

# DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA

## Área de Diagnóstico Fitosanitario Laboratorio de Nematología

### Protocolo de Diagnóstico:

*Ditylenchus dipsaci*

(Nematodo del tallo y los bulbos)

Tecámac, Estado de México, Octubre 2018

SENASICA nos protege a todos

**SAGARPA**  
SECRETARÍA DE AGRICULTURA,  
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,  
PESCA Y ALIMENTACIÓN



**SENASICA**  
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,  
INOCUIDAD Y CALIDAD  
AGROALIMENTARIA

### **Aviso**

El presente protocolo de diagnóstico fitosanitario fue desarrollado en las instalaciones de la Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), con el objetivo de diagnosticar específicamente la presencia o ausencia de *Ditylenchus dipsaci*. La metodología descrita, tiene un sustento científico que respalda los resultados obtenidos al aplicarlo. La incorrecta implementación o variaciones en la metodología especificada en este documento de referencia pueden derivar en resultados no esperados, por lo que es responsabilidad del usuario seguir y aplicar el protocolo de forma correcta.

La presente versión podrá ser mejorada y/o actualizada quedando el registro en el historial de cambios

## I. ÍNDICE

<b>1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
2.1. INFORMACIÓN SOBRE LA PLAGA .....	1
2.2. INFORMACIÓN TAXONÓMICA .....	2
2.3. FLUJO DE TRABAJO .....	5
<b>3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN .....</b>	<b>6</b>
3.1. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE NEMATODOS .....	6
3.2. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA Y MORFOMÉTRICA .....	8
3.2.1. CONFUSIÓN CON OTRAS ESPECIES.....	9
3.3. IDENTIFICACIÓN MORFOMÉTRICA .....	9
3.3.1. PREPARACIONES TEMPORALES.....	9
3.3.2. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	10
3.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR .....	12
3.4.1. EXTRACCIÓN DE DNA DE JUVENILES, HEMBRAS Y MACHOS.....	12
3.4.2. PCR PUNTO FINAL.....	13
3.4.2.1. Ensayo con primers específicos .....	13
3.4.2.2. Ensayo con primers generales .....	14
3.4.2.2.1. Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de la región ITS .....	16
3.4.2.3. Controles para las pruebas moleculares .....	17
3.4.3. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	17
3.5. IDENTIFICACIÓN DEL PATÓGENO.....	19
3.6. VERIFICACIÓN MEDIANTE SECUENCIACIÓN .....	20
<b>4. REGISTROS .....</b>	<b>20</b>
<b>5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL.....</b>	<b>21</b>
<b>6. RECONOCIMIENTO .....</b>	<b>21</b>
<b>7. REFERENCIAS .....</b>	<b>21</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>24</b>
8.1. SÍNTOMAS.....	24
8.2. EXTRACCIÓN DE NEMATODOS POR MACERADO-TAMIZADO-CENTRIFUGADO-FLOTACIÓN .....	25
8.3. TABLA DE CARACTERES MORFOMÉTRICOS PARA EL DIAGNÓSTICO .....	26
8.3.1. Caracteres para hembras .....	26
8.3.2. Caracteres para machos.....	27

## II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de <i>D. dipsaci</i> .....	11
Figura 2. Ensayo de PCR con el par de primers específicos DitNF/rDNA2 .....	18
Figura 3. Ensayo de PCR con el par de primers generales TW81/AB28. ....	18
Figura 4. Ensayo de PCR con el par de primers generales D2A/ D3B. ....	19
Figura 5. RFLP de región ITS de poblaciones de <i>D. dipsaci</i> .....	19
Figura 6. Síntomas en vegetales inducidos por <i>D. dipsaci</i> .....	24
Figura 7. Procedimiento de extracción de nematodos. ....	25

### III. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Comparativo entre <i>D. dipsaci</i> y especies relacionadas. ....	10
Cuadro 2. Primers específicos para detección de <i>D. dipsaci</i> . ....	13
Cuadro 3. Preparación de la mezcla de reacción para los primers DitNF/rDNA2. ....	13
Cuadro 4. Programa del termociclador para el ensayo con los primers DitNF1/rDNA2. ....	14
Cuadro 5. Primers generales para detección de <i>D. dipsaci</i> . ....	14
Cuadro 6. Preparación de la mezcla de reacción para los primers TW81/AB28. ....	14
Cuadro 7. Programa del termociclador para el ensayo con los primers TW81/AB28. ....	15
Cuadro 8. Primers generales para detección de <i>D. dipsaci</i> . ....	15
Cuadro 9. Preparación de la mezcla de reacción para los primers D2A/D3B. ....	15
Cuadro 10. Programa del termociclador para el ensayo con los primers D2A/D3B. ....	16

## 1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO

Describir los procedimientos para la identificación de *Ditylenchus dipsaci* sensu stricto (*D. dipsaci* s. s.) mediante caracterización morfológica-morfométrica y técnicas moleculares. Está dirigido a técnicos especialista fitosanitarios o profesionales interesados en el diagnóstico de especies de nematodos de interés cuarentenario o económico.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Información sobre la plaga

El género *Ditylenchus* posee alrededor de 80 especies nominales; sin embargo, pocos son fitopatógenos y la mayoría tienen hábitos micófagos. El nematodo del tallo y bulbos, *D. dipsaci*, es de gran importancia fitosanitaria debido a que puede afectar a más de 500 especies vegetales, entre plantas cultivadas y silvestres (EPPO, 2017).

A través de análisis morfológicos, bioquímicos, cariológicos y moleculares se ha determinado que *D. dipsaci* consiste en un complejo de 30 razas con un rango de hospedantes limitado (IPPC, 2015). Las características morfológicas y morfométricas no son de utilidad para diferenciar las razas debido a que existen traslapes de los valores. En pruebas de hospedantes diferenciales se observaron resultados inconsistentes (Sosa-Moss et al., 1997; Yavuzaslanoglu et al., 2017). Este complejo se ha dividido en dos grupos: el primero contiene a las poblaciones diploides caracterizadas por su tamaño normal y nombradas como *D. dipsaci* s. s. en donde se ubican la mayoría de las poblaciones que afectan cultivos agrícolas. El segundo grupo contiene a las poblaciones poliploides: *D. gigas*, también conocido como nematodo “gigante” debido a su gran tamaño y afecta haba, *D. weischeri* que ataca *Cirsium arvense* y cuatro especies no descritas: *Ditylenchus* sp. D en *Pilosella* spp.; *Ditylenchus* sp. E afectando *Crepis praemorsa*; *Ditylenchus* sp. F. parasitando *Leontodon autumnalis* y *Pilosella officinarum* y *Ditylenchus* sp. G sobre *Plantago maritima* (Subbotin y Riley, 2012; Jeszke et al., 2013). Subbotin et al. (2005) observaron relaciones filogenéticas muy cercanas entre poblaciones de *D. dipsaci* s. s. (en adelante *D. dipsaci*) y las clasificaron como razas.

Los principales cultivos hospedantes de *D. dipsaci* son: papa (*Solanum tuberosum* L.), betabel (*Beta vulgaris* L.), chícharo (*Pisum sativum* L.), avena (*Avena sativa* L.), centeno (*Secale cereale* (L.) M.Bieb.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), alfalfa (*Medicago sativa* L.), cebolla (*Allium cepa* L.), ajo (*Allium sativum* L.), narciso (*Narcissus pseudonarcissus* L.), fresa (*Fragaria* spp.), maíz (*Zea mays* L.), zanahoria (*Daucus carota* L.), poro (*Allium ampeloprasum* L.), canola (*Brassica napus* L.) y girasol (*Helianthus annuus* L.) (Sthurhan y Brzeski, 1991).

Los síntomas que se observan en plantas afectadas por *D. dipsaci* son: crecimiento reducido, clorosis, deformación o engrosamiento de tallos, peciolo y flores; zonas necróticas y pudrición de bulbos y rizomas. Incluso puede infestar semillas causando decoloraciones y deformaciones del tejido en frijol, haba y alfalfa (IPPC, 2015).

