



Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura



Convención Internacional de Protección Fitosanitaria
Proteger de las plagas los recursos vegetales del mundo

REVOCADO

PD 8:

Ditylenchus dipsaci y
Ditylenchus destructor

Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente

REVOCADO

NIMF 27

Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas

PD 8: *Ditylenchus dipsaci* y *Ditylenchus destructor*

Adoptado en 2015; publicado en 2016

Índice

1.	Información sobre la plaga	3
1.1	<i>Ditylenchus dipsaci</i>	3
1.2	<i>Ditylenchus destructor</i>	3
2.	Información taxonómica	4
3.	Detección	5
3.1	Hospedantes y síntomas	5
3.1.1	<i>Ditylenchus dipsaci</i>	5
3.1.2	<i>Ditylenchus destructor</i>	8
3.2	Extracción de los nematodos	9
3.2.1	Extracción de los bulbos y del ajo	9
3.2.2	Extracción de muestras de tierra y de materiales vegetales	9
4.	Identificación	11
4.1	Identificación morfológica	11
4.1.1	Preparación de los especímenes	11
4.1.2	Caracteres morfológicos de diagnóstico	12
4.2	Identificación molecular	15
4.2.1	<i>Ditylenchus dipsaci</i>	15
4.2.2	<i>Ditylenchus destructor</i>	16
4.2.3	Extracción de ADN	16
4.2.4	Análisis mediante RCP-PLFR de la región ITS del ADNr para la identificación de <i>D. dipsaci</i> y <i>D. destructor</i>	16
4.2.5	Prueba de RCP basada en SCAR para la identificación de <i>D. dipsaci</i>	17
4.2.6	Prueba de RCP específica para 18S e ITS1 para la identificación de <i>D. dipsaci</i>	18
4.2.7	Prueba de RCP específica para ADNr 5.8S para la identificación de <i>D. dipsaci</i>	18
4.2.8	Prueba de RCP específica para ADNr 5.8S e ITS para la identificación de <i>D. dipsaci</i>	19
4.2.9	Prueba de RCP basada en SCAR para la identificación de <i>D. dipsaci</i>	19
4.2.10	Controles para las pruebas moleculares	20
4.2.11	Interpretación de los resultados de la RCP convencional	20
5.	Registros	20
6.	Puntos de contacto para información adicional	20
7.	Agradecimientos	21

8. Referencias	21
9. Figuras	26

REVOCADO

1. Información sobre la plaga

El género *Ditylenchus* Felipe, 1936, está formado por un gran número de especies distribuidas por todo el mundo, la mayoría ficófagas. Sin embargo, algunas especies de este género tienen gran importancia como plagas de plantas superiores (Saturan y Bresque, 1991). Aunque ciertas plantas (como la remolacha, la alfalfa o el trébol) pueden verse afectadas tanto por *Ditylenchus dipsaci* como por *Ditylenchus destructor*, ambas especies raramente coinciden en la misma planta (Andrássy y Farkas, 1988).

1.1 *Ditylenchus dipsaci*

D. dipsaci sensu lato (s.l.), el nematodo del tallo y el bulbo, infesta a más de 1 200 especies de plantas silvestres y cultivadas. Este nematodo tiene como hospedantes muchas malas hierbas y gramíneas, que podrán tener una función importante en su supervivencia en ausencia de plantas cultivadas. Los análisis morfológicos, bioquímicos, moleculares y cariológicos de distintas poblaciones y razas de *D. dipsaci* s.l. indican que se trata de un complejo formado por al menos 30 razas, con rangos de hospedantes limitados. Jeszke *et al.* (2013) dividieron este complejo en dos grupos. El primero, *D. dipsaci sensu stricto* (s.s.), formado por poblaciones diploides caracterizadas por un tamaño “normal” y que comprende la mayoría de las poblaciones registradas hasta la fecha. El segundo grupo es poliploide y actualmente comprende *Ditylenchus gigas* Vovlas *et al.*, 2011 (la “raza gigante” de *D. dipsaci* que parasita a *Vicia faba* (haba)); *D. weischeri* Chizhov *et al.*, 2010 (que parasita a *Cirsium arvense* (cardo cundidor)); y tres especies no descritas de *Ditylenchus* llamadas D, E y F, que están asociadas a especies vegetales de Fabaceae, Asteraceae y Plantaginaceae, respectivamente (Jeszke *et al.*, 2013). De todas estas especies, solo *D. dipsaci* s.s. y su variante morfológicamente más grande *D. gigas* son plagas de las plantas de importancia económica. El presente protocolo contiene información para distinguir entre *D. dipsaci* s.s. y *D. gigas*.

