http://journals.fcla.edu/jon/article/view/67424/65092>
- Subbotin SA, Madani M, Krall E, Sturhan D and Moens M. 2005. Molecular diagnosis, taxonomy, and phylogeny of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* species complex based on the sequences of the internal transcribed spacer-rDNA. *Phytopathology* 95:1308–1315. Disponible en línea: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-95-1308>
- Subbotin SA and Riley IT. 2012. Stem and gall forming nematodes. Pp. 521-577. In: Manzanilla-Lopez RH and Marban-Mendoza N. (eds.). Practical Plant Nematology. Biblioteca Básica de Agricultura. Colegio de Postgraduados (México). 883 p.
- Tenente RCV.1996. Nematode problems of bulbs, with special reference to *Ditylenchus dipsaci*. *Nematropica* 26:91-99. <http://journals.fcla.edu/nematropica/article/view/64150/61818>
- Tenuta M, Madani M, Briar S, Molina O, Gulden R, and Subbotin SA. 2014. Occurrence of *Ditylenchus weischeri* and not *D. dipsaci* in field pea harvest samples and *Cirsium arvense* in the Canadian Prairies. *Journal of Nematology* 46:376–384. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4284090/pdf/376.pdf>
- Thies JA, Barnes DK, Rabas DL, Sheaffer CC and Wilcoxson RD. 1992. Seeding Date, Carbofuran, and Resistance to Root-Lesion Nematode Affect Alfalfa Stand Establishment. *Crop Sciences* 32:786-792. DOI:10.2135/cropsci1992.0011183X003200030042x
- Thomas WK, Vida JT, Frisse LM, Mundo M and Baldwin JG. 1997. DNA sequences from formalin-fixed nematodes: Integrating molecular and morphological approaches to taxonomy. *Journal of Nematology* 29:250-254. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2619797/pdf/250.pdf>
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24:4876-82. DOI: 10.1093/nar/25.24.4876
- Vovlas N, Troccoli A, Palomares-Rius JE, De Luca F, Liébanas G, Landa BB, Subbotin SA 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://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3059.2011.02430.x/epdf>
- Vrain TC and Lalik B. 1983. Distribution and pathogenicity of the Alfalfa Stem Nematode, *Ditylenchus dipsaci*, in British Columbia. *Plant Disease* 67:300-302. [http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1983Articles/PlantDisease67n03\\_300.PDF](http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1983Articles/PlantDisease67n03_300.PDF)
- Webster JM. 1967. The significance of biological races of *Ditylenchus dipsaci* and their hybrids. *Annals of Applied Biology* 59: 77-83. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1967.tb04418.x
- Wharton DA and Barrett J. 1985. Ultrastructural changes during recovery from anabiosis in the plant parasitic nematode, *Ditylenchus*. *Tissue Cell* 17:79-96. [http://dx.doi.org/10.1016/0040-8166\(85\)90017-5](http://dx.doi.org/10.1016/0040-8166(85)90017-5)
- Wharton DA, Rolfe RN and Perry R.N. 2000. Electrophysiological activity during recovery from anhydrobiosis in fourth stage juveniles of *Ditylenchus dipsaci*. *Nematology* 2:881-886. DOI: 10.1163/156854100750112824
- Wendt KR, Vrain TC and Webster JM. 1993. Separation identification of three species of *Ditylenchus* and some host races of *D. dipsaci* by restriction fragment length polymorphism. *Journal of Nematology* 25: 555-563. Disponible en línea: <http://journals.fcla.edu/jon/article/view-File/66542/64210>
- Westerdahl B, Goodell P, and Hafez S. 2006. Alfalfa nematodes. UC IPM Pest Management Guidelines for alfalfa. Disponible en línea: <http://ipm.ucdavis.edu/PMG/r1200111.html>

Williams BD, Schrank B, Huynh C, Shownkeen R and Waterston RH. 1992. A genetic mapping system in *Caenorhabditis elegans* based on polymorphic sequence-tagged sites. *Genetics* 131: 609-624. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1205034/pdf/ge1313609.pdf>

Wood FH and Close RC. 1974. Dissemination of lucerne stem nematode in New Zealand. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture* 2:79-82. DOI:10.1080/03015521.1974.10427674