En México, se ha reportado a *D. dipsaci* afectando únicamente cultivos de ajo y cebolla en los estados de Guanajuato (Pénjamo, Valle de Santiago, Apaseo el Alto, Cortazar), Aguascalientes (Rincón de Romos), Puebla (Tetela de Ocampo) y Veracruz (Perote) (SENASICA-SAGARPA, 2013) y alfalfa en Atoyac, Jalisco (Rosas-Hernández et al., 2017). La raza cebolla tiene la capacidad de infectar a cebolla, ajo, chícharo y frijol (Yavuzaslanoglu et al., 2017). Por lo anterior, las razas alfalfa y cebolla de *D. dipsaci* se encuentran presentes en México en áreas y cultivos específicos, sin embargo, las otras razas conocidas de esta especie mantienen el estatus de plaga cuarentenaria en base a lo establecido en IPPC (2011, 2015).

De acuerdo con SIAP (2018) en la República Mexicana existe una superficie sembrada de papa de 64 mil ha con un valor de producción cercano a 11.3 mil mdp. Así mismo, debido a las condiciones edafoclimáticas presentes en el país, existen superficies cultivadas de otros hospedantes de este nematodo por lo que su diseminación hacia otras áreas implica un riesgo considerable para la agricultura nacional (SENASICA-SAGARPA, 2013).

## 2.2. Información taxonómica (Hopper, 1972)

**Nombre científico:** *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936

**Sinónimos:** *Anguillula dipsaci* Kühn, 1857  
*Anguillulina dipsaci* (Kühn, 1857) Gervais & Van Beneden, 1859  
*Tylenchus dipsaci* (Kühn) Bastian, 1865  
*Anguillilina dipsaci* var. *allocotus* Steiner, 1934  
*Ditylenchus allocotus* (Steiner) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941  
*Anguillulina dipsaci* var. *communis* Steiner & Scott, 1935  
*Ditylenchus dipsaci* var. *narcissi* de Bruyn Ouboter, 1930  
*Anguillula devastatrix* Kühn, 1869  
*Tylenchus devastatrix* (Kühn) Örley, 1880  
*Anguillulina devastatrix* (Kühn) Neveu-Lmaire, 1913  
*Ditylenchus devastatrix* (Kühn) Tarjan, 1960  
*Anguillula secalis* Nitschke, 1860  
*Anguillulina secalis* (Nitschke) Goodey, 1932  
*Ditylenchus secalis* (Nitschke) Sididqi, 1986  
*Tylenchus allii* Beijerinck, 1883  
*Ditylenchus allii* (Beijerinck) Tarjan, 1960

*Tylenchus havensteinii* Kühn, 1881  
*Anguillulina havensteinii* (Kühn) Goodey, 1932  
*Ditylenchus havensteinii* (Kühn) Siddiqi, 1986  
*Tylenchus hyacinthi* Prillieux, 1881  
*Anguillulina hyacinthi* (Prillieux) Goodey, 1932  
*Ditylenchus dipsaci falcariae* Poghossian, 1967  
*Ditylenchus fragariae* Kirjanova, 1951  
*Tylenchus dipsaci* var. *tobaensis* Schneider, 1937  
*Ditylenchus dipsaci* var. *tobaensis* (Schneider) Kirjanova, 1951  
*Ditylenchus tobaensis* (Schneider) Kirjanova, 1951  
*Ditylenchus sonchophila* Kirjanova in Paramonov, 1970  
*Ditylenchus galeopsidis* Teploukhova in Paramonov, 1970

**Nombres comunes:** Nematodo del tallo y los bulbos (español)  
The stem and bulb nematode (inglés)  
Potato tuber nematode (inglés)  
Nématode des tiges (bulbes) (francés)  
Stengelälchen stockälchen (alemán)

**Posición taxonómica:**

Con base en anatomía y fisiología (Siddiqi, 2000):

**Phylum:** Nematoda

**Clase:** Secernentea

**Subclase:** Diplogasteria

**Orden:** Tylenchida

**Suborden:** Tylenchina

**Superfamilia:** Tylenchoidea

**Familia:** Anguinidae

**Género:** *Ditylenchus*

**Especie:** *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936

Con base a la filogenia de la subunidad pequeña (SSU-18S) del rDNA (De Ley et al., 2006; Margulis y Chapman, 2010):

**Dominio:** Eukarya

**Reino:** Animalia

**Phylum:** Nematoda

**Clase:** Chromadorea

**Subclase:** Chromadoria

**Orden:** Rhabditida

**Suborden:** Tylenchina

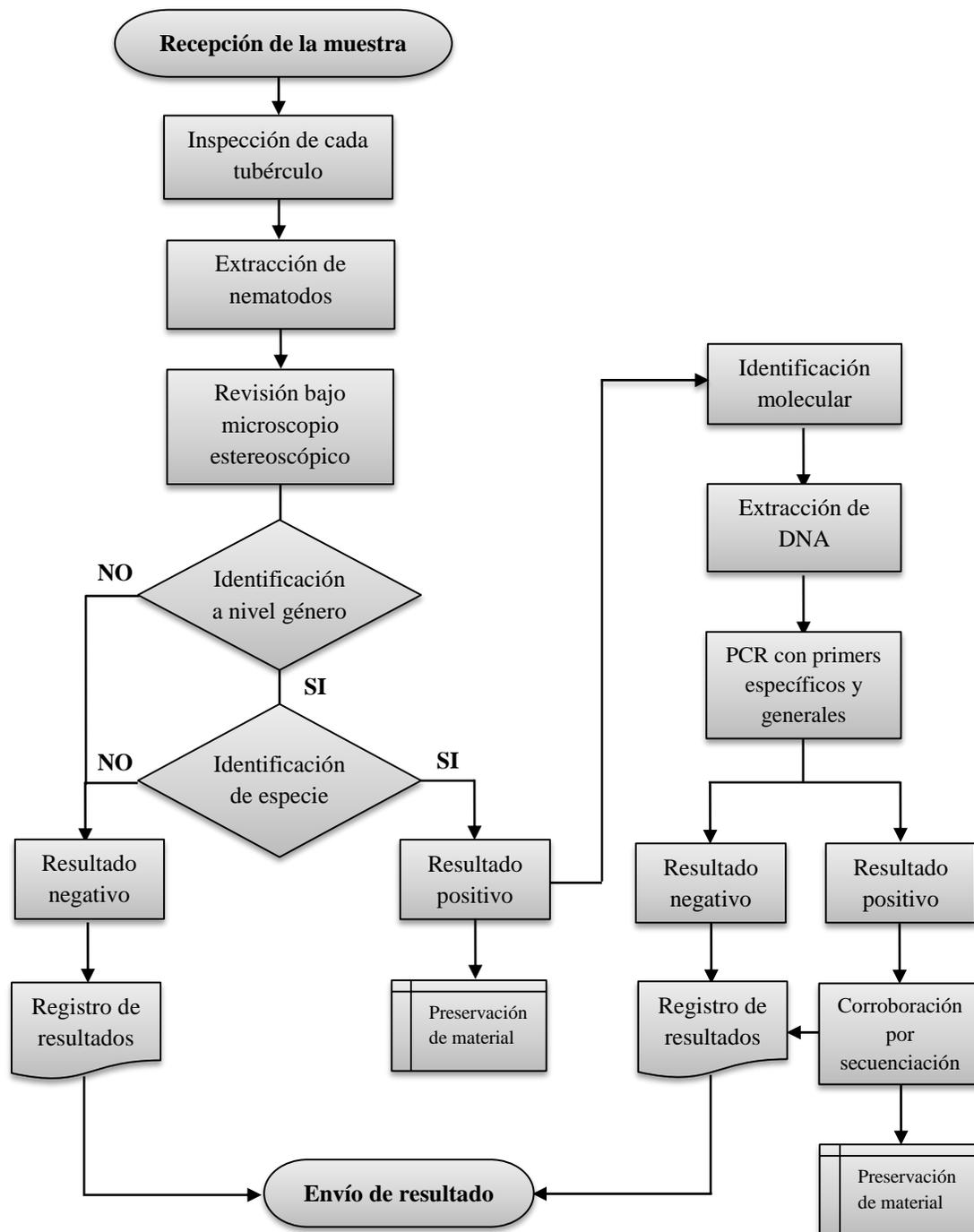
**Superfamilia:** Sphaerularioidea

**Familia:** Anguinidae

**Género:** *Ditylenchus*

**Especie:** *Ditylenchus dipsaci*

### 2.3. Flujo de trabajo



### 3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Para determinar la presencia de *D. dipsaci* es recomendable contar con material vegetal que presente los síntomas inducidos por este nematodo (Anexo 8.1). En el caso de que la muestra no cumpla con las características requeridas o se encuentre en mal estado, se registra en la bitácora y se conservan las imágenes fotográficas correspondientes para justificar el motivo por el cual no pudo ser procesado.