D. dipsaci vive principalmente como endoparásito en los órganos aéreos de las plantas (tallos, hojas y flores), pero también infesta bulbos, tubérculos y rizomas. Este nematodo se transmite por las semillas de *V. faba*, *Medicago sativa* (alfalfa), *Allium cepa* (cebolla), *Trifolium* spp. (tréboles), *Dipsacus* spp. (cardos) y *Cucumis melo* (melón) (Sosa *et al.*, 2003; Sikora *et al.*, 2005). Una característica muy importante es que en su cuarto estado juvenil puede resistir la desecación durante largo tiempo, en ocasiones 20 años o más (Barker y Lucas, 1984). Cuando el tejido vegetal comienza a secarse, los nematodos se agrupan en un estado criptobiótico formando masas algodonosas (Figura 1), o “lana de nematodos”, que se observa a menudo en las semillas de vainas muy infestadas y en los residuos vegetales secos (p. ej., los que permanecen en el campo después de la recolección). La presencia en semillas y material vegetal seco de nematodos infectivos en el cuarto estado juvenil es importante para la dispersión pasiva del nematodo a grandes distancias. En estado desecado el nematodo puede sobrevivir al paso por el tracto intestinal del ganado porcino y bovino, en la superficie o en el interior de las semillas infestadas (Palmisano *et al.*, 1971).

Aunque *D. dipsaci* se considera una plaga de las plantas superiores, Viglierchio (1971) notificó que una población californiana de *D. dipsaci* de *Allium sativum* (ajo) podía reproducirse en hongos del suelo (*Verticillium* y *Cladosporium*) en condiciones de laboratorio.

Se sabe que *D. dipsaci* es un vector externo de bacterias fitopatógenas (p. ej., *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* [sin. *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosum*, *Corynebacterium insidiosum*], que causa la podredumbre de la alfalfa).

Según la Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas (EPPO, 2013a), *D. dipsaci* está presente en las siguientes regiones (excluidas las intercepciones): Europa, Asia, África, América del Norte, América Central y el Caribe, América del Sur y Oceanía.

1.2 *Ditylenchus destructor*

D. destructor, o anguilulosis de la papa (patata), infesta casi exclusivamente los órganos subterráneos de las plantas (p. ej., tubérculos, rizomas y órganos subterráneos de tipo caulinar). Es una especie

prácticamente cosmopolita, común en las regiones templadas y responsable de graves pérdidas en la producción de papa y lúpulo (EPPO, 2013a). El nematodo tiene un rango de hospedantes amplio, que comprende más de 90 especies vegetales, entre las que hay plantas ornamentales, plantas cultivadas y malas hierbas. *Solanum tuberosum* (papa/patata) es el principal hospedante; sus tubérculos desarrollan una podredumbre húmeda o seca que se transmitirá a otros tubérculos durante el almacenamiento. En determinadas condiciones, los organismos causantes de la podredumbre húmeda podrán producir graves daños en los tubérculos, pero también destruirán los nematodos. *D. destructor* solo puede sobrevivir cuando el tubérculo es invadido por organismos que producen podredumbre seca. Rojankovski y Ciurea (1986) encontraron 55 especies de bacterias y hongos asociadas a *D. destructor* en tubérculos de *S. tuberosum*, la mayoría del género *Fusarium*.

