



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

**“TAXONOMÍA INTEGRATIVA PARA LA DELIMITACIÓN Y
DIAGNOSTICO DE ESPECIES DE NEMATODOS DE LA
FAMILIA Anguinidae EN MÉXICO”**

T E S I S

Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA

Ing. Agronomo Edgar Medina Gómez

COMITÉ TUTORAL

Directos:

DR. DANIEL MARTÍNEZ GÓMEZ

Co-Director:

DR. ÁNGEL RAMÍREZ SUAREZ

Asesor:

MTRO. JUVENTINO CUEVAS OJEDA

MÉXICO D.F. Febrero de 2016

TAXONOMÍA INTEGRATIVA PARA LA DELIMITACIÓN Y DIAGNOSTICO DE ESPECIES DE NEMATODOS DE LA FAMILIA Anguinidae EN MÉXICO”

Ing. Agronomo Edgar Medina Gómez

Universidad Autónoma Metropolitana Febrero 2016

RESUMEN

La mayoría de las especies de nematodos fitoparásitos de la familia Anguinidae son consideradas de importancia económica, ya que produce perdidas en los rendimientos de los cultivos. En México se desconoce el estatus de esta familia, por lo que existe la necesidad de delimitar los géneros y especies presentes a través de un enfoque de taxonomía integrativa. Mediante el análisis de caracteres morfológicos y morfométricos combinado con el análisis filogenético de secuencias genéticas de dos marcadores moleculares del rDNA (ITS1-5.8S-ITS2 y segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S), se describen dos nuevas especies de anguinidos: 1. *Subanguina tlaxcaltensis* n. sp. parasitando a las malezas *Ageratum conyzoides*, *Cosmos bipinnatus* y *Bidens* spp. , en los valles altos de Tlaxcala. 2. el nematodo agallador *Anguina aristide* n. sp. atacando pasto *Aristida divaricata* en el municipio de Huamantla, Tlaxcala. Se identifica al nematodo agallador foliar *Orrina phyllobia* como el agente causal del agallamiento y distorsión de hojas de *Solanum elaeagnifolium* en San Luis de la Paz, Guanajuato, así como del nematodo agallador del trigo *Anguina tritici* mediante el análisis de restricción enzimática PCR-RFLP's el cual produjo un patrón único para la identificación de esta especie. Finalmente, el análisis filogenético de la región del ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA y el segmento de expansión D2-D3 del gen 28S permitió determinar la identidad y las afinidades filogenéticas del nematodo de la alfalfa *Ditylenchus dipsaci* infectando *Medicago sativa* en Jalisco, México.

ABSTRACT

Most plant parasitic nematode species of the Family Anguinidae are considered of economic concern due to the yield losses caused in several crops. In Mexico there is no information about the status of this family so there is an urgent need to delimit the genus and species with presence in our country following an integrative taxonomic approach. Through the study of morphological and morphometric characters combined with the phylogenetic analysis of genetic sequences of two rDNA molecular markers (ITS1-5.8S-ITS2 and expansion segments D2-D3 of gen 28S), two new anguinid species were described: 1. *Subanguina tlaxcaltensis* n. sp. parasitizing local weeds *Ageratum conyzoides*, *Cosmos bipinnatus* and *Bidens* spp. in the highlands of Tlaxcala. 2. The gall nematode *Anguina aristide* n. sp. affecting grass *Aristida divaricata* in Huamantla county, Tlaxcala. Also, it was identified the leaf-gall nematode *Orrina phyllobia* as causal agent of foliar galling and distortion on *Solanum elaeagnifolium* in San Luis de la Paz, Guanajuato, as well as the wheat seed-gall nematode *Anguina tritici* by the PCR-RFLP enzymatic pattern which displayed a unique profile. Finally, a phylogenetic reconstruction of the ITS1-5.8S-ITS2 region and the expansion segments D2-D3 of gen 28S of nematode specimens detected on alfalfa allowed to determine their identity and phylogenetic affinities of Alfalfa Stem Nematode *Ditylenchus dipsaci* damaging *Medicago sativa* in Jalisco, Mexico.

DEDICATORIA

A mi esposa, amiga y compañera Silvia M. que me enseñaste a tener paciencia y tolerancia, por su amor, sacrificio y esfuerzo.

A mis hijos Ikeer Francisco e Ian Santiago por ser la fuente de mi inspiración y motivación para poder ser un mejor padre.

A mis padres, por su amor, comprensión, su ejemplo de trabajo, apoyo que siempre me han brindado y por ser un ejemplo a seguir

A mis hermanos y familia por los momentos que hemos compartido y el apoyo que me han brindado.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF-2016) SENASICA-SAGARPA por haber otorgado los apoyos y las facilidades para la realización y ejecución de este proyecto.

A la Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitopatología por haber otorgado las facilidades del uso de sus instalaciones y apoyos proporcionados.

A la Rectoría General de la Universidad Autónoma Metropolitana, por los apoyos otorgados para la difusión del proyecto en los diferentes eventos de difusión científica.

Al Consejo Nacional de ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de maestría.

A la Universidad Autónoma Metropolitana, por el aprendizaje recibido por parte de los profesores durante mi estancia en la maestría.

Al Dr. Ángel Ramírez Suarez y Mtro. Juventino Cuevas Ojeda, por haberme brindado paciencia, apoyo incondicional, consejos, sus conocimientos y lo más importante su amistad.

Al Dr. Daniel Martínez Gómez, por su apoyo y asesorías brindadas durante la maestría.

A la Biól. Salomé Alcasio Rangel y el Ing. Leonel Rosas Hernández por su amistad, consejos y apoyo en el laboratorio de Nematodos.

A la M. C. Jessica Berenice Valencia Luna y M. C. Ariana Guadalupe Robles Zárate por el apoyo brindado en el área de microscopía electrónica.

A la M.C. María del Rocío Hernández H. por sus consejos y apoyo proporcionado.

A mis compañeros y amigos Cesar, Miguel, Juan José y Brenda, por sus consejos y apoyo incondicional.

CONTENIDO

RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE CUADROS	xviii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
PROBLEMÁTICA A RESOLVER	5
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	5
OBJETIVO GENERAL	5
OBJETIVOS PARTICULARES	6
HIPÓTESIS	6
CAPITULO 1. MARCO DE TEÓRICO Y DE REFERENCIA	7
1.1 MARCO TEÓRICO.	7
1.1.1 FAMILIA ANGUINIDAE	7
1.1.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA FAMILIA ANGUINIDAE	7
1.1.3 DIAGNOSIS	8
1.1.4 DESCRIPCIÓN	8
1.1.5 GÉNEROS DE LA FAMILIA ANGUINIDAE DE IMPORTANCIA ECONÓMICA	10
1.1.5.1 GÉNERO <i>Anguina</i> Scopoli, 1777	10
1.1.5.1.1 DIAGNÓSTICO	10
1.1.5.1.2 BIOLOGÍA DEL GÉNERO <i>Anguina</i>	10
1.1.5.1.3 ESPECIES DEL GÉNERO <i>Anguina</i>	12
1.1.5.1.4 HOSPEDANTES DEL GÉNERO <i>Anguina</i>	12

1.1.5.2.1 DIAGNÓSTICO	13
1.1.5.2.2 BIOLOGÍA DEL GÉNERO <i>Ditylenchus</i>	13
1.1.5.2.3 ESPECIES DEL GÉNERO <i>Ditylenchus</i>	15
1.1.5.2.4 HOSPEDANTES DEL GÉNERO <i>Ditylenchus</i>	16
1.1.5.3 GÉNERO <i>Subanguina</i> Paramonov, 1967	16
1.1.5.3.1 DIAGNÓSTICO	16
1.1.5.3.2 BIOLOGÍA DEL GÉNERO <i>Subanguina</i>	17
1.1.5.3.3 ESPECIES DEL GÉNERO <i>Subanguina</i>	18
1.1.5.3.4 HOSPEDANTES DEL GÉNERO <i>Subanguina</i>	18
1.1.5.4 GÉNERO <i>Orrina</i> Brzeski, 1981	18
1.1.5.4.1 DIAGNOSTICO DEL GÉNERO <i>Orrina</i>	18
1.1.5.4.2 BIOLOGÍA DEL GÉNERO <i>Orrina</i>	19
1.1.5.4.3 ESPECIES DEL GÉNERO <i>Orrina</i>	19
1.1.5.4.4 HOSPEDANTES DEL GÉNERO <i>Orrina</i>	19
1.1.6 TAXONOMÍA MODERNA	19
1.1.7 TAXONOMÍA INTEGRATIVA	20
1.1.8 VARIABILIDAD GENÉTICA Y FILOGENIA DE LA FAMILIA ANGUINIDAE	21
1.2 MARCO DE REFERENCIA	22
1.2.1 IMPORTANCIA AGRÍCOLA Y PECUARIA DE LA FAMILIA ANGUINIDAE	22
1.2.3 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA FAMILIA ANGUINIDAE	24
1.2.4 REGULACIÓN FITOSANITARIA DE LA FAMILIA ANGUINIDAE	25
1.2.5 LA FAMILIA ANGUINIDAE EN MÉXICO	26
1.3 LITERATURA CITADA	28
CAPITULO 2. CARACTERIZACIÓN TAXONOMICA Y MOLECULAR DE ESPECIES DE NEMATODOS AGALLADORES FOLIARES AFECTANDO <i>Ageratum conyzoides</i>, <i>Cosmos bipinnatus</i> Y <i>Bidens</i> spp. EN LOS VALLES ALTOS DE TLAXCALA, MÉXICO	36
2.1 MATERIALES Y MÉTODOS	37
2.1.1 COLECTA DE MUESTRAS	37

2.1.2 EXTRACCIÓN DE NEMATODOS	37
2.1.3 MONTAJE Y OBSERVACIÓN DE LOS NEMATODOS EXTRAÍDOS	37
2.1.4 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MORFOMÉTRICA	38
2.1.5 PREPARACIÓN DE ESPECÍMENES PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	38
2.1.6 DIAGNÓSTICO MOLECULAR	39
2.1.6.1 EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE ESPECÍMENES INDIVIDUALES FRESCOS	39
2.1.6.2 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LA REGIÓN ITS1-5.8S-ITS2 Y LOS SEGMENTOS DE EXPANSIÓN D2-D3 DEL rDNA	39
2.1.7 SECUENCIACIÓN, BIOINFORMÁTICA Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS	40
2.2. RESULTADOS Y DISCUSIONES	41
2.2.1 SÍNTOMAS DE INFECCIÓN	41
2.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MORFOMÉTRICA EN POBLACIONES DE <i>Ageratum conyzoides</i> , <i>Cosmos bipinnatus</i> Y <i>Bidens</i> spp.	42
2.3.1 HEMBRA	42
2.3.2 MACHO	43
2.3.3 JUVENIL	43
2.4 DIAGNOSIS Y COMPARACIÓN CON OTRAS ESPECIES	49
2.5 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	51
2.6 RELACIONES FILOGENÉTICAS DE <i>Subanguina tlaxcaltensis</i> n spp. CON OTRAS ESPECIES DE ANGUINIDOS	52
2.7 LITERATURA CITADA	56
CAPITULO 3. DELIMITACIÓN TAXONÓMICA Y MOLECULAR DEL NEMATODO AGALLADOR DEL PASTO <i>Aristida divaricata</i> EN HUAMANTLA, TLAXCALA, MÉXICO	59
3.1 MATERIALES Y MÉTODOS	60
3.1.1 COLECTA DE MUESTRAS	60
3.1.2 EXTRACCIÓN DE LOS NEMATODOS	60
3.1.3 MONTAJE Y OBSERVACIÓN DE LOS NEMATODOS EXTRAÍDOS	60
3.1.4 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MORFOMÉTRICA	61

3.1.5 PREPARACIÓN DE ESPECÍMENES PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	61
3.1.6 DIAGNÓSTICO MOLECULAR	62
3.1.6.1 EXTRACCIÓN DE DNA DE ESPECÍMENES INDIVIDUALES FRESCOS	62
3.1.6.2 OLIGONUCLEÓTIDOS O PRIMERS UTILIZADOS	62
3.1.6.3 REACCIÓN DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES ITS1-5.8S-ITS2, PARCIAL 18S-ITS1-5.8S-PARCIAL ITS-2 Y LOS SEGMENTOS DE EXPANSIÓN D2-D3 DEL GEN 28S rDNA	63
3.1.6.4 PCR-RFLP'S DE LA REGIÓN PARCIAL 18S-ITS1-5.8S-PARCIAL ITS2	64
3.1.6.5 SECUENCIACIÓN, BIOINFORMÁTICA Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS	64
3.2. RESULTADOS Y DISCUSIONES	65
3.2.1 SÍNTOMAS DE INFECCIÓN	65
3.2.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MORFOMÉTRICA	65
3.3.1 HEMBRA	66
3.3.2 MACHO	66
3.3.3 JUVENIL	67
3.4 DIAGNOSIS Y COMPARACIÓN CON OTRAS ESPECIES	74
3.5 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	76
3.6 PATRÓN DE RESTRICCIÓN PCR-RFLP's	78
3.7 RELACIONES FILOGENÉTICAS DE <i>Anguina aristide</i> n sp. CON OTRAS ESPECIES DE ANGUINIDOS	79
3.8 LITERATURA CITADA	83
CAPITULO 4. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA Y MOLECULAR DEL NEMATODO AGALLADOR FOLIAR <i>Orrina phyllobia</i> AFECTANDO TROMPILLO <i>Solanum elaeagnifolium</i> EN GUANAJUATO, MÉXICO	86
4.1 MATERIALES Y MÉTODOS	87
4.1.1 MUESTREO DEL MATERIAL BIOLÓGICO	87
4.1.2 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA	87
4.1.3 PREPARACIÓN DE ESPECÍMENES PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	88

4.1.4 EXTRACCIÓN DE DNA Y PCR	88
4.1.5 SECUENCIACIÓN Y FILOGENÉTICA	89
4.2 RESULTADOS Y DISCUSIONES	90
4.2.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MORFOMÉTRICA	90
4.2.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FILOGENÉTICA	93
4.3 LITERATURA CITADA	97
CAPITULO 5. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL NEMATODO AGALLADOR	
<i>Anguina tritici</i> A TRAVÉS DEL ANÁLISIS PCR-RFLP EN TRIGO <i>Triticum aestivum</i> L.	100
5.1 MATERIALES Y MÉTODOS	101
5.1.1 EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE ESPECÍMENES INDIVIDUALES	101
5.1.2 REACCIÓN DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN PARCIAL DEL GEN 18S-ITS1-5.8S Y PARCIAL DEL ITS2	101
5.1.3 PCR-RFLP's DE LA REGIÓN PARCIAL 18S-ITS1-5.8S	102
5.2. RESULTADOS Y DISCUSIONES	102
5.3 LITERATURA CITADA	104
CAPITULO 6. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DEL NEMATODO <i>Ditylenchus dipsaci</i> (NEMATA: ANGUINIDAE) ATACANDO ALFALFA EN JALISCO, MÉXICO	105
6.1 MATERIALES Y MÉTODOS	106
6.1.1 MUESTREO DEL MATERIAL BIOLÓGICO	106
6.1.2. EXTRACCIÓN DE NEMATODOS	106
6.1.3. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA	106
6.1.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	107
6.1.4.1EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE ESPECÍMENES INDIVIDUALES	107
6.1.4.2 REACCIÓN DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN ITS1-5.8S-ITS2 Y LOS SEGMENTOS DE EXPANSIÓN D2-D3 DEL rDNA	107
6.1.4.3. PCR-RFLP's DE LA REGIÓN ITS1-5.8S-ITS2	108

6.1.4.4. SECUENCIACIÓN, BIOINFORMATICA Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO	108
6.2 RESULTADOS Y DISCUSIONES	109
6.2.1. SÍNTOMAS DE INFECCIÓN Y EXTRACCIÓN DE NEMATODOS	109
6.2.2. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA	110
6.2.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FILOGENÉTICA	113
6.2.3.1. AMPLIFICACIÓN DE LOS MARCADORES DEL rDNA	113
6.2.3.2. PATRÓN ENZIMÁTICO PCR-RFLP's	114
6.2.3.3. HOMOLOGÍA POR BLASTING Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO	115
6.3 LITERATURA CITADA	118
7. CONCLUSIONES GENERALES	121

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Síntomas causados por *Subanguina tlaxcantensis* n. sp. en *Ageratum conyzoides* (A) Deformación y agallamiento en tallos y ápices en toda la planta cuando en ataque es severo; (B) Agallamiento en tallos en *Cosmos bipinnatus* provocando distorsión; (C) Distorsión y agallamiento en tallos y ápices en *Bidens* spp. 42
- Figura 2.** Dibujos a través de cámara lucida de paratipos de *Subanguina tlaxcaltensis* n. spp.; (A) Parte anterior del Macho; (B) Parte anterior de Hembra; (C) Región labial del macho; (D) Región labial de hembra; (E) Región labial de juvenil; (F) Crustaformaria; (G) Cuerpo de la hembra; (H) Espicula y gubernáculo; (I) Cola y saco post uterino en hembra. 44
- Figura 3.** Micrografías de *Subanguina tlaxcaltensis* n. spp.; (A) Región del esófago de juvenil; (B) Región del esófago en Hembra; (C) Región del esófago del macho; (D) Sobre posición dorsal; (E) Cola, espicula y bursa del macho; (F) Cola y saco post uterino en la hembra. 45
- Figura 4.** Imágenes en SEM de *Subanguina tlaxcaltensis* n. spp. Hembra (A-D). Macho (E-F). A: Vista lateral de la región cefálica; B: Región labial y abertura de las anfidas; C: Vista lateral de la vulva; D: Vista ventral de la Vulva; E: Espicula y bursa; F: Campos laterales. 46
- Figura 5.** Productos de PCR de la región ITS1-5.8S-ITS2 usando los primers AB28 y TW81. 1-2: Control (+) *D. dipsaci*; 3-4: Control (-) Agua destilada estéril; 5-6: Población *A. conyzoides*; 7-8: *C. bipinnatus*; 9-10: *Bidens* sp. M: Marcador molecular 100 pb. 52
- Figura 6.** Productos de PCR de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S usando los primers D2A y D3B. 1-2: Control (+) *D. dipsaci*; 3-4: Control (-) Agua destilada estéril; 5-6: Población *A. conyzoides*; 7-8: *C. bipinnatus*; 9-10: *Bidens* sp. M: Marcador molecular 100 pb. 52

Figura 7.	Inferencia bayesiana de nematodos afectando <i>A. conyzoides</i> , <i>C. bipinnatus</i> y <i>Bidens</i> spp. Árbol consenso de probabilidades superiores al 50% de la alineación de secuencias de ITS1-5.8S-ITS2 generados a partir del modelo complejo: GTR + G con secuencias de anguinidos depositadas en el GenBank.	54
Figura 8.	Inferencia bayesiana de secuencias de nematodos afectando <i>A. conyzoides</i> , <i>C. bipinnatus</i> y <i>Bidens</i> spp. Árbol consenso de probabilidades superiores al 50% de la alineación de los segmentos de expansión D2-D3 generados a partir del modelo complejo: GTR + G con secuencias de anguinidos depositadas en el GenBank.	55
Figura 9.	Síntomas causados por <i>Anguina aristide</i> en <i>A. divaricata</i> . (A) agallamiento en tallo cuando en ataque es severo; (B) agallas en tallos; (C) Agallamiento de coloración marrón de las semillas.	65
Figura 10.	Dibujos a través de cámara lucida de paratipos de <i>Anguina aristide</i> n sp.; (A) Región labial de juvenil; (B) Región labial del macho; (C) Región labial de hembra; (D) Parte anterior de hembra; (E) Parte anterior del macho; (F) Cola de hembra; (G) Espicula y gubernáculo; (H) y (I) Cola del macho; (J) Crustaformaria; (K) Cuerpo de hembra.	68
Figura 11.	Micrografías de <i>Anguina aristide</i> n sp.; (A) Región del esófago de la hembra; (B) Región del esófago del macho; (C) Región del esófago del juvenil; (D) Metacarpus; (E) Sobre posición ventral; (F) Cola y saco post uterino en hembra; (G) Cola del macho.	69
Figura 12.	Imágenes en SEM de <i>Anguina aristide</i> n sp. (A) Vista lateral de la cabeza del macho; (B) Región labial y abertura de las anfidias en hembra; (C) Vista lateral de la vulva; (D) Espiculas; (E) Término de la cola de hembra; (F) Campos laterales.	70

- Figura 13.** Productos de PCR del marcador molecular ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA usando los primers AB28 y TW81. 1-2: Control (+) *D. dipsaci*; 3-4: Control (-) Agua destilada estéril; 5-10: Población de *Anguina aristide*. M: Marcador molecular 100 pb. 77
- Figura 14.** Productos de PCR de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S del rDNA usando los primers D2A y D3B. 1-2: Control (+) *D. dipsaci*; 3-4: Control (-) Agua destilada estéril; 5-8: Población de *Anguina aristide*. M: Marcador molecular 100 pb. 77
- Figura 15.** Productos de PCR de la región parcial 18-ITS1-1.58S-parcial ITS2 usando los primers rDNA1.58S y rDNA2. 1-2: Control (-) Agua destilada estéril; 3-7: Población de *Anguina aristide*. M: Marcador molecular 100 pb. 77
- Figura 16.** Patrón de digestión con enzimas de restricción de DNA amplificado por PCR de *Anguina aristide* afectando pasto en *Aristida divaricata* utilizando los primers (rDNA1.58S y rDNA2). 1 mm 100 pb. (*Anguina aristide*) testigo positivo sin digerir (1; (*Alu I*) 2, 8 y 14; (*Hha I*) 3, 9 y 15; (*EcoRI*) 4, 10, 16; (*HinfI*) 5, 11 y 17; (*Taq I*) 6, 12 y 18. 78
- Figura 17.** Reconstrucción filogenética bayesiana de secuencias ITS1-5.8S-ITS2 de nematodos detectados en *A. divaricata* en Tlaxcala, México con secuencias de anguinidos depositadas en el GenBank. Árbol consenso de probabilidades superiores al 50% generado a partir del modelo complejo: GTR + G cuyos valores de soporte se muestran sobre los clades. 81
- Figura 18.** Inferencia filogenética bayesiana de secuencias de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S del rDNA de poblaciones mexicanas de anguinidos afectando *A. divaricata* en Tlaxcala, México. Árbol de consenso de probabilidades superiores al 50% generados a partir del modelo complejo: GTR + G con otras secuencias de anguinidos depositadas en el GenBank. Valores de soporte se muestran sobre los clades. 82

Figura 19.	Síntomas causados por el nematodo agallador foliar <i>Orrina phyllobia</i> en trompillo <i>Solanum elaeagnifolium</i> . (A) y (B) distorsión y agallamiento de hojas.	87
Figura 20.	Micrografías del nematodo agallador foliar <i>Orrina phyllobia</i> .; (A) Macho; (B) Hembra; (C) Región del esófago del macho; (D) Región del esófago de la hembra; (E) Cola del macho; (F) Cola y saco post uterino en hembra.	91
Figura 21.	Imágenes en SEM de <i>Orrina phyllobia</i> ; (A) Vista lateral de la cabeza de la hembra; (B) Vista lateral de la cabeza del macho; (C) Vista lateral de la cabeza del juvenil; (D) Región labial de la hembra; (E) Campos laterales; (F) Cola del macho.	92
Figura 22.	Productos de PCR usando los primers AB28 y TW81; 1-2: Control (+) <i>Ditylenchus dipsaci</i> ; 3-4 control (-) Agua destilada estéril; 5-10 población de <i>O. phyllobia</i> . M: Marcador molecular 100 pb.	94
Figura 23.	Productos de PCR usando los primers D2A y D3B; 1-2: Control (+) <i>Ditylenchus dipsaci</i> ; 3-4 control (-) Agua destilada estéril; 5-8 población de <i>O. phyllobia</i> . M: Marcador molecular 100 pb.	94
Figura 24.	Inferencia filogenética bayesiana de secuencias de <i>O. phyllobia</i> procedentes de San Luis de la Paz, Guanajuato, México. Árbol consenso de probabilidades superiores al 50% de la alineación ITS1-5.8S-ITS2 generados a partir del modelo complejo: GTR + G con secuencias de otras especies de anguinidos depositadas en el GenBank. Los valores de soporte son especificados en cada uno de los clades.	95
Figura 25.	Reconstrucción filogenética bayesiana de secuencias de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S de <i>O. phyllobia</i> detectada en San Luis de la Paz, Guanajuato, México. Árbol consenso de probabilidades superiores al 50% de la alineación de los segmentos de expansión D2-D3 generados a partir del modelo complejo: GTR + G con otras secuencias de anguinidos	96

depositadas en el Genbank. Valores de soporte se muestran sobre los clades.

- Figura 26.** Productos de PCR de la región parcial 18-ITS1-1.58S-parcial ITS2 usando los primers rDNA1.58S y rDNA2. 1-2: Control (-) Agua destilada estéril; 3-9: Población de *Anguina tritici*. M: Marcador molecular 100 pb. 102
- Figura 27.** Digestión con enzimas de restricción de DNA amplificado por PCR de DNA de *Anguina tritici* población de Ensenada, Baja California. México, utilizando los primers rDNA1.58S y rDNA2. M: Marcador molecular 100 pb. 1. *Anguina tritici* testigo positivo sin digerir; (*Alu I*) 2; (*Hha I*) 3; (*EcoRI*) 4; (*HinfI*) 5; (*Taq I*). 103
- Figura 28.** Síntomas producidos por el nematodo *D. dipsaci* en alfalfa en Cuyacapan, Atoyac, Jalisco. A) Deformación de hojas y acortamiento de entrenudos. B) Decoloración de foliolos (“hojas albinas”). 110
- Figura 29.** Micrografías de caracteres de diagnóstico para nematodos detectados en Alfalfa de Cuyacapan, Atoyac, Jalisco. México. a) hembra, B) región anterior y estilete, C) campos laterales (4), D) saco post-uterino, E) cola aguda y bursa *leptoderan.*, F) macho. 111
- Figura 30.** Amplificación de la región *ITS1- gen 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 s.s.*; 7 y 8: controles negativos (*H₂O* estéril grado PCR); 9 y 10: control positivo de *D. dipsaci s.s.* (ajo) amplificando en un fragmento de 750 pb. 113
- Figura 31.** Amplificación de *segmentos de expansión D2 y D3 del gen 28S del rDNA*. M: marcador molecular de 100pb; 1-6: amplificado a partir de extracción individual de DNA de *D. dipsaci s.s.* encontrados; 7 y 9: control negativo (*H₂O* estéril grado PCR); 9 y 10: control positivo de *D. dipsaci s. s.* amplificando en un fragmento de 780 pb. 113

- Figura 32.** Digestión enzimática de productos de PCR de la región *ITS1-gen 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: Digestión con *RsaI* produciendo fragmentos de 335, 280, 200 y 132 pb, y 5: Digestión con *RsaI* de control positivo de *D. dipsaci* s.s. (ajo); 9: marcador molecular 100 pb, 10 y 11: Digestión con *RsaI* de *D. dipsaci* s.s. (ajo) originando fragmentos de 335, 280 y 132 pb. 114
- Figura 33.** Digestión enzimática de productos de PCR de la región *ITS1-gen 5.8S-ITS2* del *rDNA*. M: marcador molecular de 50 pb; 1 y 12: Producto PCR sin digerir; 2-8: Digestión con *HinfI* produciendo fragmentos de 400 y 300 pb, 9: marcador molecular 100 pb. 10 y 11: Digestión con *HinfI* de *D. dipsaci* s.s.(ajo) originando fragmentos de 400 y 300 pb. 115
- Figura 34.** 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. 116
- Figura 35.** 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. 117

ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1.	Muestras positivas para el estudio de <i>Subanguina tlaxcaltensis</i>	37
Tabla 2.	Datos morfométricos de <i>Subanguina tlaxcaltensis</i> n. sp. en <i>Ageratum conyzoides</i> . Todas las medidas están en μm . Media \pm DS (rango).	47
Tabla 3.	Morfometría de hembras y machos de <i>Subanguina tlaxcaltensis</i> n sp. detectados en <i>Ageratum conyzoides</i> , <i>Cosmos bipinnatus</i> y <i>Bidens</i> sp. Todas las medidas están en μm . Media \pm DS (rango).	48
Tabla 4.	Características morfométricas comparativas de hembras <i>Subanguina tlaxcaltensis</i> n sp. con otras especies del generó <i>Subanguina</i> .	50
Tabla 5.	Características morfométricos comparativas de machos de <i>Subanguina tlaxcaltensis</i> n sp. con otras especies del generó <i>Subanguina</i> .	51
Tabla 6.	Datos morfométricos de <i>Anguina aristide</i> n sp. en <i>Aristida divaricata</i> . Todas las medidas están en μm . Media \pm DS (rango).	71
Tabla 7.	Morfometría de hembras y machos de <i>Anguina aristide</i> n sp. estrechamente relacionado con <i>Anguina woodi</i> . Todas las medidas están en μm . Media \pm DS (rango).	73
Tabla 8.	Características morfométricas comparativas de hembras de <i>Anguina aristide</i> n sp. con otras especies del género <i>Anguina</i> .	76
Tabla 9.	Características morfométricas comparativas de machos de <i>Anguina aristide</i> n sp. con otras especies del género <i>Anguina</i> .	76

Tabla 10.	Patrón de restricción enzimática de especies de nematodos agalladores del género <i>Anguina</i> (Powers <i>et al.</i> , 2001) comparado con el obtenido en la población de anguinidos de pasto <i>A. divaricata</i> en Tlaxcala, México.	79
Tabla 11.	Características morfométricas comparativas de hembras y machos de <i>Orrina phyllobia</i> procedentes de San Luis de la Paz Guanajuato, México con especies reportadas por Nickle (1991) y Brzeski (1991).	93
Tabla 12.	Morfometría de especímenes de <i>Ditylenchus</i> detectados en plantas de alfalfa procedentes de Cuyacapan, Atoyac, Jalisco, México (Todos los valores están dados en μm excepto V y T, los cuales están dados en porcentaje).	112

INTRODUCCIÓN

Los nematodos fitoparásitos son plagas importantes de los agroecosistemas y muchas especies producen una gran variedad de daños al alimentarse directamente de las plantas o pueden afectar indirectamente como vectores de patógenos (van der Puteen y van Der Stole, 1998). Las pérdidas en las cosechas anuales ocasionadas por estos organismos se estiman en 8.8 a 14.6% de la producción total de los cultivos, lo que equivale a 157 billones de dólares en el mundo. Las pérdidas reales pueden ser aún mayor debido a que a menudo, solo el daño localizado más notable es investigado y reportado, mientras se pasa por alto los daños menos evidentes (Decraemer y Hunt, 2006). Aunque se han identificado más de 4,100 especies de nematodos parásitos de las plantas, continuamente se describen nuevas especies y algunas se han convertido en plaga en los cultivos debido a pequeños cambios en su hábitat y en las prácticas agrícolas (Karssen *et al.*, 2004).

Los primeros nematodos parásitos de plantas que se observaron y documentaron fueron las especies de la familia Anguinidae por lo evidente de la sintomatología que ocasionaba. Fue en 1743 que se hizo el primer reporte científico por Turrbevill Needham de estos nematodos en el trigo al cual denominó *Vibrio tritici* (conocido hoy como *Anguina tritici*) y en los años siguientes se siguió informando la misma especie en otros cereales (Luc *et al.*, 2005).

Los nematodos de la familia Anguinidae pertenecen al orden Tylenchida, que parasitan las partes aéreas, así como las raíces de las plantas. Tres de los géneros de importancia económica que comprende la familia Anguinidae son: *Anguina*, *Subanguina* y *Ditylenchus* (Kleynhans *et al.*, 1996). De estos, las especies de los géneros *Ditylenchus* y *Anguina* son los que han recibido mayor atención, no solo por su importancia económica en la agricultura, sino también por que presentan algunas adaptaciones fisiológicas notables que les permite sobrevivir en condiciones ambientales adversas (Moens y Perry, 2009).

Existe una divergencia marcada en cuanto a definir los géneros y especies de la familia Anguinidae. De acuerdo al último sistema de clasificación, se han identificado 11 especies válidas del género *Anguina* (Siddiqi, 2000) sin embargo, este sistema solo considera

criterios morfotaxonómicos razón por la cual algunos especímenes hallados en distintas partes del mundo no han podido ser clasificados debido básicamente a que su morfología no corresponde solo a una especie. Otra causa de confusión taxonómica de los miembros de este grupo de nematodos es la falta de la morfología descriptiva de todos los estadios. Esto complica la identificación de algunas especies ya que a menudo sólo el estadio J2 y el estadio J3 son analizados y por lo tanto son los más fáciles de detectar ya que están presentes en gran número en el interior de agallas de las semillas o follaje (Powers *et al.*, 2001).

Por otro lado, las especies del género *Ditylenchus* son difíciles de diferenciar debido al alto grado de similitud morfológica entre ellos (Wendt *et al.*, 1993), razón por la cual se han descrito un gran número de especies y razas fisiológicas, lo que lo convierte como uno de los grupos de nematodos fitoparásitos más difíciles de identificar (Escuer, 1998).

Existe controversia en la designación de especies del género *Subanguina*, Krall (1991) considera a *Heteroanguina* y *Mesoanguina* como géneros diferentes a *Subanguina*, sin embargo Chizhov y Subbotin (1985) redefinen a *Heteroanguina* como género *Mesoanguina*. Fortuner y Maggenti (1987) revisaron la familia Anguinidae y sinonimizan a *Heteroanguina* y *Mesoanguina* como *Subanguina*, respaldado por de Siddiqi (2000).

En la actualidad, la identificación taxonómica de los nematodos agalladores de la familia Anguinidae se realiza por métodos tradicionales esto es, en base a las características morfológicas y morfométricas. Estas metodologías hasta cierto punto pueden ser confiables, pero debido a la gran variabilidad morfológica existente entre individuos de una misma especie, se recomienda la utilización de un enfoque de taxonomía integrativa.

ANTECEDENTES

Algunas especies de nematodos formadores de agallas y/o foliares de la familia Anguinidae son considerados de importancia económica como plagas agrícolas y de cuarentena por las agencias de sanidad vegetal de varios países (Singh *et al.*, 2013).

Existe evidencia que revela el papel importante de los nematodos agalladores del género *Anguina* en la diseminación de enfermedades, tal es el caso de *Anguina tritici* que es vector de la bacteria *Clavibacter tritici*, agente causal de la pudrición amarillenta temprana de la cebada, y que puede ser tóxica al ganado ovino (Saleh y Fattah, 1990). Por otro lado, existe una asociación entre *Anguina agrostis* y la bacteria *Clavibacter rathayi* en pastos, la cual hace que las plantas que presentan esta asociación se vuelvan tóxicos cuando son ingeridos por el ganado produciendo síntomas de toxicidad manifestada en descoordinación, tambaleo y temblor muscular. De manera similar, la asociación *Anguina funesta* con la bacteria *Rathayibacter toxicus* que infesta el follaje y a las estructuras florales de las gramíneas, cuya ingestión por parte del ganado ocasiona una intoxicación grave que llega a provocar la muerte (Riley y Barbetti, 2008).

Es muy poca la literatura disponible que hace referencia al estatus de las especies de anguinidos en México. Durante el ciclo agrícola de 1981-1982, en Ensenada, Baja California, se detectó un brote de infestación del nematodo cuarentenario *Anguina tritici* atacando *Triticum aestivum* var. Nacozari, que provocó una sintomatología conocida como agalla, con una coloración café-oscura de los granos. Al disectar las agallas se encontraron un promedio de 25,000 nematodos en el segundo estadio juvenil por grano (Nieto y Delgado, 1984).

Por otro lado, en los estados de Zacatecas y Durango se ha reportado a *Ditylenchus* solo a nivel de género, en suelo de almácigos tradicionales de chile (*Capsicum annuum* L.), esta identificación se realizó a través de sus características morfométricas (Velásquez *et al.*, 2007).

En México, existe la presencia del nematodo del tallo y de los bulbos *Ditylenchus dipsaci*, la mayor cantidad de reportes se encuentran en las regiones productoras de ajo y cebolla en

los estado de Guanajuato, Aguascalientes, Puebla y Veracruz. Se tienen reportes de la especie *D. dipsaci* que provocan pérdidas que fluctúan del 30 al 100% de la cosecha total del cultivo del ajo (SENASICA, 2013).

La especie *D. dipsaci* puede causar pérdidas en los cultivos de 60 al 80% (Sturhan y Brzeski, 1991). En Italia más del 60% de plántulas de cebolla, murieron en la época de trasplante en campos infestados. En ajo, han estimado pérdidas del 50% en Italia y más del 90% en Francia y Polonia (CABI, 2010). *D. destructor* puede causar un daño significativo en las partes subterráneas (raíces, tubérculos y bulbos) de los cultivos huéspedes tales como la papa y varias plantas ornamentales. Reduce el rendimiento de las cosechas de cultivos hospedantes y causa daño adicional durante el almacenamiento (CABI, 2014).