*D. dipsaci* vive principalmente como un endoparásito en partes aéreas de plantas (tallos, hojas, flores); sin embargo también afecta bulbos y rizomas. Puede diseminarse en semillas de alfalfa, cardo, cebolla, frijol (Figura 6b), melón y trébol. El juvenil de cuarto estadio (J4) es el estado de resistencia y sobrevive a condiciones de desecación extrema y forma aglomerados llamados “lana de nematodos”, comúnmente observable en la corona de las plantas infestadas (EPPO, 2017).

Los síntomas ocasionados por *D. dipsaci*, de acuerdo con IPPC (2016) y EPPO (2017) son los siguientes: en tubérculos, el tejido infestado presenta una apariencia necrótica o pudrición seca en forma de “V” hacia el interior del tubérculo (Figura 6a); en bulbos, las escamas se tornan oscuras y al realizar cortes transversales, se observan círculos concéntricos oscuros, consistencia blanda del tejido y en ajo, se presentan áreas necróticas y deshidratación de tejido (Figuras 6c-e); el daño inicial en zanahoria se observa como múltiples brotes, hojas y decoloraciones en la zona superior de la raíz principal (unión hojas, tallo-raíz). La zona más afectada de la planta por este nematodo es de 2-4 cm sobre de la superficie del suelo. En infestaciones severas ocasiona muerte de hojas y pudrición de la zona superior de raíz; en alfalfa, las plantas presentan entrenudos cortos, amarillamiento y achaparramiento (Figura 6f); en betabel los síntomas son similares a los descritos en zanahoria (Figura 6g).

De acuerdo a lo establecido en el “Plan de trabajo para la importación de semilla de papa de Canadá a México”, firmado en octubre de 2008 entre ambos países, para la detección de nematodos fitopatógenos deben analizarse 400 tubérculos. Asimismo, para el caso de la importación de papa para consumo en la zona fronteriza de México, con base a lo establecido en el “Módulo de consulta de requisitos fitosanitarios para la importación de mercancía de origen vegetal”, la muestra a analizar para nematodos consiste de 200 tubérculos.

#### 3.1. Procedimiento de extracción de nematodos

Los especímenes (J2, J3, J4 y adultos) deben ser extraídos del material vegetal mediante el método de macerado-tamizado-centrifugación-flotación. Iniciar con la inspección de los tubérculos de papa buscando la sintomatología descrita anteriormente y en caso de que se presenten, procesar los tubérculos afectados por separado. Asimismo, realizar el pelado y procesamiento de la totalidad de los tubérculos (Carta et al., 2005).

El método de tamizado para la extracción de *D. dipsaci* incluye algunas modificaciones a la metodología propuesta por van Bezooijne (2006) y permite recuperar un alto porcentaje de ejemplares. Se fundamenta en la separación de los nematodos al pasar el material macerado a través de una serie de tamices de diferentes tamaños de abertura de malla (850, 250, 150, 45 y 32  $\mu\text{m}$ ) posteriormente, dos pasos de centrifugación, primero con caolín y finalmente, una separación por densidad utilizando solución azucarada (Hopper et al., 2005). El procedimiento se describe a continuación:

- 1) Colocar la muestra (producto del pelado) en el vaso de la licuadora (Figura 7a) y adicionar agua hasta cubrirla.
- 2) Macerar tres veces por lapsos de cinco segundos, con velocidad moderada, para asegurar una extracción eficiente.
- 3) Verter el producto macerado a un recipiente de plástico de 10 L, agregar agua a  $\frac{3}{4}$  de capacidad y agitar hasta obtener una suspensión.
- 4) Colocar el tamiz de mayor abertura (850  $\mu\text{m}$ ) sobre otro recipiente de plástico de 10 L vacío y verter la suspensión por el tamiz.
- 5) Repetir el paso 4.
- 6) Descartar material retenido en tamiz de 850  $\mu\text{m}$ .
- 7) Repetir los pasos 4 y 5 con cada uno de los siguientes tamices. Lavar, con agua a presión, el material retenido en el tamiz de 250  $\mu\text{m}$ .
- 8) Decantar lo retenido en el tamiz de 150  $\mu\text{m}$  sobre el de 45  $\mu\text{m}$  y este a su vez sobre el de 32  $\mu\text{m}$ .
- 9) Transferir el producto colectado en el tamiz de 32  $\mu\text{m}$  a tubos de centrífuga de 50 mL de capacidad (max. 30 mL por tubo).
- 10) Agregar 1 g de caolín por cada 30 mL en el tubo y mezclar perfectamente (Figuras 7d y e).
- 11) Centrifugar por 5 min a 700 g.
- 12) Eliminar cuidadosamente el sobrenadante de cada tubo y disolver la pastilla en 30 ml de solución azucarada con una gravedad específica de 1.22 (473 g de azúcar estándar en 500

mL de agua) (Figura 7g). Este paso debe hacerse lo más rápido posible debido a que los nematodos pueden plasmolizarse.

- 13) Centrifugar por 4 min a 700 g (Figura 7f).
- 14) Verter el sobrenadante en un tamiz de 32  $\mu\text{m}$  y adicionar agua para enjuagar la solución azucarada de los especímenes (Figura 7h).
- 15) Concentrar los nematodos en un vaso de precipitado procurando que el volumen de agua no exceda los 20 mL.
- 16) Vaciar esta suspensión en una caja Petri.
- 17) Observar los nematodos extraídos bajo el microscopio estereoscópico.

### 3.2. Descripción morfológica y morfométrica

Las características de *D. dipsaci* de acuerdo con Hopper (1972), Sidiqqi (2005), Subbotin y Riley (2012) son: nematodos de gran movimiento, muy alargados y delgados tanto hembras como machos (Figuras 1a y 1b). El cuerpo está marcado por estrías transversales de 1  $\mu\text{m}$  de separación con una región cefálica bien desarrollada, ligeramente aplanada (Figura 1c). Las aberturas anfidiales se encuentran en el centro de los labios laterales los cuales aparentan ser pequeños puntos refractantes y que pueden ser vistos únicamente en vista frontal; estilete desarrollado con nódulos basales distintivos; deiridio generalmente visible cerca de la base del cuello; hemizonidio adyacente al poro excretor; poro excretor opuesto al bulbo basal y este último, separado o ligeramente sobrepuesto al intestino; ovario extendiéndose hacia la región anterior con ovocitos en una hilera, ocasionalmente en dos, en ocasiones hasta el bulbo basal; el saco postuterino se extiende hasta la mitad de la distancia vulva-ano (Figura 1d); cola cónica con terminación en punta (Figuras 1f y 1g); el campo lateral con 4 incisuras (Figura 1e); el fasmidio raramente visible y únicamente en posición dorsal o ventral en especímenes recién extraídos.

La morfometría de *D. dipsaci* puede consultarse en diversas referencias como Hooper (1972), Sturhan y Brzeski (1991) y Subbotin y Riley (2012); sin embargo, se recomienda utilizar la reportada en esta última debido a que es la más actualizada y se describe a continuación:

**Hembras:**  $L = 1.1-1.7 \text{ mm}$ ;  $a = 30.2-64$ ;  $b = 6.0-8.8$ ;  $c = 13.5-19.5$ ;  $V = 79-86$ ; *estilete* = 9-12  $\mu\text{m}$ .

**Machos:**  $L = 1.0-1.5 \text{ mm}$ ;  $a = 35.5$ ;  $b = 5.5-7.8$ ,  $c = 12-17.3$ ; *estilete* = 9-12  $\mu\text{m}$ ; *espículas* = 20-28  $\mu\text{m}$ ; *gubernáculo* = 8-11  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.1. Confusión con otras especies

Existen 80 especies del género *Ditylenchus* en las cuales los índices De Man o caracteres pueden traslaparse y por ello en muchos casos es difícil realizar la diferenciación entre las mismas. *D. dipsaci* puede confundirse con *D. destructor*, *D. convallariae*, *D. myceliophagus* y *D. gigas*. Por ello, para evitar falsos positivos o negativos es necesario realizar análisis morfológicos y morfométricos detallados. En el Cuadro 1 se muestran las características que pueden ser utilizadas para separar estas especies.