Otros hospedantes comunes son *Ipomoea batatas* (batata), los lirios bulbosos (híbridos y selecciones a partir de *Iris xiphium* e *Iris xiphioides*), *Taraxacum officinale* (diente de león), *Humulus lupulus* (lúpulo), *Tulipa* spp. (tulipán), *Leopoldia comosa* (jacinto silvestre o comoso), *Hyacinthus orientalis* (jacinto común), *Gladiolus* spp. (gladiolo), *Dahlia* spp. (dalia), *Coronilla varia* (coronilla) y *Anthyllis vulneraria* (vulneraria), *Beta vulgaris* (remolacha azucarera, remolacha forrajera y remolacha), *Calendula officinalis* (caléndula), *Daucus carota* (zanahoria), *Petroselinum crispum* (perejil) y *Trifolium* spp. (trébol rojo, blanco y alsike) (Sturhan y Brzeski, 1991). En ausencia de plantas superiores, *D. destructor* se reproduce con facilidad en el micelio de unas 70 especies de hongos y se ha comprobado que destruye las hifas de los hongos cultivados (Sturhan y Brzeski, 1991). La especie es capaz de sobrevivir a la desecación y a las bajas temperaturas, pero no forma masas algodonosas como *D. dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936. En cambio, esta especie hiberna en forma de huevos, por lo que estos son más vitales para *D. destructor* que para *D. dipsaci*. *D. destructor* es una plaga reglamentada de las papas de siembra y los bulbos de flores en muchos países (Sturhan y Brzeski, 1991). Se notificó la presencia de *D. destructor* en *Arachis hypogaea* (maní, cacahute) en Sudáfrica, pero actualmente se considera que estos registros corresponden a una especie diferente, *Ditylenchus africanus* Wendt, Swart, Vrain y Webster, 1995, de morfología y morfometría muy similares a *D. destructor*.

Según la Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas (EPPO, 2013a), *D. destructor* está presente en las siguientes regiones (excluidas las intercepciones): Europa, Asia, África Austral, América del Norte, América del Sur y Oceanía.

2. Información taxonómica

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

Sinónimos: los sinónimos de la especie tipo *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936 se enumeran en Siddiqi (2000)

Posición taxonómica: Nematoda, Secernentea, Diplogasteria, Tylenchida, Tylenchina, Tylenchoidea, Anguinidae

Nombres comunes: acebollado del centeno, anguilulosis de la avena, cebollino del centeno, nematodo de la cebolla (español) (base de datos de la EPPO: <https://gd.eppo.int>, consultada el 30/11/2015)

Nota: *D. dipsaci* se considera actualmente un complejo de especies formado por un gran número de razas biológicas y de poblaciones que difieren principalmente en la preferencia de hospedante. En consecuencia, 13 especies nominales se han considerado sinónimas de *D. dipsaci* y se han diferenciado hasta 30 razas biológicas, que se distinguen principalmente por el rango de hospedantes y por lo general se nombran según su planta hospedante principal.

Nombre: *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945

Sinónimos: ninguno

Posición taxonómica: Nematoda, Secernentea, Diplogasteria, Tylenchida, Tylenchina, Tylenchoidea, Anguinidae

Nombres comunes: anguilulosis de la patata, nematodo de la patata, nematodo de la pudrición de la papa (español) (base de datos de la EPPO: <https://gd.eppo.int>, consultada el 30/11/2015)

De Ley y Blaxter (2003) han creado el sistema de clasificación más reciente, basado en observaciones morfológicas, en datos moleculares y en el análisis cladístico.

3. Detección

Tanto *D. dipsaci* como *D. destructor* producen los siguientes síntomas comunes que permiten su detección: engrosamiento, deformación, alteración del color y retraso del crecimiento de los órganos aéreos de la planta, y necrosis o pudrición de los bulbos y los tubérculos (Thorne, 1945).

Ditylenchus dipsaci

D. dipsaci muestra adaptación al parasitismo en su capacidad de invadir el tejido parenquimatoso compacto tras la lisis enzimática de la capa péctica o de laminillas medias entre paredes celulares adyacentes, lo que hace que las células se separen y se redondeen. Esto ocasiona la típica apariencia brillante o textura harinosa de los tejidos infestados, que recuerda la carne de una manzana sobremadura (Southey, 1993).

Según Vovlas *et al.* (2011), la infestación de *V. faba* por *D. gigas* (la raza gigante del nematodo del tallo y el bulbo) produce engrosamiento y deformación del tejido del tallo y regiones que se vuelven marrón rojizo y luego negras. Las plantas con infestación grave producen semillas deformadas, más oscuras y pequeñas que las semillas de plantas no infestadas; además, presentan punteado necrótico en la superficie. Además de *V. faba*, son hospedantes las especies *Lamium purpureum*, *Lamium album*, *Lamium amplexicaule*, *Ranunculus arvensis*, *Convolvulus arvensis* y *Avena sterilis*.