Existen estudios de la utilización de especímenes de anguinidos para el control biológico de malezas, tal es el caso de *Ditylenchus phyllobius* que en los últimos años se ha utilizado como un potencial agente de control biológico de la maleza hoja de plata de las solanáceas (*Solanum elaeagnifolium* Cav.) en Australia (Field *et al.*, 2009). Por otro lado, la especie *Subanguina picridis*, es el primer nematodo utilizado como agente de control biológico aprobado para su liberación en la maleza *Acroptilon repens* en sitios limitados de Estados Unidos y Rusia (Duncan, 2001).

En el contexto internacional, solo algunos géneros de la familia Anguinidae son considerados dentro de la normatividad legislativa fitosanitaria, tal es el caso de *Anguina* y *Ditylenchus*; éste último está sujeto a normas regionales y/o planes de trabajo bilaterales en algunos cultivos importantes como la papa (*Solanum tuberosum* L.). En este sentido, en México, en el año del 2003 el grupo asesor técnico de nematodos nombrado por la Organización Norteamericana de Protección Fitosanitaria (NAPPO), realizó una recopilación de metodologías para la detección, identificación y diagnóstico de especies de nematodos cuarentenados en la comercialización de la papa en Norteamérica. Estas metodologías incluyen el empleo de características morfológicas, moleculares y criterios sobre la extracción para la verificación de la identidad de los nematodos plaga en papa. Algunos de estos nematodos son miembros de la familia Anguinidae, que incluye al nematodo de la pudrición de la papa *Ditylenchus destructor* y al nematodo foliar y de los bulbos *D. dipsaci* (Carta *et al.*, 2005).

PROBLEMÁTICA A RESOLVER

En México se carece de evidencia objetiva relacionada al estatus y la relevancia de la familia Anguinidae en cultivos agrícolas y como su posible uso en el control biológico de malezas. De esta manera existe una urgente necesidad de investigación para delimitar los géneros y especies de nematodos de esta familia presentes en nuestro país, a través de un enfoque de taxonomía integrativa. La identificación y diagnóstico de especies nuevas o potencialmente perjudiciales de estos organismos es importante para el éxito de la agricultura y al mismo tiempo coadyuva en el desarrollo y establecimiento de procedimientos de cuarentena o reglamentarias para minimizar su diseminación.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué géneros y especies de nematodos de la familia Anguinidae se encuentran presentes en los estados de Baja California, Guanajuato, Jalisco y Tlaxcala?

OBJETIVO GENERAL

- Determinar los géneros y especies de nematodos de la familia Anguinidae, desde un enfoque de taxonomía integral en los estados de Baja California, Guanajuato, Jalisco y Tlaxcala.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Delimitar las especies de nematodos de la familia Anguinidae presentes en pasto *Aristida divaricata*, malezas (*Ageratum conyzoides*, *Bidens* spp. y *Cosmos bipinnatus*), alfalfa (*Medicago sativa* L.) trompillo (*Solanum elaeagnifolium* L.) y trigo (*Triticum aestivum* L.) a través de sus características morfológicas, morfométricas y moleculares.
- Determinar las relaciones filogenéticas entre las especies de nematodos anguinidos encontradas en los estados de Baja California, Guanajuato, Jalisco y Tlaxcala.

HIPÓTESIS

Considerando los síntomas que presentan algunas malezas y cultivos agrícolas en el estado de Baja California, Guanajuato, Jalisco y Tlaxcala, podemos suponer la presencia de nematodos de la familia Anguinidae de importancia económica y cuarentenaria así como agentes de control biológico, algunos de los cuales considerados como especies nuevas.

CAPITULO 1. MARCO DE TEÓRICO Y DE REFERENCIA

1.1 MARCO TEÓRICO.

1.1.1 FAMILIA ANGUINIDAE

El concepto de Anguinidae fue reconocido por primera vez, y propuesto por Paramonov a nivel de subfamilia a los géneros de *Anguina*, *Paranguina* y *Nothanguina*. Wu, 1967 estudió las relaciones entre *Tylenchus*, *Ditylenchus* y *Anguina*. Trata los tres géneros como miembros de Tylenchinae, pero sentó las bases que finalmente permitió esta separación de *Tylenchus* de los otros dos géneros. Siddiqi en 1980 coloca a Anguinidae como una superfamilia y Maggenti en 1987 propuso aceptar la familia Anguinidae bajo el suborden Tylenchina en la subclase de Tylenchia (Fortuner y Maggenti, 1987). Finalmente, Siddiqi, 2000 lo ubica a nivel de familia.

1.1.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA FAMILIA ANGUINIDAE

Existen dos tipos de clasificación, por un lado la propuesta basada en la morfología y morfometría (Siddiqi, 2000) y por el otro en base a la información que proporciona las secuencias genéticas de la SSU (sub unidad pequeña) del rDNA (De Ley *et al.*, 2006).

1. Reino: Animalia

Phylum: Nematoda

Clase: Sercenentea

Subclase: Diplogasteria

Orden: Tylenchida

Suborden: Tylenchina

Superfamilia: Thylenchoidea.

Familia: Anguinidae.

2. Reino: Animalia

Phylum: Nematoda

Clase: Chromadorea

Subclase: Chromadoria

Orden: Rhabditida

Suborden: Tylenchina

Superfamilia: Sphaerularioidea

Familia: Anguinidae.

Los géneros que comprende la familia son: *Anguina*, *Diptenchus*, *Ditylenchus*, *Indoditylenchus*, *Nothanguina*, *Nothotylenchus*, *Orrina*, *Pterotylenchus*, *Pseudhalenchus*, *Safinema*, *Subanguina* (Siddiqi, 2000) y *Litylechus* (Zhao *et al.*, 2011).

La familia Anguinidae se distingue de la mayoría de las familias del orden *Tylenchida* en que algunas de su especies son parasitas de la partes aéreas de las plantas con excepción de la especie *Subanguina radicola* que parasita a raíces e induce la producción de agallas. La mayoría se alimentan de hongos, pero los géneros que cuentan con especies fitoparásitas son *Anguina*, *Subanguina*, *Cynipanguina*, *Ditylenchus*, *Pterotylenchus*, *Litylenchus* y *Orrina* (Fortuner y Maggenti, 1987, Zhao *et al.*, 2011, Subbotin y Riley, 2012).

1.1.3 DIAGNOSIS

Son nematodos con el extremo anterior bajo y aplanado; su estilete es pequeño y delicado; el esqueleto labial es delicado; presenta aparato genital con una espermateca tubular de 16 células que está alineada con el tracto genital, las células espermáticas contiene una gran cantidad de citoplasma, con excepción del género *Pseudhalenchus*. Se parecen a los nematodos de la familia Tylenchidae en las características del extremo anterior pero se diferencia de ella por las características del aparato reproductor femenino y porque tienen una espermateca corta, de 12 células, redondeadas y que sobresalen algunas veces del tracto genital, y las células espermáticas tienen poco citoplasma y las glándulas esofágicas se sobrepone con frecuencia al intestino en su inicio (Fortuner y Maggenti, 1987).

1.1.4 DESCRIPCIÓN

Los miembros de esta familia son vermiformes: las hembras maduras algunas veces son agrandadas u obesas, pero no globosas o arrañonadas (forma de riñón). La región labial es baja y aplanada anteriormente, no anulada o con ligeras anulaciones. El primer anillo labial no presenta divisiones en los sectores; las aberturas de los anfídios son pequeñas; son elípticas y dirigidas hacia la abertura oral. Los campos laterales pueden presentar de 4 a 6 ó más incisuras. Los deirídios y fasmídios están ausentes generalmente. La cola es larga,

delgada y frecuentemente en el último tercio curvada ventralmente; algunas veces es corta y redondeada (Fortuner y Maggenti, 1987).

El esqueleto labial es delicado con estilete delgado y corto, o casi tan largo como el diámetro del anillo labial. El estilete presenta nódulos pequeños y redondos cuyos músculos son paralelos al eje del estilete. La glándula esofágica dorsal se abre justo por debajo de la base del estilete (Fortuner y Maggenti, 1987).

El procorpus puede ser delgado o ancho, separado o no del bulbo medio por una constricción. En ocasiones el bulbo medio (metacorus) puede ser fusiforme o redondeado, rara vez está ausente, con o sin válvulas. El itsmo puede presentarse delgado o ancho. Las glándulas esofágicas son cortas, piriformes, y no están sobrepuestas al intestino. La unión esófago-intestinal (cardias) contiene células grandes hialinas, del mismo diámetro que el intestino (Fortuner y Maggenti, 1987).

Las hembras poseen la vulva localizada generalmente a menos del 85% de la longitud total del cuerpo. Con un rama genital anterior y otra posterior el cual está reducida a un saco post uterino o ausente. El ovario puede ser recto o con flexiones, algunas veces tan largo que alcanza a la región esofágica; los oocitos puede estar en una o dos hileras. El oviducto presenta dos hileras de cinco células. La espermateca es larga, con 16 células, es tubular, siempre se encuentra en alineación al tracto genital, en el caso de *Pseudhalenchus* es más corto. Contiene un útero columelado variable, con cuatro hileras de cuatro o más células o con muchas células pequeñas arregladas de forma irregular. La vagina es oblicua o perpendicular al eje del cuerpo; sin epitigma vulva, (se encuentra presente en *Pterotylenchus*) (Fortuner y Maggenti, 1987).

Los machos son similares a las hembras, sin dimorfismo sexual secundario excepto en las especies con hembras adultas obesas, mientras que los machos siempre permanecen vermiformes. Las células espermáticas contienen una gran cantidad de citoplasma. Las alas caudales son pequeñas del tipo *leptoderan* que termina a menos de 1/3 de longitud de la cola, o más largas, envolviendo hasta 2/3 de la longitud de la cola, o envuelta completamente (Fortuner y Maggenti, 1987).

1.1.5 GÉNEROS DE LA FAMILIA ANGUINIDAE DE IMPORTANCIA ECONÓMICA

Los nematodos de la familia Anguinidae son parásitos especializados de vegetales, en las cuales inducen agallas en varios de los órganos (semillas, tallos y hojas). Los géneros *Anguina*, *Subanguina* y *Orrina* son considerados nematodos formadores de agallas de las partes aéreas mientras que en el género *Ditylenchus* solo se cuenta con algunas especies que se consideran como agalladores foliares (Riley y Barbetti, 2008).

1.1.5.1 GÉNERO *Anguina* Scopoli, 1777

1.1.5.1.1 DIAGNÓSTICO

Los nematodos del género *Anguina* presentan marcado dimorfismo sexual. La morfología general de estos nematodos es muy similar al género *Ditylenchus*. Hembras robustas y grandes, con un diámetro de 1.5 mm y 5.0 mm de longitud del cuerpo. Cuando las hembras mueren por relajación ocasionada por calor, éstas toman la forma de espiral enrollada. Los machos son más pequeños ya que llegan a medir entre 1-2.5 mm y cuando estos mueren toman una forma arqueada (Luc *et al.*, 2005).

El género *Anguina* posee un procorpus generalmente separado del bulbo medio el cual puede presentarse con o sin válvulas; el istmo generalmente está separado de la región glandular. Presenta glándulas esofágicas agrandadas, generalmente sobrepuestas al intestino. Los oocitos están presentes en hileras múltiples, presenta un útero columelado. Los machos presentan testículos generalmente sin flexiones; el gobernáculo rara vez está ausente y las alas caudales son largas, pero no alcanza la punta de cola. Las hembras adultas siempre son hinchadas u obesas (Fortuner y Maggenti, 1987).

1.1.5.1.2 BIOLOGÍA DEL GÉNERO *Anguina*

Los machos y las hembras del género *Anguina* son predominantemente endoparásitos migratorios, induciendo agallas y deformaciones en hojas, tallos y semillas. Las agallas contienen adultos, así como un gran número de huevos, y juveniles (J2, J3 y J4) que en este estadio poseen hábitos ectoparásitos. Algunas especies penetran el parénquima de la hoja o

en el tejido floral, por lo general cuando estas estructuras son jóvenes lo que origina el desarrollo y formación de las agallas (cambios morfológicos pronunciados en los tejidos vegetales) en los que los nematodos se convierten en adultos maduros. Los juveniles pueden permanecer inactivos en las agallas secas por lo menos 30 años. Por lo general, emergen en la primavera, cuando las condiciones de agua y humedad son adecuadas y sobreviven poco en el suelo y cuando lo hacen, el tiempo de duración es de aproximadamente un año (Shurtleff y Averre, 2000).

La primera muda puede ocurrir en el huevo y en algunas especies, sólo una generación se puede desarrollar dentro de una agalla durante una estación de crecimiento de la planta. Una sola hembra puede ovipositar hasta varios cientos de huevos, que eclosionan como juveniles en el segundo estadio (J2). Otras especies pueden producir más de una generación en una temporada (Shurtleff y Averre, 2000).

La etapa infecciosa se da en los estadios juveniles (J2) y (J4), y esto dependerá del tipo de especie y los tejidos de las plantas afectadas. Cuando las hojas del trigo son infectadas, éstas presentan deformaciones y reducción de tamaño. Una sola agalla puede contener un máximo de 40 adultos de ambos sexos y hasta 30,000 huevos y juveniles. Las flores infectadas desarrollan agallas oscuras pequeñas, que se mezclan con las semillas durante la cosecha o pueden caer al suelo. Algunas agallas en las hojas, tallos, y las inflorescencias son características por su tamaño, forma, color, y la ubicación. Las plantas infectadas pueden presentar retraso en el crecimiento o enanismo, las hojas y brotes presentan distorsiones en la primera etapa de su crecimiento; posteriormente, las semillas infectadas presentan disminución de tamaño y forma irregular, de coloración oscura, retraso en el crecimiento y están llenas de miles o cientos de nematodos juveniles. Las plantas severamente infectadas pueden llegar a morir (Shurtleff y Averre, 2000).

Algunas especies de *Anguina* son reportadas como vectores de enfermedades bacterianas en partes aéreas de las plantas. La pudrición caracterizada por el amarillamiento de la espiga del trigo es resultado de una infección combinada de *Clavibacter tritici* y *Anguina tritici* (Gupta y Swarup, 1972). Las especies *Anguina funesta* y *A. agrostis* que infectan y producen agallas en las semillas de diferentes pastos forrajeros mismas que son colonizadas por la bacteria *Rathayibacter toxicus*. Cuando el ganado consume pasto que contiene esta

bacteria sufre una intoxicación caracterizada por síntomas neurológicos que pueden llegar a ser mortales (Riley y Mckay, 1990, Stynes y Bird, 1980).

1.1.5.1.3 ESPECIES DEL GÉNERO *Anguina*

Las especies que conforman el género *Anguina* se presentan a continuación: *Anguina agropyri*, *A. agropyronifloris*, *A. agrostis*, *A. amsinckia*, *A. amsinckiae*, *A. australis*, *A. balsamophila*, *A. bradys*, *A. caricis*, *A. coffeae*, *A. ferulae*, *A. funesta*, *A. graminis*, *A. graminophila*, *A. lolii*, *A. mahogani*, *A. microlaenae*, *A. mucronata*, *A. musicola*, *A. pacificae*, *A. phalaridis*, *A. pharangi*, *A. polygona*, *A. poophila*, *A. pratensis*, *A. similis*, *A. spermophaga*, *A. tridomina*, *A. tritici*, *A. wevelli* y *A. woodii* (CABI, 2013).

1.1.5.1.4 HOSPEDANTES DEL GÉNERO *Anguina*

Dentro del género *Anguina*, la mitad de las especies son parásitos de las plantas monocotiledóneas, mayormente gramíneas. Las restantes especies parasitan dicotiledóneas en su gran mayoría de la familia *Asteraceae*, y solo en ocasiones atacan a especies de otras familias. *Anguina agrostis* y *A. graminis* se reproducen en una infinidad de especies de gramíneas, principalmente de climas fríos y templados. Los hospederos principales de *Anguina tritici* son el trigo (*Triticum aestivum*, *T. dicoccum*, *T. monococcum*) y el centeno (*Secale cereale* L.) mientras que la avena (*Avena sativa* L.) y la cebada (*Hordeum vulgare* L.) pocas veces son atacados por esta especie (Lehman, 1981).

Algunos hospedantes de otras especies del género *Anguina* son: *Elymus repens*, *Agrostis capilaris*, *Agrostis* sp., *Ehrharta longiflora*, *Lolium rigidum*, *Festuca rubra*, *Microlaena stipoides*, *Phleum phleoides*, *Calliargon* sp., *Calliargonella cuspidata*, *Koeleria gracilis*, *Trisetum flavescens*, *Holcus lanatus*, *Arctagrostis latifolia*, *Agrostis flaccida*, *Poa malacantha*, *Poa annua*, *Poa malacantha*, *Poa sibirica*, *Calamagrostis purpurea*, *Hierochloa alpina*, *Festuca nigrescens*, *Polygon monspeliensis*, *Agristis avenacea*, *Astrebla pectinata*, *Stipa scabra*, *Carex acuta*, *Ferula jaeschkeana*, *Centaurea leuophylla*, *Ehrharta longiflora* (McClure et al., 2008; Swart et al., 2004; Subbotin et al., 2004).

1.1.5.2 GÉNERO *Ditylenchus* Filipjev, 1936

Debido a la gran variabilidad morfológica y morfométrica, se han descrito un gran número de especies y razas en este género, por consiguiente este grupo de nematodos fitoparásitos es uno de los más difíciles de identificar (Douda *et al.*, 2013).

1.1.5.2.1 DIAGNÓSTICO

La longitud del cuerpo de las especies del género *Ditylenchus* son generalmente menores de 1.5 mm de largo, no se curvan fuertemente cuando están relajados (Douda *et al.*, 2013). El bulbo medio puede ser con o sin válvulas; el istmo no se encuentra separado del bulbo por una constricción; el bulbo glandular se encuentra corto y en ocasiones largo, cuando es largo se puede sobreponerse al intestino por una distancia larga o corta. El ovario se puede encontrar corto o largo, en ocasiones alcanza la región esofágica y puede estar reflejado; los oocitos se pueden encontrar en una o dos hileras, el útero se encuentra columelado con cuatro hileras de cuatro células; en saco posuterino puede estar presente o ausente. El testículo generalmente se encuentra sin flexiones, bursa *leptoderan* y que puede ser corta o larga pero nunca alcanza el extremo posterior. Las hembras son vermiformes o ligeramente hinchadas. Los nematodos de este género pueden ser micófagos o parásitos de plantas superiores (Fortuner y Maggenti, 1987).

1.1.5.2.2 BIOLOGÍA DEL GÉNERO *Ditylenchus*

Las especies del género *Ditylenchus* son ectoparásitos y endoparásitos migratorios de las plantas, atacan al tejido parenquimatoso de brotes, bulbos, tubérculos, hojas, flores, semillas y rara vez a las raíces (Douda *et al.*, 2013).

El nematodo foliar o de los bulbos *D.dipsaci* es una plaga que ataca a más de 500 especies de plantas. Este nematodo invade todas las partes aéreas de sus hospedantes y se puede encontrar presente y sobrevivir en las semillas de la cosecha anterior. Una vez que afecta la planta, se produce un retraso en el crecimiento, hinchamiento y a menudo se arquean los tallos y otras partes aéreas. Los síntomas incluyen deformación de hojas o zonas similares a

ampollas superficiales. Las hojas crecen en forma desordenada y con frecuencia cuelgan como si estuvieran marchitándose, presentándose una clorosis y en consecuencia plantas infectadas pueden llegar a morir (Kerkoud *et al.*, 2007).

En el cultivo del ajo (*Allium sativum* L.), *D. dipsaci* causa amarillamiento de las hojas y provoca daños a la placa basal del bulbo causando la muerte, en este caso no provoca deformación ni hinchazón. En fresa (*Fragaria ananassa* L.), *D. dipsaci* produce síntomas muy similares a los causados por los nematodos foliares (*Aphelenchoides* spp.), por lo que los nematodos deben ser extraídos y ser identificados a partir del tejido infectado para confirmar su diagnóstico. En algunas variedades de alfalfa (*Medicago sativa* L.) afectadas por este nematodo puede aumentar la gravedad de la marchitez bacteriana, causada por *Clavibacter michiganensis* (Shurtleff y Averte, 2000).

El nematodo *Ditylenchus angustus* es una especie ectoparásito en los tejidos jóvenes y tiernos del arroz (*Oryza sativa* L.). Durante el período húmedo, pocos días después de la plantación emigra del suelo a la planta, subiendo a lo largo del tallo de las plantas jóvenes e invadiendo los brotes terminales en la zona de crecimiento. Al poco tiempo puede encontrarse en los tallos jóvenes por encima del primer nudo, más tarde en la vaina de las hojas, en el tallo y finalmente en los pedúnculos, las panículas y alrededor de las semillas jóvenes (Kerkound *et al.*, 2007) donde se enrolla y se inactiva formando masas algodonosas. En condiciones de sequía se encuentra en estado de anhidrobiosis entre los restos de cosechas anteriores, pudiendo sobrevivir durante al menos 15 meses. Los nematodos rápidamente se activan cuando se inundan los campos de arroz en la temporada siguiente. La temperatura óptima para que produzca la infección es entre 20-30 °C, y alta humedad relativa, mientras que si el arroz crece en la estación seca con temperaturas más bajas la migración y reproducción del parasito se atenúa o se detiene (Seshadri y Dasgupta, 1975).

Los primeros síntomas del ataque de *D. angustus* son clorosis y rompimiento en tiras de las hojas superiores que posteriormente adquieren un color blanquecino y un amarillamiento de la nervadura central. Las hojas afectadas presentan malformaciones, enrollamiento y frecuentemente tienen el margen ondulado. Cuando los ataques son severos, la panícula

puede permanecer encerrada entre las hojas. Las panículas afectadas tienen el pedúnculo decolorado y solo se producen granos normales en las zonas apicales (Escuer, 1998).

En lo que respecta a la especie *Ditylenchus destructor*, éste es un endoparásito migratorio, que infesta mayoritariamente las partes subterráneas de las plantas como tubérculos, estolones, rizomas y bulbos, pero también puede invadir las partes aéreas y causar enanismo, arrollamiento y decoloración de las hojas. Si la infestación es severa y se extiende puede llegar a morir la planta, aunque muy a menudo los síntomas de infestación solo se ven en las partes subterráneas de la planta. En las raíces y rizomas causa lesiones necróticas de color castaño oscuro. En el tulipán (*Tulipa gesneriana* L.) la infestación se inicia en la base del bulbo y se extiende hasta las partes aéreas produciendo lesiones amarillentas o pardas. Si bien *D. destructor* es similar a *D. dipsaci* en el rango de hospedantes, esta especie no tiene un estado de resistencia como sucede con *D. dipsaci*. En ausencia de plantas superiores *D. destructor* se desarrolla y sobrevive alimentándose de estructuras fungosas (Escuer, 1998).

1.1.5.2.3 ESPECIES DEL GÉNERO *Ditylenchus*

Las especies del género *Ditylenchus* son:

Ditylenchus acuminatus, *D. acutatus*, *D. acutus*, *D. africanus*, *D. alli*, *D. alliphilus*, *D. allocotus*, *D. amsinckiae*, *D. anchiliposoma*, *D. angustus*, *D. apus*, *D. australiae*, *D. brevicauda*, *D. brevicauda*, *D. citri*, *D. clavicaudatus*, *D. daunia*, *D. destructor*, *D. dipsaci*, *D. domesticus*, *D. equalis*, *D. exilis*, *D. falcariae*, *D. filenchulus*, *D. filicauda*, *D. filimus*, *D. flagellicauda*, *D. flagellicauda*, *D. fragariae*, *D. geraerti*, *D. gigas*, *D. hexaglyphus*, *D. intermedius*, *D. kheirii*, *D. kischkeae*, *D. leptosoma*, *D. longicauda*, *D. longimatrixalis*, *D. major*, *D. maleki*, *D. medicaginis*, *D. microdens*, *D. myceliophagus*, *D. myceliophagus*, *D. obesus*, *D. phloxidis*, *D. phyllobius*, *D. protensus*, *D. radicolica*, *D. silvaticus*, *D. sonchophila*, *D. taylori*, *D. tenuis*, *D. terricola*, *D. terricolus*, *D. trifolii*, *D. trifolii*, *D. triformis*, *D. valveus*, *D. valveus*, *D. varaprasadi* (CABI, 2013).

1.1.5.2.4 HOSPEDANTES DEL GÉNERO *Ditylenchus*

El género *Ditylenchus* destaca por afectar a más de 500 especies de plantas diferentes, incluyendo malezas. Los principales hospederos son haba (*Vicia faba* L.), ajo (*Allium sativum* L.), alfalfa (*Medicago sativa* L.), maíz (*Zea mays* L.), narciso (*Narcissus bulbocodium*), avena (*Avena sativa* L.), cebolla (*Allium cepa* L.), puerro (*Allium porrum*), fresa (*Fragaria ananassa* L.), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), chicharo (*Pisum sativum* L.), centeno (*Secale cereale*), papa (*Solanum tuberosum* L.), por mencionar solo algunos (Sturhad y Brzeski, 1991).

Existen especies de *Ditylenchus* que tienen una gama de hospederos más limitado. En el caso de *D. africanus* afecta al cultivo de cacahuete (*Arachis hypogaea* L.). La especie de *D. destructor* ataca principalmente a la papa (*Solanum tuberosum*), pero también puede encontrarse en zanahoria (*Daucus carota*), trébol (*Trifolium* spp.), ajo (*Allium sativum* L.). La especie de *D. angustus* tiene una distribución restringida donde solo llega a parasitar a especies cultivadas y silvestres de arroz (Moens y Perry, 2009).

1.1.5.3 GÉNERO *Subanguina* Paramonov, 1967

El género *Subanguina* o *Mesoanguina* presenta adultos de la primera generación en forma curvada al relajarlo en calor, las siguientes generaciones son de menor tamaño. La mayoría de las especies producen agallas aéreas con cavidad interna bien desarrolladas de plantas dicotiledóneas, principalmente en especies de la familia Asteraceae, Boraginaceae y Plantaginaceae (Nickle, 1991).

1.1.5.3.1 DIAGNÓSTICO

Los nematodos del género *Subanguina* son de gran tamaño (1-2 mm), las hembras maduras son vermiformes y robustas que generalmente adoptan una forma curvada, el bulbo medio valvulado y el istmo puede estar separado de la región glandular por una constricción. Las glándulas esofágicas pueden o no estar sobrepuestas al inicio del intestino; los oocitos se encuentran en una o dos hileras. El útero se encuentra columnado con cuatro largas hileras

de células (entre 8 y 12 células por fila). El testículo generalmente se encuentra sin flexiones. La bursa es de tamaño medio o largo, pero sin llegar a la punta de la cola (Fortuner y Maggenti, 1987).

1.1.5.3.2 BIOLOGÍA DEL GÉNERO *Subanguina*

El nematodo *Subanguina radicola* es un parásito de la cebada y pastos como *Poa annua*, *P. pratensis* y *Agrostis stolonifera* L. cv. *Providence*, agente ocasional de agallas radiculares dentro de 2 cm superiores del área radicular de estos pastos (Mitkowski, 2003; Mitkowski, 2007). El ciclo de vida de *S. radicola* a 25 ° C y periodos de 16 hrs luz, la oviposición ocurre dentro de los primeros 13 días y eclosionan después de 22 días. Una generación se completa a los 30 días. El hecho de que los J3 salen de las agallas y en el estadio J4 es la primera etapa presente en las agallas de reciente formación, hace especular que la inducción de la formación de agallas se produce desde el exterior por procesos pre infecciosos del J4 y que más tarde infecta y se desarrolla dentro de la agalla (Magnusson y Hustad, 2012).

La especie *Subanguina picridis* es considerado como el nematodo agallador foliar de *Acroptilon repens* L. El ciclo de vida de *S. picridis* ha sido descrito por Ivanova (1966) y Watson (1986). El segundo estadio (J2) infectivo penetra en los tejidos meristemáticos del ápice y en las axilas de las hojas de los brotes jóvenes, durante los meses de marzo-abril. Las agallas pueden presentarse en hojas, tallos y la corona de la raíz de las plantas infectadas por un periodo de 30 días aproximadamente. El juvenil (J3) se alimenta, madura, y se reproducen dentro de las agallas, produciendo dos generaciones durante la temporada de crecimiento. A medida de que las plantas huéspedes comienzan a envejecer, los juveniles detienen el desarrollo y entran en un estado de anhidrobiosis permaneciendo viables durante muchos años dentro de agallas secas.

1.1.5.3.3 ESPECIES DEL GÉNERO *Subanguina*

La especies del género *Subanguina* son: *Subanguina balsamophila*, *S. calamagrostis*, *S. caricis*, *S. centaureae*, *S. chartolepidis*, *S. chilensis*, *S. chrysopogoni*, *S. cousinae*, *S. ferulae*, *S. graminophila*, *S. kopetdaghica*, *S. millefolii*, *S. mobilis*, *S. montana*, *S. moxae*, *S. pharangii*, *S. picridis*, *S. plantaginis*, *S. polygoni*, *S. radicolica*, *S. spermophaga*, *S. tridomina*, *S. varsobica* (CABI, 2013).

1.1.5.3.4 HOSPEDANTES DEL GÉNERO *Subanguina*

Se ha registrado que el género *Subanguina* ataca a gramíneas y asteráceas principalmente. Destacan los hospederos *Agrostis stolonifera* L. cv. *Providence*, *Poa annua* y *Poa pratensis* (Mitkoski y Jackson, 2006; Mitkowski, 2007), *Achillea millefolium* L., *Acroptilon repens* L., *Artemisia asiática*, *Arctotheca caléndula*, *Guizotia abyssinica*, *Balsamorhiza macrophylla*, *Amsinckia intermedia* (Nickle, 1991).

1.1.5.4 GÉNERO *Orrina* Brzeski, 1981

El nematodo *Orrina phyllobia* es considerado como un parasito obligado y forma agallas sobre las hojas, utilizado como un potencial método de control biológico del trompillo *Solanum elaeagnifolium* (Nickle, 1991).

1.1.5.4.1 DIAGNOSTICO DEL GÉNERO *Orrina*

Estos nematodos poseen el cuerpo delgado los cuales mide 1 mm de largo aproximadamente, la región ventral se adopta una forma arqueada cuando está relajado. Presentan un campo lateral estrecho con cuatro incisuras. Región labial plana, en forma de tapón. El corpus tiene forma cilindroide y ausencia de bulbo medio. La glándula esofágica se sobrepone al intestino. Con ovario extendido, oocitos en una o dos filas, y bursa subterminal. El cuarto estadio juvenil es la etapa infecciosa de este nematodo (Siddiqi, 2000).

1.1.5.4.2 BIOLOGÍA DEL GÉNERO *Orrina*

Las lesiones ocasionadas por el nematodo *Orrina* suelen ser evidentes después de 10 a 14 días. Las agallas se producen en las superficies de las hojas donde ocurre el aumento de tamaño, y a menudo se enrosca toda la superficie. Miles de nematodo se pueden encontrar en una sola agalla. Las plantas muy infectadas son severamente dañadas o incluso pueden llegar a morir (Krall, 1991).

1.1.5.4.3 ESPECIES DEL GÉNERO *Orrina*

La única especie que comprende este género es *Orrina phyllobia* (= *Ditylenchus phyllobius*) (Krall, 1991).

1.1.5.4.4 HOSPEDANTES DEL GÉNERO *Orrina*

El nematodo *Orrina phyllobia* es específico de la maleza conocida comúnmente como trompillo *Solanum elaeagnifolium* (Krall, 1991).

1.1.6 TAXONOMÍA MODERNA

El método más ampliamente usado para describir especies es a través de la comparación y descripción de caracteres morfológicos cualitativos que es lo que se conoce como *concepto morfológico de especie*. Cada especie es representada por un binomio linneano que hace referencia a un espécimen o un conjunto de ellos (holotipo o sintipos). Las descripciones originales actúan como la fuente científica de cada hipótesis, ya que incluyen la descripción morfológica original (evidencias), la designación de tipos y la denominación de la especie. Estas hipótesis son testables y modificables mediante el estudio y comparación de los tipos y el estudio de la variabilidad de los caracteres en ejemplares (Wheeler, 2004) sin embargo existen un gran número de conceptos de especie que toman en cuenta aspectos de reproducción, adaptación, genealogía, etc.

1.1.7 TAXONOMÍA INTEGRATIVA

En la mayoría de los estudios taxonómicos tradicionales no se articula el concepto de especie ni se especifican los criterios operacionales que servirán para la delimitación de esas especies. Si bien existen un gran número de conceptos, el concepto filogenético de especie según Wheeler y Platnick (2000) donde establece que una especie es definida como “*la más pequeña agregación poblacional (sexual) o linaje (asexual) que es diagnosticable por una combinación única de caracteres*” es la que más se acerca a la realidad en la tarea del descubrimiento de nuevas especies y su diagnóstico. Para abordar este concepto, es recomendable utilizar la estrategia de la taxonomía integrativa propuesta por DeSalle *et al.*, 2005 que implica el uso multidisciplinario para comprobar una hipótesis en la delimitación y/o diagnóstico de especies.

Una taxonomía con un enfoque integrativo puede combinar de manera efectiva las fortalezas de la taxonomía tradicional basándose en la morfología y los enfoques basados en características moleculares (DNA), así como otros parámetros como geografía, fisiología, etc., lo que permitirá resolver los problemas de delimitación de las especies (Riedel *et al.*, 2013).

En los últimos años, se han propuesto los marcadores moleculares como códigos de barras para la secuenciación de organismos metazoarios, varios autores subrayan la importancia de un enfoque de código de barras de DNA sobre la base de múltiples marcadores. Los genes mitocondriales y ribosomales se utilizan a menudo ya que son fáciles de amplificar, tiene una buena sinapomorfias y una gran cantidad de secuencias disponibles en base de datos (Ferri *et al.*, 2009).

Existe un amplio número de estudios de taxonomía con un enfoque integral para delimitar y diagnosticar especies del Phylum Nematoda (Handoo *et al.*, 2014; Vovlas *et al.*, 2013). Un estudio realizado a través de un análisis filogenético para determinar las relaciones evolutivas de especies pertenecientes al orden Tylenchida evaluadas mediante el uso de caracteres morfológicos y datos de la secuenciación de los fragmentos de expansión D2 y D3 de los genes del RNA ribosomal 28S permitió resolver la incongruencia entre la clasificación basada en la morfometría y la filogenia molecular (Subbotin *et al.*, 2006).

1.1.8 VARIABILIDAD GENÉTICA Y FILOGENIA DE LA FAMILIA ANGUINIDAE

La identificación de anguinidos de importancia agronómica y de cuarentena, se ha realizado a través de identificación molecular en la región del ITS1 del rDNA. El empleo de esta región en un estudio de filogenia sugiere que existe una considerable diversificación genética en este grupo de nematodos, acompañado a la especialización en diferentes especies de hospederos (Powers *et al.*, 2001).

Los estudios de las relaciones filogenéticas en nematodos de la familia Anguinidae han tomado importancia en los últimos años debido a que explican las relaciones genéticas entre especies a través de un análisis en conjunto de características morfológicas y genotípicas. Un estudio reveló que secuencias de los segmentos de expansión D2 y D3 del gen 28S rDNA de nematodos endoparásitos *Ditylenchus dipsaci* y *D. destructor*, comparados con otros anguinidos agalladores de semillas y follaje, confirmaron que existe una estrecha relación genética de *D. dipsaci* con el grupo de nematodos agalladores de la subfamilia Anguininae (*Anguina*, *Heteroanguina*, *Mesoanguina* y *Subanguina*) al mismo tiempo se determinó que *D. dipsaci* y *D. destructor* muestran una gran distancia genética entre estas dos especies de importancia económica a pesar de estar morfológicamente relacionadas (Douda *et al.*, 2013).

Otros ejemplos relacionados a la delimitación de nuevas especies a través de un sistema integrativo es el caso de *Ditylenchus gallaeformans* que es un nematodo agallador de follaje de malezas (Familia Melastomataceae). La delimitación se llevó a cabo mediante el análisis morfométricos utilizando microscopía de luz y electrónica de barrido, así como el análisis molecular. Este último consistió en la amplificación del gen 18S rRNA, y la región ITS1-5.8-ITS2 del rDNA. El análisis filogenético de *D. gallaeformans* como nueva especie reveló una estrecha relación genética con la especie *Ditylenchus drepanocercus* (Oliveira *et al.*, 2012). Por otro lado, estudios morfométricos y moleculares de la especie *Anguina woodi*, un nematodo agallador de semillas de *Ehrharta villosa* mediante la amplificación del gen 18S (parcial), ITS1, gen 5.8, ITS2 y el gen 28S (parcial) demostró que *A. woodi* es una nueva especie y que tiene una relación muy estrecha morfológica, morfométrica y molecular con *A. australis* (Swart *et al.*, 2004).