### 3.3. Identificación morfométrica

Una vez detectados hembras y/o machos de *Ditylenchus* spp. se deben medir y calcular los caracteres morfométricos descritos en el Anexo 8.3 considerando, al menos, 10 especímenes para obtener una fuente de variación aceptable. Por ello, es necesario elaborar preparaciones temporales y permanentes.

#### 3.3.1. Preparaciones temporales

- 1) Transferir los nematodos a una gota de agua destilada estéril sobre un portaobjetos, preferentemente, cóncavo.
- 2) Relajar los nematodos con calor sin matarlos, con la ayuda de un mechero de alcohol, hasta que no presenten movimiento.
- 3) Colocar los nematodos sobre medio de montaje agua-agar 1% en un portaobjetos. Es recomendable colocar los especímenes en una posición sinuosa para facilitar la observación clara de las características de diagnóstico distintivas.
- 4) Colocar un cubreobjetos sobre el medio de montaje y evitar la formación de burbujas. En caso de que se presenten, colocar la preparación dentro de una cámara húmeda por 30 minutos e identificar las preparaciones con los datos correspondientes de la muestra.
- 5) Observar la morfología en el microscopio compuesto con los objetivos 10 a 100X, obtener las fotografías y la morfometría indicada en el Anexo 8.3.

#### 3.3.2. Preparaciones permanentes

Realizar la muerte-fijación de los nematodos con formol 4 % o trietanolamina a 70 °C y posteriormente la deshidratación gradual con glicerina de acuerdo con Seinhorst (1959, 1962). Finalmente, elaborar las preparaciones permanentes utilizando glicerina deshidratada como medio de montaje y parafina grado histopatología como sellador. Considerar 4-6 ejemplares (machos, hembras y juveniles) por preparación.

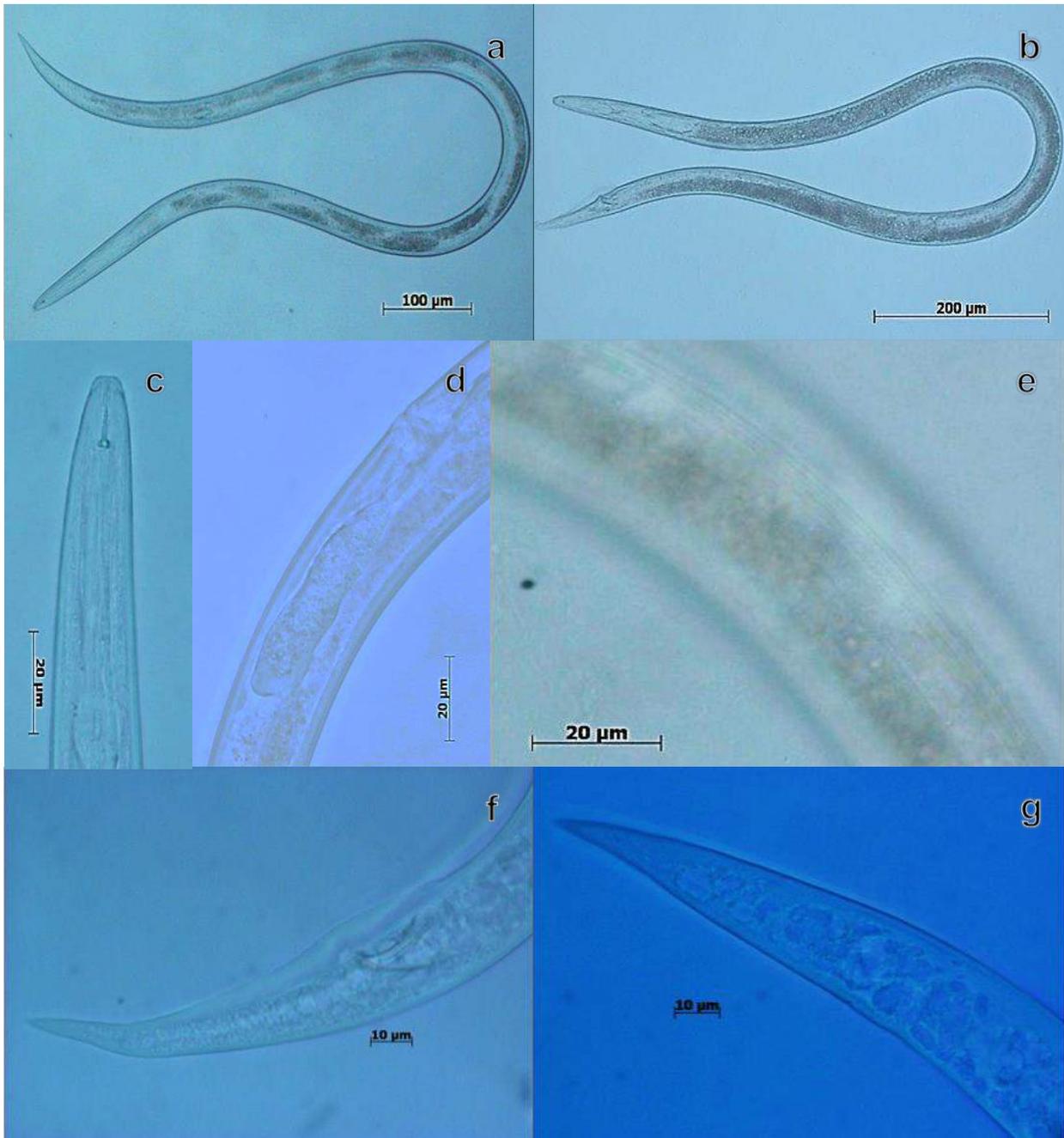
**Nota:** las laminillas deben etiquetarse con los datos correspondientes de la muestra y conservarse como evidencia, junto con los valores morfométricos y las micrografías obtenidas.

**Cuadro 1.** Comparativo entre *D. dipsaci* y especies relacionadas (Hooper, 1972; Sturhan y Brzeski, 1991; Vovlas *et al.*, 2011; IPPC. 2016; EPPO, 2017).

Característica	<i>D. destructor</i>	<i>D. dipsaci</i>	<i>D. convallariae</i>	<i>D. myceliophagus</i>	<i>D. gigas</i>
Longitud de hembras (mm)	1.0 (0.8–1.4)	1.1 (0.9–1.3)	1.1 (0.9–1.3)	0.9 (0.6–1.0)	1.6–2.29
Estilete (µm)	10–12	11–13	11–13	7–10	11.5–13.0
Bulbo posterior	Sobrepuesto dorsalmente	No sobrepuesto	No sobrepuesto	Sobrepuesto dorsalmente	No sobrepuesto
# líneas laterales	6	4	6	6	4
Posición de vulva (%)	80 (78–83)	82 (79–82)	77 (74–79)	82.5 (74–90)	82(79–82)
Saco postuterino	2/3 - 3/4 distancia vulva-año	1/2 distancia vulva-año	1/4-1/2 distancia vulva-año	2 – 2 1/4 distancia vulva-año	81-150 µm
Longitud vulva-año	1 3/4–2 1/3 la longitud de la cola	1 3/4–2 1/4 la longitud de la cola	2–2 1/4 La longitud de la cola	2–2 1/4 la longitud de la cola	1 3/4–2 1/4 la longitud de la cola
Forma de la cola	Cónica	Cónica	Cónica	Ampliamente cónica	Cónica
Punta de la cola	Punta finamente redondeada	Punta aguda	Punta aguda	Punta finamente redondeada	Punta aguda
Espícula (µm)	9–12	10–12	8–11	9	23.5–28
Cono/Estilete	50 % aprox.	50 % aprox.	< 50 %	< 50 %	50 % aprox.

### 3.3.3. Interpretación de resultados

En caso de que la comparación morfológica y morfométrica se encuentren dentro de los rangos descritos en la literatura de referencia y el resultado corresponda como positivo a *D. dipsaci*, o si los ejemplares corresponden a *Ditylenchus* pero presentan características morfométricas diferentes a las descritas para *D. dipsaci*, es necesario realizar el diagnóstico molecular como se describe en el apartado 3.4. para la confirmación del resultado. Si no se detectan nematodos correspondientes al género *Ditylenchus* se debe reportar el diagnóstico como negativo.