Ditylenchus destructor

D. destructor suele infestar los órganos subterráneos de las plantas (tubérculos y estolones de la papa; rizomas de la menta y raíces del lúpulo y la tila), ocasionando alteración del color y pudrición del tejido vegetal. A veces también resultan infestados los órganos aéreos, lo que provoca enanismo, engrosamiento y ramificación del tallo, y enanismo, abarquillado y alteración del color de las hojas (p. ej., en la papa) (Sturhan y Brzeski, 1991). Sin embargo, lo más frecuente es no encontrar síntomas de infección en los órganos aéreos de las plantas.

3.1 Hospedantes y síntomas

3.1.1 *Ditylenchus dipsaci*

Según Sturhan y Brzeski (1991) los hospedantes principales de *D. dipsaci* son Gramineae: *Avena sativa* (avena), *Secale cereale* (centeno), *Zea mays* (maíz), *Triticum aestivum* (trigo); Liliaceae: *A. cepa*, *A. sativum*, *Tulipa* spp.; Leguminosae: *M. sativa*, *Vicia* spp., *Pisum sativum*, *Trifolium* spp.; Solanaceae: *S. tuberosum*, *Nicotiana* spp.; Cruciferae: *Brassica campestris*, y Amarilidaceae: *Narcissus* spp. Otros hospedantes son *D. carota*, *Fragaria* spp. (fresa/frutilla), *B. vulgaris*, *H. orientalis*, *Allium ampeloprasum* (puerro silvestre), *Phlox drummondii*, *Phlox paniculata*, *Dianthus* spp. (clavel), *Apium graveolens* (apio), *Hydrangea* spp., *Lens culinaris* (lenteja), *Brassica napus* (colza), *Petroselinum crispum* y *Helianthus annuus* (girasol).

Una planta hospedante podrá albergar varias generaciones sucesivas de *D. dipsaci* durante una temporada de crecimiento. Si las partes afectadas de la planta se necrosan debido a las lesiones ocasionadas por la plaga, los nematodos abandonan el hospedante antes de que termine de morir. Cuando no disponen de plantas hospedantes, los nematodos se pueden introducir en otras plantas y alimentarse de ellas durante un tiempo, aunque no pueden reproducirse en plantas distintas de sus hospedantes (Andrássy y Farkas, 1988). Los síntomas más frecuentes de infestación por *D. dipsaci* son el raquitismo y clorosis de las plantas; el engrosamiento, raquitismo, deformación o presencia de agallas en tallos, peciolos y flores, y la pudrición y presencia de lesiones necróticas en bulbos y rizomas, que a menudo se observan en forma de anillos marrones al cortar los bulbos. *D. dipsaci* también podrá infestar las

semillas, por ejemplo, de *Phaseolus vulgaris* (judía cometodo, habichuela verde o judía verde), *V. faba*, *Allium* spp. y *M. sativa*. Las semillas pequeñas generalmente no muestran signos de infestación visibles, pero las semillas más grandes podrán tener manchas y la superficie contraída.

3.1.1.1 Síntomas específicos de las Gramineae

Avena sativa y Secale cereale (McDonald y Nicol, 2005). Las hojas se deforman, los tallos se engrosan y se produce una proliferación patológica de retoños; la planta es achaparrada y raquítica. En el cultivo de *S. cereale*, *D. dipsaci* está presente sobre todo en suelos ligeros pobres en humus y de forma natural en zonas donde se cultiva centeno regularmente. Los primeros signos de infestación se pueden observar a finales del otoño, pero son más evidentes en la primavera: en cultivos de centeno, la presencia de varias manchas en plantas con retraso del crecimiento indica que el cultivo está afectado por la plaga. Como las plantas de *A. sativa* infestadas tienen un crecimiento más lento, su color verde destaca cuando el cultivo amarillea. El *T. aestivum* afectado presenta los mismos síntomas que los demás cereales y solo es infestado por *D. dipsaci* en Europa central y oriental (Rivoal y Cook, 1993).

Zea mays es un mal hospedante de *D. dipsaci*, pero la invasión de los tejidos del tallo en plantas jóvenes produce necrosis en esos tejidos y ocasiona el encamado o la muerte de la planta antes de la recolección (Rivoal y Cook, 1993). Las hojas de las plantas infestadas son quebradizas y están retorcidas en espiral. Los entrenudos se acortan y la parte baja del tallo se ahueca, mientras que las plantas más grandes se rompen y se encaman.