1.2 MARCO DE REFERENCIA

1.2.1 IMPORTANCIA AGRÍCOLA Y PECUARIA DE LA FAMILIA ANGUINIDAE

Las especies de la familia Anguinidae son consideradas de importancia dentro de los agroecosistemas, esto por su papel en la reducción de pérdidas en los rendimientos de los cultivos, en la transmisión de enfermedades las cuales pueden tener un impacto directo en la actividad pecuaria y por su relevancia en el control biológico de malezas. El impacto directo de *Anguina funesta* además de afectar los pastos, es la muerte del ganado como producto del consumo de semillas infectadas con el nematodo y las pérdidas de producción causadas por *corynetoxin* un compuesto tóxico producido por la bacteria *Rathayibacter toxicus* estrechamente asociada a *A. funesta*. En Australia se estima que cada año mueren 30,000 ovejas y varios cientos de cabeza de ganado bovino. El peor registro fue documentado en 1991, cuando 80,000 ovejas murieron (Roberts *et al.*, 1994). Además de los efectos sobre el ganado, las pérdidas por *A. funesta* tiene otros impactos económicos, como los costos de las medidas de control y los costos de las pruebas realizadas para la detección de *Rathayibacter toxicus*, para la exportación de la producción de heno en Australia (Riley y Barbetti, 2008).

El nematodo agallador del trigo *Anguina tritici* es uno de los nematodos fitoparásitos de gran importancia transmitidos por semilla botánica de la familia Anguinidae. Las espigas de trigo totalmente infestadas con este nematodo pueden presentar 100% de pérdidas en la formación del grano. Algunas pérdidas parciales ocasionadas por *A. tritici* varían de 53.4% y 51% en la reducción de peso de los granos (Paruthi *et al.*, 1987). En plántulas se presentan pérdidas de hasta el 90%, además de que con un 8.5% de semillas agalladas en semilla para siembra y diseminadas en los campos de cultivo de trigo, resultan en 70% de pérdidas (Reddy, 1983). El nematodo *A. tritici* puede causar pérdidas en cultivos de la cebada en países del tercer mundo en donde hay malas prácticas agrícolas, monocultivo y uso de semillas para siembra de mala calidad (Anwar *et al.*, 2001).

Por otro lado, el nematodo *Anguina pacificae* se ha convertido en un factor muy importante que afecta la calidad, producción y mantenimiento de césped de campos de golf. Esta especie es la plaga más devastadora de pasto *Poa annua* en los campos de golf en el norte

de California de los Estados Unidos en donde asociaciones profesionales de golf han gastado miles de dólares en los intentos infructuosos del control de esta especie de plaga (McClure y Schmitt 2012).

En el oeste y sur de Australia, el nematodo *Anguina agrostis* causa agallas en ryegrass anual o pasto ballico (*Lolium rigidum*) y es vector de la bacteria *Clavibacter (Corynebacterium) rathayi*. Cuando las plantas infectadas son consumidas por el ganado, existe una intoxicación en los animales, causando una enfermedad conocida como toxicidad anual del pasto ryegrass. La bacteria infesta las agallas produciendo toxinas localizadas principalmente en las paredes de la agallas. Si el ganado consume cerca de 1000 agallas, puede llegar a ocasionar la muerte. La industria cárnica en Australia estuvo preocupada por el gran número de muertes de cabezas de ganado al alimentarse de pasto infestado por lo que el gobierno Australiano autorizó grandes sumas de dinero destinadas a la investigación de este problema (Stynes y Bird, 1980).

El género *Ditylenchus* comprende muchas especies, de las cuales cinco se conocen actualmente como importantes plagas en los cultivos, *Ditylenchus dipsaci*, *D. destructor*, *D. angustus*, *D. africanus* y *D. gigas*. El nematodo foliar o de los bulbos *D. dipsaci* es un endoparásito migratorio que afecta más de 500 especies de angiospermas, incluyendo muchas malezas (EPPO, 2008). Sin medidas de control, este nematodo puede causar grandes pérdidas en cultivos de ajo, cebolla, papa, cereales, legumbres, fresas y plantas ornamentales, especialmente los bulbos de flores (Castillo *et al.*, 2007).

El nematodo de la pudrición de la papa *D. destructor*, es una plaga muy extendida y económicamente importante en el cultivo de papa considerado su principal hospedero pero puede ocasionalmente afectar ajo, alfalfa, zanahoria y algunos bulbos de ornamentales (EPPO, 2008). A diferencia con *D. dipsaci* que es una especie estrechamente relacionada, *D. destructor* no es capaz de resistir la desecación excesiva, y por esta razón es una plaga importante en suelos frescos y húmedos (Marek *et al.*, 2010).

El nematodo agallador de solanáceas *Orrina phyllobia* es de interés económico debido a su potencial uso como agente de control biológico de la solanácea *Solanum elaeagnifolium* el cual es una especie de maleza perenne de particular importancia en la producción de algodón (Sturhan y Brzeski, 1991).

1.2.3 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA FAMILIA ANGUINIDAE

El nematodo agallador *A. tritici* se encuentra presente en varios países a nivel mundial entre los que destacan: Egipto, Etiopía, Brasil, Estados Unidos (Georgia, Maryland, Carolina del Norte, Carolina del Sur, Virginia y Este de Virginia), Afganistán, China (Anhui, Guizhou, Hebei, Jiagsu, Shandong, Zhejiang), India (Bihar, Dehi, Haryana, Jammu, Madhya, Punjab, Rajasthan y Uttar Pradesh), Iran, Irak, Israel, Corea, Paquistán, Arabia Saudita, Siria, Taiwán, Austria, Azerbaiyán, Bulgaria, Croacia, Chipre, Francia, Alemania, Grecia, Hungría, Irlanda, Italia, Lituania, Holanda, Polonia, Rumania, Rusia, Serbia, España, Suiza, Suecia, Turquía, Ucrania, Inglaterra, Australia, Nueva Zelanda (EPPO, 2010).

El nematodo de los pastos *A. agrostis* se encuentra distribuida en Alemania, Canadá, Estados Unidos, China, Kirguistán, Republica Checa, Estonia, Eslovaquia, Finlandia, Georgia, Inglaterra, Irlanda, Holanda, Noruega, Polonia, Rusia, Ucrania (EPPO, 2010). La distribución de *A. funesta* solo se ha reportado en Australia (Riley y Barbetti, 2008).

La distribución mundial de *Subanguina radicola* comprende los países de Alemania, Arabia Saudita, Argentina, Bulgaria, Canadá, China, Ecuador, Estados Unidos, Estonia, Holanda, India, Inglaterra, Irlanda, Nueva Zelanda, Noruega, Polonia, Rumania, Rusia, Serbia y Ucrania (CABI, 2013).

En lo que respecta al nematodo foliar y de los bulbos *Ditylenchus dipsaci* incluye los países de Albania, Alemania, Argelia, Argentina, Australia, Azerbaiyán, Bélgica, Bielorrusia, Bolivia, Bosnia-Herzegovina, Brasil, Bulgaria, Canadá, Chile, China, Chipre, Colombia, Corea, Costa Rica, Croacia, Dinamarca, Ecuador, Eslovaquia, Eslovenia, España, Estados Unidos, Estonia, Finlandia, Francia, Georgia, Grecia, Haití, Holanda, Hungría, Inglaterra, Irán, Irak, Irlanda, Islandia, Israel, Italia, Japón, Jordania, Kazajistán, Kenia, Kirguistán, Letonia, Lituania, Macedonia, Malta, Marruecos, México, Moldavia, Nueva Zelanda, Noruega, Omán, Pakistán, Paraguay, Perú, Polonia, Portugal, República Dominicana, Rumania, Rusia, Serbia, Siria, Sudáfrica, Suecia, Suiza, Túnez, Turquía, Uruguay, Ucrania, Uzbekistán, Uruguay, Venezuela, Yemen (CABI, 2013).

En relación al nematodo de la pudrición seca de la papa *D. destructor*, éste se encuentra distribuido en países como Albania, Alemania, Arabia Saudita, Australia, Azerbaiyán,

Bélgica, Bielorrusia, Bulgaria, Canadá, China, Corea, Ecuador, Eslovaquia, Estados Unidos, Estonia, Finlandia, Francia, Grecia, Holanda, Hungría, Inglaterra, Irán, Japón, Kazajistán, Kirguistán, Lituania, Luxemburgo, Moldavia, México, Nueva Zelanda, Noruega, Pakistán, Perú, Polonia, Rumania, Rusia, Sudáfrica, Suecia, Suiza, Tayikistán, Turquía, Ucrania y Uzbekistán. Mientras que, la distribución de *D. angustus* se encuentra en Asia (Birmania, Filipinas, India, Indonesia, Malasia, Tailandia y Vietnam) y en África en el país de Madagascar. El nematodo foliar del cacahuete *D. africanus* se localiza en países del continente africano como son Mozambique y Sudáfrica (CABI, 2013).

El nematodo gigante del tallo *Ditylenchus gigas* se encuentra en países como España, Irán, Italia y Líbano (Vovlaset *al.*, 2011). El nematodo agallador *Orrina phyllobia* se encuentra distribuido en los estados de Texas y Arizona en los E.U. y en el sur de la India (Sturhan y Brzeski, 1991).

1.2.4 REGULACIÓN FITOSANITARIA DE LA FAMILIA ANGUINIDAE

Algunas especies de anguinidos están reguladas por las diferentes agencias de sanidad vegetal. En Europa están regulados por la European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO), entre las especies que se encuentran reguladas como de cuarentena están *Anguina tritici*, *Anguina agrostis* y *Subanguina radicolica*. Entre las especies que se encuentran reglamentadas no cuarentenadas se encuentran *Anguina pratensis*, *A. funesta*, *Anguina* sp. *A. agropyi*, *Subanguina hyparnheniae* y *Subanguina chilensis* (Singh, 2013).

En México la agencia que se encarga de regular los artrópodos, enfermedades y malezas exóticas es el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) para lo cual, existen normas oficiales mexicanas (NOM's) que tienen la finalidad de evitar la introducción y propagación en territorio mexicano (SENASICA, 2013).

La Norma Oficial Mexicana NOM-017-FITO-1995. Por lo que establece la cuarentena exterior para prevenir la introducción de plagas de trigo (*Triticum aestivum*) prohíbe la introducción de trigo infectado con *Anguina tritici* ya que es una plaga cuarentenaria en este cultivo (DOF, 1995). Existe también el proyecto de norma PROY-NOM-029-FITO-

2002, que establece los requisitos y especificaciones fitosanitarios aplicables a semillas para siembra, de importación en las que incluye las especies de *Anguina tritici* y *Anguina agrostis* (DOF, 2002).

Algunos otros géneros y especies de anguinidos como *D. dipsaci* y *D. destructor* se encuentran regulados por la Organización Norteamericana de Protección de las Plantas (NAPPO), en la Norma Regional de Medidas Fitosanitarias NRMF No. 3 Movilización de papa hacia un país miembro de la NAPPO. A nivel de México, este nematodo está regulado en todas las variantes de papa *S. tuberosum* en las NOM-012-FITO-1996, la NOM-025-FITO-2000 y la NOM-041-FITO-2002 (SENASICA, 2013). Existen también las especificaciones del Módulo de Requisitos Fitosanitarios de importación establecidos por SENASICA (<http://sistemas.senasica.gob.mx/mcrfi/>).

1.2.5 LA FAMILIA ANGUINIDAE EN MÉXICO

Como se mencionó en un inicio, son muy pocas las referencias en relación a la presencia de especies de anguinidos en nuestro país. Destaca el brote del nematodo agallador del trigo *A. tritici* a principios de la década de los 80's en Baja California afectando *Triticum aestivum* var. Nacozari, (Nieto y Delgado, 1984). Por otro lado, en los estados de Guanajuato, Aguascalientes, Zacatecas y Durango se ha reportado a *Ditylenchus dipsaci* afectando ajo y cebolla (Velásquez *et al.*, 2007).

En el año 2006, en el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRFS-SENASICA), se realizó la identificación de dos poblaciones de anguinidos mediante morfotaxonomía de machos, hembras y juveniles (J2), y un análisis molecular mediante la Reacción de la Cadena de Polimerasa (PCR). Los nematodos que se identificaron fueron *Anguina* spp. que ataca a las semillas de pasto *Aristida divaricata* en el municipio de Huamantla, Tlaxcala, y la segunda especie identificada fue *Anguina tritici* que es un nematodo agallador del trigo. Los resultados obtenidos mediante el análisis de la PCR mostro un fragmento amplificado (ITS1) de 550 pares de bases (pb) para *Anguina tritici* y en el caso de *Anguina* sp. se obtuvo 570 pb. Concluyeron que *Anguina* spp. en pasto no tenía correlación morfológica y

molecular con otras especies ya descritas, por lo que se podría tratar de una especie aun no reportada (Romero,2006).

La Universidad Autónoma Chapingo en conjunto con SENASICA cuenta con registros sobre poblaciones de nematodos de la familia Anguinidae que están causando daños a diferentes huéspedes, entre los que se encuentran; en pasto (*Aristida divaricata*) en el municipio de Huamantla Tlaxcala;trompillo (*Solanum elaeagnifolium*), en el municipio de San Luis la Paz, Guanajuato;trigo (*Triticum aestivum* L.) en el municipio de Mexicali, Baja California; ageratum (*Ageratum conyzoides.*) en los municipios de en el municipio de, Calpulalpan, Españaíta, Huamantla Ixtenco, Terrenate, estado de Tlaxcala; alfalfa (*Medicago sativa*) en el municipio de Atoyac Jalisco. Considerando estas poblaciones, sería importante determinar el estatus taxonómico de las poblaciones antes mencionadas y de esta manera tener una visión más clara de la situación de la familia Anguinidae en México.

1.3 LITERATURA CITADA

Anwar, S.A., McKenry, M.V., Riaz, A. and Khan, M.S.A. (2001). Evaluation of wheat cultivars for *Anguina tritici* resistance, development and influence of nematode on wheat growth. *International Journal of Nematology* 11:150-156.

CABI. (2010). CAB International. Crop Protection Compendium. Wallingford, UK. CAB International.

CABI Thesaurus. (2013). <http://www.cabi.org/cabthesaurus>.

CABI. (2014). *Ditylenchus destructor*. Invasive Species Compendium. Available online: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/19286>.

Carta, L.K., Hando, Z. A., Powers, T.O., Miller, S A., Pérez Z.R. and Ramirez, S.A. (2005). Guidelines for isolation and identification of regulated nematodes of potato (*Solanum tuberosum* L.) in North America. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:211-222.

Castillo, P., Vovlas, N., Azpilicueta, A., Landa, B.B. and Jimenez-Diaz, R.M. (2007). Host-parasite relationships in fall-sown sugar beets infected by the stem and bulb nematode, *Ditylenchus dipsaci*. *Plant Disease* 91; 71–9.

Chizhov, V. and Subbotin, S. (1985). Revision of the nematode subfamily Anguininae (Nematoda, Tylenchida) on the basis of their biological characteristics. *Zoologicheskyy Zhurnal* 64 1476-1486.

Decraemer, W. and Hunt, D.J. (2006). Structure and classification. In: Perry RN, Moens M. Plant nematology. CAB International, Wallingford, pp 3–32.

De Ley, P., W. Decraemer and Eyualem-Abebe. (2006). Introduction: Summary of present knowledge and research addressing the ecology and taxonomy of freshwater nematodes. pp. 3-30. In FRESHWATER NEMATODES Ecology and Taxonomy. Eds. Eyualem-Abebe, I. Andrassy and W. Traunspurger. CAB International, UK, 752 pp.

DeSalle, R., M.G. Egan, and M. Siddall. (2005). The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*

360:1905-1916.

DOF. (1995). Norma Oficial Mexicana NOM-017-FITO-1995. Por la que se establece la cuarentena exterior para prevenir la introducción de plagas de trigo. <http://www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento>.

DOF. (2002). PROY-NOM-029-FITO-2002, Requisitos y especificaciones fitosanitarias aplicable a semillas para siembra, de importación. <http://www.cofemerir.gob.mx/.../2544.59.59.1.PROY-NOM-029-FITO-2002>

Douda, O., Marek, M., Zouhar, M. and Rysanek, P. (2013). Insights into the structure and phylogeny of the 28 rRNA expansion segments D2 and D3 of the plant-infecting nematodes from the genus *Ditylenchus* (Nematoda: Anguinidae). *Phytopathologia Mediterranea* 52:84-97.

Duncan, C.L. (2001). Knapweed management: another decade of change. In: Smith, Lincoln, ed. Proceedings, 1st international knapweed symposium of the 21st century; 2001 March 15-16; Coeur d'Alene, ID. Albany, CA: U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, pp 1-7.

EPPO. (2008). *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus dipsaci*. EPPO Bulletin 38, 363-373.

EPPO. (2010). Plant Quarantine Retrieval System (PQR). Version 3.10. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO).

Escuer, M. (1988). Nematodos del género *Ditylenchus* de interés fitopatológico. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas 24:773-786.

Ferri, M., Barbuto, M., Bain, O., Galimberti, A., Uni, S., Guerrero, R., Ferte, H., Bandi, C., Martin, C. and Casiraghi M. (2009). Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). *Frontier in Zoology* 6:1.

Field, R.P., Kwong, R.M. and Sagliocco, J.L. (2009). Host Specificity of *Ditylenchus phyllobius*, a Potential Biological Control Agent of Silver-Leaf Nightshade (*Solanum*

elaeagnifolium Cav.) in Australia [online]. *Plant Protection Quarterly*, Vol. 24, No. 4:141-145.

Fortuner, R. and Maggenti, A.R. (1987). A reappraisal of Tylenchina (Nemata). 4. The family Anguinidae Nicoll. 1936 (1926) *Revue Nématol* 10:163-176.

Gupta, P. and Swarup, G. (1972). Ear-cockle and yellow ear-rot disease of wheat. Nematode bacterial association. *Nematologica* 18:320-324.

Handoo, Z.A., Palomares-Rius, J.E., Cantalapiedra-Navarrete, C., Liébanas, G., Subbotin, S. A. and Castillo, P. (2014). Integrative taxonomy of the stunt nematodes of the genera *Bitylenchus* and *Tylenchorhynchus* (Nematoda, Telotylenchidae) with description of two new species and a molecular phylogeny. *Zoological Journal of the Linnean Society* 172:231-264.

Ivanova, T.S. (1966). Biological control of mountain bluet (*Acroptilon picridis* C.A.M.). (In Russian.) *Izvestiya Akademii Nauk Tadzhikskioi USSR* 2:51-63.

Karssen, G., Blok, R.J., van Aelst, A.C., van den Beld, I., Kox, L.F.F., Kerthals, G., Molendijk, L., Zijlstra, C., van Hoof, R. and Cook, R. (2004). Description of *Meloidogyne minor* n.sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode associated with yellow patch disease in golf courses. *Nematology* 6:59-72.

Kerkoud M, Esquibet M, Plantard O, Avrillon M, Guimier C, Franck M. (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.

Kleynhans, K., P., N., van den Berg, E., Swart, A., Marais, M. and Buckley, N., H. (1996). Plant nematodes in South Africa. Pretoria: Business Print, 164 pp.

Krall, L.E. (1991). Wheat and Grass Nematodes: *Anguina*, *Subanguina* and Related Genera. Manual of Agricultural Nematology. Marcel Dekker. INC. E.U.A., pp 721-760.

Lehman, P.S. (1981). Three species of dagger nematodes pathogenic to citrus. Division of Plant Industry, Florida Department of Agriculture and Consumer Services. Nematology Circular, N° 81.

Luc, M., Sikora, R., A., Bridge, J. (2005). Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Editor CABI. Wallingford, UK.

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.

McClure, M.A., and Schmitt, M.E. (2012). A method for screening candidate nematicides against the Pacific shoot-gall nematode, *Anguina pacifica*. *Nematropica* 42:146-152.

McClure, M.A., Schmitt, M.E. and McCullough, M.D. (2008). Distribution, biology and pathology of *Anguina pacifica*. *Journal of Nematology* 40(3):226–239.

Mitkowski, N.A. and Jackson N. (2003). *Subanguina radícicola*. The root-gall Nematode infecting *Poa annua* in New Brunswick, Canada. *Plant Disease* 87:1263.

Mitkowski, N.A. (2007). First Report of *Subanguina radícicola*, the root-gall nematode infecting *Poa annua* putting greens in Washington State. *Plant Disease* 91:905

Moens, M., & Perry, R.N. (2009). Migratory plant endoparasitic nematodes: A group rich in contrasts and divergence. *Annual Review of Phytopathology* 47:313–332.

Nickle WR. (1991). Manual of Agricultural Nematology. Dekker, Inc., 757 pp.

Nieto, G.L. y Delgado S.S. (1984). Detección de agallas de semillas de trigo ocasionadas por el nematodo *Anguina tritici* localizadas en el estado de Baja California Norte. XI Congreso Nacional de Fitopatología. San Luis Potosí. Resumen 94.

Oliveira, D.R., Santin, M.A., Seni, J.D., Dietrich, A., Salazar, A.L., Subbotin, A.S., Mundo-Ocampo, M., Golgenberg, R. and Barreto, W.R. (2012). *Ditylenchus gallaeformans*

sp. n. (Tylenchida: Anguinidae) a neotropical nematode with biocontrol potential against weedy Melastomatacea. *Nematology* 15:1-18.

Paruthi, L.J., Mohinder, S. and Gupat, D.C. (1987). Quantitative and qualitative losses in wheat grains due to “earcockle” and “tundu”. *Seed Research* 15:83:86.

Powers, O.T., Szalanski, L.A., Mullin, G.P., Harris, S.T., Bertozzi, T. and Griesbach, A.J. (2001). Identification of seed gall nematodes of agronomic and regulatory concern whit PCR-RFLP of ITS1. *Journal of nematology* 33:191-194.

Reddy, P.P. (1983). Plant Nematology. Agriculture Publishing Academy New Delhi India, 287 pp.

Riedel, A., Sagata, K., Suhardjono, R.Y., Tänzler, R. and Balke, M. (2013). Integrative taxonomy on the fast track-towards more sustainability in biodiversity research. *Frontiers in Zoology* 10:15.

Riley, I.T. and McKay, A.C. (1990). Specificity of the adhesion of some plant pathogenic microorganisms to the cuticle of the nematodes in the genus *Anguina* (Nematoda: Anguinidae). *Nematologica* 36:90–103.

Riley, I.T. and Barbetti, M.J. (2008). Australian anguinids: Their agricultural impact and control. *Australian Plant Nematology* 37:289-297.

Roberts, W.D., Mlodawski, G., Macdonagh, A., Gibson, R., Bucat, J. (1994). The distribution of annual ryegrass toxicity in Western Australia. In ‘Plant associated toxins: agricultural, phytochemical and ecological aspects’. CAB International: Wallingford, UK.

Romero, C.R. (2006). Estandarización de la PCR para identificación del nematodo agallador del Trigo *Anguina Tritici* y caracterización morfológica y molecular de *Anguina* sp. de pasto de Tlaxcala, México. Tesis Profesional. UACH.Méx., 53 pp.

Saleh, H.M. and Fattah, F.A. (1990). Studies of the Wheat Seed Gall Nematode. *Nematologia Mediterranea* 18:59-62.

- SENASICA. (2013). Nematodo del tallo y de los bulbos (*Ditylenchus dipsaci* Kühn, 1857). Dirección General de Sanidad Vegetal-Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México, D.F. Ficha técnica No., pp 18-24.
- Seshadri, A.R. and Dasgupta, D.R. (1975). *Ditylenchus angustus*. C.I.H. *Descriptions of Plant-parasitic Nematodes*. Vol. 5 N° 64.
- Shurtleff, M.C. and Averre, C.W. (2000). Diagnosing plant diseases caused by nematodes. APS Press, 189 pp.
- Siddiqi, M.R. (1980). The origin and phylogeny of the nematode orders Tylenchida Thorne, 1949, and Aphelenchida n. ord. *Helminthological Abstracts Series B Plant Nematology* 49:143–170.
- Siddiqi, M.R. (2000). Tylenchida parasites of plants and insect. Second Edition. Wallingford. UK. CABI Publishing, 848 pp.
- Singh, S.k., Hodda, M. and Ceniza G.J. (2013). Plant-parasitic nematodes of potential phytosanitary importance, their main hosts and reported yield losses. *Bulletin OEPP/EPPO* 43:334-374.
- Sturhan, D. and Brzeski, M.W. (1991). Stem and bulb nematodes, *Ditylenchus* spp. In: Nickle, W. R. (Ed.) *Manual of Agricultural Nematology*. New York, USA, pp 423-464.
- Stynes, B.A. and Bird A.F. (1980). *Anguina agrostis* the vector of annual rye grass toxicity Australia. *Nematologica* 26:475-490.
- Subbotin, S.A., Krall, E.L., Riley, I.T, Chizhov, V.N., Staelens, A., De Loose M. and Moens M. (2004). Evolution of the gall –forming plant parasitic nematodes (Tylenchida: Anguinidae) and their relationship whit host as inferred from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30:226-235.
- Subbotin, S.A., Sturhan, D., Chizhov, V.N., Vovlas, N. and Baldwin, J.G. (2006). Phylogenetic analysis of Tylenchida Thorne, 1949 as inferred from D2 and D3 expansion fragments of the 28S rRNA gene sequences. *Nematology* 8:455-474.

Subbotin, S.A. and Riley, I.T. (2012). Stem and gall nematodes. In: Practical Plant Nematology. (Eds. R. H. Manzanilla-López and N. Marbán-Mendoza). Biblioteca Básica de Agricultura BBA. México, pp 521-577.

Swart, A., Subbotin, S.A., Tiedt, L.R. and Riley, I.T. (2004). *Anguina woodi* sp. n. (Tylenchida: Anguinidae) from dune grass, *Ehrharta villosa*, in South Africa. *Nematology* 6:129-144.

van der Putten, W. H. and van der Stole, C.D. (1998). Plant Parasitic nematodes and spation-temporal variation in natural vegetation. *Applied Soil Ecology* 10:253-262.

Velásquez, V.R., Amador, R.A., Medina, A.M. y Lara, F.V. (2007). Presencia de patógenos en almácigos y semillas de Chile (*Capsicum annuum* L.) en Aguascalientes y Zacatecas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25:75-79.

Vovlas N., Trisciuzzi N., Troccoli A., De Luca F., Cantalapiedra-Navarrete C., Castillo P. (2013). Integrative diagnosis and parasitic habits of *Cryphodera brinkmani* a non-cyst forming heteroderid nematode intercepted on Japanese white pine bonsai trees imported into Italy. *European Journal of Plant Pathology* 135:717-726.

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.

Watson, A.K. (1986). Host range of, and plant reaction to, *Subanguina picridis*. *Journal of Nematology* 18:112-120.

Wendt, K.R., Vrain, T.C. and Webster J.M. (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.

Wheeler, Q.D. and N.I. Platnick. (2000). The phylogenetic species concept (*sensu* Wheeler and Platnick), p. 55-69. In: Wheeler, Q. D. and R. Meier (editors), Species concepts and phylogenetic theory: a debate. New York: Columbia University Press, 230 pp.

Wheeler, R.D. (2004). Taxonomic triage and the poverty of phylogeny. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 359:571–583.

Wu, L.Y. (1967). Differences of spermatheca and sperm cells in the genera *Ditylenchus* Filipjev, 1936 and *Tylenchus* Bastian, 1865 (Tylenchidae: Nematoda). *Canadian Journal of Zoology* 45:27-30.

Zhao, Z.Q., Davies, K., Alexander, B. and Riley, I.T. (2011). *Litylenchus coprosma* gen. n., sp. n. (Tylenchida: Anguinata), from leaves of *Coprosma repens* (Rubiaceae) in New Zealand. *Nematology* 13:29-44.

CAPITULO 2. CARACTERIZACIÓN TAXONOMICA Y MOLECULAR DE ESPECIES DE NEMATODOS AGALLADORES FOLIARES AFECTANDO *Ageratum conyzoides*, *Cosmos bipinnatus* Y *Bidens* spp. EN LOS VALLES ALTOS DE TLAXCALA, MÉXICO

La subfamilia Anguininae incluye algunas especies de nematodos que son considerados parásitos especializados de las plantas los cuales inducen agallas en tallos, hojas, flores, semillas (Subbotin *et al.*, 2004). Comúnmente los anguinidos inducen agallas en las partes aéreas, y solo *Subanguina radicola* es la única especie que produce agallas en la raíz. De la totalidad de 27 especies de nematodos agalladores reportadas por Krall, (1991), 15 de ellas parasitan monocotiledóneas y el resto parasitan dicotiledóneas en su enorme mayoría de la familia Asteraceae y ocasionalmente atacan plantas de otras familias. La familia Asteraceae, constituye el grupo de plantas más distribuido en todo el mundo que consta de más de 23,000 especies y 1,620 géneros (Bremer, 1994). Esta familia tiene importancia económica y ecológica ya que incluye especies de oleaginosas de gran relevancia, plantas ornamentales y especies hortícolas, así como algunas malas hierbas invasoras peligrosas en todo el mundo. Las malezas Asteraceae *Ageratum conyzoides*, *Bidens* spp. y *Cosmos bipinnatus*, se encuentran distribuidos en las zonas boscosas y áreas de cultivos en valles altos del estado de Tlaxcala y representan un problema serio en la producción agrícola. Dentro de la biodiversidad de organismos que afectan estas malezas, se encuentran los nematodos que producen deformaciones y agallas foliares. Si bien se tiene conocimiento de la presencia de dichos organismos, no se ha descrito ningún nematodo de la familia Anguinidae atacando a estas plantas en México por lo que en esta investigación se plantea la delimitación de especies asociadas con esta sintomatología. Se describe a *Subanguina tlaxcalensis* n. sp. como un nematodo agallador de las partes aéreas parasitando tallos y hojas.

2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.1 COLECTA DE MUESTRAS

Se realizó un muestreo dirigido en campo y zona boscosa a plantas de *A. conyzoides*, *Cosmos bipinnatus* y *Bidens* spp., con síntomas de agallas foliares (tabla 1), registrando las coordenadas geográficas de cada uno de los puntos de muestreo.

Tabla 1. Muestras positivas para el estudio de *Subanguina tlaxcaltensis*.

Hospedante	msnm	Coordenadas	Estado	Municipio
<i>Ageratum conyzoides</i>	2971	Latitud: 19°31'29.87"N, y Longitud: 97°53'49.10"W	Tlaxcala	Villa real
<i>Ageratum conyzoides</i>	3021	Latitud: 19°17'00.92"N, y Longitud: 98°00'17.65"W	Tlaxcala	Huamantla
<i>Ageratum conyzoides</i>	2900	Latitud: 19°29'29.13"N, y Longitud: 97°53'51.01"W	Tlaxcala	Terrenate
<i>Cosmos bipinnatus</i>	2780	Latitud: 19°36'25.04"N, y Longitud: 98°03'03.10"W	Tlaxcala	Tlaxco
<i>Bidens</i> spp	2780	Latitud: 19°36'25.04"N, y Longitud: 98°03'03.10"W	Tlaxcala	Tlaxco

2.1.2 EXTRACCIÓN DE NEMATODOS

En una caja petri con agua destilada estéril, se colocaron las agallas encontradas en el material biológico por un periodo de incubación de 24 hrs a 24°C para permitir la hidratación de los mismos. Las agallas se disectaron con unas pinzas de disección y bisturí con la finalidad de extraer los diferentes estadios de desarrollo tales como: huevecillos, juveniles del segundo estadio (J2), machos y hembras (Coney *et al.*, 2007).

2.1.3 MONTAJE Y OBSERVACIÓN DE LOS NEMATODOS EXTRAÍDOS

Los huevecillos se extrajeron con la ayuda de una micropipeta y colocados directamente en portaobjetos sobre medio agua-agar al 2% para su observación y medición en un microscopio compuesto. Los juveniles del segundo estadio (J2), machos y hembras se transfirieron en 20 µl de agua destilada estéril en un portaobjetos y relajados con calor en un portaobjetos, posteriormente se montaron en agua-agar al 2% para su observación, medición y toma de fotografías en el microscopio compuesto digital (Esser, 1986; Southey, 1986).

2.1.4 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MORFOMÉTRICA

La identificación taxonómica tradicional de los nematodos extraídos se realizó en base a sus características morfológicas y morfométricas apoyándose en el uso de claves taxonómicas (Brzeski, 1981; Siddiqi, 2000). La identificación morfométrica se realizó a través de mediciones los caracteres principales de diagnóstico, utilizando un universo poblacional de n=20 para huevecillos, juveniles (J2), hembras y machos, cuyos valores fueron utilizados para la determinación de los índices de Man útiles en la identificación morfológica de especies. Las mediciones se llevaron a cabo en micras (μm), con un micrómetro adaptado al microscopio compuesto Zeiss Primo, con los objetivos 10X, 40X y 100X. Se tomaron micrografías de los principales caracteres de diagnóstico de los géneros y especies analizadas. Los esquemas de caracteres de diagnóstico fueron realizados en un microscopio Zeiss Primo de contraste de fases adaptándole una cámara lucida Zeiss 474620.

2.1.5 PREPARACIÓN DE ESPECÍMENES PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Para la visualización de caracteres morfológicos de los nematodos, por medio de microscopía electrónica de barrido, los especímenes se colocaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml en solución formol-glicerol 8:2, por un periodo mínimo de 24 hrs., para después efectuar 5 lavados con solución Sorensen (cacodilato de sodio 0.1 M y pH=7) cada 15 minutos, en cada lavado se decantó la solución Sorensen y en un campana de extracción se colocaron 500 μl de tetraóxido de osmio 1% por un periodo de 2 hrs, se decantó y se volvió a efectuar 5 lavados con solución Sorensen (Eisenback, 1985).

Posteriormente se absorbe la solución y se realizan cambios seriales de etanol (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%) durante 20 minutos. Se colocaron los especímenes en sobres de papel filtro y se introdujeron a una cámara de secado de punto crítico Quorum-Emitech K850. Una vez terminado el proceso de secado se colocan los especímenes en un porta muestra y se observaron en un microscopio de barrido marca Zeiss Sigma VP.

2.1.6 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

2.1.6.1 EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE ESPECÍMENES INDIVIDUALES FRESCOS

Después del análisis morfológico y morfométrico de las poblaciones de anguinidos, los nematodos analizados fueron recuperados del medio de montaje. Se colocó el espécimen en 10 µl de buffer de extracción (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 nematodo con una punta de micropipeta bajo el microscopio estereoscópico y mezcló la solución buffer de extracción-nematodo con la micropipeta. Se transfirió la solución a un tubo de microcentrifuga de 200 µl y se congeló a -40°C por 30 min. Pasado el tiempo de congelación, se incubó inmediatamente los tubos de micro centrifuga con las muestras a 65°C por 1 hora. Se dio vortex al menos una vez durante el periodo de incubación y se agregó 0.1 µl Proteinasa K (60 µg/ml) cuando faltaron 10-15 min para terminar la incubación. Se incubó a 95°C por 15 min para inactivar la Proteinasa K, se enfrió a 4°C. Se utilizaron 5 µl del extracto crudo de DNA para la reacción de PCR (Williams *et al.*, 1992, Thomas *et al.*, 1997).

2.1.6.2 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LA REGIÓN ITS1-5.8S-ITS2 Y LOS SEGMENTOS DE EXPANSIÓN D2-D3 DEL rDNA

El extracto crudo de DNA fue utilizado como templado para la amplificación de los marcadores genéticos presentes en el rDNA. La reacción de la PCR se realizó en tubos de microcentrifuga de 200 µl en un volumen total de 50 µl.

Los oligonucleótidos que se utilizaron para la amplificación la región ITS1-gen 5.8S -ITS2 fueron **TW81** (5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3') con sentido Forward (Howlett *et al.*, 1992) y **AB28** (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') con sentido Reverse (Joyce *et al.*, 1994). Para la amplificación de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S se utilizaron los primers **D2A** (5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3') con sentido Forward y **D3B** (5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3') con sentido Reverse (Douda *et al.*, 2013).

Cada reacción constó de los siguientes reactivos: buffer de PCR 1X (Invitrogen), $MgCl_2$ 3 mM, Mix dNTP's 200 μ M, Primer 1 (TW81) 0.4 μ M, Primer 2 (AB28) 0.4 μ M, *Taq* Polimerasa 2.5 U/ μ l y 5.0 μ l DNA. La reacción de PCR se llevo a cabo en un termociclador i-Cycler (BIO-RAD) bajo las condiciones de desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, desnaturalización a 95°C por 45 seg., anillamiento a 57°C por 30 seg., extensión a 72°C por 1.30 min., por 34 ciclos y extensión final a 72°C por 5 min (Skantar *et al.*, 2007).