**Figura 1. Morfología de *D. dipsaci*.** Hembra: a). Cuerpo completo, c). Región anterior, d). Saco postuterino, e). Campo lateral con cuatro incisuras, g). Cola. Macho: b). Cuerpo completo, f). Cola y espículas.

### 3.4. Identificación molecular

El análisis molecular de *D. dipsaci* es un procedimiento necesario para confirmar su identidad, complementado su diagnóstico y aportando mayor precisión y confiabilidad del resultado. Por lo anterior, es necesaria la amplificación de dos marcadores moleculares con tres juegos de primers para resolver posibles controversias.

#### 3.4.1. Extracción de DNA de juveniles, hembras y machos

La extracción del DNA puede llevarse a cabo utilizando especímenes individuales de cualquier estadio biológico o varios especímenes a la vez, sin embargo, es necesario asegurarse de que los nematodos correspondan a *D. dipsaci* mediante caracterización morfométrica. Se sugiere emplear el método de extracción de DNA (lisis celular) propuesto por Williams et al. (1992) con algunas modificaciones:

- 1) Después de realizar el análisis morfométrico, recuperar los nematodos del medio de montaje agua-agar.
- 2) Colocar un espécimen en 13  $\mu\text{L}$  de buffer de extracción (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM KCl, 0.45 % Tween 20; 0.05 % gelatina y 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de proteinasa K grado RNA) sobre un cubreobjetos limpio.
- 3) Macerar el nematodo (con una punta de micropipeta o aguja de insulina) bajo el microscopio estereoscópico.
- 4) Mezclar por pipeteo 4-6 veces y transferir la solución a un tubo de PCR de 200  $\mu\text{L}$  y mantenerlo en hielo.
- 5) Congelar a  $-40\text{ }^\circ\text{C}$  por 30 min.
- 6) Pasado el tiempo de congelación, incubar inmediatamente los tubos a  $65\text{ }^\circ\text{C}$  por una hora y mezclar con vortex, al menos, una vez durante este periodo.
- 7) Incubar a  $95\text{ }^\circ\text{C}$  por 15 min (para inactivar a la proteinasa K).
- 8) Conservar a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ .
- 9) Dar un golpe de minicentrífuga para concentrar el producto.

### 3.4.2. PCR punto final

#### 3.4.2.1. Ensayo con primers específicos

Para la detección específica de *D. dipsaci*, mediante la técnica de PCR punto final, se utilizan los primers DitNF1/rDNA2 que amplifican la región parcial del espacio transcrito interno 1 (ITS1), gen 5.8S y espacio transcrito interno 2 (ITS2) del rDNA (Subbotin et al., 2005). Estos primers permiten la detección de especímenes de todas las poblaciones de *D. dipsaci* s. s. y se obtiene un producto de 263 pb.

**Cuadro 2.** Primers específicos para detección de *D. dipsaci*.

Tipo	Nombre del primer	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Sentido	DitNF1	-TTATGACAAATTCATGGCGG-	263
Antisentido	rDNA2	-TTTCACTCGCCGTTACTAAGG-	

Preparar la reacción de PCR punto final para el par de primers DitNF/rDNA2 de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 3.

**Cuadro 3.** Preparación de la mezcla de reacción para los primers DitNF/rDNA2.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer PCR	10 X	1 X	2.5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2.0 mM	1.0
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5
Primer DitNF	10 µM	1 µM	2.5
Primer rDNA2	10 µM	1 µM	2.5
Taq DNA Pol	5 U/µL	1.5 U	0.3
DNA	-----	-----	5.0
Agua grado biología molecular	-----	-----	10.7
		<b>Volumen final (µL)</b>	25

Programar el termociclador de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 4.

**Cuadro 4.** Programa del termociclador para el ensayo con los primers DitNF1/rDNA2.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	4 minutos	1
Desnaturalización	94°C	15 segundos	35
Alineamiento	57°C	30 segundos	
Extensión	72°C Rampeo 0.5°C/seg	30 segundos	
Extensión final	72°C	10 minutos	1
Conservación	4°C	∞	

Los productos se deben correr durante 80 minutos a 90 V en un gel de agarosa al 1.4 % en Buffer TAE 1X (100 mL) teñido con 7µl de GelRed™ Biotum u otro medio aceptable que permita la interpretación de los resultados.

### 3.4.2.2. Ensayo con primers generales

Con el uso de los primers TW81 y AB28 diseñados por Joyce et al. (1994) y Howlett et al. (1992) es posible la amplificación de las regiones del ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA y se obtiene un fragmento de 750 pb.

**Cuadro 5.** Primers generales para detección de *D. dipsaci*.

Tipo	Nombre del primer	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Sentido	<b>TW81</b>	-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-	750
Antisentido	<b>AB28</b>	-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-	

Preparar la reacción de PCR punto final para el par de primers TW81/AB28 de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 6.

**Cuadro 6.** Preparación de la mezcla de reacción para los primers TW81/AB28.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer PCR	10 X	1 X	2.5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	3.0 mM	1.5
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5
Primer AB28	10 µM	0.4 µM	1.0
Primer TW81	10 µM	0.4 µM	1.0
Taq DNA Pol	5 U/µL	2.5 U	0.5
DNA	-----	-----	5.0
Agua grado biología molecular	-----	-----	13
		<b>Volumen final (µL)</b>	25

Programar el termociclador de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 7.

**Cuadro 7.** Programa del termociclador para el ensayo con los primers TW81/AB28.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 minutos	1
Desnaturalización	95°C	45 segundos	34
Alineamiento	57°C	30 segundos	
Extensión	72°C Rampeo 0.5°C/seg	90 segundos	
Extensión final	72°C	5 minutos	1
Conservación	4°C	∞	

Los productos se deben correr durante 80 minutos a 90 V en un gel de agarosa al 1.4% en Buffer TAE 1X (100 ml) teñido con 7µl de GelRed™ Biotum, u otro medio aceptable que permita la interpretación de los resultados.

Con la amplificación de los segmentos de expansión D2 y D3 del gen 28S del rDNA de *D. dipsaci* utilizando los primers generales D2A y D3B (Courtright, 2000) se obtiene un producto de 850 pb.

**Cuadro 8.** Primers generales para detección de *D. dipsaci*.

Tipo	Nombre del primer	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Sentido	<b>D2A</b>	-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-	850
Antisentido	<b>D3B</b>	-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-	

Preparar la reacción de PCR punto final para el par de primers D2A/D3B de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 6.

**Cuadro 9.** Preparación de la mezcla de reacción para los primers D2A/D3B.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer PCR	10 X	1 X	2.5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	3.0 mM	1.5
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5
Primer D2A	10 µM	0.4 µM	1.0
Primer D3B	10 µM	0.4 µM	1.0
Taq DNA Pol	5 U/µL	2.5 U	0.5
DNA	-----	-----	5.0
Agua grado biología molecular	-----	-----	13
		<b>Volumen final (µL)</b>	25

Programar el termociclador de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 7.

**Cuadro 10.** Programa del termociclador para el ensayo con los primers D2A/D3B.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 minutos	1
Desnaturalización	95°C	45 segundos	34
Alineamiento	55°C	45 segundos	
Extensión	72°C Rampeo 0.5°C/seg	1 minuto	
Extensión final	72°C	5 minutos	1
Conservación	4°C	∞	

Los productos se deben correr durante 80 minutos a 90 V en un gel de agarosa al 1.4% en Buffer TAE 1X (100 ml) teñido con 7µl de GelRed™ Biotum, u otro medio aceptable que permita la interpretación de los resultados.

#### 3.4.2.2.1. Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de la región ITS

Al fragmento obtenido con los primers TW81/AB28 de la región ITS, se realiza la digestión con las enzimas de restricción *HinfI* y *RsaI* (*Invitrogen*<sup>TM</sup>) como a continuación se describe:

- 1) Etiquetar los tubos de microcentrífuga de 200 µL con los datos de la muestra y de la enzima de restricción correspondiente.
- 2) Descongelar los buffers y la enzima a utilizar.
- 3) Considerar un 20 µL como volumen final en la siguiente proporción: 7 µL de agua destilada estéril libre de DNAsas y RNAsas, 2 µL del buffer de la enzima (10X), 1 µL de la enzima (10 U/µL), 10 µL del producto de PCR.
- 4) Incubar los tubos a 37 °C en un termociclador por 2.5 horas.
- 5) Correr los productos digeridos mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa ultrapura-1000 al 3 % y considerar dos controles positivos: producto de PCR no digerido y control positivo digerido).