3.1.1.2 Síntomas específicos de las Liliaceae

Allium cepa, Allium sativum y Allium cepa var. aggregatum (champiño). En la mayoría de las especies de *Allium* la infestación por *D. dipsaci* produce una deformación característica de las hojas y los bulbos (figuras 2, 3 y 4). La base de las plantas jóvenes se hinchona y las hojas se deforman. Los bulbos infestados más viejos muestran engrosamiento (hinchazón) de las escamas, a menudo con grietas abiertas en el plato basal (Potter y Olthof, 1993). Cuando *A. cepa* es infestada por *D. dipsaci*, su apariencia es escarchada, debido a la disolución de las células ocasionada por la alimentación del nematodo (Ferris y Ferris, 1998). Los bulbos infestados tienen a pudrirse en poco tiempo durante el almacenamiento (Bridge y Hunt, 1986). Las escamas internas del bulbo suelen sufrir una infestación más intensa que las externas. A medida que avanza la temporada, los bulbos se ablandan y cuando se cortan se percibe el pardeamiento de las escamas en círculos concéntricos. En cambio, *D. dipsaci* no induce deformación de las hojas ni engrosamiento en *A. sativum*, pero ocasiona amarilleamiento y necrosis de las hojas (Netscher y Sikora, 1990). Melnikov et al. (2012) notificaron por primera vez la presencia de *D. dipsaci* en *A. sativum* en Minnesota (Estados Unidos de América). Los síntomas detectados en los órganos aéreos de la planta fueron retraso del crecimiento y clorosis, mientras que los bulbos presentaban necrosis, subdesarrollo y deformación. En las hojas de *Allium* spp. infestadas podrán aparecer pequeñas vesículas, mientras que en las semillas no se observan síntomas.

Tulipa spp. (Southey, 1993). Los síntomas de la infestación por *D. dipsaci* del tulipán, tanto en las plantas en crecimiento como en los bulbos, son bastante diferentes de los de *Narcissus* spp. En el campo, la infestación se detecta mejor en la floración; el primer signo es una lesión decolorada o purpúrea en un lado del tallo, inmediatamente por debajo de la flor, que se dobla hacia la lesión. La lesión aumenta de tamaño, la epidermis se resquebraja —revelando debajo un tejido laxo típico— y el daño se extiende hacia abajo y a menudo hacia arriba, a los pétalos. En las infestaciones más graves, se produce una extensión de lesiones similares desde las axilas foliares hacia abajo, por los tallos, y el crecimiento podrá distorsionarse. Las infestaciones comienzan en la base de los bulbos nuevos, que surgen de yemas laterales de la base de los tallos existentes. Al retirar las escamas marrones exteriores, la infección se puede ver y notar en las escamas exteriores carnosas en forma de zonas blandas grises o marrones. Los bulbos infestados no muestran anillos marrones como en el narciso y en el jacinto.

3.1.1.3 Síntomas específicos de las Leguminosae

Medicago sativa. *D. dipsaci* es la plaga de nematodos más importante de *M. sativa*. La infestación se produce con facilidad en los suelos más pesados y durante épocas de lluvias abundantes o en superficies

regadas por aspersor. La llamada “bandera blanca”, relacionada con la pérdida de clorofila foliar, suele ser un síntoma de los cultivos infestados en condiciones de déficit hídrico (Griffin, 1985). En los campos infestados hay a menudo zonas irregulares de crecimiento escaso. Los síntomas típicos de la infestación por nematodos incluyen el engrosamiento basal, el enanismo y la torsión de los tallos y las hojas, el acortamiento de los entrenudos y la abundancia de yemas axilares, que lleva a una proliferación patológica de nuevos tallos que da una apariencia arbustiva a la planta (McDonald y Nicol, 2005). Las plantas infestadas a veces no alcanzan una altura suficiente para su uso como heno (Ferris y Ferris, 1998) y a menudo no producen espigas florales (McDonald y Nicol, 2005). En la alfalfa, *D. dipsaci* es un factor predisponente para *Phytophthora megasperma*. El daño por *D. dipsaci* aumenta cuando en las plantas enfermas y quebradas hay también presencia de otros nematodos, saprófagos (de las especies *Rhabditis*, *Cephalobus* y *Panagrolaimus*), que contribuyen a acelerar su muerte (Andrássy y Farkas 1988). En las semillas de *Medicago* infestadas no se observan síntomas.