Para los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S, los componentes de reacción fueron: buffer de PCR 1X (Invitrogen), $MgCl_2$ 3 mM, Mix dNTP's 200 μ M, Primer 1 (D2A) 0.4 μ M, Primer 2 (D3B) 0.4 μ M, *Taq* Polimerasa 2.5 U/ μ l y 5.0 μ l DNA. Las condiciones de termociclaje fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, desnaturalización a 95°C por 45 seg., anillamiento a 55°C por 45 seg., extensión a 72°C por 1 min., por 34 ciclos y extensión final a 72°C por 5 min. (Marek *et al.*, 2010) modificado. Los productos de PCR se corrieron a través de electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1.4% teñido con Redgel (Biotium) y se visualizó en un foto documentador Gel Doc EZ (BIORAD).

2.1.7 SECUENCIACIÓN, BIOINFORMATICA Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Los productos amplificados por PCR fueron secuenciados por el método de Sanger en el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria-SAGARPA. Las secuencias sentido y antisentido ("forward" y "reverse") se editaron con el programa CodonCode Aligner 4.2.7. Durante la edición de los electroferogramas revisaron los posibles errores en la lectura de las bases nitrogenadas de la secuencia de ADN analizada. La edición se realizó de manera manual y consistió en la corroboración visual de la correspondencia de picos de diferentes colores (a cada base se le asigna un pico de color distinto) con la secuencia de bases que aparece en la parte superior del cromatograma, y la corrección de la misma en los casos en que esto fuese necesario. Al final de la edición las secuencias de primers de cada marcador fueron eliminadas.

Una vez obtenidas las secuencias, se realizó una comparación por Blasting con secuencias homologas depositadas en el NCBI. Para la realización de las inferencias filogenéticas de las secuencias de poblaciones mexicanas ya editadas, estas fueron sometidas a una alineación múltiple con secuencias del GenBank y con secuencias outgroup con la opción CLUSTAL W 2.3 (Thompson *et al.*, 1997). La búsqueda del mejor modelo de substitución para la inferencia bayesiana se realizó en Mr modeltest 2.3 (Nylander, 2004) y PAUP 4 (Swofford, 1998). Se utilizaron los criterios de MrBayes v3.2 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001) bajo el modelo GTR+G, ejecutando cuatro cadenas para 1.0×10^6 generaciones. En las cadenas de Markov se tomaron muestras a intervalos de 100 generaciones. Se realizaron dos corridas por cada análisis. El primer 20% de los árboles muestreados fue eliminado de todos los análisis y los árboles restantes fueron seleccionados para calcular el árbol consenso por la regla de la mayoría del 50% y las probabilidades posteriores para cada clade. Los árboles fueron graficados con FigTree v1.3.1 (Rambaut, 2009).

2.2. RESULTADOS Y DISCUSIONES

2.2.1 SÍNTOMAS DE INFECCIÓN

Se detectaron en campo los síntomas de agallas en plantas de *Ageratum conyzoides*, *Cosmos bipinnatus* y *Bidens* spp. mostrando deformaciones de distorsión en tejidos de hojas, entrenudos y peciolas (Fig. 1). Este tipo de infecciones pueden llegar a confundirse con síntomas inducidos por otros patógenos y/o insectos.

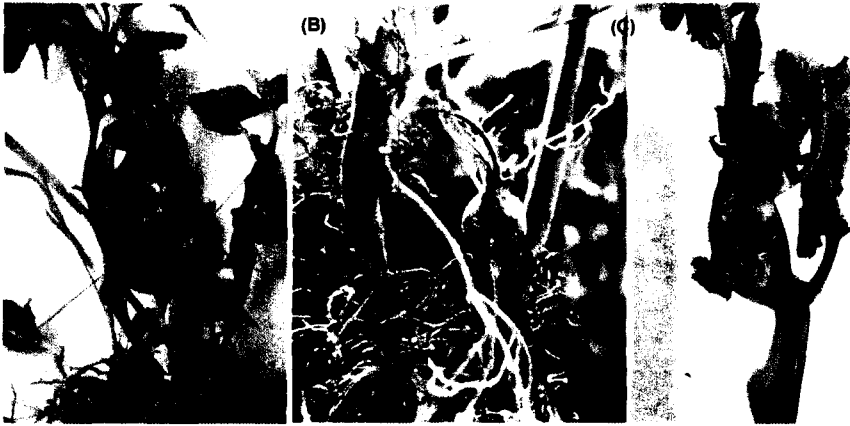


Figura 1. Síntomas causados por *Subanguina tlaxcantensis* n. sp. en *Ageratum conyzoides* (A) Deformación y agallamiento en tallos y ápices en toda la planta cuando en ataque es severo; (B) Agallamiento en tallos en *Cosmos bipinnatus* provocando distorsión; (C) Distorsión y agallamiento en tallos y ápices en *Bidens* spp.

2.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MORFOMÉTRICA EN POBLACIONES DE *Ageratum conyzoides*, *Cosmos bipinnatus* Y *Bidens* spp.

Las mediciones del holotipo, 20 hembras, 20 machos y 20 juveniles paratipos de la poblaciones en *A. conyzoides* se reportan en la tabla 2, y para las poblaciones *Cosmos bipinnatus* y *Bidens* sp. se muestran en la tabla 3. Las ilustraciones corresponden a las figuras 2-4.

2.3.1 HEMBRA

Cuerpo ligeramente curvado ventralmente a una forma de C (Fig. 2G) cuando está relajado en calor. Cutícula delgada, finamente anillada. Capsula cefálica baja y aplanada, longitud $2.43 \pm 0.11 \mu\text{m}$ (2.25 -2.5) y ancho $7.45 \pm 0.10 \mu\text{m}$ (7.25 -7.5) (Fig. 2D). Estilete pequeño $11.25 \pm 1.28 \mu\text{m}$ (10-12.5) con nódulos redondeados longitud $1.4 \pm 0.04 \mu\text{m}$ (1.38-1.49) y ancho $1.96 \pm 0.008 \mu\text{m}$ (1.96-1.98). Orificio de la glándula esofágica dorsal (DGO) $3.66 \pm 0.21 \mu\text{m}$ (3.12-3.81) cerca de los nódulos. Esófago tylenchoide (Procorpus, metacorpus, istmo y postcorpus) bien desarrollado (Fig. 2B y Fig. 3B), procorpus separado del

metacarpus por una ligera constricción. Metacarpus ovoide largo $18.7 \pm 1.19 \mu\text{m}$ (16.25-20) y ancho $12.61 \pm 0.36 \mu\text{m}$ (12-13.75) con válvula conspicua. Istmo largo y estrecho. El postcorpúsculo ligeramente sobrepuesto dorsalmente (Fig. 3D). El anillo nervioso se presenta en medio del istmo. Poro excretor posterior al metacarpus situado a nivel del postcorpúsculo $156.52 \pm 11.82 \mu\text{m}$ (130-172.5). Campo lateral de 6 incisuras continuo no areolado a la mitad del cuerpo (Fig. 4F). Ovario monodelfíco prodelfíco con saco post-uterino corto $50.9 \pm 4.7 \mu\text{m}$ (43.8-62.5), en ocasiones se presenta reflejado con uno o dos pliegues. Oocitos en dos o tres líneas. Espermateca ovalada y lleno de espermatozoides en forma redondas. Útero **cuadricumelado** que consiste en 12 a 16 células por hilera (Fig. 1F). Huevo embrionario en ocasiones presente en el útero. Vulva pronunciada (Fig. 4C y Fig. 4D). Cola aguda (Fig. 2I y Fig. 3F).

2.3.2 MACHO

Cuerpo ligeramente curvado ventralmente, más pequeño y estrecho que en las hembras. Capsula cefálica baja, débilmente desarrollada longitud $2.45 \pm 0.10 \mu\text{m}$ (2.25-2.5) y ancho $7.43 \pm 0.11 \mu\text{m}$ (7.25 -7.5) (Fig. 2C). Estilete delicado $11.24 \pm 1.6 \mu\text{m}$ (10-15) con nódulos pequeños. Poro excretor en el nivel de bulbo medio. Esófago bien desarrollado, con amplio procorpúsculo (Fig. 2A y Fig. 3C). El bulbo medio oval con estrías. Istmo largo y estrecho. Región glandular alargada, en forma de espátula ligera sobreposición dorsal, poco visible el núcleo glandular dorsal. Campo lateral de 6 incisuras. Testículo extendido o reflejado con uno o dos pliegues. Espícula curvada 36 ± 5 (30-45) (Fig. 2H, Fig. 4E). Gubernáculo pequeño $15.8 \pm 2.2 \mu\text{m}$ (12.5-20). La Bursa sub-terminal se extiende casi al término de la cola $95.87 \pm 8.43 \mu\text{m}$ (77.5-107.5). Cola aguda $10.55 \mu\text{m}$ (62.5-100) (Fig. 3E).

2.3.3 JUVENIL

Segundo estadio juvenil con cuerpo recto $528.54 \pm 80 \mu\text{m}$ (390-560). Capsula cefálica muy parecida a los adultos. Estilete $9.9 \pm 0.005 \mu\text{m}$ (9.97-10). Esófago bien desarrollado. El postcorpúsculo ligeramente sobrepuesto dorsalmente al intestino. Cola cónica con punta redondeada $47.7 \pm 7.06 \mu\text{m}$ (37.5-62.5).



Figura 2. Dibujos a través de cámara lucida de paratipos de *Subanguina tlaxcaltensis* n. spp.; (A) Parte anterior del Macho; (B) Parte anterior de Hembra; (C) Región labial del macho; (D) Región labial de hembra; (E) Región labial de juvenil; (F) Crustaformaria; (G) Cuerpo de la hembra; (H) Espícula y gubernáculo; (I) Cola y saco post uterino en hembra.



Figura 3. Micrografías de *Subanguina tlaxcaltensis* n. spp.; (A) Región del esófago de juvenil; (B) Región del esófago en Hembra; (C) Región del esófago del macho; (D) Sobre posición dorsal; (E) Cola, espícula y bursa del macho; (F) Cola y saco post uterino en la hembra.

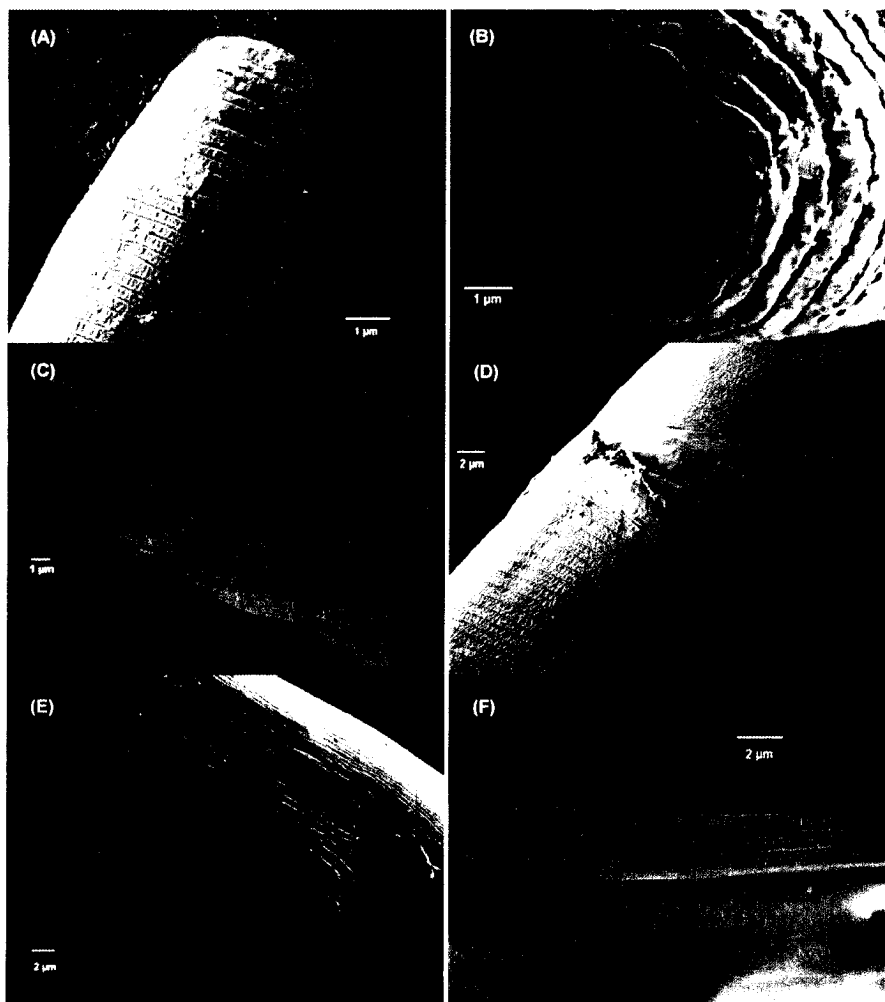


Figura 4. Imágenes en SEM de *Subanguina tlaxcaltensis* n. spp. Hembra (A-D). Macho (E-F). A: Vista lateral de la región cefálica; B: Región labial y abertura de las anfidias; C: Vista lateral de la vulva; D: Vista ventral de la Vulva; E: Espicula y bursa; F: Campos laterales.

Tabla 2. Datos morfométricos de *Subanguina tlaxcaltensis* n. spp. en *Ageratum conyzoides*. Todas las medidas están en μm . Media \pm DS (rango).

Características	<i>Ageratum conyzoides</i>			
	Hembra		Machos	Juveniles
	Holotipo	Paratipos	Paratipos	Paratipos
n	-	20	20	20
L	1407.5	1517.1 \pm 85.2	1471.1 \pm 140.2	528.5 \pm 80.9
	-	(1382-1720)	(1275-1720)	(390-650)
a	26.8	28.05 \pm 2.2	34.9 \pm 3.5	31.2 \pm 5.4
	-	(24.6-31.4)	(26.8-39.6)	(22.3-42.8)
b	7.9	8 \pm 0.7	8.15 \pm 0.47	3.7 \pm 0.4
	-	(6.5-9.1)	(7.3-8.6)	(3.1-4.9)
b'	7.4	8.8 \pm 0.7	7.8 \pm 0.42	3.8 \pm 0.5
	-	(7.5-9.9)	(7.8-3)	3.12-5.2)
c	15.21	16.3 \pm 1.3	16.6 \pm 2.2	11.2 \pm 1.8
	-	(14.3-19)	(13.5-20.4)	(6.24-15.7)
c'	4.62	4.5 \pm 0.5	3.6 \pm 0.39	4 \pm 0.7
	-	(3.6-5.7)	(2.8-3.9)	(3-6.2)
V	80.81	81.7 \pm 1.2	-	-
	-	(79.6-83.9)	-	-
Estilete	12.5	11.2 \pm 1.3	11.4 \pm 1.6	10 \pm 0
	-	(10-12.5)	(10-15)	(10-10)
Parte anterior al bulbo medio	67.5	67.2 \pm 2.7	63.2 \pm 5.80	53.9 \pm 4.7
	-	(62.5-72.5)	(50-70)	(45-61.25)
MB	38.02	37.2 \pm 3.8	35.12 \pm 3.3	41.3 \pm 2.9
	-	(28-43.5)	(30.5-40.6)	(36.8-46.9)
Esófago	177.5	182.3 \pm 20.9	180.7 \pm 15.5	130.5 \pm 9.8
	-	(155-250)	(147.5-200)	(112.5-147.5)
Parte anterior a la parte final de la glándula	190	190.8 \pm 13.6	189.2 \pm 15.2	140.4 \pm 10
	-	(165-212.5)	(157.5-207.5)	(122.5-147.5)
Sobreposición	25	26.5 \pm 11.3	31 \pm 10.6	6.7 \pm 4.6
	-	(10-52.5)	(10-50)	(2.5-15)
Parte anterior al poro excretor	142.5	156.5 \pm 11.8	168.5 \pm 6.8	108 \pm 13.5
	-	(130-172.5)	(155-177.5)	(85-125)
Anchura de cuerpo (BW)	52.5	54.4 \pm 5.9	42.3 \pm 3.8	17.1 \pm 2.1
	-	(47.5-70)	(37.5-50)	(13-75-20.2)
Parte anterior a la vulva	1137.5	1241.2 \pm 481.9	-	-
	-	(1125-1442.5)	-	-
PUS	52.5	50.9 \pm 4.7	-	-
	-	(43.8-62.5)	-	-
PUS/BW	1	0.94 \pm 0.1	-	-
	-	(0.7-1.2)	-	-
Vulva-ano (VA)	177.5	182.6 \pm 14.8	-	-
	-	(155-212.5)	-	-
Longitud de la cola	92.5	93.0 \pm 6.1	89.4 \pm 10.6	47.7 \pm 7
	-	(80-105)	(62.5-100)	(37.5-62.5)
Ancho del cuerpo a nivel del ano	20	20.8 \pm 2.1	27.5 \pm 2.8	11.8 \pm 1.15
	-	(17.5-25)	(22.5-32.5)	(10-12.5)
PUS/Vulva-ano	29	28.05 \pm 3.55	-	-
	-	(21.7-34.9)	-	-
Espicula	-	-	36 \pm 5	-
	-	-	(30-45)	-
Gubernáculo	-	-	15.8 \pm 2.2	-
	-	-	(12.5-20)	-

Tabla 3. Morfometría de hembras y machos de *Subanguina tlaxcaltensis* n spp. detectados en *Ageratum conyzoides*, *Cosmos bipinnatus* y *Bidens* sp. Todas las medidas están en μm . Media \pm DS (rango).

Carácter	Hembra			Machos		
	<i>Ageratum conyzoides</i>	<i>Cosmos bipinnatus</i>	<i>Bidens</i> sp.	<i>Ageratum conyzoides</i>	<i>Cosmos bipinnatus</i>	<i>Bidens</i> sp.
n	20	20	20	20	20	20
L	1517 \pm 85.2 (1382-1700)	1240.1 \pm 180.1 (1082-1705)	1300 \pm 197.2 (1100-1700)	1471.1 \pm 140.2 (1275-1720)	1052.9 \pm 78.6 (932.5-1192.5)	1140 \pm 116 (938-144)
a	28.05 \pm 2.2 (24.6-31.4)	33.2 \pm 5.3 (25.8-45.5)	30.7 \pm 5 (24.6-44.7)	34.9 \pm 3.5 (26.8-39.6)	33.3 \pm 3.5 (28.3-38.8)	33.5 \pm 3.1 (28.4-38.8)
b	8 \pm 0.7 (6.5-9.1)	7.14 \pm 1.14 (5.93-10.10)	7.4 \pm 1.1 (6-9)	8.15 \pm 0.47 (7.3-8.6)	5.4 \pm 0.8 (4.2-6.9)	6.3 \pm 1.3 (4.4-8.4)
b'	8.8 \pm 0.7 (7.5-9.9)	6.74 \pm 1.10 (5.59-9.61)	7.1 \pm 1 (5.8-9.4)	7.8 \pm 0.42 (7-8.3)	7 \pm 1 (6-8)	6.04 \pm 1.3 (4.2-8.3)
c	16.3 \pm 1.3 (14.3-19)	13.98 \pm 2.03 (10.1-17.05)	14.7 \pm 1.9 (10.1-17.6)	16.6 \pm 2.2 (13.5-20.4)	12.8 \pm 0.9 (11.1-14.1)	13.52 \pm 1.5 (11.1-16.5)
c'	4.5 \pm 0.5 (3.6-5.7)	5.6 \pm 2.5 (4-12.5)	5.1 \pm 1.9 (4-12.5)	3.6 \pm 0.39 (2.8-3.9)	3.6 \pm 0.4 (3-4.2)	3.4 \pm 0.4 (2.9-4.2)
V	81.7 \pm 1.2 (79.6-83.9)	79.33 \pm 2.73 (76.39-85.92)	80.3 \pm 2.4 (76.4-85.7)	-	-	-
Estillete	11.2 \pm 1.3 (10-12.5)	10.38 \pm 0.60 (10-11.25)	10.8 \pm 1.1 (10-12.5)	11.4 \pm 1.6 (10-15)	10.2 \pm 0.8 (10-12.5)	10.89 \pm 1.6 (10-15)
Parte anterior al bulbo medio	67.2 \pm 2.7 (62.5-72.5)	62.4 \pm 5.7 (52.5-70)	65 \pm 5.6 (52.5-72.5)	63.2 \pm 5.80 (50-70)	61.5 \pm 5.2 (52.5-65)	62.32 \pm 5 (52.5-65)
M8	37.2 \pm 3.8 (28-43.5)	35.9 \pm 3.6 (28.8-41.2)	36.1 \pm 3.9 (28-41.5)	35.12 \pm 3.3 (30.5-40.6)	33.2 \pm 3.4 (24.2-40)	34.14 \pm 4.2 (24.2-40.6)
Esófago	182.3 \pm 20.9 (155-250)	174.2 \pm 12.1 (152.5-191.2)	181.4 \pm 21.6 (151-250)	180.7 \pm 15.5 (147.5-200)	187.5 \pm 22 (155-227.5)	184.46 \pm 20.2 (155-227.5)
Parte anterior a la parte final de la glándula	190.8 \pm 13.6 (165-212.5)	184.7 \pm 12.4 (163.7-202.5)	189 \pm 13.4 (163.8-212.5)	189.2 \pm 15.2 (157.5-207.5)	198 \pm 21.8 (167.5-237.5)	193.39 \pm 20.3 (167.5-237.5)
Sobreposición	26.5 \pm 11.3 (10-52.5)	17.13 \pm 5.83 (11.25-27.5)	23.1 \pm 11.7 (11-52.5)	31 \pm 10.6 (10-50)	24 \pm 14 (10-14)	25 \pm 14 (10-42)
Parte anterior al poro excretor	156.5 \pm 11.8 (130-172.5)	119.5 \pm 15.48 (105-157.5)	134.8 \pm 23.8 (105-172)	168.5 \pm 6.8 (135-177.5)	115.5 \pm 14.1 (100-140)	130.7 \pm 27.7 (100-175)
Anchura de cuerpo (8W)	54.4 \pm 5.9 (47.5-70)	37.5 \pm 2 (35-42.5)	45.1 \pm 10.5 (35-70)	42.3 \pm 3.8 (37.5-50)	31.7 \pm 2.6 (27.5-35)	34.46 \pm 5.2 (26-45)
Parte anterior a la vulva	1241.2 \pm 81.9 (1125-1442.5)	987.9 \pm 183.7 (842.5-1465)	1090 \pm 190.1 (875-1442)	-	-	-
PUS	50.9 \pm 4.7 (43.8-62.5)	46.7 \pm 3.9 (42.5-52.5)	48.3 \pm 5.1 (42.5-62.5)	-	-	-
PUS/8W	0.94 \pm 0.1 (0.7-1.2)	1.25 \pm 0.1 (1.13-1.4)	1.1 \pm 0.2 (0.7-1.4)	-	-	-
Vulva-ano (VA)	182.6 \pm 14.8 (155-212.5)	162.5 \pm 23 (125-205)	170 \pm 21 (121-205)	-	-	-
Longitud de la cola	98.0 \pm 6.1 (80-105)	89.75 \pm 14.5 (70-125)	92.3 \pm 11.8 (64-132)	89.4 \pm 10.6 (62.5-100)	82.7 \pm 7.3 (75-95)	85 \pm 7.5 (75-95)
Ancho del cuerpo a nivel del ano	20.8 \pm 2.1 (17.5-25)	17.1 \pm 3.2 (10-22.5)	18.75 \pm 3.2 (11-22)	27.5 \pm 2.8 (22.5-32.5)	23 \pm 2 (20-25)	24.82 \pm 3.5 (20-30)
PUS/Vulva-ano	28.05 \pm 3.55 (21.7-34.9)	29.22 \pm 4.20 (21.95-36)	28.7 \pm 3.8 (22-36)	-	-	-
Espícula	-	-	-	36 \pm 5 (30-45)	27.2 \pm 3.4 (22.5-35)	28.75 \pm 3.9 (22.5-35)
Gubernaculo	-	-	-	15.8 \pm 2.2 (12.5-20)	12.2 \pm 2.2 (10-15)	12.85 \pm 2.2 (10-15)

2.4 DIAGNOSIS Y COMPARACIÓN CON OTRAS ESPECIES

Subanguina tlaxcaltensis se puede distinguir de otras especies de *Subanguina* por características morfométricas y moleculares, así como la inducción de agallas en las partes aéreas de sus diferentes hospedantes. Los caracteres principales de diagnóstico diferenciales incluyen: cuerpo semi-obeso con una longitud 1.3-1.7 mm; estilete pequeño 10-12.5 μm , cono que comprende el 45% de la longitud total del estilete; en SEM presenta disco labial poco visible, abertura oral pequeña y redondeada, apertura de las anfídis situado en la base del disco labial (Fig. 4B), capsula cefálica consta de 4 anillamientos labiales (Fig. 4A), campo lateral compuesto por seis incisuras continuas no areolado; postcorpus ligeramente sobrepuesto dorsalmente; saco post-uterino corto; termino de la cola en forma aguda.

Subanguina tlaxcaltensis es similar morfológica y morfo-métricamente a *S. millefolii* Löw, 1874 (Tabla 4) y (Tabla 5). Sin embargo se diferencia por la sobreposición dorsal de la glándula esofágica (frente a la sobreposición ventral de la glándula esofágica de *S. millefolii*), saco post-uterino (43.7 a 62.5 μm vs 39 a 48 μm), longitud total del cuerpo más corto en la hembra (1.3 a 1.7 mm vs 1.58 a 2.28 mm), distancia de la posición de la vulva al extremo anterior en porcentaje (V) más corto (79.5 a 83.9 % vs 88 a 92%) y huevos mas grandes (57.5 a 72.5 μm de longitud por 25 a 37.5 μm de ancho vs 42 a 61 μm por 28 a 35 μm).

S. tlaxcaltensis difiere de *S. picridis* Kirjanova, (1944) (Tabla 4) y (Tabla 5), por la longitud de la hembra (1.3 a 1.7 mm vs 1.5 a 2.1 mm), estilete más corto (11.25 μm vs 12 μm), saco postuterino corto (28% de la distancia de la vulva al ano vs 58%), en el macho la espícula es más corta (30 a 45 μm vs 40 a 43 μm), huevos más pequeños (57.5 a 72.5 μm de longitud por 25 a 37.5 μm de ancho vs 63 a 80 μm por 31 a 34 μm).

S. tlaxcaltensis es muy cercana morfológicamente a *S. moxae* Yokoo y Choi, 1968 (Tabla 4) y (Tabla 5). Difiere en el valor de *a* (Longitud del cuerpo dividido entre el diámetro mayor de cuerpo 24.6 a 31.4 μm vs 17 a 29 μm), el valor de *C* (longitud total del cuerpo dividido entre la longitud de la cola 14.3 a 19 μm vs 20 a 33 μm), menor porcentaje de la distancia de la posición de la vulva al extremo anterior en porcentaje (V) (79.5 a 83.9% vs 88 a

92%), seis líneas en el campo lateral vs 9 a 10, longitud del macho es más largo (1.27 a 1.72 μm vs 1.11 a 1.45 μm) y Gubernáculo más grande (12.5 a 20 μm vs 12 a 14 μm).

S. tlaxcaltensis está más estrechamente relacionado filogenéticamente con *Heteroanguina graminophila* T. Goodey, 1933, sinónimo de *Subanguina graminophila*, pero difiere en la longitud del cuerpo de la hembra siendo más corto (1.3 a 1.7 mm vs 1.5 a 2.6 mm), estilete corto (10 a 12.5 μm vs 13 a 15 μm), el ovario en hilera de uno a dos ovocitos (frente a ovario multinucleado) y menor porcentaje de la distancia de la posición de la vulva al extremo anterior en porcentaje (V) (79.5 a 83.9 % vs 88 a 92 %) (Tabla 4).

Tabla 4. Características morfométricas comparativas de hembras *Subanguina tlaxcaltensis* n spp. con otras especies del género *Subanguina*.

HEMBRAS	n	L	a	b	C	V	Estilete	Autor
<i>Subanguina</i> en <i>Ageratum conyzoides</i>	20	1517.5 (1382-1720)	26.1 (24.6-31.4)	8.4 (6-9.7)	16.4 (14.3-19)	81.8 (79.5-83.9)	11.25 (10-12.5)	
<i>Subanguina</i> en <i>Cosmos bipinnatus</i>	20	1240 (1082-1705)	33.2 (25.8-45.5)	7.1 (5.93-10.1)	13.9 (10.1-17.05)	79.3 (75.3-85.9)	10.3 (10-11)	
<i>Subanguina</i> en <i>Bidens</i> sp	20	1352 (1120-1720)	30.7 (24.6-44.7)	7.4 (6-9.9)	14.7 (10.1-17.6)	80.3 (76.4-85.7)	10.8 (10-12.5)	
<i>Subanguina picinis</i> (<i>Acropteron repens</i>)	10	1230 (1250-1620)	29.99 (26.06-35.05)	8.35 (7.27-9.23)	17.20 (13.89-21.27)	82.85 (80.00-88.61)	-	(Watson, 1966)
<i>Subanguina picinis</i> (<i>Onopordum acanthium</i>)	10	1650 (1490-1820)	26.90 (21.85-30.56)	9.19 (8.49-10.93)	17.63 (15.75-20.16)	85.10 (82.21-87.10)	-	(Watson, 1966)
<i>Subanguina picinis</i> (<i>Cynara scolymus</i>)	10	1400 (1250-1530)	27.48 (26.30-33.18)	7.90 (6.64-9.01)	15.43 (12.83-17.54)	82.90 (79.10-84.97)	-	(Watson, 1966)
<i>Subanguina picinis</i> (<i>Centaurea diffusa</i>)	8	1690 (1220-2290)	23.59 (17.78-30.89)	8.65 (6.86-12.12)	19.13 (14.89-22.78)	84.22 (80.26-88.50)	-	(Watson, 1966)
<i>Subanguina picinis</i> (frat)	17	2400 (1925-2885)	22.9 (18.3-27.2)	9.7 (7.5-13.6)	33 (26-40.4)	87.5 (82.5-89.5)	9.9 (9.5-11)	(Pouijan y Bert, 2006)
<i>Subanguina radicola</i>	-	(1110-2240)	(26.2-37.6)	(6.8-13.8)	(13.5-21.5)	(75-81)	(12-16)	(Krahl, 1991)
<i>Subanguina venefili</i>	-	(1610-1950)	(19.9-26.9)	(8.1-8.7)	(27-42.2)	(90-94)	(8.1-10.3)	(Krahl, 1991)
<i>Subanguina miferfolii</i>	-	(1580-2280)	(20-28)	(8.8-12)	(22.4-31.1)	(88-92)	(10-11)	(Krahl, 1991)
<i>Subanguina mosae</i>	31	1500 (1130-1750)	21 (17-29)	11.4 (8.9-14.2)	26.5 (20-33)	90 (88-92)	(9-10)	(Krahl, 1991)
<i>Subanguina mobiks</i>	-	(1300-2500)	(20.7-31.8)	(6.4-9.4)	(16.9-30.7)	71.0-86.8	(9-11)	(Krahl, 1991)
<i>Subanguina guztotae</i>	10	(1280-2300)	(24.6-38.7)	(6.4-9.5)	(14.1-22.3)	(79-85)	(8.5-11.1)	(Krahl, 1991)
<i>Subanguina balsamiphis</i>	-	(2600-3400)	17	7	30	88	16	(Krahl, 1991)
<i>Heteroanguina graminophila</i>	-	(1560-2600)	(25.5-49.1)	(7.9-14.1)	(15.7-38.4)	(88-92)	(13-15)	(Krahl, 1991)
<i>Mesoanguina amsinckiae</i>	-	(1000-1400)	31	8	22	-	10	(Krahl, 1991)
<i>Heteroanguina caricis</i>	-	(1960-2650)	(25-45)	(13-22)	(17.3-26.5)	(83-88)	(11.7-14.2)	(Krahl, 1991)
<i>Heteroanguina ferulae</i>	-	(1540-2400)	(30-50)	(8.2-12)	(18-30)	(85-90)	(8.4-11.2)	(Krahl, 1991)
<i>Heteroanguina polygoni</i>	-	(1220-1840)	(30-51)	(6.0-8.8)	(18.4-28.6)	(74.5-94.5)	(12-13.0)	(Krahl, 1991)
<i>Subanguina plantaginis</i>	40	1528 (1187.5-2062.5)	26.4 (22.1-42.5)	7.7 (5.9-8.8)	20.8 (14.9-25.8)	86.5 (81.6-90.01)	10.3 (9.8-10.6)	(Hirschman, 1977)
<i>Subanguina chrysopogoni</i>	32	1653 (1318-2040)	26.8 (18-30)	18.18 (7.5-12.9)	30.4 (24-35)	92.2 (89.3-94.7)	7.5 (7-8)	(Bajaj et al., 1990)

Tabla 5. Características morfométricas comparativas de machos de *Subanguina tlaxcaltensis* n spp. con otras especies del género *Subanguina*.

MACHOS	n	L	a	b	c	Epicula	Gubernáculo	Estilite	Autor
<i>Subanguina</i> en <i>Aperium conyzoides</i>	20	1275 (1275-1720)	34.9 (26.6-36.6)	7.8 (6.8-8.3)	16.6 (13.5-20.4)	36 (30-45)	15.8 (12.5-20)	11.4 (10-14)	
<i>Subanguina</i> en <i>Cosmos bipinnatus</i>	20	1240 (1062-1705)	33.3 (28.3-38.8)	5.4 (4.2-6.9)	12.8 (11.1-14.1)	27.2 (22.5-35)	12.2 (10-15)	10.2 (10-12.5)	
<i>Subanguina</i> en <i>Bidens</i> sp.	20	1352 (1120-1720)	33.5 (28.4-38.8)	6.3 (4.4-8.4)	13.52 (11.1-18.5)	28.75 (22.5-35)	12.85 (10-15)	10.89 (10-15)	
<i>Subanguina picrodis</i> (<i>Acropitium rapesei</i>)	10	1460 (1200-1980)	33.02 (26.46-40.94)	7.62 (6.12-8.62)	15.82 (13.84-18.96)	40.40 (36-48)	13.40 (9.01-16.51)	-	(Watson, 1986)
<i>Subanguina picrodis</i> (<i>Oropodum acanthum</i>)	10	1520 (1350-1700)	33.26 (27.59-37.78)	8.07 (7.53-8.63)	16.73 (16.06-18.42)	42.80 (36-54)	14.30 (12.01-16.51)	-	(Watson, 1986)
<i>Subanguina picrodis</i> (<i>Cynara scolymus</i>)	10	1400 (1240-1800)	33.97 (29.78-37.50)	7.28 (6.89-8.39)	14.67 (13.03-18.19)	34.50 (28.50-45)	12.80 (10.50-16.50)	-	(Watson, 1986)
<i>Subanguina picrodis</i> (<i>Conium maculatum</i>)	8	1660 (1730-2260)	28.38 (24.46-33.70)	9.49 (8.54-10.35)	19.09 (16.71-22.31)	43.50 (40.50-48)	15.60 (15-18.50)	-	(Watson, 1986)
<i>Subanguina picrodis</i> (fari)	17	1775 (1450-2040)	32 (27-37)	8 (7-9)	23 (22-28)	32 (30-37)	10 (10-11)	10 (8-10)	(Pourjan y Berl, 2006)
<i>Subanguina radicolae</i>	-	(860-1980)	(26-36.9)	(7.3-10.1)	(13.6-20.8)	(25-31)	(6.0-11)	(12.0-16)	(Krahl, 1991)
<i>Subanguina wevelli</i>	-	(1010-1420)	(30.0-41.9)	(5.9-8.1)	(20.1-25.7)	(34.2-40.8)	(15.8-19.9)	(8.0-11.8)	(Krahl, 1991)
<i>Subanguina melleifol</i>	-	(1330-1550)	(27-37)	(7.8-9.1)	(16-20)	(33-36)	(15-17)	(10-11.0)	(Krahl, 1991)
<i>Subanguina moxoe</i>	31	(1110-1450)	(25-35)	(8.1-11.2)	(18-23)	(30-34)	(12-14)	(9.0-10)	(Krahl, 1991)
<i>Subanguina mobilis</i>	-	(1200-1500)	(21.2-39.1)	(5.9-8.9)	(16.3-25)	(23-25)	(7.2-7.6)	(8.0-8.0)	(Krahl, 1991)
<i>Subanguina guttoideae</i>	19	(1050-1480)	(29.0-46.7)	(6.2-8.4)	(13.5-16.3)	(27.2-31.6)	(8.1-10.3)	(9.6-11.1)	(Krahl, 1991)
<i>Subanguina balsamiphilus</i>	-	(1500-2000)	30	7	20	-	-	-	(Krahl, 1991)
<i>Mesoanguina plantaginis</i>	-	(1140-1510)	(32.8-48.8)	(5.2-7.5)	(13.9-20.21)	(26.5-31.1)	(8.8-13.6)	(9.2-10.2)	(Krahl, 1991)
<i>Heteranguina granitophila</i>	-	(1400-1450)	(26.9-50.0)	(7-13.1)	(19.4-26.7)	(34-44)	(15-18)	(13-15)	(Krahl, 1991)
<i>Mesoanguina amsackiae</i>	-	(1000-1300)	36	7	15	-	-	10	(Krahl, 1991)
<i>Heteranguina caricis</i>	-	(2020-2950)	(34-42)	(9.0-27)	(19-25)	(26.7-33.5)	(11.7-14.29)	(10.0-11.7)	(Krahl, 1991)
<i>Heteranguina fenulae</i>	-	(1200-2100)	(40-60)	(6.0-11)	(16-21)	(27-39)	(8.4-12)	(9.6-11)	(Krahl, 1991)
<i>Heteranguina polygoni</i>	-	(1260-1520)	(30.0-58.5)	(5.0-8.9)	(16.4-28.5)	(36-40)	(12-13.0)	(11-12.0)	(Krahl, 1991)
<i>Subanguina plantaginis</i>	40	1451.7 (1176-1850)	36.4 (31-47)	6.8 (5.8-7.8)	17.3 (14.7-24.4)	30.1 (27.5-34.2)	11.8 (10.2-13.9)	10 (9.6-10.2)	(Hirschman, 1977)
<i>Subanguina chrysopogoni</i>	32	1186 (952-1403)	41.6 (32-56)	6.98 (5.9-11.2)	23.5 (18-28)	31.8 (30-36)	15 (14-17)	8.97 (8-9)	(Bajaj et al., 1990)

2.5 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

La amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA, produjo un producto de 820 pares de bases (pb) aproximadamente (Fig. 5), mientras que los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S amplificó un producto de 920 pb (Fig. 6), basado en la estimación usando un gel de electroforesis. Las secuencias de ambos marcadores que fueron comparadas mediante la búsqueda de homología por BLAST con secuencias del NCBI no confirmo la identidad de las secuencias, obteniendo homologías muy bajas, 93% con *Subanguina radicolae* (JN885538) en la región ITS1-5.8S-ITS2 y 97% con *Ditylenchus oncogenus* (KF612015) en los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S.