El perfil de restricción de la población extraída de ajo de *D. dipsaci* con las enzimas *HinfI* y *RsaI* es de tres fragmentos para ambos casos: 416, 300, 210 pb y 334, 290 y 143 pb,

respectivamente. Cuando la población es de alfalfa, con *HinfI* se observa el mismo patrón de restricción; sin embargo, con *RsaI* se obtienen 4 fragmentos: 334, 290, 210, 143 pb (Figura. 5).

### 3.4.2.3. Controles para las pruebas moleculares

En todos los ensayos de PCR punto final descritos en este protocolo es necesario incluir, por duplicado, los siguientes controles:

**Control negativo:** descarta falsos positivos y contaminación de la reacción. El volumen que ocuparía el DNA se reemplaza por agua grado biología molecular.

**Control positivo:** provee un patrón de referencia con el cual comparar los resultados positivos en las muestras. Utilizar DNA plasmídico de *D. dipsaci* que será proporcionado por el CNRF, previa solicitud de los laboratorios o personas interesadas.

En el caso del análisis RFLP es necesario incluir:

**Control positivo en la digestión:** permite tener un patrón de referencia para verificar el proceso de digestión y comparar las bandas. Digerir el control positivo amplificado.

**Control positivo en la electroforesis de la digestión:** ofrece una referencia del tamaño y número de fragmentos digeridos. Se incluye la digestión del producto de PCR del control positivo con los primers TW81/AB28.

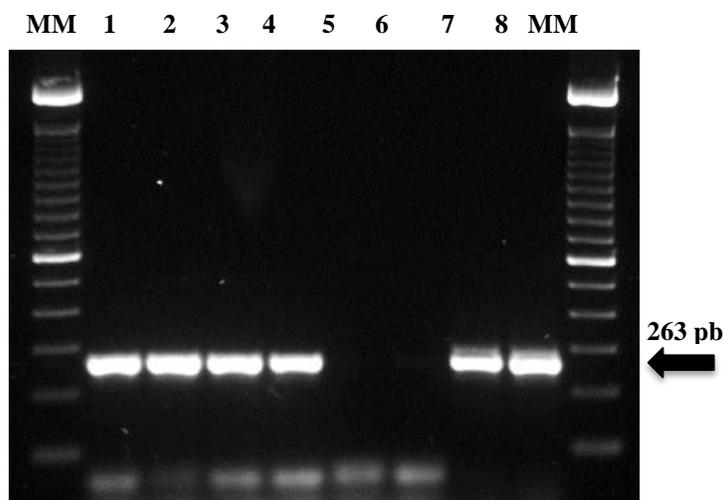
**Control positivo en la electroforesis de la digestión:** permite la comparación del fragmento obtenido y la eficiencia de la enzima de restricción sobre los productos de PCR.

### 3.4.3. Interpretación de resultados para los ensayos de PCR punto final

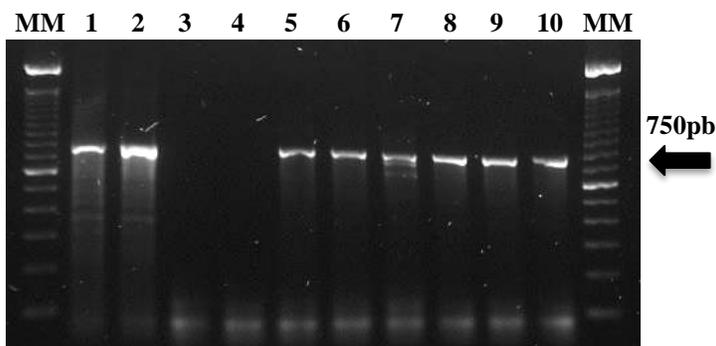
Los resultados son válidos solamente bajo los siguientes criterios:

- Los controles negativos no deben generar bandas en ningún ensayo de PCR.
- Los controles positivos para el ensayo de PCR con el par de primers DitNF/rDNA2 deben de generar una banda de 263 pb (Figura 2).
- Los controles positivos para el ensayo de PCR con el par de primers TW81/AB28 deben generar una banda de 750 pb (Figura 3).
- Los controles positivos para el ensayo de PCR con el par de primers D2A/D3B deben generar una banda de 850 pb (Figura 4).
- Se considerará como resultado positivo aquellas muestras que amplifiquen el fragmento de 263, 750, 850 pb con los primers DitNF/rDNA2, TW81/AB28 y D2A/D3B, respectivamente, así como los perfiles de digestión descritos en el apartado 3.4.3.2.1.

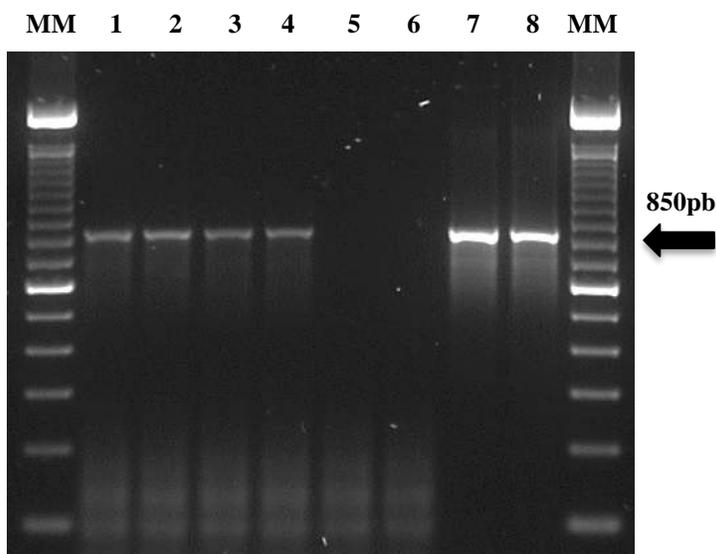
- El resultado será negativo si no existe amplificación del fragmento de 263 pb con los primers DitNF/rDNA2.



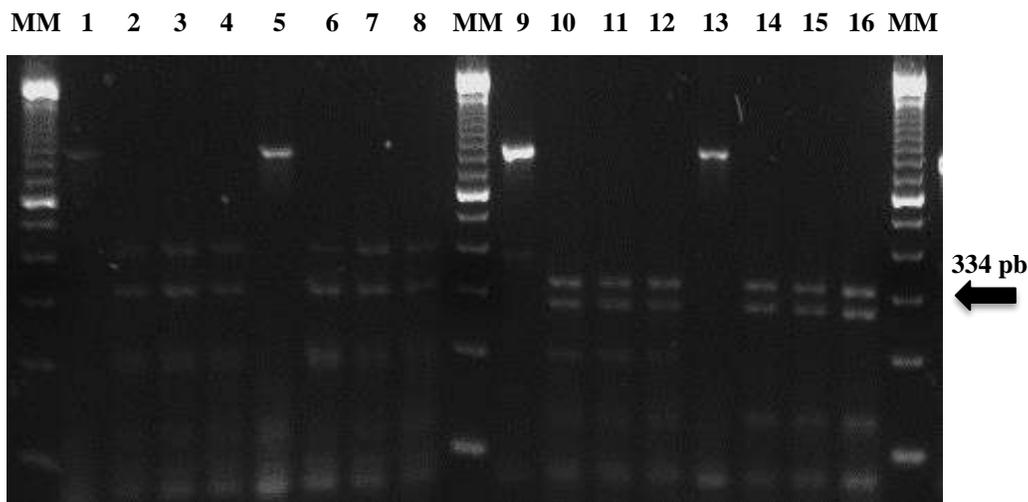
**Figura 2. Ensayo de PCR con el par de primers específicos DitNF/rDNA2:** MM: Marcador molecular 100 pb (Invitrogen); 1-2: DNA de *D. dipsaci* de ajo; 3-4: DNA de *D. dipsaci* de alfalfa; 5 y 6: Control negativo; 7 y 8: Control positivo (DNA plasmídico *D. dipsaci*).



**Figura 3. Ensayo de PCR con el par de primers generales TW81/AB28:** MM: Marcador molecular 100 pb (Invitrogen); 1 y 2: Control positivo (DNA plasmídico *D. dipsaci*); 3 y 4: Control negativo; 5-10: DNA de *D. dipsaci*.