Trifolium spp. (Cook y Yeates, 1993). Los síntomas son bastante similares a los descritos para *M. sativa*, excepto en los tréboles rojo y blanco. La plaga invade el trébol rojo, sobre todo con tiempo frío y lluvioso. En el campo aparecen grandes círculos de plantas enfermas; las más afectadas son las plantas del interior, y las situadas en el centro suelen estar marchitas. Las plantas se engrosan en la base, como bulbos, y las hojas se vuelven quebradizas y marchitas y sus venas se engrosan visiblemente. Los primordios florales se hinchan en forma de agallas; una sola agalla podrá contener 5 000 nematodos (Courtney, 1962). Los tallos de trébol blanco infestados por *D. dipsaci* son cortos y están engrosados, las yemas forman matas y las partes infestadas se amarronan en verano o en otoño. Las hojas son más estrechas de lo habitual, pero con peciolo más gruesos y más cortos. Los botones florales están engrosados en la base (Andrássy y Farkas, 1988).

3.1.1.4 Síntomas específicos de las Solanaceae

***Solanum tuberosum*.** *D. dipsaci* produce una podredumbre en forma de embudo que se extiende hacia el interior del tubérculo más que la podredumbre superficial causada por *D. destructor*. El nematodo invade los tallos y las hojas y esto origina un típico retraso del crecimiento de la planta acompañado de una fuerte deformación de los tallos y los peciolo (Evans y Trudgill, 1992).

Nicotiana spp. (Johnson, 1998). Los nematodos infectivos (en el cuarto estado juvenil) penetran en las hojas y los tallos de las plántulas de tabaco con tiempo húmedo y provocan pequeños engrosamientos amarillos (agallas) que podrán extenderse 10 cm o más por encima del suelo. Al aumentar el número de agallas, se inicia una necrosis prematura del tejido vegetal. Las hojas más bajas podrán desprenderse y las más altas amarillean y las agallas acaban por pudrirse, lo que detiene el crecimiento de las plantas infestadas. Finalmente, sobre todo con tiempo frío y húmedo y en suelos pesados, los tallos infestados se rompen y las plantas caen.

3.1.1.5 Síntomas específicos de las Cruciferae

La infestación por *D. dipsaci* en nabinas (*B. campestris*) maduras podrá producir una pudrición grave de la corona.

3.1.1.6 Síntomas específicos de las Amarilidaceae

Narcissus spp. (Southey, 1993). Los síntomas típicos son la presencia en las hojas de engrosamientos similares a ampollas de color amarillento pálido (vesículas) y los anillos marrones concéntricos que se pueden ver al cortar los bulbos transversalmente (figuras 5 y 6). Cuando los bulbos se cortan longitudinalmente se observa que la necrosis comienza por el cuello y se extiende hacia abajo. Los engrosamientos se observan mejor antes de la floración, cuando las hojas están en crecimiento activo. En las infestaciones leves, es más fácil detectar los engrosamientos palpando con los dedos índice y pulgar que visualmente. La infestación por *D. dipsaci* se puede detectar en los bulbos secos causando un mínimo de daños mediante un corte justo por debajo del cuello. Una inspección exhaustiva en las etapas iniciales de la infestación revela zonas brillantes y esponjosas en las que las células se han separado; poco después se produce una necrosis parda.

3.1.1.7 Síntomas específicos de otros hospedantes

***Fragaria* spp.** *D. dipsaci* es la única especie de *Ditylenchus* considerada patógena de la fresa (Brown *et al.*, 1993). El daño se observa en las hojas, pequeñas y deformes, y en los peciolos, cortos, gruesos y retorcidos.

Familia Asparagaceae, subfamilia Sciloideae (jacintos) y otros bulbos (Southey, 1993). Los síntomas en los bulbos son los mismos que en *Narcissus* spp., pero generalmente no se observan engrosamientos evidentes en las hojas de las plantas. El follaje podrá presentar rayas amarillo pálido, deformación y a menudo un ligero engrosamiento. Otros bulbos liliáceos por lo general muestran los mismos síntomas que los jacintos. Los síntomas de infestación en las Amaryllidaceae son similares a los de *Narcissus* spp.; por ejemplo, *Galanthus* spp. y *Nerine* spp. muestran engrosamientos en las hojas y anillos marrones concéntricos en los bulbos.