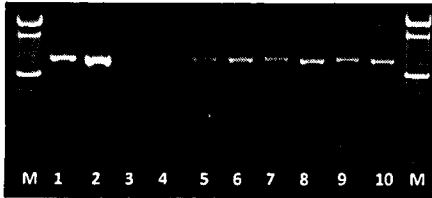


Figura 5. Productos de PCR de la región ITS1-5.8S-ITS2 usando los primers AB28 y TW81. 1-2: Control (+) *D. dipsaci*; 3-4: Control (-) Agua destilada estéril; 5-6: Población *A. conyzoides*; 7-8: *C. bipinnatus*; 9-10: *Bidens* sp. M: Marcador molecular 100 pb.

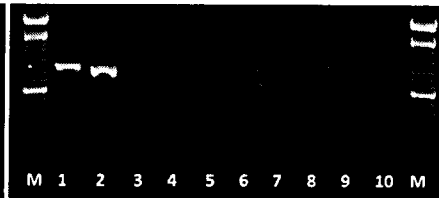


Figura 6. Productos de PCR de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S usando los primers D2A y D3B. 1-2: Control (+) *D. dipsaci*; 3-4: Control (-) Agua destilada estéril; 5-6: Población *A. conyzoides*; 7-8: *C. bipinnatus*; 9-10: *Bidens* sp. M: Marcador molecular 100 pb.

2.6 RELACIONES FILOGENÉTICAS DE *Subanguina tlaxcaltensis* n spp. CON OTRAS ESPECIES DE ANGUINIDOS

El resultado obtenido de la alineación múltiple de las secuencias amplificadas de la región ITS1-5.8S-ITS2, incluyendo 33 secuencias del NCBI y una longitud de 948 pb indican marcadas diferencias nucleotídicas en relación a secuencias ya publicadas. El árbol de consenso de probabilidades superiores al 50%, revela una afinidad de *S. tlaxcaltensis* entre sus diferentes hospedantes agrupados en un solo clado bien soportado (100%), pero diferenciándolo por hospedante (Fig. 7). Existe una estrecha relación con *Heteroanguina graminophila* (AF396318) y (AF396315) (*Subanguina graminophila*) y *Anguina wevelli* (AF396317) y (AF363109) (*Subanguina wevelli*) con un valor de soporte de 91%, separado por un subclado independiente.

La alineación múltiple de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S se realizó con 26 secuencias y una longitud de 835 pb. El análisis bayesiano reveló que las secuencias de Tlaxcala se agrupan en un subclado independiente conformadas por sus diferentes hospederos de *Subanguina tlaxcaltensis* con un valor de soporte de 100 % (Fig. 8). Existe una estrecha afinidad con un subclado conformado por *Heteroanguina graminophila* (DQ328720), *Subanguina chilensis* (DQ328724) y *Subanguina millefolii* (DQ328722). Estos resultados demuestran que las secuencias de las poblaciones de Tlaxcala de ambos marcadores moleculares se encladan de manera independiente a las especies de nematodos agalladores reportados por Subbotin *et al.*, (2004) lo que da soporte a que se tratan de una especie nueva.

Este es el primer reporte que una especie de *Subanguina* que afecta a las asteráceas *A. conyzoides*, *C. bipinnatus* y *Bidens* spp. a nivel mundial. Esta nueva especie podría ser potencialmente perjudicial para una gran cantidad de especies cultivables de asteráceas de importancia económica, que son utilizadas para la producción de plantas medicinales, ornato, hortícolas y producción de aceite.

Mediante el análisis de las secuencias de la región del ITS1_5.8S ITS2 y los segmentos de expansión D2 D3 del gen 28S, así como caracteres morfológicos, los nematodos que se encuentran parasitando *A. conyzoides*, *C. bipinnatus* y *Bidens* spp. en los valles altos de Tlaxcala, México, corresponden a una misma especie. Las secuencias genéticas fueron depositadas en el GenBank con números de acceso KT205564, KT205563, KT205559 y KT205558 para ITS1-5.8S-ITS2 y KT205568, KT205567, KT205562 y KT205561 para los segmentos de expansión D2D3 del gen 28S. La integración de los análisis y ciertas características morfológicas, morfométricas, moleculares y filogenéticas, permitió delimitar estas poblaciones como una nueva especie, el cual se propone como *Subanguina tlaxcalensis* cuyo epíteto específico hace referencia a la localidad tipo (Topotipo) de esta especie en el estado de Tlaxcala, México. Este nuevo descubrimiento fue confirmado por el Dr. Zafar A. Handoo especialista en taxonomía de nematodos fitoparásitos y los holotipos han sido depositados en la Colección de Nematodos del USDA, en Maryland USA.

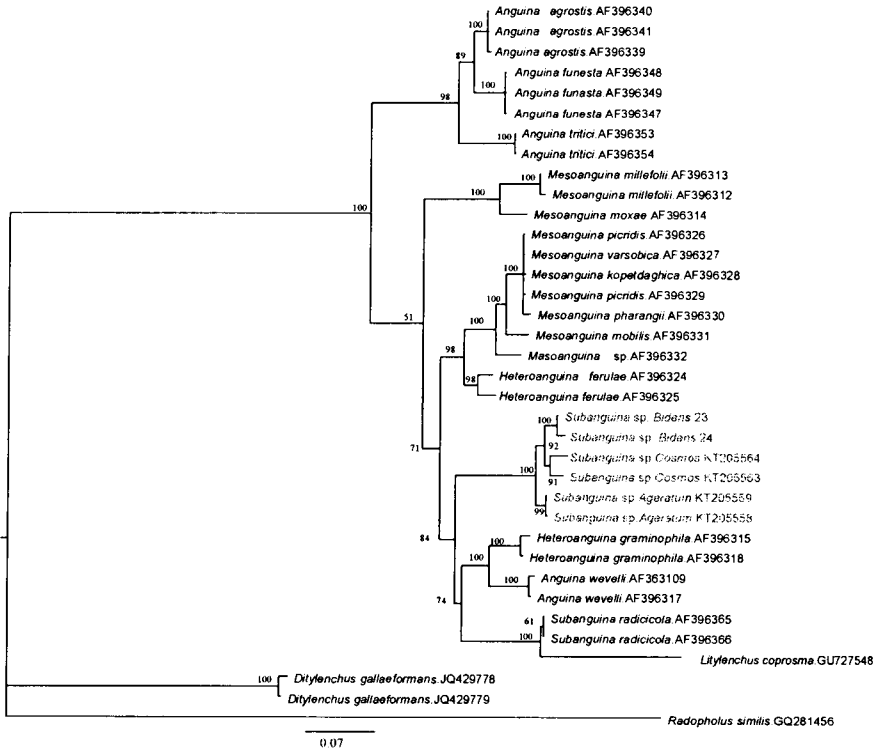


Figura 7. Inferencia bayesiana de nematodos afectando *A. conyzoides*, *C. bipinnatus* y *Bidens* spp. Árbol consenso de probabilidades superiores al 50% de la alineación de secuencias de ITS1-5.8S-ITS2 generados a partir del modelo complejo: GTR + G con secuencias de anguinidos depositadas en el GenBank.

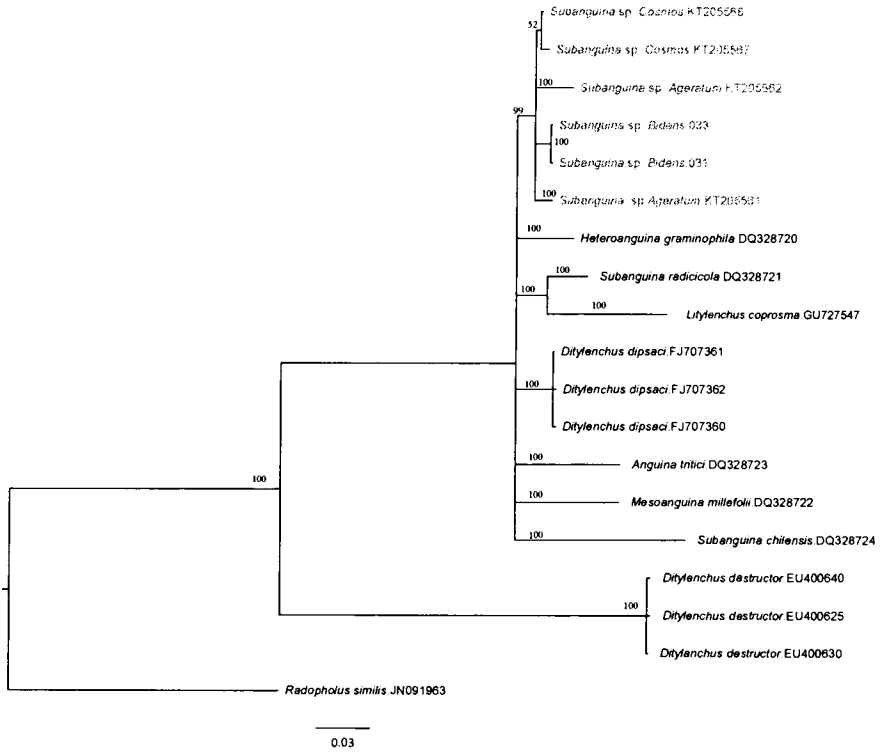


Figura 8. Inferencia bayesiana de secuencias de nematodos afectando *A. conyzoides*, *C. bipinnatus* y *Bidens* spp. Árbol consenso de probabilidades superiores al 50% de la alineación de los segmentos de expansión D2-D3 generados a partir del modelo complejo: GTR + G con secuencias de anguinidos depositadas en el GenBank.

2.7 LITERATURA CITADA

Bajaj, H.K., Dabur, K.R., Paruthi, I.J. and Bhatti D.S. (1990). Description and biology of *Subanguina chrysopogoni* sp n. (Nematoda), a parasite of *Chrysopogon fulvus* (Gramineae) in Haryana, India. *Nematology* 36: 55-72.

Bremer, K. (1994). Asteraceae: Cladistics and Classification. Timber Press, Portland, Oregon.

Brzeski, M.W. (1981). The genera of Anguinidae (Nematoda, Tylenchida). *Revue Nématol* 4:23-34.

Coney, D.L., Nicol, J.M. and Claudius-Cole, B. (2007). Practical plant nematology: a field and laboratory guide. SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Cotonou, Benin.

Douda, O., Marek, M., Zouhar, M. and Rysanek, P. (2013). Insights into the structure and phylogeny of the 28 rRNA expansion segments D2 and D3 of the plant-infecting nematodes from the genus *Ditylenchus* (Nematoda: Anguinidae). *Phytopathologia Mediterranea* 52:84-97.

Eisenback, J.D. (1985). Techniques for preparing nematodes for scanning electron microscopy. In: Barker, K.R., Carter, G.G. & Sasser, J.N. (Eds.) An advanced treatise on Meloidogyne, Volume II: Methodology. Department of Plant Pathology, North Carolina State University, Raleigh, U.S.A., pp 79–105.

Esser, R. P. (1986). A water agar en face technique. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 53:254-255.

Hirschmann, H. (1977). *Anguina plantaginis* n. sp. Parasitic on *Plantago aristata* with a description of its developmental stages. *Journal of Nematology* 9:230-247.

Howlett, B.J., Brownlee, A.G., Guest, D.I., Adcock, G.J., and McFadden, G.I. (1992). The 5S ribosomal RNA gene is linked to large and small subunit ribosomal RNA genes in the oomycetes, *Phytophthora vignae*, *P. cinnamomi*, *P. megaspera* f. sp. *glycinae* and *Saprolegnia ferax*. *Current Genetics* 22:455–461.

- Huelsenbeck, J. and Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754-755.
- Krall, L.E. (1991). Wheat and Grass Nematodes: *Anguina*, *Subanguina* and Related Genera. Manual of Agricultural Nematology. Marcel Dekker. INC. E.U.A.
- Nylander, J. (2004). MrModeltest 2.3. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Pourja, E. and Bert, W. (2006). Aprutides *guidettii* Scognamiglio, 1974 (Nematoda: Aphelenchoididae) and *Subanguina picridis* (Kirjanova, 1944) Brzeski, 1981 (Nematoda:Anguinidae) from Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology* 8:331-342.
- Rambaut, A. (2009). FigTree.v1.3.1. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/>.
- Siddiqi, M.R. (2000). Tylenchida parasites of plants and insect. Second Edition. Wallingford. UK. CABI Publishing, 848 pp.
- Skantar, A.M., Handoo, Z.A., Carta, L.K., & Chitwood, D.J. (2007). Morphological and molecular identification of *Globodera pallida* associated with potato in Idaho. *Journal of Nematology* 39:133–144.
- Southey, J.F. (1986). Laboratory Methods for Work whit Plant and Soil Nematodes. MAFF, London, pp 59-80.
- Subbotin, S.A., Krall, E.L., Riley, I.T, Chizhov, V.N., Staelens, A., De Loose M. and Moens M. (2004). Evolution of the gall –forming plant parasitic nematodes (Thylenchida: Anguinidae) and their relationship whit host as inferred from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30:226-235.
- Swofford, D. (1998). PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b8a. Sunderland, MA: Sinauer.

Thomas, W.K., Vida, J.T., Frisse, L.M., Mundo, M. and Baldwin, J.G. (1997). DNA sequences from formalin-fixed nematodes: Integrating molecular and morphological approaches to taxonomy. *Journal of Nematology* 29:250-254.

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24:4876-82.

Watson, A.K. (1986). Biology of *Subanguina picridis*, a potential biological control agent of russian knapweed. *Journal of Nematology* 18:149-153.

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.

CAPITULO 3. DELIMITACIÓN TAXONÓMICA Y MOLECULAR DEL NEMATODO AGALLADOR DEL PASTO *Aristida divaricata* EN HUAMANTLA, TLAXCALA, MÉXICO

Las especies del generó *Anguina* tiene un rango de hospedantes específicos que atacan estructuras aéreas de las plantas. La mayoría de estos nematodos son parásitos obligados de plantas monocotiledóneas, principalmente en gramíneas (Hirschmann, 1977). Existen especies de anguinidos (*Anguina tritici*, *A. agrostisy* *A. funesta*) que son consideradas de importancia económica y cuarentenaria y que se encuentran reguladas por varios países (Krall, 1991). Varias especies se encuentran estrechamente asociadas con bacterias tóxicas responsables de enfermedades y envenenamiento al ganado que utiliza las gramíneas hospederas como fuente de alimento (Subbotin y Riley, 2012).

El pasto *Aristida divaricata* es un zacate perenne de la familia Poacea distribuida en Estados Unidos y México sobre todo en suelos arenosos de pastizales, matorrales y zonas abiertas de bosques de pino, encino de climas templado-frío. El valor nutritivo como forraje es considerado regular sobre todo cuando las plantas se encuentran en un estado fenológico de desarrollo vegetativo pero éste comienza a disminuir conforme las plantas alcanzan la madurez fisiológica (Herrera y Pámanes, 2010). En el municipio de Huamantla, Tlaxcala, México, se detectaron síntomas de agallas foliares en hojas, tallos y semillas en plantas de *Aristida divaricata*, síntomas asociados a los ocasionados por nematodos de la familia Anguinidae. Se describe a la especie *Anguina aristide* como el agente causal del agallamiento en pasto *A. Divaricata* mediante un estudio de taxonomía integrativa.

3.1 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1 COLECTA DE MUESTRAS

Se realizó un muestreo dirigido en zonas abiertas de bosque de pino y encino de pastos con síntomas de agallas en la parte foliar, en el municipio de Huamantla, Tlaxcala, México, localizadas entre las coordenadas Latitud: 19°18'06.08"N, y Longitud; 97°58'21.86"W y Latitud: 19°17'53.17"N, Longitud: 97°58'31.46"W, a una altura de 2735-2745 msnm. Se colectaron plantas completas con sintomatología asociada al daño en el follaje y se llevaron al invernadero del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Chapingo para incrementar la fuente de inóculo.

3.1.2 EXTRACCIÓN DE LOS NEMATODOS

Secciones de tallo, hojas y semillas fueron incubadas en una caja petri con agua destilada estéril a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Las muestras con agallas fueron hidratadas por un periodo de 3 h, y posteriormente se disectaron con una aguja de disección y bisturí bajo microscopio estereoscópico con la finalidad de extraer los diferentes estadios biológicos: huevecillos, juveniles, machos y hembras (Coney *et al.*, 2007).

3.1.3 MONTAJE Y OBSERVACIÓN DE LOS NEMATODOS EXTRAÍDOS

Los huevecillos fueron extraídos con la ayuda de una micropipeta y colocados directamente en portaobjetos sobre medio agua-agar al 2% para su observación y medición en un microscopio compuesto. Los juveniles del segundo estadio (J2), machos y hembras se transfirieron en 20 μl de agua destilada estéril en un portaobjetos y relajados con calor en un portaobjetos, posteriormente se montaron en medio de montaje agua-agar al 2% para su observación, medición y toma de fotografías en el microscopio compuesto digital (Southey, 1986).

3.1.4 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MORFOMÉTRICA

La identificación taxonómica tradicional de los nematodos extraídos se realizó en base a sus características morfológicas y morfométricas apoyándose en el uso de claves taxonómicas (Brzeski, 1981; Krall, 1991; Siddiqi, 2000). La identificación morfométrica se realizó a través de una serie de mediciones principales de diagnóstico, utilizando un universo poblacional de $n=20$ para huevecillos, juveniles, hembras y machos, cuyos valores fueron utilizados para la determinación de los índices de Man, útiles en la identificación de especies. Las mediciones se llevaron a cabo en micras (μm), con un micrómetro adaptado al microscopio compuesto con cámara fotográfica digital, con los objetivos 10X, 40X y 100X. Se tomaron fotografías de los principales caracteres de diagnóstico de los géneros y especies

3.1.5 PREPARACIÓN DE ESPECÍMENES PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Para el procedimiento y visualización de caracteres morfológicos de los nematodos, por medio de microscopía electrónica de barrido. Las muestras se fijaron en solución formol-glicerol 8:2, por un periodo mínimo de 24 hrs, se realizaron cinco lavados con solución Sorensen (cacodilato de sodio 0.1 M y $\text{pH}=7$) cada 15 minutos, y en un campana de extracción se colocaron 500 μl de tetraóxido de osmio 1% por un periodo de 2 hrs, se decantó y se volvió a efectuar 5 lavados con solución Sorensen (Eisenback, 1985). Posteriormente se deshidataron en gradiente de etanol (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100%). Se colocaron los especímenes en sobres de papel filtro y se introdujeron a una cámara de secado de punto crítico Quorum-Emitech K850. Una vez terminado el proceso de secado se colocan los especímenes en un porta muestra y se observaron en un microscopio de barrido Zeiss Sigma VP.

3.1.6 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

3.1.6.1 EXTRACCIÓN DE DNA DE ESPECÍMENES INDIVIDUALES FRESCOS

Después del análisis morfológico y morfométrico de las poblaciones de la familia Anguinidae los especímenes analizados fueron recuperados del medio de montaje y se colocaron en 10 μ l de buffer de extracción de DNA (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 nematodo con una punta de micropipeta bajo el microscopio estereoscópico y se mezcló perfectamente la solución buffer de extracción-nematodo con la mismamicropipeta. Se transfirió la solución a un tubo de microcentrifuga de 200 μ l y congeló a -40°C por 30 min. Pasado el tiempo de congelación, se incubó inmediatamente a 65°C por 1 h. Se dio vortex al menos una vez durante el tiempo de incubación y se agregó 0.1 μ l Proteínasa K (60 μ g/ml) 10-15 min antes de terminar la incubación. Se incubó a 95°C por 15 min para inactivar la Proteínasa K y se enfrió a 4°C. Se emplearon 5 μ l del extracto crudo de DNA para la reacción de PCR. (Williams *et al.*, 1992, Thomas *et al.*, 1997).

3.1.6.2 OLIGONUCLEÓTIDOS O PRIMERS UTILIZADOS

Se emplearon tres juegos de oligonucleótidos: para la amplificación la región ITS1-gen 5.8S-ITS2 del rDNA fueron **TW81** (5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3) con sentido forward (Howlett *et al.*, 1992) y **AB28** (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3) con sentido reverse (Joyce *et al.*, 1994). Para la amplificación del segmento de expansión D2-D3 del gen 28S nuclear se utilizaron los primers **D2A** (5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3) con sentido forward y **D3B** (5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3) con sentido reverse (Douda *et al.*, 2013). Los primers utilizados para la amplificación de la región parcial del gen 18S-ITS1-5.8S y parcial del ITS2 rDNA 1.58S fueron **rDNA1.58S** (3'-GCCACCTAGTGAGCCGAGCA-5') y **rDNA 2** (5'-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3') (Powers *et al.*, 2001).

3.1.1.6.3 REACCIÓN DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES ITS1-5.8S-ITS2, PARCIAL 18S-ITS1-5.8S-PARCIAL ITS-2 Y LOS SEGMENTOS DE EXPANSIÓN D2-D3 DEL GEN 28S rDNA

Para la amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2, el extracto crudo de DNA fue utilizado como templado para la amplificación del marcador genético presente en el arreglo del rDNA. Se consideraron dos controles positivos (DNA plasmídico conteniendo el marcador molecular de *D. dipsaci*) y dos controles negativos (agua destilada estéril). La reacción de la PCR se realizó en tubos de microcentrífuga de 200 μ l en un volumen total de 50 μ l. Cada reacción constó de los siguientes componentes: buffer de PCR 1X (Invitrogen) MgCl₂ 3 mM, Mix dNTP's 200 μ M, Primer 1 (TW81) 0.4 μ M, Primer 2 (AB28) 0.4 μ M, *Taq* Polimerasa 2.5 U/ μ l y 5.0 μ l DNA. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador i-Cycler (BIO-RAD) bajo las condiciones de desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos, desnaturalización a 95 °C por 45 seg., anillamiento a 57 °C por 30 seg., extensión a 72 °C por 1.30 min., por 34 ciclos y extensión final a 72 °C por 5 min (Skantar *et al.*, 2007).

La amplificación de la región parcial 18S-ITS1-5.8S se agregaron los siguientes componentes: buffer de PCR 1X (Invitrogen) MgCl₂ 1.7 mM, Mix dNTP's 200 μ M, Primer 1 (rDNA1.58S) 0.5 μ M, Primer 2 (rDNA2) 0.5 μ M, *Taq* Polimerasa 5 U/ μ l y 5.0 μ l DNA, bajo condiciones de desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min, desnaturalización a 94 °C por 1 min, anillamiento a 57 °C por 1 minuto, extensión a 72°C por 2 min. por 40 ciclos y extensión fina a 72 °C por 5 minutos (Szalanski *et al.*, 1997) (modificado).

Para la amplificación de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S, los componentes fueron: buffer de PCR 1X (Invitrogen) MgCl₂ 3 mM, Mix dNTP's 200 μ M, Primer 1 (D2A) 0.4 μ M, Primer 2 (D3B) 0.4 μ M, *Taq* Polimerasa 2.5 U/ μ l y 5.0 μ l DNA, bajo condiciones de desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos, desnaturalización a 95 °C por 45 seg., anillamiento a 55 °C por 45 seg., extensión a 72 °C por 1 min., por 34 ciclos y extensión final a 72 °C por 5 min (Marek *et al.*, 2010) modificado. Los productos finales fueron analizados mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1.4% teñido con GelRed (Biotium) y se visualizó en un fotodocumentador Gel Doc EZ (BIORAD).

3.1.6.4 PCR-RFLP'S DE LA REGIÓN PARCIAL 18S-ITS1-5.8S-PARCIAL ITS2

Al obtener un producto final amplificado de la región parcial 18S-ITS1-5.8S, se realizó una digestión enzimática con las enzimas *Alu I*, *Hha I*, *Eco RI*, *Hinf I* y *Taq I*, a una temperatura de incubación de 37 °C a excepción de la enzima *Taq I* que se incubó a 65 °C, por un periodo de 3 h. El volumen final para cada reacción fue de 20 µl con los siguientes componentes: buffer de digestión 2 µl, enzima de restricción 1µl, 10 µl de producto de PCR y 7 µl de agua destilada estéril (Powers *et al.*, 2001).

3.1.6.5 SECUENCIACIÓN, BIOINFORMÁTICA Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Los productos amplificados fueron secuenciados por el método de Sanger en el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria-SENASICA. Las secuencias sentido y antisentido ("forward" y "reverse") fueron ensamblados y editados con el programa CodonCode Aligner 4.2.7. Se revisaron los posibles errores en la lectura de las bases nitrogenadas de las secuencias de DNA analizadas. La edición y corrección de la lectura se realizó de manera manual en los casos necesarios y al final los primers fueron cortados y eliminados.

Se realizó un BLASTING comparativo para determinar homología con secuencias depositadas en el GenBank. Previo a la realización de las inferencias filogenéticas de las secuencias, estas fueron sometidas a una alineación múltiple con CLUSTAL W 2.3 (Thompson *et al.*, 1997). La búsqueda del mejor modelo de sustitución para la inferencia bayesiana se realizó en Mr modeltest 2.3 (Nylander, 2004) y PAUP 4 (Swofford 1998). Se realizó un análisis bayesiano con MrBayes v3.2 (Huelsenbeck y Ronquist 2001) bajo el modelo GTR-G, ejecutando cuatro cadenas para 1.0×10^6 generaciones. En las cadenas de Markov se tomaron muestras a intervalos de 100 generaciones. Dos carreras se realizaron por cada análisis. El primer 20% de los árboles muestreados fue eliminados de todos los análisis y los árboles restantes fueron usados para calcular el árbol consenso por la regla de la mayoría del 50% y las probabilidades posteriores para cada clade. Los árboles fueron graficados con FigTree v1.3.1 (Rambaut, 2009).

3.2. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.2.1 SÍNTOMAS DE INFECCIÓN

Se detectaron síntomas de agallas de color marrón en la partes aéreas del pasto *Aristida divaricata*, que se manifestó en las deformaciones en tallos, hojas y semillas (Fig. 9). En general se presentó una relación de 3 hembras por 2 machos/agalla aproximadamente.

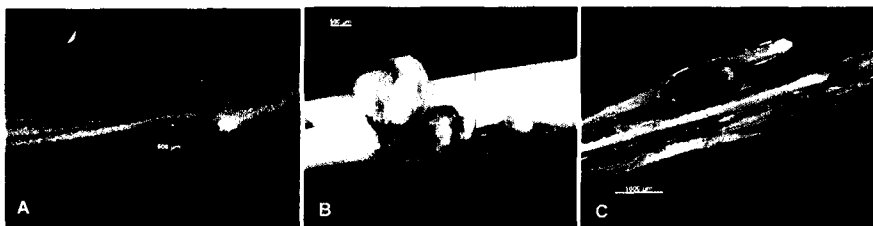


Figura 9. Síntomas causados por *Anguina aristide* en *A. divaricata* (A) agallamiento en tallo cuando el ataque es severo; (B) agallas en tallos; (C) Agallamiento de coloración marrón de las semillas

3.2.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MORFOMÉTRICA

Los valores morfológicos y morfométricos de los especímenes detectados en pasto *A. divaricata* en Huamantla, Tlaxcala, México no se encuentran dentro de los valores reportados para las especies de anguinidos ya descritas (Cid del Prado Vera y Maggenti, 1984; Hirschmann, 1977; Krall, 1991; Swart *et al.*, 2004) por lo que todo parece indicar que se trata de una especie nueva.

Las mediciones de holotipo, 20 hembras, 20 machos y 20 juveniles paratipos de *Anguina aristide*, se reportan en la tabla 6 y 7, así como en las figuras 10-12.

3.3.1 HEMBRA

Cuerpo obeso en forma de espiral cuando es relajado en calor (Fig. 10 K). Cutícula delgada, finamente anillada. Capsula cefálica poco desarrollada longitud $2.1 \pm 0.31 \mu\text{m}$ (2-3) y ancho $8.7 \pm 0.5 \mu\text{m}$ (8-9) (Fig. 10 C). Estilete finamente pequeño $10 \pm 0 \mu\text{m}$ con nódulos redondeados longitud $1.6 \pm 0.5 \mu\text{m}$ (1-2) y ancho $2.6 \pm 0.5 \mu\text{m}$ (2-3). Orificio de la glándula esofágica dorsal (DGO) $2.9 \pm 0.3 \mu\text{m}$ (2-3) cerca de los nódulos. Esófago tylenchoide (Procorpus, metacarpus, istmo y postcorpus) bien desarrollado (Fig. 10 D) y (Fig. 11 A), procorpus separado del metacarpus por una ligera constricción. Metacarpus corto poco desarrollado largo $21.8 \pm 1.7 \mu\text{m}$ (19-25) y ancho $12.3 \pm 1.5 \mu\text{m}$ (11-15) (Fig. 11 D) con válvula conspicua poco visible. Istmo corto y estrecho. El postcorpus ligeramente sobrepuesto ventralmente (Fig. 11 E). El anillo nervioso se presenta en medio del istmo. Poro excretor posterior al metacarpus situado en la parte posterior del postcorpus $147.7 \pm 15.7 \mu\text{m}$ (122.5-172.5). Campo lateral discontinuo no areolado a la mitad del cuerpo (Fig. 12 F). Ovario multinucleado reflejado monodelfico prodélfico. Saco post-uterino corto $64.7 \pm 9.7 \mu\text{m}$ (50-80). Oocitos en múltiples hileras. Espermateca redondeada y lleno de espermatozoides. Útero **cuadricumelado** que consiste en 4 hileras con 20 a 24 células cada una (Fig. 10 J). Huevo embrionario en ocasiones presente en el útero. Vulva ligeramente pronunciada (Fig. 12 C). Cola cónica con terminación bifurcada (Figs. 10 F, 11 F y 12 E).

3.3.2 MACHO

Cuerpo ligeramente curvado ventralmente, más pequeño y angosto que en las hembras. Cápsula cefálica baja, débilmente desarrollada longitud $2.8 \pm 0.4 \mu\text{m}$ (2-3) y ancho $8.7 \pm 0.5 \mu\text{m}$ (8-9) (Fig. 10 B). Estilete delicado $10 \pm 0 \mu\text{m}$ con nódulos pequeños. Poro excretor en el nivel de la región glandular. Esófago bien desarrollado, procorpus corto (Fig. 10 E) y (Fig. 11 B). El bulbo medio oval longitud $20.1 \pm 2.6 \mu\text{m}$ (16-23), ancho $10.6 \pm 1.6 \mu\text{m}$ (8-14) con ligero estriamiento. Istmo y bulbo glandular cortos. Ligera sobreposición ventral al intestino, poco visible el núcleo glándular dorsal. Campo lateral discontinuo a la mitad del cuerpo. Testículo reflejado con uno o más pliegues. Espícula curvada $24.7 \pm 1.6 \mu\text{m}$ (23-27) (Fig. 10 G-1), (Fig. 12 D). Gubernáculo ligeramente pequeño $11.4 \pm 1.2 \mu\text{m}$ (10-14). La

bursa sub-terminal y se extiende casi al término de la cola $72 \pm 10.8 \mu\text{m}$ (57.5-95) (Fig. 10 H). Cola cónica $58.2 \pm 4.4 \mu\text{m}$ (52.5-67.5) (Fig. 10 H) y (Fig. 11 G).

3.3.3 JUVENIL

Segundo estadio juvenil con cuerpo recto $580.21 \pm 51 \mu\text{m}$ (511-662). Cápsula cefálica muy parecida a los adultos (Fig. 10 A). Estilete $9.75 \pm 0.27 \mu\text{m}$ (9.5-10). Esófago bien desarrollado (Fig. 11 C). Postcorpus ligeramente sobrepuesto ventralmente al intestino. Cola cónica con punta redondeada $58 \pm 4.1 \mu\text{m}$ (52.5-62.5). La cola aguda no bifurcada.

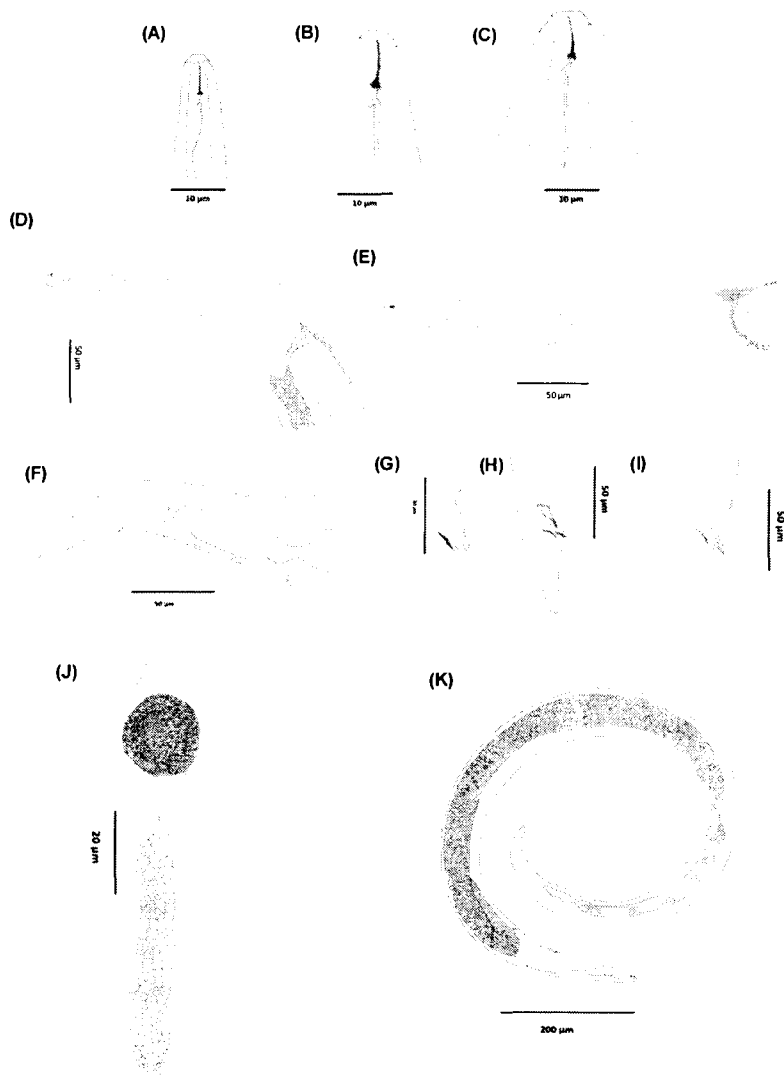


Figura 10. Dibujos a través de cámara lucida de paratipos de *Anguina aristide* n sp.; (A) Región labial de juvenil; (B) Región labial del macho; (C) Región labial de hembra; (D) Parte anterior de hembra; (E) Parte anterior del macho; (F) Cola de hembra; (G) Espícula y gubernáculo; (H) y (I) Cola del macho; (J) Crustaformaria; (K) Cuerpo de hembra.