**Figura 4. Ensayo de PCR con el par de primers generales D2A/ D3B:** MM: Marcador molecular 100 pb (Invitrogen); 1-4: DNA de *D. dipsaci*; 5: Control negativo; 6 y 6: Control negativo; 7 y 8: Control positivo (DNA plasmídico *D. dipsaci*).



**Figura 5. RFLP de región ITS de poblaciones de *D. dipsaci*:** MM: Marcador molecular 100 pb (Invitrogen); 1, 5, 9, 13: PCR sin digerir; 2-4 (alfalfa), 6-8 (ajo): *Hinf*; 10-12 (alfalfa), 14-16 (ajo): *RsaI*.

### 3.5. Identificación del patógeno

Un reporte positivo a *D. dipsaci*, dependiendo del origen de la muestra analizada, debe contener la información de las pruebas siguientes:

*Muestra de importación:*

- Caracterización morfológica-morfométrica

- Amplificación positiva de PCR punto final con los primers DitNF/rDNA2, TW81/AB28 y D2A/D3B.
- El análisis RLFP de la región ITS obtenida con los primers TW81/AB28.

*Muestra nacional:*

- Caracterización morfológica-morfométrica
- Amplificación positiva de PCR punto final con los primers DitNF/rDNA2.
- El análisis RLFP de la región ITS obtenida con los primers TW81/AB28.
- Los casos en los que se debe de verificar por secuenciación son:
  - Detecciones en zonas reconocidas como libres del patógeno.
  - Primeras detecciones en nuevos hospedantes.
  - Cuando se necesite un sustento fitosanitario de mayor relevancia para la movilidad de tejido vegetal.

### 3.6. Verificación mediante secuenciación

Se recomienda secuenciar los fragmentos amplificados de la región ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA y de los segmentos de expansión D2 y D3 del gen 28S. El análisis molecular de nematodos fitopatógenos con, al menos dos, marcadores provee de un diagnóstico molecular robusto (Sobbotin *et al.*, 2005; Vovlas *et al.*, 2011).

- 1) Enviar los productos de PCR a secuenciar, atendiendo las especificaciones para el envío de muestras de la institución a la que se solicita el servicio.
- 2) Obtenida la secuencia, ingresar a la herramienta de alineamiento Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).
- 3) Insertar la secuencia de interés y realizar el alineamiento con los parámetros predeterminados.
- 4) Revisar cuidadosamente las especies que aparecen en la parte superior de la tabla, el porcentaje de cobertura e identidad (deberán tender hacia el 100%), el valor de E (deberá tender a cero) (Benson *et al.*, 2013). Verificar quien depositó la secuencia debido a existen muchas que han sido incorrectamente identificadas, por lo que en ocasiones el resultado obtenido, aún con 100% de cobertura e identidad, no resulta totalmente concluyente.

## 4. REGISTROS

En caso de obtener un resultado positivo a *D. dipsaci* se deben conservar:

- Los datos de rastreabilidad de la muestra, registros y las evidencias físicas y digitales sobre el diagnóstico de este nematodo.
- Las preparaciones permanentes con especímenes debidamente etiquetadas.
- Conservar el DNA extraído a -40 °C.
- Resguardar el material vegetal positivo, que no fue utilizado en su empaque original, bajo refrigeración a 4 °C, correctamente etiquetado, durante 3 meses posteriores al diagnóstico.

En caso de obtener un resultado negativo, inactivar y desechar el material vegetal.

## 5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL

**Correo:** lab.nematologia@senasica.gob.mx

**Teléfono:** 01 (52) 55 5905 1000, **Ext.** 51420 y 51429.

## 6. RECONOCIMIENTO

El presente documento es la modificación al protocolo escrito por el Dr. Ángel Ramírez Suárez; fue revisado, actualizado y complementado por el Grupo DiaFi (Leonel Rosas Hernández), el Laboratorio de Nematología (Japhet Torres López); y editado por el Grupo DiaFi (Ariana Guadalupe Robles Zárate).

## 7. REFERENCIAS

- Benson, A. D., Mark, C. K. C., Karsch-Mizrachi I., Lipman, J. D., Ostell, J., Sayers, W. E. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41, 36-42.
- Carta, L. K., Handoo, Z. A., Powers, T. O., Miller, S. A. Pérez-Zubiri, R., and Ramírez-Suárez, A. (2005). Guidelines for isolation and identification of regulated nematodes of potato (*Solanum tuberosum* L.) in North America. *Rev. Mex. Fitopatol*, 23 (2), 211-222.
- Courtright, E. M., Wall, D. H., Virginia, R. A. Frisse, L. M., Vida, J. T. and Thomas, W. K. (2000). Nuclear and mitochondrial DNA sequence diversity in the Antarctic nematode *Scottinema lindsayae*. *Journal of nematology*, 32 (2), 143-153.
- De Ley, P., Decraemer, W. and Eyuaem-Abebe. (2006). Introduction: Summary of present knowledge and research addressing the ecology and taxonomy of freshwater nematodes. In: Eyuaem-Abebe, Andrásy, I. and W. Traunspurger (Eds.), *Freshwater nematodes ecology and taxonomy*. (pp. 3-30). Wallingford, UK: CABI Publishing.
- EPPO. 2017. PM 7/87 (2) *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus dipsaci*. EPPO Bulletin 47 (3): 401–419.
- Hooper, D. J., Hallman, J. and Subottin, S. 2005. Methods for extraction, processing and detection of plant and soil nematodes. In: Luc, M., R. A. Sikora and Bridge, J. (eds).

- Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. 2<sup>nd</sup> edition CAB International. Eigham, UK. pp: 53-86.
- Hooper, D.J. 1972. *Ditylenchus dipsaci*. CIH Descriptions of Plant-parasitic Nematodes. Set 1, No. 14. CAB International, Wallingford, UK.
- IPPC. 2011. International Standards for Phytosanitary Measures (ISPM) 8 Determination of pest status in an area. International Plant Protection Convention (IPPC). En línea: <https://www.ippc.int/en/core-activities/standards-setting/ispms/#612> Fecha de consulta: 17 de abril de 2018.
- IPPC. 2015. International Standards for Phytosanitary Measures (ISPM) 5 Glossary of Phytosanitary Terms. International Plant Protection Convention (IPPC). En línea: <https://www.ippc.int/en/core-activities/standards-setting/ispms/#612> Fecha de consulta: 15 de abril de 2018.
- IPPC. 2016. ISPM27: Diagnostics protocols for regulated pests. DP 8: *Ditylenchus dipsaci* and *Ditylenchus destructor*. International Plant Protection Convention (IPPC). 32 p.
- Jeszke, A., Budziszewska, M., Dobosz, R., Stachowiak, A., Protasewicz, D., Wieczorek, P. and Obrepalska-Stepłowska, A. 2013. A comparative and phylogenetic study of the *Ditylenchus dipsaci*, *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus gigas* populations occurring in Poland. J. Phytopathol 162: 61-67.
- Margullis, L. and Chapman, J. (2009). *Kingdoms and domains. An illustrated guide to the phyla of life on earth*. London, UK. Academic Press.
- NAPPO. (2011). Regional Standard for Phytosanitary Measures (RSPM). RSPM 3, Movement of Potatoes into a NAPPO Member Country. 51 p.
- Courtright, E. M., Wall, D. H., Virginia, R. A. Frisse, L. M., Vida, J. T. and Thomas, W. K. (2000). Nuclear and mitochondrial DNA sequence diversity in the Antarctic nematode *Scottinema lindsayae*. *Journal of nematology*, 32 (2), 143-153.
- Seinhorst, J. W. (1959). A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica*, 4, 67-69.
- Seinhorst, J. W. (1962). On the killing, fixation and transferring to glycerin of nematodes. *Nematologica*, 8, 29-32.
- Qiao, Y., Yu, Q., Badiss, A., Zaidi, M. A., Ponomareva, E., Hu, Y. and Ye, W. 2016. Paraphyletic genus *Ditylenchus* Filipjev (Nematoda, Tylenchida) corresponding to the *D. triformis* group and the *D. dipsaci*-group scheme. *ZooKeys* 568: 1-12.
- Rosas-Hernández, L., Ramírez-Suárez, A., Alcasio-Rangel, S., López-Buenfil, J. A., Medina-Gómez, E. 2017. Detección, identificación e inferencia filogenética del nematodo del tallo *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn), Filipjev (Nematoda: Anguinidae) afectando alfalfa *Medicago sativa* L. en Jalisco, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 377-396.
- SENASICA-SAGARPA. 2013. Nematodo del tallo y de los bulbos *Ditylenchus dipsaci*. Dirección General de Sanidad Vegetal-Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México, D.F. Ficha Técnica No 18. 24 p.