Beta vulgaris* y *Daucus carota (Cooke, 1993). Al alimentarse, *D. dipsaci* destruye el punto vegetativo de las plántulas (ocasionando la formación de múltiples coronas); los cotiledones y las hojas podrán retorcerse, hincharse y deformarse, y se podrán formar agallas en las hojas o en los peciolos de las plantas algo más desarrolladas. Más avanzada la temporada, el nematodo al alimentarse de la corona podrá causar una podredumbre conocida como pudrición de la corona o del cuello, cuya primera manifestación visible son unas pústulas grisáceas en relieve, normalmente en las cicatrices de las hojas. La pudrición se desarrolla seguidamente hacia afuera y hacia abajo, expandiéndose por el hombro de la raíz y permitiendo que la corona se desprenda al tirar de ella. En *D. carota*, otros síntomas podrán consistir en el desarrollo anormal de las hojas y la alteración del color de la parte superior de la raíz principal. Los síntomas se producen principalmente en la raíz y el tallo de la planta, entre 2 cm y 4 cm por debajo y por encima del nivel del suelo. Las infestaciones graves causan la necrosis de las hojas y la podredumbre de la corona, especialmente en otoño (Figura 7).

***Phlox paniculata* y otras plantas ornamentales** (Southey, 1993). En el flox, los síntomas típicos de los brotes infestados son el engrosamiento y fragilidad y el acortamiento de los entrenudos de los tallos, que tienen tendencia a rajarse. La rizadura y reducción del limbo de las hojas superiores (las más altas podrán verse reducidas a delgados filamentos) son síntomas característicos y exclusivos de este hospedante. Se han registrado crecimiento anormal, engrosamiento y otros síntomas en especies y cultivares hospedantes de *Anemone*, *Calceolaria*, *Cheiranthus*, *Gypsophila*, *Helenium*, *Heuchera*, *Lychnis*, *Lysimachia* y *Penstemon* (Roberts, 1981). Edwards (1937) notificó retraso del crecimiento, malformación foliar, pudrición y ausencia de floración en *Primula* spp. Las plantas leñosas no suelen resultar infestadas, pero *D. dipsaci* podrá infestar a *Hydrangea*, causando deformación de los brotes no leñosos, engrosamiento de los peciolos y las venas principales y una acusada rizadura del limbo de las hojas. Las hojas rizadas suelen ser el primer signo de infestación. Otra planta leñosa, *Yucca smaliana*, muestra deformación foliar y engrosamientos similares a ampollas.

3.1.2 *Ditylenchus destructor*

Según Sturhan y Brzeski (1991), *D. destructor* parasita principalmente tubérculos (p. ej., papa y dalia), bulbos (p. ej., lirios bulbosos, tulipanes y gladiolos) y raíces cultivadas (p. ej., remolacha azucarera y zanahoria) y es capaz de destruir las hifas de *Agaricus hortensis* (champiñón común). Otros hospedantes son *I. batatas*, *A. sativum*, *P. vulgaris*, *Angelica sinensis* (dong quai, angélica china o ginseng hembra), *Panax ginseng* (ginsén o ginseng), *Taraxacum officinale*, *Begonia* spp. y bulbos de *Erytronium denscanis* (diente de perro).

***Solanum tuberosum* y *Dahlia* spp.** Durante el período de crecimiento no hay signos visibles. Los nematodos normalmente penetran en los tubérculos de papa a través de los estolones: la mayoría se localizan en el límite entre las partes que pardean y las que no están dañadas. Si se toma una pequeña muestra de esta parte del tubérculo y se coloca en agua, la masa de pequeños nematodos se puede apreciar incluso con una simple lupa. Los primeros síntomas de infestación por *D. destructor* son manchas pequeñas, de aspecto calizo, blancas o de color claro, que se pueden observar justo por debajo de la piel del tubérculo (Brodie, 1998). Estas manchas después se agrandan y se oscurecen gradualmente (pasando de gris a marrón oscuro y a negro) y adquieren una textura esponjosa (Figura 8) que es, sobre

todo, el resultado de la invasión secundaria por bacterias, hongos y nematodos saprófitos (Brodie, 1998). Los tubérculos afectados gravemente presentan típicamente zonas ligeramente hundidas, con la superficie agrietada, arrugada y apergaminada. La piel no es invadida, pero se vuelve delgada y se agrieta a medida que los tejidos subyacentes infestados se secan y encogen (Brodie, 1998). Al final del proceso se podrá producir la momificación de los tubérculos enteros totalmente dañados; estos tubérculos momificados flotan en el agua (Figura 9). Por el contrario, la piel de *S. tuberosum* no suele agrietarse por la infestación por *D. dipsaci*. Los nematodos se siguen reproduciendo dentro de los tubérculos después de la recolección y podrán llegar a formar poblaciones muy numerosas. Los síntomas podrán ser más visibles después del almacenamiento. Por lo general, en los tubérculos infestados se producen infecciones secundarias por hongos, bacterias y nematodos de vida libre.