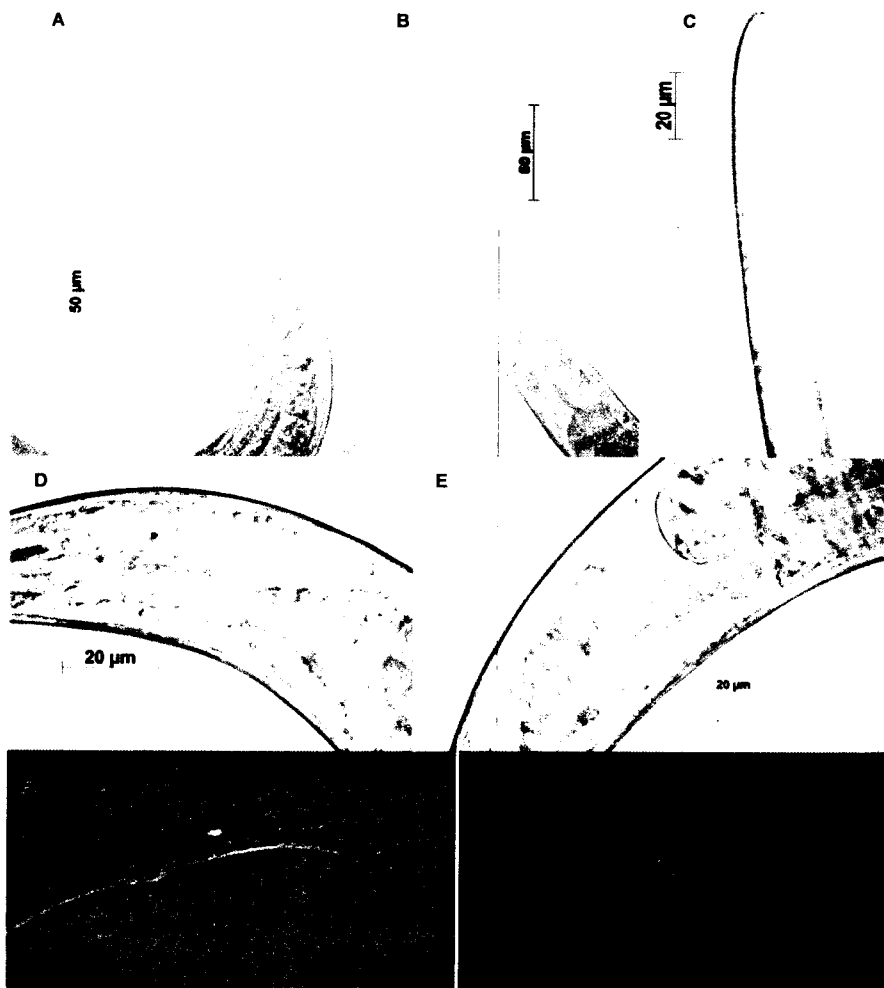


Figura 11. Micrografías de *Anguina aristide* n sp.; (A) Región del esófago de la hembra; (B) Región del esófago del macho; (C) Región del esófago del juvenil; (D) Metacarpus; (E) Sobre posición ventral; (F) Cola y saco post uterino en hembra; (G) Cola del macho.



Figura 12. Imágenes en SEM de *Anguina aristide* n. sp. (A) Vista lateral de la cabeza del macho; (B) Región labial y abertura de las anfidias en hembra; (C) Vista lateral de la vulva; (D) Espículas; (E) Término de la cola de hembra; (F) Campos laterales.

Tabla 6. Datos morfométricos de *Anguina aristiden* sp. en *Aristida divaricata*. Todas las medidas están en μm . Media \pm DS (rango).

Características	<i>Aristida divaricata</i>			
	Hembra		Macho	Juvenil
	Holotipo	Paratipos	Paratipos	Paratipos
n	-	20	20	20
L	1795	1834.3 \pm 394.3	1343.4 \pm 89.9	680.4 \pm 30.14
	-	(1352-2387)	(1196.2-1475)	(629.8-722)
a	17.5	19 \pm 3.3	24.7 \pm 2.6	46.4 \pm 2.08
	-	(14.4-24.6)	(20.3-29.5)	(44.1-50)
b	9.97	10.6 \pm 3.2	7.8 \pm 0.5	4.84 \pm 0.27
	-	(6.7-15.8)	(6.9-9)	(4.54-5.26)
c	23.9	26.7 \pm 5	23.1 \pm 1.5	12.4 \pm 0.65
	-	(18.8-34.6)	(20.8-25.3)	(11.8-13.6)
c'	2.14	2.3 \pm 0.3	1.6 \pm 0.1	68.3 \pm 5.4
	-	(1.9-2.7)	(1.4-1.8)	(59.8-73.8)
V	89.6	90.3 \pm 1.4	-	-
	-	(88.1-92.3)	-	-
DGO o DGED	3	2.9 \pm 0.3	2.9 \pm 0.1	2.79 \pm 0.13
	-	(2-3)	(2.5-3)	(2.62-2.99)
o = Distancia de la base de los nódulos a la DGED/longitud del estilete	0.3	0.3 \pm 0.03	0.29 \pm 0.01	0.30 \pm 0.10
	-	(0.2-0.3)	(0.25-0.3)	(0.27-0.32)
Largo de Metenchium (Cono)	3.5	3.2 \pm 0.2	3.5 \pm 0	4.3 \pm 0.23
	-	(3-3.5)	(3.5-3.5)	(4.15-4.75)
Largo de Telenchium (Columna)	5.5	5.2 \pm 0.2	5.5 \pm 0	3.8 \pm 0.04
	-	(5-5.5)	(5.5-5.5)	(3.79-3.9)
Largo del estilete	10	10 \pm 0	10 \pm 0	9.2 \pm 0.21
	-	(10-10)	(10-10)	(9.06-9.64)
m= Longitud del conox100/total del estilete (%)	55	52 \pm 2.6	55 \pm 0	47.1 \pm 1.44
	-	(50-55)	55-55	(45.7-49.21)
Ancho de nódulos	2	2.6 \pm 0.5	2.2 \pm 0.4	1.23 \pm 0.04
	-	(2-3)	(2-3)	(1.17-1.3)
Largo de nódulos	1	1.6 \pm 0.5	1.03 \pm 0.06	1.02 \pm 0.2
	-	(1-2)	(1-1.2)	(1.05-1)
P.A.- centro del bulbo medio	57.5	55.9 \pm 5.7	58.5 \pm 5.3	59.9 \pm 2.57
	-	(47.5-62.5)	(50-65)	(57.27-64.32)
Distancia del centro del bulbo media hasta el final del lóbulo de la faringe	132.5	121.5 \pm 15.7	114.7 \pm 15	139.2 \pm 4.24
	-	(95-140)	(90-132.5)	(134.2-144.6)
P.A. - poro excretor	147.5	147.7 \pm 15.7	129 \pm 15.1	115.6 \pm 1.42
	-	(122.5-172.5)	(115-155)	(113.98-118.2)
Ancho de la cutícula a la mitad del cuerpo	3	2.8 \pm 0.4	3.3 \pm 0.7	0.64 \pm 0.007
	-	(2-3)	(3-5)	(0.65-0.63)
Diámetro del cuerpo a la mitad del cuerpo	102.5	99.2 \pm 26.7	54.7 \pm 4.5	14.6 \pm 0.78
	-	(55-142.5)	(50-65)	(13.72-15.95)
Diámetro del cuerpo a la altura del poro excretor	45	38.7 \pm 8.8	37 \pm 4	12.49 \pm 0.57
	-	(30-57.5)	(32.5-45)	(11.55-13.3)

Continuación de tabla 6. Datos morfométricos de *Anguina aristide* n sp. en *Aristida divaricata*. Todas las medidas están en μm . Media \pm DS (rango).

Características	<i>Aristida divaricata</i>			
	Hembra		Macho	Juvenil
	Holotipo	Paratipos	Paratipos	Paratipos
Diámetro del cuerpo ala altura del ano	35	30.5 \pm 3.7	27.7 \pm 2.5	9.89 \pm 0.64
	-	(25-35)	(25-32.5)	(8.98-10.53)
Largo de la cola	75	69 \pm 9.7	58.2 \pm 4.4	53.9 \pm 0.98
	-	(50-82.5)	(52.5-67.5)	(53-55.7)
Longitud del bulbo medio	21	21.8 \pm 1.7	20.1 \pm 2.6	11.3 \pm 0.45
	-	(19-25)	(16-23)	(10.58-11.9)
Diámetro del bulbo medio	11	12.3 \pm 1.5	10.6 \pm 1.6	6.28 \pm 0.79
	-	(11-15)	(8-14)	(5.25-7.63)
Altura de la cabeza del labio	2	2.1 \pm 0.3	2.8 \pm 0.4	1.9 \pm 0.1
	-	(2-3)	(2-3)	(1.78-2.06)
Diámetro de la cabeza del labio	9	8.7 \pm 0.5	8.1 \pm 0.3	4.7 \pm 0.28
	-	(8-9)	(8-9)	(4.19-5.09)
Longitud (PUS)	62.5	64.7 \pm 9.7	-	-
	-	(50-80)	-	-
Distancia de la vulva al ano/largo de la cola	1.4	1.5 \pm 0.2	-	-
	-	(1.2-2)	-	-
PUS x100/distancia vulva al ano (%)	65	63.1 \pm 7.9	-	-
	-	(50-80)	-	-
Vulva-ano (VA)	110	104 \pm 19.8	-	-
	-	(75-132.5)	-	-
Espícula	-	-	24.7 \pm 1.6	-
	-	-	(23-27)	-
Gubernáculo	-	-	11.4 \pm 1.2	-
	-	-	(10-14)	-
Largo de la cola/ Largo de la espícula	-	-	2.4 \pm 0.2	-
	-	-	(2-2.8)	-
Largo de la bursa	-	-	72 \pm 10.8	-
	-	-	(57.5-95)	-
% de la longitud de la cola que cubre la bursa	-	-	81.7 \pm 6.8	-
	-	-	(71-91.3)	-

Tabla 7. Morfometría de hembras y machos de *Anguina aristide* n sp. estrechamente relacionado con *Anguina woodi*. Todas las medidas están en μm . Media \pm DS (rango).

Características	<i>Aristida divaricata</i>		<i>Anguina woodi</i>	
	Hembra	Macho	Hembra	Macho
n	10	10	18	12
L	1834.3 \pm 394.3 (1352-2387)	1343.4 \pm 89.9 (1196.2-1475)	2100 (1600-2700)	1600 (1400-2100)
a	19 \pm 3.3 (14.4-24.6)	24.7 \pm 2.6 (20.3-29.5)	7.4 (8.7-14.3)	21.7 (6.9-11.6)
b	10.6 \pm 3.2 (6.7-15.8)	7.8 \pm 0.5 (6.9-9)	11 (8.7-14.3)	8.9 (6.9-11.6)
c	26.7 \pm 5 (18.8-34.6)	23.1 \pm 1.5 (20.8-25.3)	32.2 (22.2-40.0)	23.5 (20.5-32.4)
c'	2.3 \pm 0.3 (1.9-2.7)	1.6 \pm 0.1 (1.4-1.8)	1.9 (1.5-2.4)	2.1 (1.7-2.3)
V	90.3 \pm 1.4 (88.1-92.3)	-	89.3 (86-93.3)	-
DGO o DGED	2.9 \pm 0.3 (2-3)	2.9 \pm 0.1 (2.5-3)	1.4 (0.5-3.0)	0.9 (0.5-1.5)
o = Distancia de la base de los nódulos a la DGED/longitud del estilete	0.3 \pm 0.03 (0.2-0.3)	0.29 \pm 0.01 (0.25-0.3)	12.5 (8.6-19.0)	8 (4.2-12.5)
Largo de Metenchium (Cono)	3.2 \pm 0.2 (3-3.5)	3.5 \pm 0 (3.5-3.5)	5.4 (4.0-7.0)	5.4 (4.5-6.5)
Largo de Telenchium (Columna)	5.2 \pm 0.2 (5-5.5)	5.5 \pm 0 (5.5-5.5)	5.8 (5.0-6.5)	6.2 (5.0-7.0)
Largo del estilete	10 \pm 0 (10-10)	10 \pm 0 (10-10)	11.2 (9.5-13.5)	11.4 (10.5-12.0)
m= Longitud del conox100/total del estilete (%)	52 \pm 2.6 (50-55)	55 \pm 0 (55-55)	47.3 (36.4-56.3)	46.5 (39.1-55.0)
Ancho de nódulos	2.6 \pm 0.5 (2-3)	2.2 \pm 0.4 (2-3)	3.3 (3.0-4.0)	3.5 (3.0-4.0)
Largo de nódulos	1.6 \pm 0.5 (1-2)	1.03 \pm 0.06 (1-1.2)	1.9 (1.5-2.5)	2.1 (1.5-2.5)
P.A. - centro del bulbo medio	55.9 \pm 5.7 (47.5-62.5)	58.5 \pm 5.3 (50-65)	74 (62-81)	71 (61-78)
Distancia del centro del bulbo media hasta el final del lóbulo de la faringe	121.5 \pm 15.7 (95-140)	114.7 \pm 15 (90-132.5)	124 (78-163)	118 (87-171)
P.A. - poro excretor	147.7 \pm 15.7 (122.5-172.5)	129 \pm 15.1 (115-155)	171 (144-210)	157 (139-182)
Ancho de la cutícula a la mitad del cuerpo	2.8 \pm 0.4 (2-3)	3.3 \pm 0.7 (3-5)	1.8 (1.5-3.0)	1.8 (1.0-2.5)
Diámetro del cuerpo a la mitad del cuerpo	99.2 \pm 26.7 (55-142.5)	54.7 \pm 4.5 (50-65)	127 (85-205)	76 (53-115)
Diámetro del cuerpo a altura del poro excretor	38.7 \pm 8.8 (30-57.5)	37 \pm 4 (32.5-45)	66 (54-78)	49 (40.5-65.0)
Diámetro del cuerpo a la altura del ano	30.5 \pm 3.7 (25-35)	27.7 \pm 2.5 (25-32.5)	36 (29-57)	33 (26-39)
Largo de la cola	69 \pm 9.7 (50-82.5)	58.2 \pm 4.4 (52.5-67.5)	67 (50-107)	69 (64-73)
Longitud del bulbo medio	21.8 \pm 1.7 (19-25)	20.1 \pm 2.6 (16-23)	22.3 (20.0-25.0)	21.1 (18.0-33.0)
Diámetro del bulbo medio	12.3 \pm 1.5 (11-15)	10.6 \pm 1.6 (8-14)	14.5 (10.5-17.0)	12.9 (12.0-14.5)
Altura de la cabeza del labio	2.1 \pm 0.3 (2-3)	2.8 \pm 0.4 (2-3)	3 (2.5-3.5)	3.1 (2.5-4.0)
Diámetro de la cabeza del labio	8.7 \pm 0.5 (8-9)	8.1 \pm 0.3 (8-9)	9.6 (8.5-11.0)	8.9 (8.3-9.5)
Longitud (PUS)	64.7 \pm 9.7 (50-80)	-	86 (67-120)	-
Distancia de la vulva al ano /largo de la cola	1.5 \pm 0.2	-	2.5	-

Continuación de Tabla 7. Morfometría de hembras y machos de *Anguina aristide* n sp. estrechamente relacionado con *Anguina woodi*. Todas las medidas están en μm . Media \pm DS (rango).

Características	<i>Aristida divaricata</i>		<i>Anguina woodi</i>	
	Hembra	Macho	Hembra	Macho
Diámetro del cuerpo a la altura del ano	30.5 \pm 3.7 (25-35)	27.7 \pm 2.5 (25-32.5)	36 29-57	33 26-39
Largo de la cola	69 \pm 9.7 (50-82.5)	58.2 \pm 4.4 (52.5-67.5)	67 50-107	69 64-73
Longitud del bulbo medio	21.8 \pm 1.7 (19-25)	20.1 \pm 2.6 (16-23)	22.3 20.0-25.0	21.1 18.0-33.0
Diámetro del bulbo medio	12.3 \pm 1.5 (11-15)	10.6 \pm 1.6 (8-14)	14.5 10.5-17.0	12.9 12.0-14.5
Altura de la cabeza del labio	2.1 \pm 0.3 (2-3)	2.8 \pm 0.4 (2-3)	3 2.5-3.5	3.1 2.5-4.0
Diámetro de la cabeza del labio	8.7 \pm 0.5 (8-9)	8.1 \pm 0.3 (8-9)	9.6 8.5-11.0	8.9 8.3-9.5
Longitud (PUS)	64.7 \pm 9.7 (50-80)	-	86 67-120	-
Distancia de la vulva al ano /largo de la cola	1.5 \pm 0.2 (1.2-2)	-	2.5 1.1-3.0	-
PUS x100/distancia vulva al ano (%)	63.1 \pm 7.9 (50-80)	-	56 37-76	-
Vulva-ano (VA)	104 \pm 19.8 (75-132.5)	-	-	-
Espícula	-	24.7 \pm 1.6 (23-27)	-	34.3 33.0-36.0
Gubernáculo	-	11.4 \pm 1.2 (10-14)	-	12.3 10.0-14.0
Largo de la cola/ Largo de la espícula	-	2.4 \pm 0.2 (2-2.8)	-	2.2 1.8-3.5
Largo de la bursa	-	72 \pm 10.8 (57.5-95)	-	101 67-126
% de la longitud de la cola que cubre la bursa	-	81.7 \pm 6.8 (71-91.3)	-	59.3 39.9-73.0

3.4 DIAGNOSIS Y COMPARACIÓN CON OTRAS ESPECIES

El nematodo agallador *Anguina aristide* se puede distinguir de otros anguinidos tanto por características morfológicas como moleculares. Los caracteres principales de diagnóstico diferencial incluyen: cuerpo obeso de la hembra con una longitud 1.3-2.3 mm; estilete pequeño 10 μm , cono que comprende el 55% de la longitud total del estilete; en microscopía de barrido (SEM) presenta disco labial aplanado poco visible, abertura oral pequeña y redondeada, apertura de las anfídias situado en la base del disco labial (Fig. 12 B), cápsula cefálica consta de 3 anillamientos labiales (Fig. 12 A), campo lateral

discontinuo no areolado; postcorpus ligeramente sobrepuesto ventralmente; saco post-uterino corto; termino de la cola en forma bifurcada.

Anguina aristide es similar morfológica, morfométrica y molecularmente a *A. woodi* Swart, 2004, sin embargo se diferencia en la hembra en el disco labial aplanado y anfidias visibles vs disco labial pronunciado y anfidias no visibles en *A. woodi*, estilete más corto 10 a 10.5 μm vs 10.5 a 12 μm , distancia de la parte anterior al centro del bulbo medio más corto de 47.5 a 62.5 μm vs 62 a 81 μm , longitud del saco post-uterino (50-80 vs 67-120 μm), longitud total del cuerpo en la hembra (1.3 a 2.3 mm vs 1.6 a 2.7 mm), diámetro a la mitad del cuerpo (55 a 142.5 μm vs 85 a 205 μm) y huevos más pequeños (60-77.5 μm de longitud x 32.5-40 μm de ancho vs 87-107 x 40-56 μm). En machos el largo de la bursa (57.5-95 μm vs 67-126 μm), espícula más pequeña (23-27 μm vs 33-36 μm).

A. aristide difiere de *A. graminis* Hardy, 1850 (Tabla 8) y (Tabla 9), por la longitud de la hembra (1.3-2.3 mm vs 1.8 a 2.7 mm), estilete más corto (10-10.5 μm vs 12 μm), longitud total del cuerpo dividido entre la longitud de la cola valor de *C* (18.8-34.6 μm vs 27-30 μm), distancia de la posición de la vulva al extremo anterior en porcentaje (V) (88.1-92.3% vs 84-86%) (Tabla 8). En machos espícula más corta (23-27 μm vs 40-42 μm), gubernáculo más pequeño (11.42 μm vs 13 μm).

Similarmente, *A. aristide* es muy cercana morfológicamente a *A. agropyri* Kirjanova, 1955 (Tabla 8) y (Tabla 9). Difiere en la longitud de la hembra (1.3-2.3 mm vs 2.23-4.7 mm), longitud del estilete (10-10.5 μm vs 10-12 μm), mayor porcentaje de la distancia de la posición de la vulva al extremo anterior en porcentaje (V) (88.1-92% vs 84-90%) , Saco post-uterino menor de la distancia de la vulva al ano a diferencia de *A. agropyri* cuenta con saco post-uterino mayor de la distancia de la vulva-ano y cola bifurcada vs cola cónica con punta redondeada. En macho difiere en la longitud del cuerpo (1.1-1.4 mm vs 1.9-3.1 mm), espícula más corta (23-27 μm vs 33-40 μm).

A. aristide está también estrechamente relacionado morfológicamente con *A. microlaenae*, Steiner, 1938 (Tabla 8) y (Tabla 9), pero difiere en la longitud del cuerpo de la hembra siendo más corto (1.3-2.3 mm vs 1.3-3.0 mm), estilete más largo (10-10.5 μm vs 9 μm), mayor porcentaje de la distancia de la posición de la vulva al extremo anterior en

porcentaje (V) (88.1-92% vs 87-88%). En longitud del cuerpo del macho siendo más corto (1.1-1.4 mm vs 1.1-2 mm), espícula más corta (23-27 μ m vs 27-35 μ m).

Tabla 8. Características morfométricas comparativas de hembras de *Anguina aristide* n sp. con otras especies del género *Anguina*.

HEMBRAS	n	L	a	b	c	V	Estilote	Autor
<i>Anguina aristide</i>	20	1834 (1352-2387)	19 (14.4-24.6)	10.6 (6.67-15.81)	26.7 (18.8-34.6)	90.3 (88.1-92.35)	10:0	
<i>Anguina woody</i>	-	2100 (1.600-2.700)	17.4 (12-21.4)	11 (8.7-14.3)	32 (22.2-40.0)	89.3 (86-93.3)	11.2 (9.5-13.5)	(Swart et al., 2004)
<i>Anguina tritici</i>	-	3000- 5200	13-30	9.8-25	24-63	70-95	8.0-11.0	(Kraill, 1991)
<i>Anguina agrastis</i>	-	1390-2600	13.8-25.4	12.6-28.7	25.2-43.0	87-92	10-12.0	(Kraill, 1991)
<i>Anguina funesta</i>	-	1650	16.8-20.1	9.30-34	18.1-41.2	87.0-94	7.0-10.0	(Kraill, 1991)
<i>Anguina agropyri</i>	-	2230-4780	16.6-25.7	14.5-24.4	21.2-47.7	84.90	10-12.0	(Kraill, 1991)
<i>Anguina graminis</i>	-	1870-2700	18.7-20.0	9.0-10.0	27.0-30.0	84-86	10	(Kraill, 1991)
<i>Anguina hypartheniae</i>	10	1510-1840	18-29	7.0-11.3	25-34	90-92	7.0-8.0	(Kraill, 1991)
<i>Anguina danthoniae</i>	120	1820-3090	12.1-16.2	7.9-13.7	25.3-42.4	90-93.0	8.0-12.5	(Kraill, 1991)
<i>Anguina spermophaga</i>	5	1700-1800	35.8-37.6	8.3-10.0	33-35	87.91	6.6-7.4	(Kraill, 1991)
<i>Anguina tumefaciens</i>	7	1380-2060	20.1-39.3	6.7-10.9	17.0	86-92	8.8-10.7	(Kraill, 1991)
<i>Anguina pacificae</i>	26	1440-2580	19.4-33.2	8.1-13.1	19.9-34.4	82-89	8.9-12.4	(Cid del Prado y Maggenti, 1991)
<i>Anguina paludicola</i>	-	1510-4400	18.8-33.2	8.5-22.1	21.8-54.0	81-94	9.0-13	(Bertozzi y Davies, 2009)
<i>Anguina microloaenae</i>	-	1300-3000	12.0-19.0	9.0-19.0	15-32	87-88	9.00	(Kraill, 1991)

Tabla 9. Características morfométricas comparativas de machos de *Anguina aristide* n sp. con otras especies del género *Anguina*.

MACHOS	n	L	a	b	c	Espícula	Gubernáculo	Estilote	Autor
<i>Anguina aristide</i>	20	1343 (1196-1475)	24.68 (20.3-29.5)	7.78 (6.9-8.98)	23.1 (20.8-25.2)	24.7 (23-27)	11.45 (10-14)	10:0	
<i>Anguina woody</i>	-	1600(1400-2100)	21.7 (15.2-29.6)	8.9(6.9-11.6)	23.5(20.5-32.4)	34.3(33.0-36.0)	12.3 (10.0-14.0)	11.4 (10.5-12.0)	(Swart et al., 2004)
<i>Anguina tritici</i>	-	1900-2500	21-30	6.3-13	17-28	35-40	10.00	8.0-11.0	(Kraill, 1991)
<i>Anguina agrastis</i>	-	1050-1450	23.8-30.0	6.5-8.9	21.5-28.5	25-32	10.0-13.0	10-12.0	(Kraill, 1991)
<i>Anguina funesta</i>	-	780-1520	20.3-30.9	6.30-9.5	16.1-24.9	7.0-10	16.0-28	9.0-14.0	(Kraill, 1991)
<i>Anguina agropyri</i>	-	1910-3110	22.7-29.2	10.6-21.3	18.6-34.0	33-40	13-15	10-12.0	(Kraill, 1991)
<i>Anguina graminis</i>	-	1120-1580	21.0-22.4	5.0-6.0	16.0-17.0	40-42	13	10.0	(Kraill, 1991)
<i>Anguina hypartheniae</i>	10	1260-1390	31-39	6.6-9.6	27-35	32-40	13-18	6.0-7.0	(Kraill, 1991)
<i>Anguina danthoniae</i>	120	1590-2350	16.2-22.4	8.5-11.7	20.4-31.3	27.5-34.5	11.0-17.5	10.5-14.0	(Kraill, 1991)
<i>Anguina spermophaga</i>	5	1590-2350	31-35	9.0	21.6-24.0	36.8-42.3	14-18.4	5.5-7.0	(Kraill, 1991)
<i>Anguina tumefaciens</i>	7	1350-2030	23.7-34.6	7.1-8	15-24.6	34	13	8.0-11.1	(Kraill, 1991)
<i>Anguina pacificae</i>	26	1910-3110	1.22-1.84	21.1-33.0	5.8-10.4	26.2-40.7	10.6-15.5	9.3-12.7	(Cid del Prado y Maggenti, 1991)
<i>Anguina paludicola</i>	-	1500-2490	18.3-37.3	8.9-14.4	18.0-35.3	27-37	7.0-13	8.0-12	(Bertozzi y Davies, 2009)
<i>Anguina microloaenae</i>	-	1100-2000	17-27	8.0-14	16-26	27-35	9.0-10	8.0-9.0	(Kraill, 1991)

3.5 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

La amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 fue un producto de 820 pares de bases (pb) aproximadamente (Fig.13), mientras que los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S amplificó un producto de 920 pb (Fig.14), y en la región parcial del gen 18S-ITS1-5.8S-

parcial del ITS2 amplificó un producto de 644 pb (Fig.15), basado en la estimación del peso molecular usando un gel de electroforesis horizontal. La búsqueda de homología por BLAST con secuencias del NCBI no confirmó la identidad de las secuencias, obteniendo homologías muy bajas, 90% con *Anguina graminis* con acceso AF396351 en la región ITS1-5.8S-ITS2, en los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S identidad de 89% con *Anguina tritici* (DQ328723) y la región parcial del gen 18S-ITS1-5.8S- parcial del ITS2 la homología fue de 84% con *Anguina* sp. con acceso (AF363103). Estos resultados confirman que los especímenes detectados en pasto *A. divaricata* corresponden a una especie nueva.



Figura 13. Productos de PCR del marcador molecular ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA usando los primers AB28 y TW81. 1-2: Control (+) *D. dipsaci*; 3-4: Control (-) Agua destilada estéril; 5-10: Población de *Anguina aristide*. M: Marcador molecular 100 pb.



Figura 14. Productos de PCR de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S del rDNA usando los primers D2A y D3B. 1-2: Control (+) *D. dipsaci*; 3-4: Control (-) Agua destilada estéril; 5-8: Población de *Anguina aristide*. M: Marcador molecular 100 pb.

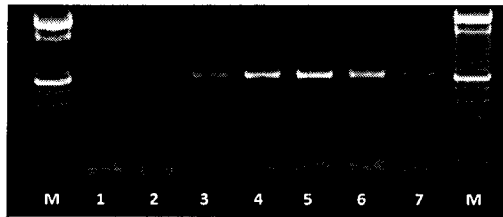


Figura 15. Productos de PCR de la región parcial 18S-ITS1-5.8S-parcial ITS2 usando los primers rDNA1.58S y rDNA2. 1-2: Control (-) Agua destilada estéril; 3-7: Población de *Anguina aristide*. M: Marcador molecular 100 pb.

3.6 PATRÓN DE RESTRICCIÓN PCR-RFLP's

Los perfiles de fragmentos obtenidos de la digestión enzimática (PCR-RFLPs) de la región 18S parcial- ITS1-5.8S-parcial ITS2 mostraron los siguientes patrones: *AluI* 395 y 325.7 pb; *HhaI* 644 pb; *EcoRI* 644 pb; *HinfI* 616,364 y 211 pb y *TaqI* 627, 467 y 154 pb (Fig.16). Todas las enzimas cortaron el fragmento amplificado de *Anguina* en pasto con un patrón de digestión diferente a las repostadas en estudios previos similares Powers *et al.*, (2001) (Tabla 10). Estos resultados reafirman la hipótesis de que la especie detectada en paso de Huamantla, Tlaxcala, México corresponde a una especie no descrita.

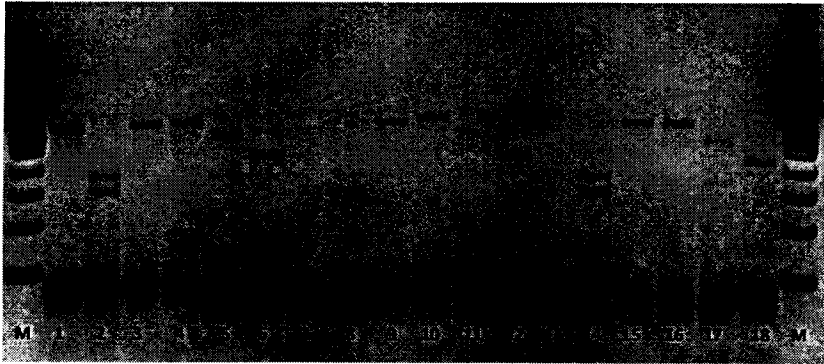


Figura 16. Patrón de digestión con enzimas de restricción de DNA amplificado por PCR de *Anguina aristide* afectando pasto en *Aristida divaricata* utilizando los primers (rDNA1.58S y rDNA2). 1 mm 100 pb. (*Anguina aristide*) testigo positivo sin digerir (1; (*Alu I*) 2, 8 y 14; (*Hha I*) 3, 9 y 15; (*EcoRI*) 4, 10, 16; (*HinfI*) 5, 11 y 17; (*Taq I*) 6, 12 y 18.

Tabla 10. Patrón de restricción enzimática de especies de nematodos agalladores del género *Anguina* (Powers *et al.*, 2001) comparado con el obtenido en la población de anguinidos de pasto *A. divaricata* en Tlaxcala, México.

Muestra	Alu I	Hha I	EcoRI	Hinf I	Taq I
<i>Anguina weveili</i>	550	550	301 249	375 129 46	357 135 58
<i>A. agrostis</i>	548	548	299 249	448 100	355 135 58
<i>A. agropyronifloris</i>	547	547	547	447 100	489 58
<i>A. funesta</i>	548	548	299 249	448 100	490 58
<i>A. graminis</i>	548	548	548	249 199 100	490 58
<i>A. microlaenae</i>	550	550	301 249	449 52 49	357 135 58
<i>A. pacificae</i>	549	549	549	448 101	491 58
<i>A. tritici</i>	277 274	462 88	550	550	492 58
<i>A. sp. Dactylis</i>	550	550	550	252 198 100	347 135 58
<i>A. sp. Agrostis</i>	553	303 250	553	454 99	360 135 58
<i>A. sp. Polygonum</i>	553	553	553	454 99	360 135 58
<i>A. sp. Stipa</i>	548	548	299 249	375 98 46 29	355 135 58
<i>A. sp. Astrebla</i>	359 216	575	575	401 128 46	517 58
<i>A. sp. Hokus</i>	550	550	301 249	450 100	303 135 58 54
<i>Anguina aristide</i>	395 325.7	644	644	616 364 211	627 467 154

3.7 RELACIONES FILOGENÉTICAS DE *Anguina aristide* n sp. CON OTRAS ESPECIES DE ANGUINIDOS

Se realizaron las inferencias filogenéticas de los especímenes detectados en *A. divaricata* con secuencias de otras especies de anguinidos con la región ITS1-5.8S-ITS2 y los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S mediante inferencia Bayesiana.

El resultado obtenido de la alineación múltiple de secuencias de la región ITS1-5.8S-ITS2, del rDNA incluyeron 48 secuencias y una longitud de 850 pb. El árbol de consenso de probabilidades superiores al 50% reveló una afinidad de *Anguina aristide* con *Anguina agropyri* (AF39635), *Anguina woodi* (AY307122) y *Anguina australis* (AF396334) sin

embargo, la población de Huamantla, Tlaxcala se separa en un clade independiente con un valor de soporte de 100% (Fig.17). Por otro lado, la alineación de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S fue de 16secuencias y una longitud de 801 pb. El árbol de consenso de probabilidades superiores al 50%, ubicó a la población mexicana en un clade distinto con un valor de soporte de 100 % (Fig.18).

El resultado obtenido demuestra una nuestras secuencias de ambas regiones se enclada de manera independiente a los diferentes especies de nematodos agalladores reportados (Subbotin *et al.*, 2004; Powers *et al.*, 2001).

El nematodo agallador que parasita *Aristida divaricata* comparte caracteres morfológicos y morfométricos con otras especies de anguinidos, pero presenta ciertas características morfológicas distintivas que la difiere de otras especies descritas. La integración de caracteres fenotípicos, genotípicos y filogenéticos, permitieron delimitar a la población mexicana como una nueva especie (*Anguina aristide* n sp.).

El epíteto específico *A. aristide* hace referencia al hospedero detectado en zonas abiertas de pastizales en bosques de pino y encino de valles altos de Huamantla, Tlaxcala. México (Topotipo). Esta nueva especie fue confirmada por el Dr. Z. A. Handoo, taxónomo y curador de la colección nematológica del USDA, en Beltsville, Maryland, USA al cual fueron depositados los holotipos de la nueva especie.

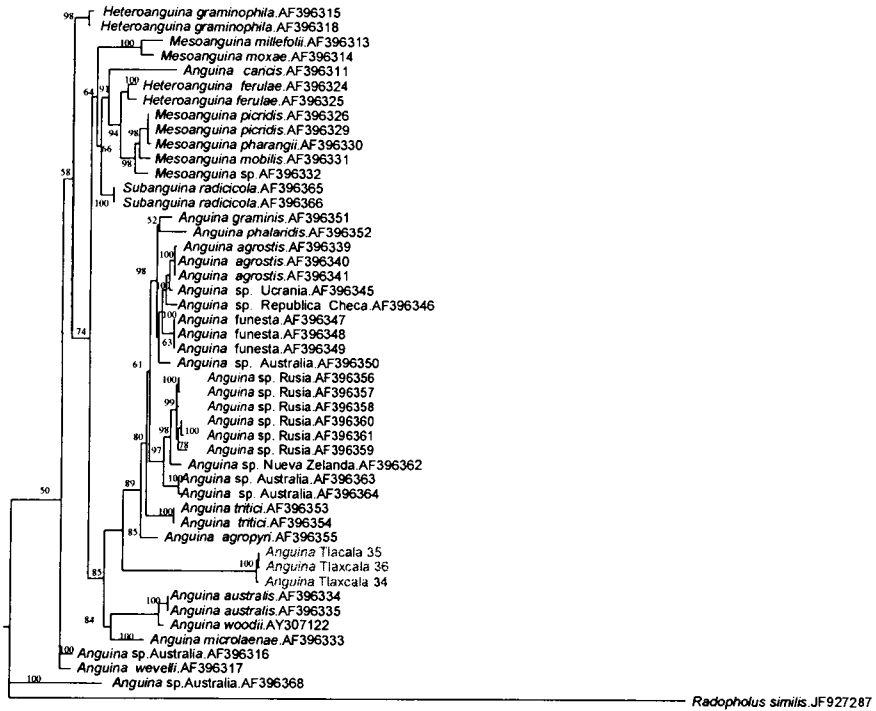


Figura 17. Reconstrucción filogenética bayesiana de secuencias ITS1-5.8S-ITS2 de nematodos detectados en *A. divaricata* en Tlaxcala, México con secuencias de anguinidos depositadas en el GenBank. Árbol consenso de probabilidades superiores al 50% generado a partir del modelo complejo: GTR + G cuyos valores de soporte se muestran sobre los clades.