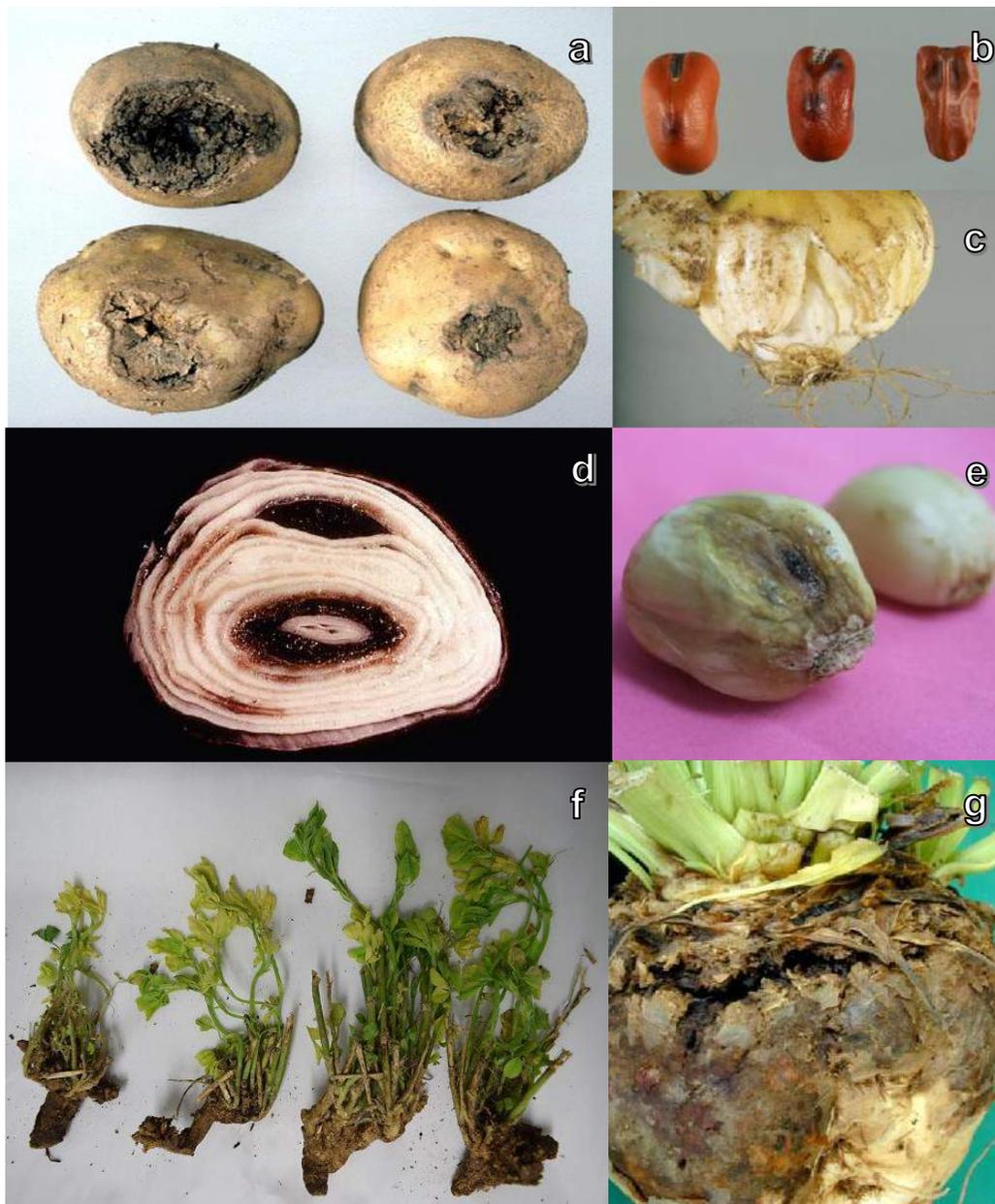
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2018. Atlas agroalimentario 2012-2018. SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). México. 215p.
- Siddiqi, M. R. (2000). *Tylenchida: Parasites of plants and insects*. 2nd edition. London, UK. CABI Publishing.
- Sturhan, D. and Brzeski, M. W. (1991). Stem and bulb nematodes, *Ditylenchus* spp. In: W. R. Nickle (Ed.), *Manual of agricultural nematology*. (pp. 423–464). New York, USA: Marcel Dekker, Inc.
- Subbotin, S. A and Riley, I. T. (2012). Stem and gall nematodes. In: Manzanilla-López, R. H. and N. Marbán-Mendoza, (Eds). *Practical Plant Nematology*, BBA, México. pp: 521-577.
- Yavuzaslanoglu, E., Sonmezoglu, O. A., Gene, N., Akar, Z. and Terzi, B. (2017). Molecular characterization of *Ditylenchus dipsaci* on onion in Turkey. *Eur J. Plant Pathol*. DOI: doi.org/10.1007/s10658-017-1366-7
- Vovlas, N., Troccoli, A., Palomares-Rius, J. E., De Luca, F., Liébanas, 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.
- 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.

**Forma recomendada de citar:**

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2018). Protocolo de Diagnóstico: *Ditylenchus dipsaci* (Nematodo del tallo y los bulbos) [Versión 1.0]. Tecámac, México. Autor.

## 8. ANEXOS

### 8.1. Síntomas



**Figura 6. Síntomas en vegetales inducidos por *D. dipsaci*:** a). Pudrición seca en papa; b). Semillas de frijol infestadas con *D. dipsaci*; c). Cambio de coloración de tejido en bulbos; d) Manchas necróticas en bulbos de *Narcissus* sp.; e). Deshidratación de tejido y necrosis en dientes de ajo infestados con nematodos; f). Amarillamiento, deformación foliar y crecimiento reducido de plantas de alfalfa; g) Daño por nematodos sobre betabel. **Créditos:** a-c, g). EPPO, 2017; e y f). Rosas-Hernández, L.; d). C. W. Laughlin, Nemapix (2000).

## 8.2. Extracción de nematodos por macerado-tamizado-centrifugado-flotación



**Figura 7. Procedimiento de extracción de nematodos:** a). Macerado de muestra en licuadora; b). Vertido de macerado sobre tamices; c). Lavado y tamizado de muestra; d). Colecta de tamizado 450 mallas; e). Mezcla de tamizado con caolín; f). Centrifugado; g). Agregando solución azucarada, y h). Decantado y lavado de extracto de nematodos.

### 8.3. Tabla de caracteres morfométricos para el diagnóstico

#### 8.3.1. Caracteres para hembras

Característica	1	2	3..	..10	Prom.	Rango	Des. est
Long. del cuerpo							
Diámetro del labio							
Altura del labio							
Long. del estilete							
Columna del estilete							
Cono del estilete							
M (cono*100/estilete)							
DGED							
Cabeza-metacarpus							
Cabeza-poro excretor							
Cabeza-cardia							
Cabeza-extremo posterior glándula del esófago							
Ancho máximo del cuerpo							
Cabeza-vulva							
Saco postuterino (PUS)							
Vulva-ano (V-A)							
V-A/PUS							
Cola							
Ancho del cuerpo a nivel del ano							
% posición de vulva (V)							
<i>a</i>							
<i>b</i>							
<i>c</i>							
<i>c'</i>							

### 8.3.2. Caracteres para machos

Característica	1	..1	Prom.	Rang	Des.
Long. del cuerpo					
Diámetro del labio					
Altura del labio					
Long. del estilete					
Columna del estilete					
Cono del estilete					
M (cono*100/estilete)					
DGED					
Cabeza-metacarpus					
Cabeza-poro excretor					
Cabeza-cardia					
Cabeza-extremo posterior glándula					
Ancho máximo del Cola					
Ancho del cuerpo a nivel de la cloaca					
Espícula					
Gubernáculo					
Long. testículos					
% posición de testículos (T)					
<i>a</i>					
<i>b</i>					
<i>c</i>					
<i>c'</i>					