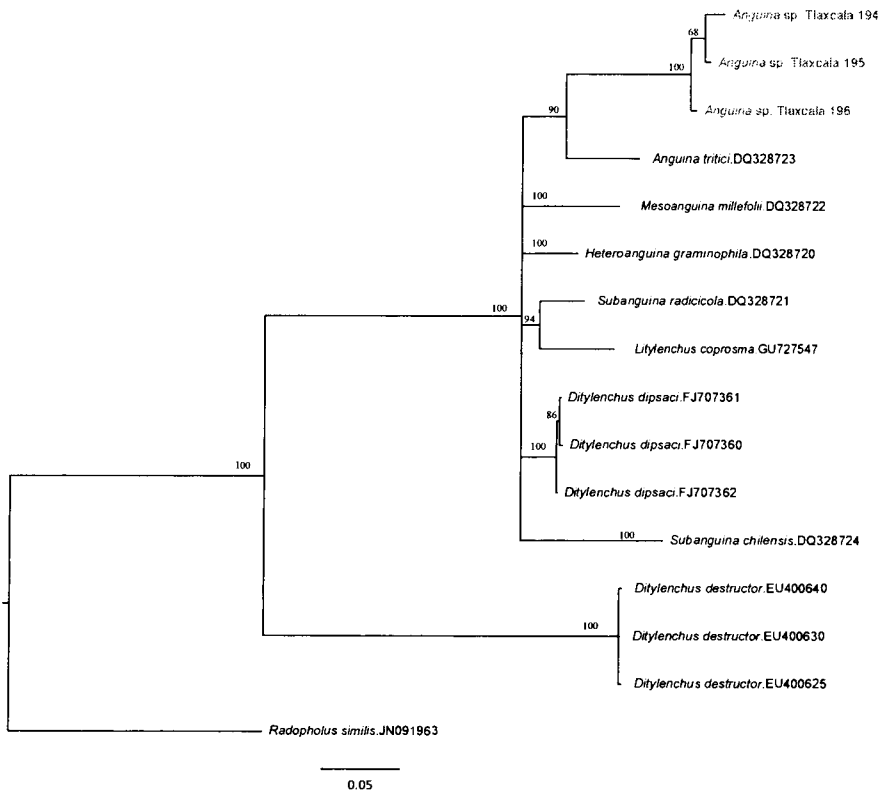


Figura 18. Inferencia filogenética bayesiana de secuencias de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S del rDNA de poblaciones mexicanas de anguinidos afectando *A. divaricata* en Tlaxcala, México. Árbol de consenso de probabilidades superiores al 50% generados a partir del modelo complejo: GTR + G con otras secuencias de anguinidos depositadas en el GenBank. Valores de soporte se muestran sobre los clades.

3.8 LITERATURA CITADA

- Bertozzi T., Davies K.A. (2009). *Anguina paludicola* sp. n. (Tylenchida: Anguinidae): the nematode associated with *Rathayibacter toxicus* infection in *Polypogon monspeliensis* and *Lachnagrostis filiformis* in Australia. *Zootaxa* 2060:33–46.
- Cid del Prado Vera, I., Maggenti A.R. (1984). A new gall-forming species of *Anguina* Scopoli, 1777 (Nemata: Anguinidae) on bluegrass, *Poa annua* L., from the coast of California. *Journal of Nematology* 16:386–392.
- Coney, D.L., Nicol, J.M. and Claudius-Cole, B. (2007). Practical plant nematology: a field and laboratory guide. SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Cotonou, Benin.
- Douda, O., Marek, M., Zouhar, M. and Rysanek, P. (2013). Insights into the structure and phylogeny of the 28 rRNA expansion segments D2 and D3 of the plant-infecting nematodes from the genus *Ditylenchus* (Nematoda: Anguinidae). *Phytopathologia Mediterranea* 52:84-97.
- Eisenback, J.D. (1985). Techniques for preparing nematodes for scanning electron microscopy. In: Barker, K.R., Carter, G.G. & Sasser, J.N. (Eds.) An advanced treatise on *Meloidogyne*, Volume II: Methodology. Department of Plant Pathology, North Carolina State University, Raleigh, U.S.A., pp 79–105.
- Herrera, A. Y., Pámanes, G. D. S. (2010). Guía de pastos de Zacatecas. IPN-CIDIIR Durango-CONABIO. México, 149 pp.
- Hirschmann, H. (1977). *Anguina plantaginis* n. sp. Parasitic on *Plantago aristata* with a description of its developmental stages. *Journal of Nematology* 99:230-247.
- Howlett, B.J., Brownlee, A.G., Guest, D.I., Adcock, G.J., and McFadden, G.I. (1992). The 5S ribosomal RNA gene is linked to large and small subunit ribosomal RNA genes in the oomycetes, *Phytophthora vignae*, *P. cinnamomi*, *P. megaspera* f. sp. *glycinae* and *Saprolegnia ferax*. *Current Genetics* 22:455–461.

Huelsenbeck, J. and Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754-755.

Joyce, S.A., Reid, A., Driver, F., and Curran, J. (1994). Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to identification of entomopathogenic nematodes. In A. M. Burnell, R.-U. Ehlers and J. P. Masson, eds. COST 812 Biotechnology: Genetics of Entomopathogenic Nematode-Bacterium Complexes. Proceedings of Symposium & Workshop, St. Patrick's College, Maynooth, County Kildare, Ireland. pp 178-187.

Krall, L.E. (1991). Wheat and Grass Nematodes: *Anguina*, *Subanguina* and Related Genera. Manual of Agricultural Nematology. Marcel Dekker. INC. E.U.A.

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.

Nylander, J. (2004). MrModeltest 2.3. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

Powers, O.T., Szalanski, L.A., Mullin, G.P., Harris, S.T., Bertozzi, T. and Griesbach, A.J. (2001). Identification of seed gall nematodes of agronomic and regulatory concern with PCR-RFLP of ITS1. *Journal of Nematology* 33:191-194.

Rambaut, A. (2009). FigTree. v1.3.1. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/>.

Skantar, A.M., Handoo, Z.A., Carta, L.K., and Chitwood, D.J. (2007). Morphological and molecular identification of *Globodera pallida* associated with potato in Idaho. *Journal of Nematology* 39:133-144.

Southey, J.F. (1986). Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes. MAFF, London, pp 59-80.

Subbotin, S.A., Krall, E.L., Riley, I.T., Chizhov, V.N., Staelens, A., De Loose M. and Moens M. (2004). Evolution of the gall-forming plant parasitic nematodes (Tylenchida:

Anguinidae) and their relationship with host as inferred from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30:226-235.

Subbotin, S.A. and Riley, I.T. (2012). Stem and gall nematodes. In: Practical Plant Nematology. (Eds. R. H. Manzanilla-López and N. Marbán-Mendoza). Biblioteca Básica de Agricultura BBA. México, pp 521-577.

Swart, A., Subbotin, S.A., Tiedt, L.R. and Riley, I.T. (2004). *Anguina woodi* sp. n. (Tylenchida: Anguinidae) from dune grass, *Ehrharta villosa* in South Africa. *Nematology* 6:129-144.

Swofford, D. (1998). PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b8a. Sunderland, MA: Sinauer.

Szalanski, A.L., Sui, D.D., Harris, T.S. and Powers, T.O. (1997). Identification of cyst nematodes of agronomic and regulatory concern by PCR-RFLP of ITS1. *Journal of Nematology* 29:253-264.

Thomas, W.K., Vida, J.T., Frisse, L.M., Mundo, M. and Baldwin, J.G. (1997). DNA sequences from formalin-fixed nematodes: Integrating molecular and morphological approaches to taxonomy. *Journal of Nematology* 29:250-254.

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24:4876-82.

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.

CAPITULO 4. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA Y MOLECULAR DEL NEMATODO AGALLADOR FOLIAR *Orrina phyllobia* AFECTANDO TROMPILLO *Solanum elaeagnifolium* EN GUANAJUATO, MÉXICO

El trompillo *Solanum elaeagnifolium* es una maleza perenne de la familia Solanaceae, originaria del noreste de México y el suroeste de EE.UU (Robinson *et al.*, 1978), considerada como una planta invasora y se encuentra distribuida en casi todo el mundo (EPPO, 2007). Esta planta invasora es de importancia económica en un gran número de cultivos sobre todo en agricultura intensiva del norte de la República Mexicana. Así mismo, es considerada una especie ruderal como resultado de los hábitats alterados por el hombre; comúnmente se puede encontrar en orillas de carreteras, campos de cultivo abandonados, incluso en zonas urbanas (Vibrans, 2009). Debido a la gran capacidad de esta maleza para fungir como reservorio de plagas y enfermedades, se han establecido medidas de manejo cultural como parte de la regulación fitosanitaria para restringir el establecimiento y dispersión de plagas (DOF, 1997). Dentro de los organismos asociados a *S. elaeagnifolium* y que pudieran ser utilizados como posibles agentes de control biológico destacan diferentes ordenes y familias de insectos, ácaros eriófidos y nematodos. El nematodo agallador foliar *Orrina phyllobia* fue reportado por Thorne (1934) como *Ditylenchus phyllobius* (= *Nothanguina phyllobia*), y está distribuido en el sur de Estados Unidos, México y Sur de la India afectando esta maleza (Brzeki, 1991). Es considerado como un parasito obligado y forma agallas sobre las hojas, por lo que pudiera ser utilizado como un potencial método de control biológico de *S. elaeagnifolium* (Orr *et al.*, 1975; Robinson *et al.* 1978; Wapshere, 1988; Nickle, 1991). Si bien existe evidencia de *O. phyllobia* como un prospecto agente de control biológico para el trompillo, también existe la posibilidad de que pueda afectar algunas otras especies de solanáceas nativas y algunas cultivadas como la berenjena *S. melongena* (Field *et al.*, 2009). En México se carece de evidencia objetiva de la presencia de este nematodo afectando esta maleza por lo que en esta investigación se propuso identificar y caracterizar morfológica y molecularmente poblaciones del nematodo agallador foliar *O. phyllobia* en Guanajuato, México.

4.1 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.1 MUESTREO DEL MATERIAL BIOLÓGICO

En el mes de Julio se realizó un muestreo dirigido a la maleza *S. elaeagnifolium* con síntomas de agallas foliares (Fig. 19) en el cultivo de maíz y en zonas urbanas en el municipio de San Luis de la Paz, Guanajuato, México. Las muestras fueron colectadas entre las coordenadas Latitud: 21°16'24.39"N, Longitud: 100°29'35.17"W y Latitud: 21°18'33.41"N, Longitud: 100°31'39.32"W.



Figura 19. Síntomas causados por el nematodo agallador foliar *Orrina phyllobia* en trompillo *Solanum elaeagnifolium*. (A) y (B) distorsión y agallamiento de hojas.

4.1.2 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

Las hojas deformadas y con agallas de *S. elaeagnifolium* fueron disectadas e incubadas en agua destilada estéril a $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ para favorecer la emergencia de los diferentes estadios biológicos del nematodo (huevecillos, juveniles J2, machos y hembras). Para el estudio morfológico, los nematodos fueron relajados en calor y se montaron en agua-agar 2% (Esser, 1986) para la examinación al microscopio compuesto con contraste de fases adaptado con un micrómetro de platina y cámara digital.

4.1.3 PREPARACIÓN DE ESPECÍMENES PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Para el procedimiento y visualización de caracteres morfológicos de los nematodos por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM), las muestras se fijaron en solución formol-glicerol 8:2, por un periodo mínimo de 24 hr y se realizaron cinco lavados con solución Sorensen (cacodilato de sodio 0.1 M y pH=7) cada 15 minutos. En una campana de extracción se colocaron 500 µl de tetraóxido de osmio 1% por 2 hr, se decantó y se volvió a efectuar cinco lavados con solución Sorensen (Eisenback, 1985). Posteriormente se deshidrataron en gradientes de etanol (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%). Se colocaron los especímenes en sobres de papel filtro y se introdujeron a una cámara de secado de punto crítico Quorum-Emitech K850. Una vez terminado el proceso de secado se colocan los especímenes en un porta muestra y se observaron en un microscopio de barrido marca Zeiss Sigma VP.

4.1.4 EXTRACCIÓN DE DNA Y PCR

Se extrajo el DNA a través de especímenes individuales empleando el protocolo descrito por Williams *et al.*, 1992. Se amplificaron dos marcadores moleculares: 1. la región del ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA utilizando los primers AB28 (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') (Joyce *et al.*, 1994) y TW81 (3'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-5') (Howlett *et al.*, 1992). 2. la amplificación de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S con los primers D2A (5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3') y D3B (3'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-5') (Nunn, 1992). La reacción de la cadena de polimerasa (PCR) para los primers AB28 y TW81 se realizó en un volumen final de 50 µl con los siguientes componentes: 5 µl de buffer de PCR 10X, 3 µl de MgCl₂ 50mM, 1 µl mix de DNTP's 10mM, 2 µl de cada primer a 10 µM, 0.5 µl de Taq polimerasa 5U/ µl, 5 µl de extracción de DNA y 31.5 µl de H₂O libres de DNAsas & RNAsas. Las condiciones de termociclaje incluyeron una etapa de desnaturalización inicial de 95°C durante 3 min seguido de 35 ciclos de 95°C durante 0.45 min, 57°C durante 0.30 min y 72°C durante 1.30 min, y finalizando con un ciclo a 72°C durante 5 min (Skantar *et al.*, 2007) modificado. La reacción de la PCR para los primers

D2A y D3B comprendió 5 μ l de buffer de PCR 10X, 3 μ l de $MgCl_2$ 50mM, 1 μ l mix de dNTP's 10mM, 2 μ l de cada primer 10 μ M, 0.5 μ l de Taq polimerasa 5U/ μ l, 5 μ l de extracción de DNA y 31.5 μ l de H_2O libres de DNAsas & RNAsas. Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 95°C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de 95°C durante 0.45 min, 55°C durante 0.45 min y 72°C durante 1 min, y finalmente con un ciclo a 72°C durante 5 min (Vovlas *et al.*, 2011) modificado. Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis horizontal utilizando geles de agarosa al 1.4% en solución tampón 1X TAE, teñidos con GelRed y visualizados en un fotodocumentador Gel Doc EZ (BIORAD).

4.1.5 SECUENCIACIÓN Y FILOGENÉTICA

Los productos de PCR fueron secuenciados mediante tecnología Sanger, ensamblados y editados con el programa CodonCode Aligner 4.2.7. Durante la edición de los electroferogramas fue importante revisar manualmente los posibles errores en la lectura de las bases nitrogenadas de la secuencia de ADN y se eliminaron los primers. Obtenidas las secuencias de poblaciones mexicanas, se realizó la búsqueda de homología con secuencias del GenBank (NCBI), utilizando el algoritmo BLAST para comprobar si las secuencias generadas de los nematodos que causan agallas en *S. elaeagnifolium* pudieran ser similares o iguales a otras secuencias reportadas. Las secuencias de ambos marcadores moleculares junto con otras secuencias del GenBank fueron sometidas a una alineación múltiple con la opción de Clustal W (Thompson *et al.* 1994). La búsqueda del mejor modelo de sustitución para ambos marcadores fue realizado a través de Mr Modeltest 2.3 (Nylander, 2004) y PAUP 4.0b10 (Swofford, 1998). El análisis filogenético para los dos marcadores se llevo a cabo mediante inferencia bayesiana con MrBayes v3.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003), con el modelo GTR+G, con un árbol de arranque aleatorio y se corrió con la Cadena de Markov de Monte Carlo (MCMC) para 1×10^6 generaciones, tomado muestras a intervalos de 100. Dos carreras se realizaron para cada análisis. Después de desechar muestras burn-in y la evaluación de la convergencia, las muestras restantes se retuvieron para análisis posteriores. Las topologías se utilizaron para generar un árbol con la regla de la mayoría de

consenso 50% de probabilidades posteriores para determinar los valores de soporte de los clades obtenidos. Los árboles se visualizaron utilizando Fig Tree (Rambaut, 2009).

4.2 RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.2.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MORFOMÉTRICA

Las características morfológicas y morfométricas de hembras y machos coinciden con las descripciones hechas por Brzeski (1991) para el nematodo agallador foliar *Orrina phyllobia* (= *Ditylenchus phyllobius*). **Hembra:** Cuerpo corto y recto 692 μm (637-785) (Fig. 20B); capsula cefálica plana en forma de tapón (Fig. 21A y Fig. 21D), estilete pequeño 9 μm (8-9) con nódulos grandes (Fig. 20D); esófago alargado, ausencia del bulbo medio; glándula esofágica se sobrepone al intestino; Campo lateral de cuatro incisuras (Fig. 21F); Ovario extendido, oocitos en una o dos filas; saco post-uterino corto; cola aguda con punta redondeada (Fig. 20F). **Macho:** Cuerpo corto y delgado 700 μm (672-737) (Fig. 20A), estilete delicado 9 μm (8-9) con nódulos grandes (Fig. 20C); capsula cefálica muy parecida a la de la hembra (Fig. 21B); espícula corta 19.8 μm (18-21); bursa sub-terminal 58.3 μm (48-66) (Fig. 20E); cola con proyección con terminación en punta (Fig. 21C). La tabla 11 muestra la caracterización morfométrica de la población de *O. phyllobia* del estado de Guanajuato, México y su comparación con las poblaciones de *Ditylenchus phyllobius* Arizona, E.U, citado por Nickle (1991) y la población de Texas, E.U. Brzeski (1991). Existen diferencias en los índices: *a* (Longitud del cuerpo/el diámetro mayor del cuerpo) y *b'* (longitud del cuerpo/distancia de las glándulas esofágicas al extremo anterior del cuerpo cuando esta sobrepuesto) ya que la población mexicana posee valores más altos que los reportados.



Figura 20. Micrografías del nematodo agallador foliar *Orrina phyllobia*.: (A) Macho; (B) Hembra. (C) Región del esófago del macho; (D) Región del esófago de la hembra; (E) Cola del macho; (F) Cola y saco post uterino en hembra.

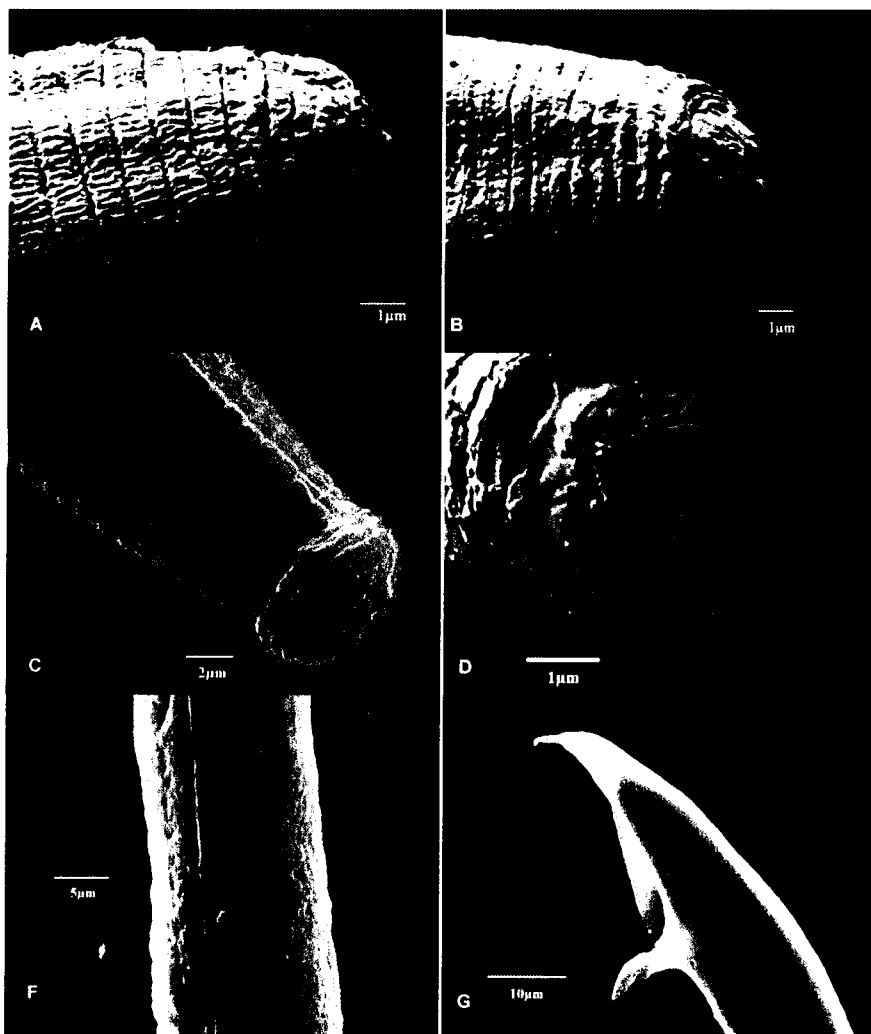


Figura 21. Imágenes en SEM de *Orrina phyllobia*. (A) Vista lateral de la cabeza de la hembra; (B) Vista lateral de la cabeza del macho; (C) Vista lateral de la cabeza del juvenil; (D) Región labial de la hembra; (E) Campos laterales; (F) Cola del macho

Tabla 11. Características morfométricas comparativas de hembras y machos de *Orrina phyllobia* procedentes de San Luis de la Paz Guanajuato, México con especies reportadas por Nickle, (1991) y Brzeski, (1991).

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

4.2.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FILOGENÉTICA

La amplificación de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA y segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S produjeron un fragmento de 850 pb y 900 pb respectivamente basado en electroforesis en gel de agarosa (Figs. 3 y 4). La búsqueda de homología por BLAST con secuencias del NCBI para la región ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA muestra un 99% de identidad con *D. phyllobius* (AF363112) y para los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S no existen secuencias de este nematodo en el banco de genes del NCBI sin embargo, el blasting muestra un 78% de identidad con *Ditylenchus gallaeformans* (KF494346), un nematodo que ocasiona síntomas similares en malezas tropicales del género *Miconia* en Brasil y Costa Rica (Oliveira *et al.*, 2012). Las secuencias fueron depositadas en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (GenBank), para la región del gen ITS1-5.8S-ITS2 DNAr fueron asignados los números KT192615 y KT192616 y para segmento de expansión D2-D3 del 28S rDNA KT192617 y KT192618.

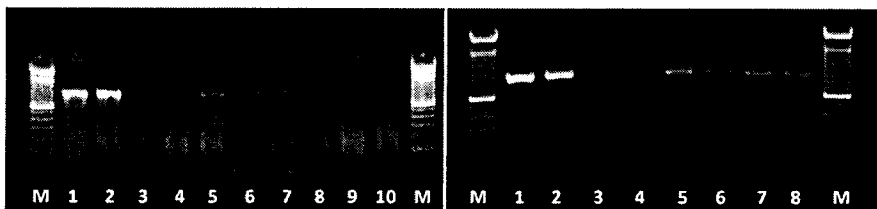


Figura 22. Productos de PCR usando los primers AB28 y TW81; 1-2: Control (+) *Ditylenchus dipsaci*; 3-4 control (-) Agua destilada estéril; 5-10 población de *O. phyllobia*. M: Marcador molecular 100 pb.

Figura 23. Productos de PCR usando los primers D2A y D3B; 1-2: Control (+) *Ditylenchus dipsaci*; 3-4 control (-) Agua destilada estéril; 5-8 población de *O. phyllobia*. M: Marcador molecular 100 pb.

La secuencia obtenida de la región ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA sirvió para confirmar la identificación de *O. phyllobia* como el agente causal del agallamiento foliar de *S. elaeagnifolium*, utilizando como referencia la secuencia de *D. phyllobius* (Powers *et al.*, 2001). Por otro lado, la reconstrucción filogenética con los segmentos de expansión D2-D3 de la población mexicana indica cierta cercanía con *D. gallaeformans*, aportando marcadores moleculares para estos segmentos para el diagnóstico de esta especie.

El análisis filogenético de *O. phyllobia* se infirió a partir de la región ITS1-5.8S-ITS2 de un alineamiento múltiple que incluyó 37 secuencias utilizando *Radopholus similis* (GQ281456) como grupo externo. El conjunto de datos comprendió 869 caracteres. La reconstrucción filogenética bayesiana ubicó a la población mexicana de *O. phyllobia* en un clado independiente con un valor de soporte de 96.96 % junto con *D. phyllobius* (= *O. phyllobia*) AF363112 (Fig. 24). En lo que respecta a la inferencia de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S, el alineamiento múltiple incluyó 21 secuencias y utilizando *Radopholus* sp (HQ823572) como grupo externo. El conjunto de datos incluyó 807 caracteres nucleotídicos. Debido a que no existen secuencias de este marcador molecular en el banco de genes para este nematodo, la población mexicana de *O. phyllobia* y las secuencias del GenBank de otras especies de anguinidos formaron agrupaciones independientes con un valores altos de soporte (Fig. 25).

Si bien existe evidencia de *O. phyllobia* como un prospecto agente de control biológico para el trompillo, también existe la posibilidad de que pueda afectar algunas otras especies

de solanáceas nativas y algunas cultivadas como la berenjena *S. melongena* (Field et al., 2009). Se sugiere para estudios futuros determinar cuál es el comportamiento de *O. phyllobia* al ser inoculado en diferentes especies cultivadas para determinar el rango de hospederos.

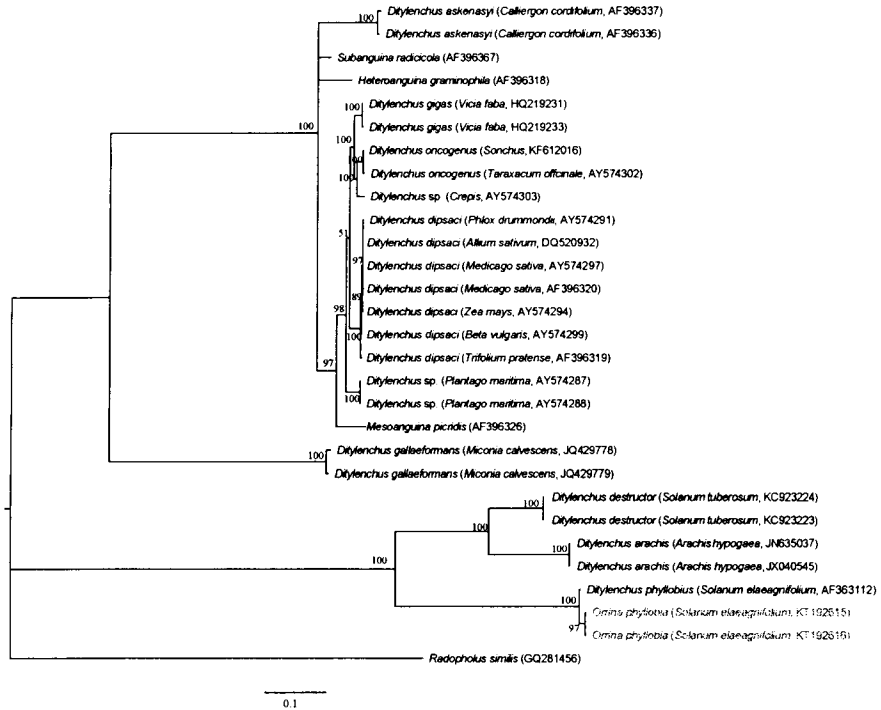


Figura 24. Inferencia filogenética bayesiana de secuencias de *O. phyllobia* procedentes de San Luis de la Paz, Guanajuato, México. Árbol consenso de probabilidades superiores al 50% de la alineación ITS1-5.8S-ITS2 generados a partir del modelo complejo: GTR + G con secuencias de otras especies de anguinidos depositadas en el GenBank. Los valores de soporte son especificados en cada uno de los clades.

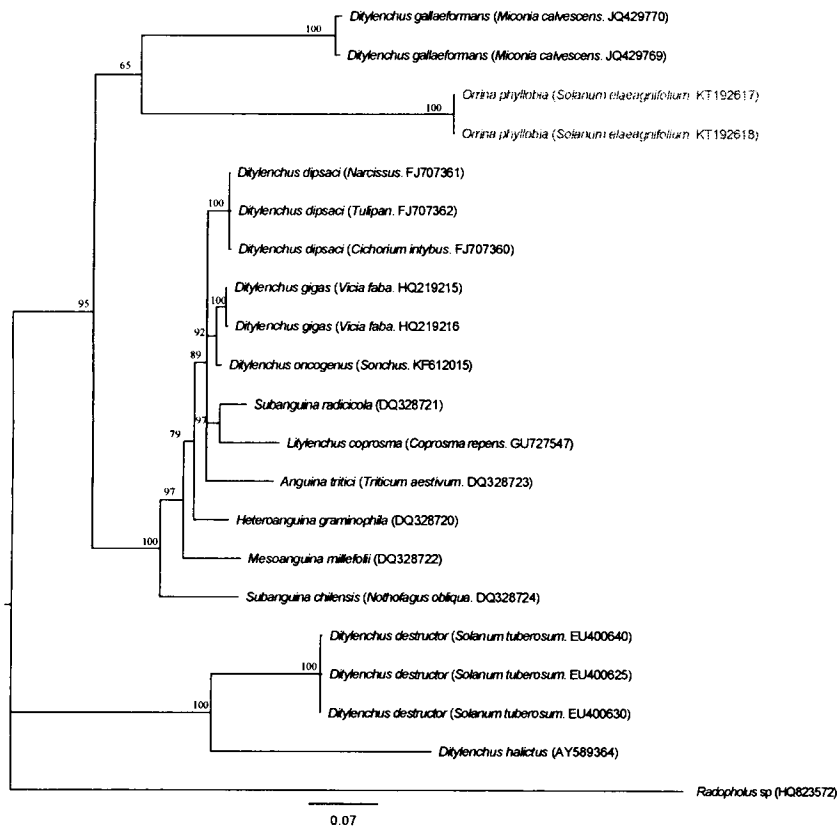


Figura 25. Reconstrucción filogenética bayesiana de secuencias de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S de *O. phyllobia* detectada en San Luis de la Paz, Guanajuato, México. Árbol consenso de probabilidades superiores al 50% de la alineación de los segmentos de expansión D2-D3 generados a partir del modelo complejo: GTR + G con otras secuencias de anguínidos depositadas en el Genbank. Valores de soporte se muestran sobre los clades.

4.3 LITERATURA CITADA

Brzeski, M.W. (1991). Review of the genus *Ditylenchus* Filipjev, 1936 (Nematoda: Anguinidae). *Revue de Nematologie* 14:9–59.

DOF. (1997). Norma Oficial Mexicana NOM-026-FITO-1995. Por la que se establece el control de plagas del algodón. México, 13 pp.

Eisenback, J.D. (1985). Techniques for preparing nematodes for scanning electron microscopy. In: Barker, K.R., Carter, G.G. & Sasser, J.N. (Eds.) An advanced treatise on *Meloidogyne*, Volume II: Methodology. Department of Plant Pathology, North Carolina State University, Raleigh, U.S.A., pp 79–105.

EPPO. (2007). *Solanum eleagnifolium* Cav. Data sheets on quarantine pests. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 37, 236–245.

Esser RP. (1986). A water agar en face technique. Proceedings of the Helminthological Society of Washington 53:254-255.

Field, R. P., Kwong, R. M. and Sagliocco, J.L. (2009). Host specificity of *Ditylenchus phyllobius*, a potential biological control agent of silver-leaf nightshade (*Solanum elaeagnifolium* Cav.) in Australia. *Plant Protection Quarterly* 24:141-144.

Howlett, B.J., Brownlee, A.G., Guest, D.I., Adcock, G.J. and McFadden, G.I. (1992). The 5S ribosomal RNA gene is linked to large and small subunit ribosomal RNA genes in the oomycetes, *Phytophthora vignae*, *P. cinnamomi*, *P. megaspera* f. sp. *glycinae* and *Saprolegnia ferax*. *Current Genetics* 22:455–461.

Joyce, S.A., Reid, A., Driver, F. and Curran, J. (1994). Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to the identification of entomopathogenic nematodes. In: Burnell, A.M., Ehlers, R.-U. & Masson, J.-P. (Eds). COST 812 Biotechnology: Genetics of entomopathogenic nematodes-bacterium complexes. Proceedings of symposium and workshop, St Patrick's College, Maynooth, County Kildare, Ireland. Luxembourg, European Commission, DGXII, pp 178- 187.

Nickle W.R. (1991). Manual of Agricultural Nematology. Dekker, Inc., 757 pp.

- Nunn, G.B. (1992). Nematode molecular evolution. Ph.D. dissertation, University of Nottingham, UK.
- Nylander, J.A.A. (2004). MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Oliveira, RDL., Santin, AM., Seni, DJ., Dietrich, A., Salazar, LA., Subbotin, SA., Mundo-Ocampo, M., Goldenberg, R. and Barreto, RW. (2013). *Ditylenchus gallaeformans* sp. n. (Tylenchida: Anguinidae) a neotropical nematode with biocontrol potential against weedy Melastomataceae. *Nematology* 15:179-196.
- Orr, C. C., J. R. Abernathy, and E. B. Hudspeth. (1975). *Nothanguina phyllobia*, a nematode parasite of silverleaf nightshade. *Plant Disease Reporter* 59:416-417.
- Rambaut, A. (2009). FigTree. v1.3.1. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/>.
- Robinson A.F., Orr C.C. and Heintz C.E. (1978). Distribution of *Nothanguina phyllobia* and its potential as a biological control agent of silverleaf nightshade. *Journal of Nematology* 10, 361–366.
- Ronquist, F. and Huelsenbeck, J. P. (2003). MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Skantar, A.M., Handoo, Z.A., Carta, L.K., and Chitwood, D.J. (2007). Morphological and molecular identification of *Globodera pallida* associated with potato in Idaho. *Journal of Nematology* 39(2):133-144.
- Swofford, D.L. (1998). PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.

Vibrans, H. (2009). Malezas de México. CONABIO. Fecha de consulta 08 diciembre del 2015.

Vovlas N., Troccoli, A., Palomares-Rius, J.E., De Luca, F., Liebanas, G., Landa, B.B., Subbotin, S.A. and Castillo, P. (2011). *Ditylenchus gigas* n. sp. parasitizing broad bean: A new stem nematode singled out from the *Ditylenchus dipsaci* species complex using a polyphasic approach with molecular phylogeny. *Plant Pathology* 60:762–775.

Wapshere, A.J. (1988). Prospects for the biological control of silver-leaf nightshade, *Solanum elaeagnifolium*, in Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* 39:187-197.

Williams, B.D., B. Schrank, C. Huynh, R. Shownkeen, and R.H. Waterston. (1992). A genetic mapping system in *Caenorhabditis elegans* based on polymorphic sequence-tagged sites. *Genetics* 131:609-624.

CAPITULO 5. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL NEMATODO AGALLADOR *Anguina tritici* A TRAVÉS DEL ANÁLISIS PCR-RFLP EN TRIGO *Triticum aestivum* L.

El nematodo agallador del trigo *Anguina tritici* fue reportada por Turbevill Needham en 1743, como el primer nematodo parásito de las plantas que fue observado y descrito (Lehman, 1979). Este nematodo agallador de la semilla afecta con mayor frecuencia a los granos de trigo y centeno pero también puede atacar avena y cebada. Debido a que son afectadas las semillas, representa un serio riesgo en la diseminación a zonas libres como producto de la comercialización entre países de diferentes continentes. *Anguina tritici* es considerado un nematodo endoparásito cuando se alimenta en los tejidos de los puntos de crecimiento de las hojas. Más tarde, los juveniles penetran en los botones de las flores en el momento del brote floral y comienzan a alimentarse como endoparásitos. Este patógeno provoca agallas en los granos de trigo, causando pérdidas significativas del rendimiento en zonas consideradas como centro del origen de cereales como países del Medio Oriente (Evans *et al.*, 1993).

En el estado de Baja California, México en el ciclo agrícola 1981-1982, se detectó un brote de infestación del nematodo de cuarentena *Anguina tritici* atacando *Triticum aestivum* var. Nacozari, que presento agallamiento decoloración café-oscura de los granos. Al disectar las agallas se encontraron un promedio de 25,000 nematodos en el segundo estadio juvenil por grano (Nieto y Delgado, 1984). Las medidas fitosanitarias implementadas para erradicar el brote de *A. tritici* en México permitieron mantener bajo control este problema sin embargo, se sigue reglamentando la movilización de semilla de trigo de importación mediante la NOM-017-FITO-1995 por la que se establece la cuarentena exterior para prevenir la introducción de plagas del trigo (DOF, 1996).

Con la finalidad de proporcionar herramientas de diagnóstico alternativos, se realizó un estudio molecular con semillas infectadas por este nematodo detectados en México a principios de la década de los 80's y que forman parte de la colección de referencia del laboratorio de Nematología del Centro Nacional de Referencia-SENASICA.

5.1 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.1 EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE ESPECÍMENES INDIVIDUALES

Las semillas de trigo infectadas con *A. tritici* fueron incubadas por 2 hr en agua destilada estéril. Una vez que las semillas fueron hidratadas, estas fueron disectadas para permitir la liberación de huevecillos, juveniles J2. Se colocaron individualmente los especímenes en 10 μ l de buffer de extracción de DNA (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 individualmente el nematodo con una punta de micropipeta bajo el microscopio estereoscópico y se mezcló la solución buffer de extracción-nematodo con la micropipeta. Se transfirió la solución a un tubo de microcentrifuga de 200 μ l y se congeló a -40°C por 30 min. Pasado el tiempo de congelación, se incubó inmediatamente a 65°C por 1 hora. Se dio vortex al menos una vez durante el periodo de incubación y se agregó 0.1 μ l Proteínasa K (60 μ g/ml) faltando 10-15 min para terminar la incubación. Se incubó a 95°C por 15 min para inactivar la Proteínasa K, y se enfrió a 4°C. Se utilizaron 5 μ l del extracto crudo de DNA para la reacción de PCR. (Williams *et al.*, 1992, Thomas *et al.*, 1997).

5.1.2 REACCIÓN DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN PARCIAL DEL GEN 18S-ITS1-5.8S Y PARCIAL DEL ITS2

Se realizó la amplificación por PCR de la región parcial del gen 18S-ITS1-5.8S y parcial del ITS2 del rDNA empleando los primers rDNA1.58S (3'-GCCACCTAGTGAGCCGAGCA-5') y rDNA 2 (5'-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3') (Powers *et al.*, 2001).

El volumen de reacción fue de 50 μ l con los siguientes componentes: buffer de PCR 1X (Invitrogen), MgCl₂ 1.7 mM, Mix dNTP's 200 μ M, Primer 1 (rDNA1.58S) 18 pM, Primer 2 (rDNA2) 18 pM, *Taq* Polimerasa 5 U/ μ l y 5.0 μ l DNA. Las condiciones de termociclaje fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 2 min, desnaturalización a 94°C por 1 min, anillamiento a 57°C por 1 min, extensión a 72°C por 2 min. por 40 ciclos y extensión final a 72°C por 5 min. (Szalanski *et al.*, 1997). El producto final de PCR fue analizada mediante

electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1.4% teñido con GelRed (Biotium) y se visualizó en un fotodocumentador Gel Doc EZ (BIORAD).

5.1.3 PCR-RFLP's DE LA REGIÓN PARCIAL 18S-ITS1-5.8S

El producto final amplificado por PCR de la región parcial 18S-ITS1-5.8S-ITS2 parcial, se realizó una digestión enzimática con las enzimas *AluI*, *HhaI*, *EcoRI*, *HinfI* y *TaqI*, a una temperatura de incubación de 37°C con excepción de la enzima *TaqI* que se incubó a 65°C, por un periodo de 3 h. El volumen final de cada digestión fue de 20 µl con los siguientes componentes: buffer de digestión 2 µl, 1 µl de la enzima a 10 U/µl, 10 µl de producto de PCR y 7 µl de agua destilada estéril (Powers *et al.*, 2001).

5.2. RESULTADOS Y DISCUSIONES

El producto amplificado de la región parcial 18S-ITS1-5.8S-ITS2 parcial fue de 596 pb aproximadamente (Fig. 26). El perfil de restricción de la digestión enzimática (PCR-RFLPs) proporcionaron los siguientes patrones: *AluI* 288, y 235.7 pb; *HhaI* 510 pb; *EcoRI* 640 pb; *HinfI* 640 pb y *TaqI* 570 y 90 pb., (Fig. 27) lo cual corroboró molecularmente la especie *A. tritici* de acuerdo a los patrones enzimáticos obtenidos por Powers *et al.*, (2001).

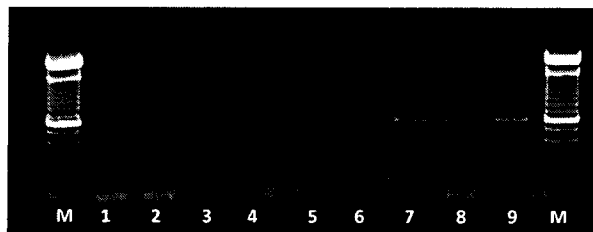


Figura 26. Productos de PCR de la región parcial 18-ITS1-1.58S-parcial ITS2 usando los primers rDNA1.58S y rDNA2. 1-2: Control (-) Agua destilada estéril; 3-9: Población de *Anguina tritici*. M: Marcador molecular 100 pb.

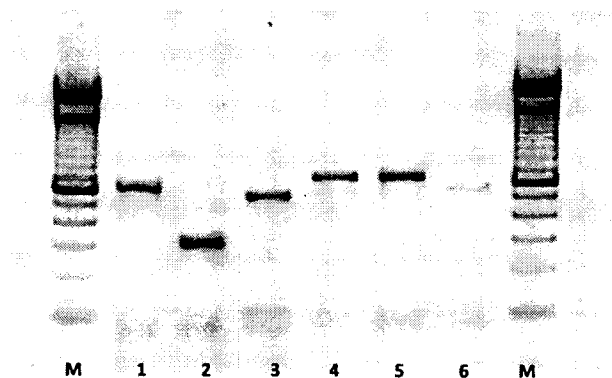


Figura 27. Digestión con enzimas de restricción de DNA amplificado por PCR de DNA de *Anguina tritici* población de Ensenada, Baja California. México, utilizando los primers rDNA1.58S y rDNA2. M: Marcador molecular 100 pb. 1. *Anguina tritici* testigo positivo sin digerir; (*Alu I*) 2; (*Hha I*) 3; (*EcoRI*) 4; (*HinfI*) 5; (*Taq I*).

Los patrones de PCR-RFLPs permitieron separar la especie de *Anguina tritici* de las demás especies. Este método es fácil y confiable para el diagnóstico de nematodos anguinidos transmitidos por semilla botánica ya que se tienen restricciones cuarentenarias en la movilización de semilla.

5.3 LITERATURA CITADA

DOF. (1996). NOM-017-FITO-1995 Por la que se establece la cuarentena exterior para prevenir la introducción de plagas del trigo. SENASICA-SAGARPA

Evans K., Trudgil D.L. and Webster J.M. (1993). Extraction, identification and control of plant parasitic nematodes. In: Evans K., Trudgil D.L., Webster J.M. (Eds.), Plant parasitic nematodes in temperate agriculture. CAB International Publishing, Wallingford (UK), pp 648-649.

Lehman P.S. (1979). Seed and leaf gall nematodes of the genus *Anguina* occurring in North America. Nematology Circular No. 55..

Nieto, G.L. y Delgado S.S. (1984). Detección de agallas de semillas de trigo ocasionadas por el Nematodo *Anguina Tritici* localizadas en el estado de Baja California Norte. XI Congreso Nacional de Fitopatología. San Luis Potosí. Resumen 94.

Powers, O.T., Szalanski, L.A., Mullin, G.P., Harris, S.T., Bertozzi, T. and Griesbach, A.J. (2001). Identification of seed gall nematodes of agronomic and regulatory concern whit PCR-RFLP of ITS1. *Journal of nematology* 33:191-194.

Szalanski, A.L., Sui, D.D., Harris, T.S. and Powers, T.O. (1997). Identification of cyst nematodes of agronomic and regulatory concern by PCR-RFLP of ITS1. *Journal of Nematology* 29:253–264.

Thomas, W.K., Vida, J.T., Frisse, L.M., Mundo, M. and Baldwin, J G. (1997). DNA sequences from formalin-fixed nematodes: Integrating molecular and morphological approaches to taxonomy. *Journal of Nematology* 29: 250-254.

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.

CAPITULO 6. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DEL NEMATODO *Ditylenchus dipsaci* (NEMATA: ANGUINIDAE) ATACANDO ALFALFA EN JALISCO, MÉXICO

El género *Ditylenchus* Filipjev, 1936, comprende alrededor de 90 especies descritas y un gran número de razas fisiológicas, muchas de ellas probablemente representando un complejo de especies difíciles de diferenciar debido a su gran similitud morfológica (Andersson, 1971; Duncan y Moens, 2006). La gran mayoría de las especies poseen hábitos micófagos y algunos son parásitos de plantas entre ellas *D. angustus*, *D. africanus*, *D. gigas*, *D. destructor* y *D. dipsaci* (Wendt *et al.* 1993). Esta última especie es conocida como nematodo foliar o de los bulbos y es la de mayor importancia económica debido a las pérdidas económicas que ocasiona. Los hábitos alimenticios de endoparasitismo obligatorio hacen que sea considerado un polífago de excelencia ya que afecta partes aéreas y subterráneas como bulbos, cormos, tubérculos y rizomas (Caubel y Pedron, 1976). El cultivo de alfalfa también puede ser afectado por poblaciones de *D. dipsaci*, ya que parasitan los brotes y pueden causar la muerte de plántulas jóvenes. Al afectar la semilla botánica, representa un riesgo en la diseminación a zonas donde no se encuentre presente (Gray *et al.*, 1994; Milano de Tomasel y McIntyre, 2001).

Durante 2014, el Programa Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria del SENASICA en el estado de Jalisco realizó un muestreo en el cultivo de alfalfa (*Medicago sativa* L.) con crecimiento reducido, acortamiento de entrenudos, deformación y decoloración de brotes y hojas. Estos síntomas son sospechosos a nematodos de importancia cuarentenaria por lo que el objetivo del trabajo fue la determinación taxonómica, molecular y la relación filogenética del nematodo foliar afectando este cultivo.

6.1 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.1 MUESTREO DEL MATERIAL BIOLÓGICO

El muestreo fue realizado en campos de alfalfa de la localidad Cuyacapan, Atoyac, Jalisco localizadas entre las coordenadas Latitud: 19.974489° N y Longitud: -103.5276407° W. Se colectaron siete muestras de plantas completas con raíces, tallos, hojas que presentaban síntomas sospechosos a nematodos foliares de importancia cuarentenaria.

6.1.2. EXTRACCIÓN DE NEMATODOS

Las plantas fueron disectadas de 1-2 cm aproximadamente tanto de raíces como de follaje y se incubaron por 4 h en agua destilada estéril a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ con 3 tratamientos: 1. raíces, 2. hojas+brotos y 3 tallos. Transcurrido el tiempo se procedió a realizar la observación de los nematodos fitoparásitos que emergieron de los tejidos bajo microscopio estereoscópico.

6.1.3. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

Se realizó la taxonomía tradicional de los especímenes detectados, para esto se seleccionaron hembras y machos, se anestesiaron con calor de mechero de alcohol y colocados en medio de montaje agua-agar al 2% (Esser, 1986). Se determinaron las características morfológicas y morfométricas para la identificación del género. Para la identificación de la especie se tomaron mediciones de los caracteres de diagnóstico y la obtención de los índices de Man. Se tomaron micrografías con una cámara digital AxioCam ICc1 (Carl Zeiss) adaptado al microscopio compuesto (Axiostar Plus de Carl Zeiss) y utilizando los objetivos de 20 y 100X. Las mediciones fueron realizadas con el programa AxioVision Rel 4.8 (Carl Zeiss).

6.1.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

6.1.4.1. EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE ESPECÍMENES INDIVIDUALES

La extracción de DNA se realizó a través del método propuesto por Williams *et al.*, 1992 y Thomas *et al.*, 1997 (modificado) utilizando los especímenes individuales previamente analizados por taxonomía tradicional. Los nematodos fueron recuperados del medio de montaje y colocados en 10 μ l de buffer de extracción (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0.45 % Tween 20; 0.05% gelatina) sobre un cubreobjetos limpio. Se maceró el espécimen con una punta de micropipeta bajo el microscopio estereoscópico y se mezcló la solución buffer de extracción-nematodo con la micropipeta. Se transfirió la solución a un tubo de microcentrifuga de 200 μ l y congeló a $-40^{\circ}C$ por 30 min. Pasado el tiempo de congelación, se incubaron inmediatamente a $65^{\circ}C$ por 1 h dando vortex al menos una vez durante la incubación y se agregó 0.1 μ l de Proteinasa K (60 μ g/ml) faltando 10-15 min. Se incubó a $95^{\circ}C$ por 15 min para inactivar la Proteinasa K y se conservó a $-20^{\circ}C$.

6.1.4.2 REACCIÓN DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN ITS1-5.8S-ITS2 Y LOS SEGMENTOS DE EXPANSIÓN D2-D3 DEL rDNA

Se utilizaron 5 μ l del extracto crudo de DNA para amplificar dos marcadores moleculares:

1. La región ITS1-5.8S-ITS2 empleando los primers AB28 (5'-GTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') (Joyce *et al.*, 1994) y TW81 (5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGT-3') (Howlett *et al.*, 1992). 2. Amplificación de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S empleando los primers D2A (5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3') y D3B (5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3') (Nunn, 1992).

Las reacciones de la PCR se realizaron en tubos de microcentrifuga de 200 μ l en un volumen total de 50 μ l. Para la amplificación de ITS1-5.8S-ITS2, la reacción constó de los siguientes componentes: buffer de PCR IX (Invitrogen), $MgCl_2$ 3 mM, Mix dNTP's 200 μ M, Primer 1 (TW81) 0.4 μ M, Primer 2 (AB28) 0.4 μ M, *Taq* Polimerasa 2.5 U/ μ l y 5.0 μ l DNA. La reacción se llevó a cabo en un termociclador i-Cycler (BIO-RAD) bajo las

condiciones de termociclaje: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, 34 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 45 seg., anillamiento a 57 °C por 30 seg., extensión a 72 °C por 1.30 min., y finalmente una extensión final a 72 °C por 5 min. (Skantar *et al.*, 2007) modificado.

Respecto a los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S, los componentes de reacción fueron: buffer de PCR IX (Invitrogen), MgCl₂ 3 mM, Mix dNTP's 200 µM, Primer 1 (D2A) 0.4 µM, Primer 2 (D3B) 0.4 µM, *Taq* Polimerasa 2.5 U/µl y 5.0 µl DNA. Las condiciones de termociclaje fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos, 34 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 45 seg., anillamiento a 55 °C por 45 seg., extensión a 72 °C por 1 min., y finalmente una extensión final a 72 °C por 5 min. (Marek *et al.*, 2010) modificado. Los productos de PCR de ambos marcadores fueron analizados por electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1.4% teñido con GelRed (Biotium) y visualizados en un fotodocumentador Gel Doc EZ (BIORAD).

6.1.4.3. 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 buffer de digestión, 1 µl de la enzima, 7 µl de producto de PCR y 10 µl de agua destilada estéril grado biología molecular. Se incubaron las muestras a 37°C para favorecer la digestión por 3 h y se analizaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa ultrapura-1000 al 2.5% teñidos con GelRed y visualizados en el fotodocumentador Gel Doc (BioRad).

6.1.4.4. SECUENCIACIÓN, BIOINFORMÁTICA Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Los productos amplificados fueron secuenciados por el método de Sanger en el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, SENASICA-SAGARPA. Las secuencias sentidas y antisentidas "forward" y "reverse" fueron ensambladas, editadas y secuencias de primers eliminadas con el programa CodonCode Aligner 4.2.7. Se revisaron los posibles errores en

la lectura de las bases nitrogenadas de la secuencia de los electroferogramas. La edición y corrección se realizó de manera manual en los casos en que fueron necesarios.

Se realizó BLASTING para determinar homología con secuencias depositadas en el Genbank. Para la realización de las inferencias filogenéticas, las secuencias de poblaciones mexicanas y algunas depositadas en el banco de genes fueron sometidas a una alineación múltiple con CLUSTAL W 2.3 (Thompson *et al.*, 1997). La búsqueda del mejor modelo de sustitución para inferencia bayesiana se realizó en Mr modeltest 2.3 (Nylander, 2004) y PAUP 4 (Swofford 1998). Se utilizaron los criterios de MrBayes v.3.2 (Huelsenbeck y Ronquist 2001), ejecutando 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 corrimientos utilizando el modelo HKY+G. El primer 20% de los árboles muestreados fueron eliminados de todos los análisis y los árboles restantes fueron usados para calcular el árbol consenso por la regla de la mayoría del 50% y las probabilidades posteriores fueron proporcionadas para cada clado. Los árboles fueron graficados con FigTree v1.3.1 (Rambaut, 2009).

6.2 RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.2.1. SÍNTOMAS DE INFECCIÓN Y EXTRACCIÓN DE NEMATODOS

Todas las muestras alfalfa presentaron síntomas de reducción del crecimiento, acortamiento de entrenudos, deformación de brotes (Fig. 28 A) y hojas así como decoloración de folíolos (“hojas albinas”) (Fig. 28 B). En tratamiento de incubación de raíces sólo se detectaron nematodos saprófitos mientras que los tratamientos de hojas, brotes y tallos se detectó un gran número especímenes activos del género *Ditylenchus*.



Figura 28. Síntomas producidos por el nematodo *D. dipsaci* en alfalfa en Cuyacapan, Atoyac, Jalisco. A) Deformación de hojas y acortamiento de entrenudos B) Decoloración de folíolos (“hojas albinas”).

6. 2. 2. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

Para la determinar la identidad de la especie involucrada en la sintomatología observada en alfalfa, se utilizaron los valores reportados por Hooper, 1972; Decker, 1969, Sturhan & Brzeski 1991, para especies del género *Ditylenchus*.

Los especímenes presentaron las características siguientes: **Hembras:** cuerpo delgado, región cefálica baja ligeramente aplanada, región glandular sin sobreposición marcada, bulbo medio muscular con válvula bien definida (Fig. A). Estilete pequeño y débil con nódulos bien desarrollados (Fig. B), saco postuterino con una longitud de $\frac{1}{2}$ de la distancia entre la vulva y el ano (Fig. D). **Machos:** cuerpo delgado (Fig. F), relativamente más pequeños que las hembras; espículas y gubernáculo simple de tamaño moderados y con bursa que cubre aproximadamente el 75% de la cola (bursa leptoderan) (Fig. E). Tanto en hembras como en machos se observó un campo lateral con 4 incisuras (Fig. c) y cola cónica aguda con terminación en punta de lápiz (Figs. A y F). Estas características morfológicas y morfométricas concuerdan con las reportadas para el género *Ditylenchus*. Para la identificación a nivel de especie fue necesario realizar las mediciones de los caracteres de diagnóstico y la obtención de los *Índices de Man* (Tabla 12). Como resultado de la

comparación de las mediciones e *Índices de Man* con los valores de referencia mencionados por Hooper, 1972; Decker, 1969 y Sturhan & Brzeski 1991, la especie corresponde al nematodo foliar o nematodo de la Alfalfa *D. dipsaci sensu stricto*.

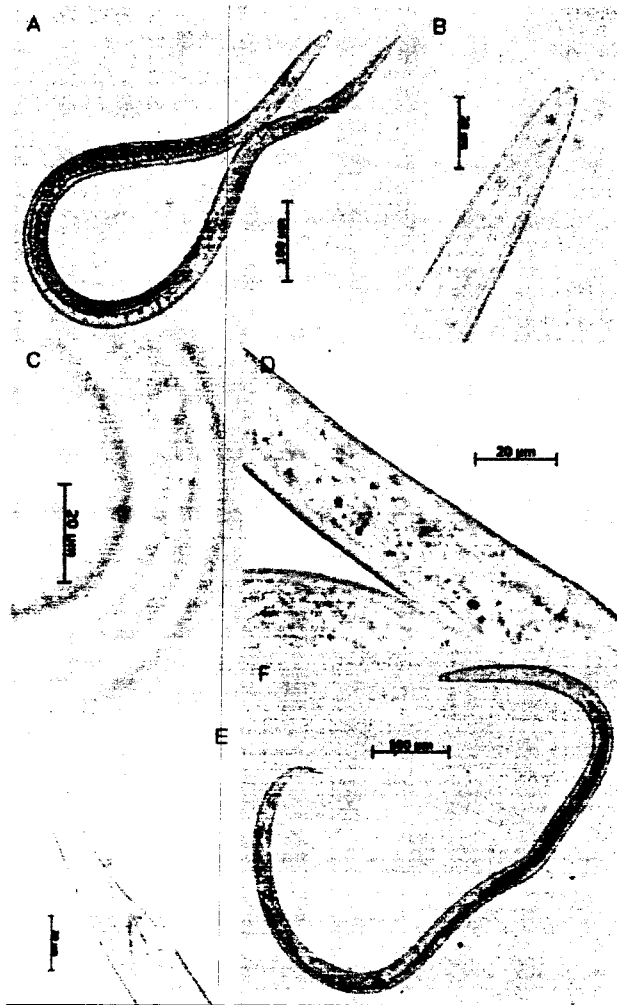


Figura 29. Micrografías de caracteres de diagnóstico para nematodos detectados en Alfalfa de Cuyacapan, Atoyac, Jalisco México a) hembra, B) región anterior y estilete. C) campos laterales (4), D) saco post-uterino, E) cola aguda y bursa *leptoderan.*, F) macho

Tabla 12. Morfometría de especímenes de *Ditylenchus* detectados en plantas de alfalfa procedentes de Cuyacapan, Atoyac, Jalisco, México (Todos los valores están dados en μm excepto V y T, los cuales están dados en porcentaje).

PARÁMETROS DE MEDICIÓN O ÍNDICES DE MAN)	VALORES DE ESPECÍMENES DETECTADOS		VALORES DE REFERENCIA PARA <i>D. dipsaci</i> S.S. (Hopper, 1972; Decker, 1969; Sturhan & Brzeski 1991)	
	n=10	n=15	?	?
Longitud total	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	*	*
Long. estilete	10.1±0.5 9.5-10.8	9.9±0.2 9.5-10.1	(10.0-13.0)	(9.0-12.0)
Long. esófago a la unión esófago-intestinal	172.3±17.8 134.3-219.4	178.4±20.4 153.4-215.0	*	*
Longitud de cola	90.1±12.4 77.3-111.1	85.7±4.3 80.1-93.1	95-105	*
Long. saco postuterino (PUS)	63.9±11.5 46.9-82.5	-	1/2 la distancia vulva-ano	-
Long. 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	-
Long. espícula	-	21.4±1.9 19.1-24.0	-	20-28
Long. gubernáculo	-	7.5±1.0 6.4-9.0	-	(8.0-11.0)
Long. de cloaca a parte más alejada del testículo.	-	672.1±116.2 491.9-801.4	-	*
a	38.7±3.2 33.4-46.4	41.2±2.3 38.0-43.7	30.2-64	35.4-53.5
b	7.0±0.7 6.0-8.4	6.3±0.7 5.5-7.4	6.0-8.8	5.5-7.8
c	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

♀=Hembras

♂= Machos

- = No aplica

* = Valor no disponible en literatura de referencia

6.2.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FILOGENÉTICA

6.2.3.1. AMPLIFICACIÓN DE LOS MARCADORES DEL rDNA

La amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 y segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S del rDNA produjeron un fragmento de aproximadamente 750 pb (Fig. 30) y 780 pb respectivamente (Fig. 31).

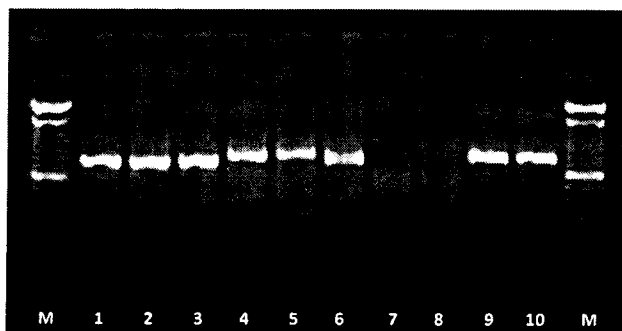


Figura 30. Amplificación de la región *ITS1- gen 5.8S-ITS2* del rDNA de *D. dipsaci* detectado en Alfalfa. M: marcador molecular de 100 pb; 1-6: amplificado a partir de extracción individual de DNA de *D. dipsaci s.s.*; 7 y 8: controles negativos (H_2O estéril grado PCR); 9 y 10: control positivo de *D. dipsaci s.s.* (ajo) amplificando en un fragmento de 750 pb.

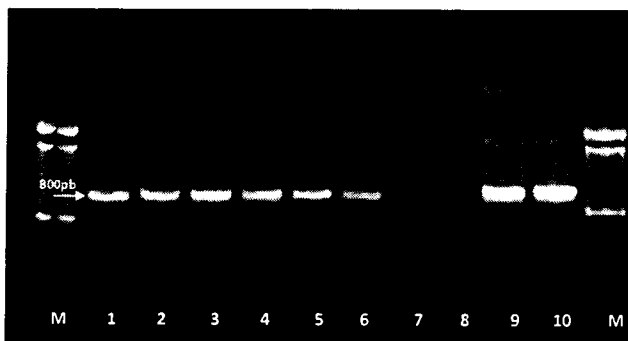


Figura 31. Amplificación de *segmentos de expansión D2 y D3 del gen 28S del rDNA*. M: marcador molecular de 100pb; 1-6: amplificado a partir de extracción individual de DNA de *D. dipsaci s.s.* encontrados; 7 y 9: control negativo (H_2O estéril grado PCR); 9 y 10: control positivo de *D. dipsaci s. s.* amplificando en un fragmento de 780 pb.

6.2.3.2. PATRÓN ENZIMÁTICO PCR-RFLP's

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 (Fig. 32) y con *HinfI* se obtuvieron dos fragmentos: 400 y 300 pb (Fig. 33). El patrón de digestión coincide con el presentado por el nematodo de los bulbos *D. dipsaci s.s.* en ajo para ambas enzimas sin embargo el patrón de digestión del nematodo *D. dipsaci s.s.* detectado en alfalfa con la enzima *RsaI* mostró un fragmento adicional de 200 pb. Es conocida la gran variabilidad patogénica de *D. dipsaci* manifestada en varias razas o patotipos representados por el hospedero que afecta, de esta forma basado en el patrón de restricción de *RsaI* pudiera indicar que el nematodo foliar y de los bulbos *D. dipsaci s.s.* detectado en este hospedero se tratase de la raza alfalfa.

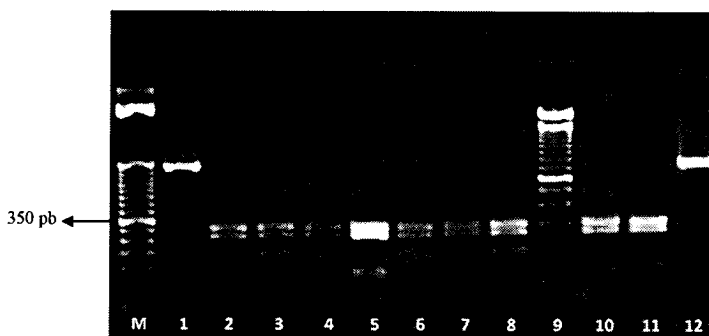


Figura 32. Digestión enzimática de productos de PCR de la región *ITS1-gen 5.8S-ITS2* del *rDNA* con la enzima *RsaI*. M: marcador molecular de 50 pb; 1 y 12: Producto de PCR sin digerir; 2-4, 6-8: Digestión con *RsaI* produciendo fragmentos de 335, 280, 200 y 132 pb, y 5: Digestión con *RsaI* de control positivo de *D. dipsaci s.s.* (ajo); 9: marcador molecular 100 pb, 10 y 11: Digestión con *RsaI* de *D. dipsaci s.s.* (ajo) originando fragmentos de 335, 280 y 132 pb.

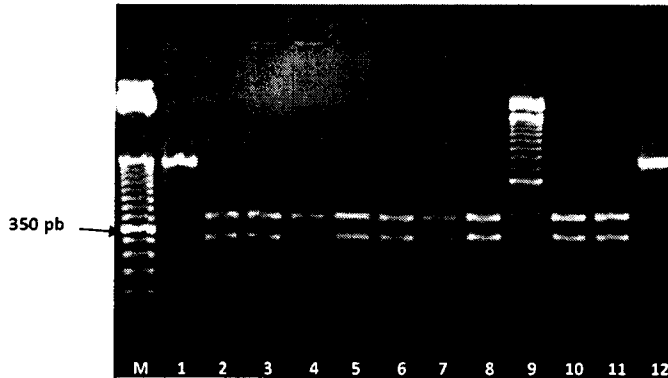


Figura 33. Digestión enzimática de productos de PCR de la región *ITS1-gen 5.8S-ITS2 del rDNA*. M: marcador molecular de 50 pb; 1 y 12: Producto PCR sin digerir; 2-8: Digestión con *Hinfl* produciendo fragmentos de 400 y 300 pb, 9: marcador molecular 100 pb. 10 y 11: Digestión con *Hinfl* de *D. dipsaci s.s.*(ajo) originando fragmentos de 400 y 300 pb.

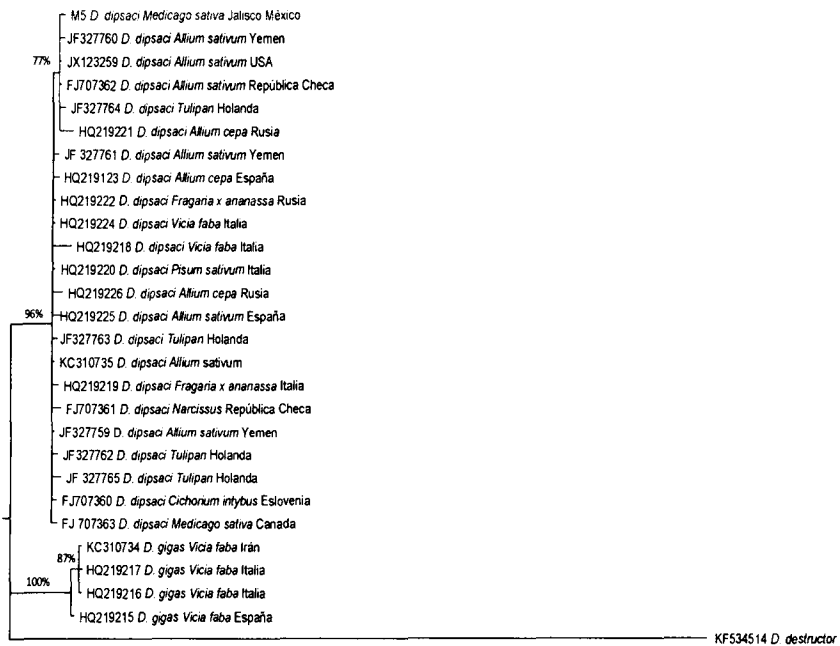
6.2.3.3. HOMOLOGÍA POR BLASTING Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO

La búsqueda de homología por BLAST con secuencias del NCBI para la regiones ITS1-5.8S-ITS2 y los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S ambos del rDNA de *D. dipsaci* de Cuyacapan, Atoyac, Jalisco, México, muestran un 99% de identidad con un conjunto de secuencias de *D. dipsaci* depositadas en el GenBank de diferentes hospederos y regiones del mundo.

El análisis filogenético se realizó inicialmente con un alineamiento múltiple de 37 secuencias y utilizando *D. destructor* (EF20813) como grupo externo. El conjunto de datos comprendió 1113 caracteres. La reconstrucción filogenética fue muy similar a la topología reportada por diferentes autores (Subbotin *et al.*, 2005; Castillo *et al.*, 2007; Jeszke *et al.*, 2014). La población mexicana de *D. dipsaci* enAlfalfa, se agrupó en el clade *sensu stricto* diploide de *D. dipsaci* (Fig. 34). Se observó similar tendencia en la inferencia a partir de las secuencias de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S rDNA de un alineamiento múltiple incluye 28 secuencias (Fig. 35).



Figura 34. 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 anguínidos depositadas en el GenBank. Valores de soporte son indicados en cada una de los clados.



0.03

Figura 35. 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.

6.3 LITERATURA CITADA

Andersson, S. (1971). The potato rot nematode, *Ditylenchus destructor* Thorne, as parasite in potatoes] In Swedish with English summary. Dissertation. Agricultural College of Sweden, Uppsala (SE).

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.

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.

Duncan, W.L and Moens, M. (2006). Migratory endoparasitic nematodes. In: Plant Nematology. Eds. R.N. Perry and M. Moens. CABI, UK., 447 pp.

Decker, H. (1969). Phytonematologie. VEB DeutscherLandwirtschaftsverlag, Berlin (DE).

Esser, R. P. (1986) .A water agar en face technique. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 53: 254-255.

Gray, F.A., Williams, J.L., Griffin, G.D and Wilson, T.E. (1994). Distribution in the Western United States on alfalfa and cultivar Reaction to mixed populations of *Ditylenchus dipsaci* and *Aphelenchoides ritzemabosi*. Supplement to *Journal of Nematology* 26:705-719.

Hooper, D.J. (1972). *Ditylenchus dipsaci*. CIH. Description of Plant Parasitic Nematodes. Set 1, No. 14.

Howlett, B.J., Brownlee, A.G., Guest, D.I., Adcock, G.J., and McFadden, G.I. (1992). The 5S ribosomal RNA gene is linked t o large and small subunit ribosomal RNA genes in the oomycetes, *Phytophthora vignae*, *P. cinnamomi*, *P. megasperaf. sp. glycinae* and *Saprolegnia ferax*. *Current Genetics* 22: 455–461.

- Huelsenbeck , J. and Ronquist, F. (2001). MrBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Jeszke, A., Budziszewska, M., Dobosz, R., Stachowiak, A., Protasewicz, D., Wieczorek, P. and Obrępańska-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.
- Joyce, S.A., Reid, A., Driver, F., and Curran, J. (1994). Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to identification of entomopathogenic nematodes. In A. M. Burnell, R.-U. Ehlers and J. P. Masson, eds. COST 812 Biotechnology: Genetics of Entomopathogenic Nematode-Bacterium Complexes. Proceedings of Symposium & Workshop, St. Patrick's College, Maynooth, County Kildare, Ireland, pp 178–187.
- Marek, M., Zouhar, M., Doua, 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.
- Milano de Tomasel, M.C., and McIntyre, G.A. (2001). Distribution and biology of *Ditylenchus dipsaci* and *Aphelenchoides ritzemabosi* in alfalfa grown in Colorado. *Nematopica* 31:11–16.
- Nunn, G.B. (1992). Nematode Molecular Evolution. Ph.D. Dissertation. University of Nottingham, UK.
- Nylander, J. (2004). MrModeltest 2.3. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Rambaut, A. (2009). FigTree. v1.3.1. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/>.
- Skantar, A.M., Handoo, Z.A., Carta, L.K., and Chitwood, D.J. (2007). Morphological and molecular identification of *Globodera pallida* associated with potato in Idaho. *Journal of Nematology* 39:133-144.

Sturhan, D. and Brzeski, M.W. (1991). Stem and bulb nematodes, *Ditylenchus* spp. In: Manual of Agricultural Nematology (Ed. Nickle WR), pp. 423–464. Marcel Dekker, Inc., New York (US).

Subbotin S.A., 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.

Thomas, W.K., Vida, J.T., Frisse, L.M., Mundo, M. and Baldwin, J.G. (1997). DNA sequences from formalin-fixed nematodes: Integrating molecular and morphological approaches to taxonomy. *Journal of Nematology* 29:250-254.

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24:4876–82.

Wendt, K.R., Vrain, T.C. and Webster J.M. (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.

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.

7. CONCLUSIONES GENERALES

1. El empleo de la taxonomía con un enfoque integrativo para la delimitación y diagnóstico de especies de nematodos de la familia Anguinidea en México fue de gran importancia ya que fortaleció las bondades de la taxonomía tradicional. Esto permitió descubrir y caracterizar dos nuevas especies nativas y la presencia de algunos afectando nuevos hospederos en nuestro país.
2. Se confirmó el descubrimiento y la caracterización morfológica y molecular del nematodo agallador foliar *Subanguina tlaxcaltensis* que es un nematodo que ocasiona agallas en tallos, hojas, peciolas y brotes *Ageratum conyzoides*, *Cosmos bipinnatus* y *Bidens* spp., del grupo de las Asteraceae localizado en los valles altos del estado de Tlaxcala.
3. Se determinó la delimitación y caracterización por morfotaxonomía y análisis molecular del nematodo agallador de la semilla *Anguina aristide*, nematodo que afecta hojas, tallos y semilla botánica en el pasto *A. divaricata*. Este nematodo se encontró distribuido en pastizales de zonas abiertas de bosques de pino y encino del municipio de Huamantla, Tlaxcala.
4. El estudio morfológico, morfométrico y molecular permitió determinar la presencia en México del nematodo foliar *Orrina phyllobia* atacando trompillo *Solanum elaeagnifolium*, maleza de importancia económica y ruderal en el municipio de San Luis de la Paz, Guanajuato.
5. Los patrones de restricción PCR-RFLPs permitieron diagnosticar molecularmente al nematodo agallador del trigo *Anguina tritici* de otras especies, haciéndolo un método fácil y fiable para su diagnóstico.

6. Las herramientas de taxonomía tradicional combinada con las moleculares proporcionaron evidencias para confirmar el primer reporte del nematodo foliar *Ditylenchus dipsaci* afectando plantas de alfalfa *Medicago sativa* en Jalisco, México.