***Beta vulgaris*.** La infestación produce lesiones necróticas oscuras en las raíces y los rizomas. Dallimore y Thorne (1951) notificaron síntomas similares a los de la pudrición del cuello. En la remolacha azucarera no solo ocasionan pérdida de rendimiento sino también una reducción del contenido de azúcar.

***Daucus carota*.** La infestación produce grietas transversales en la piel de la zanahoria y manchas blancas en el tejido cortical. Las infecciones secundarias por hongos y bacterias en esas zonas también podrán producir descomposición; los daños se observan fácilmente en una sección transversal de la zanahoria. El nematodo continúa con su actividad destructora durante el almacenamiento en invierno y las zanahorias dejan de ser aptas para el consumo.

***Iris* spp. y *Tulipa* spp.** (Southey, 1993). La infestación produce marcas lineales grisáceas que se extienden hacia arriba desde la placa basal por las escamas carnosas exteriores. A medida que avanza la infestación, los daños se extienden por la superficie del bulbo y a través de sus tejidos y se produce una pudrición secundaria seca y fibrosa que causa el hundimiento del bulbo. Cuando se secciona transversalmente un bulbo infestado se perciben claramente unas manchas marrones anulares. El amarilleo y el marchitamiento descendente del follaje son síntomas secundarios causados por el daño en el bulbo y el posterior cese de la actividad fisiológica de las raíces.

La infestación por *D. destructor* de los conos de la planta ornamental *Liatris spicata* (liatris o liátride) conservada en cámaras frigoríficas en Sudáfrica se manifestó en forma de podredumbre negruzca con nematodos vivos en diferentes estados en el tejido adyacente a las zonas en descomposición (Van der Vegte y Daiber, 1983).

3.2 Extracción de los nematodos

3.2.1 Extracción de los bulbos y del ajo

Para extraer los nematodos, las escamas afectadas de los bulbos (principalmente las interiores) o los dientes de ajo afectados se cortan en pequeños trozos y se ponen en un recipiente (p. ej., una placa de Petri) con agua de grifo a temperatura ambiente. Para obtener una suspensión clara los trozos se podrán colocar sobre un tamiz de 200 µm a 250 µm de abertura cubierto con papel de filtro, que actúa como soporte (método del plato de Oostenbrink). Al cabo de 1 hora o más, los nematodos se pueden observar con una lupa binocular (con un aumento de al menos 40×).

3.2.2 Extracción de muestras de tierra y de materiales vegetales

El método del embudo de Baermann es una técnica de referencia para la extracción de nematodos de muestras de tierra y de materiales vegetales (bulbos, raíces, peladuras de papa y semillas). Se ajusta un tubo de goma al tallo del embudo y se cierra mediante una pinza de muelle o de tornillo. El embudo se coloca en un soporte y se llena casi hasta el borde con agua de grifo. La tierra o el tejido vegetal cortado en pedazos pequeños se coloca dentro de un trozo de muselina o en papel tisú, que se dobla alrededor del material y se sumerge suavemente en el agua del embudo. Los nematodos activos atraviesan el tejido y se hunden hasta el fondo del cuello del embudo. Transcurridas unas horas, o al día siguiente, se extrae una pequeña cantidad del agua que contiene los nematodos y se observa al microscopio (Flegg y Hooper, 1970).

Una variante de esta técnica consiste en sustituir el embudo por un plato. Se deshacen los terrones de la tierra y se retiran las piedras y los residuos vegetales. La muestra de tierra (50 ml) se distribuye uniformemente en un círculo de papel absorbente de una sola capa sobre un tamiz de plástico de malla gruesa colocado sobre un recipiente de plástico. Se añade agua al recipiente hasta que la tierra esté completamente húmeda pero no sumergida. El recipiente se cubre con una placa de Petri grande que hace de tapa para reducir la evaporación de agua. Esta estructura se mantiene al menos 24 horas; después se desecha la tierra y la suspensión de nematodos se vierte del recipiente a un plato para su examen con la ayuda de un microscopio de disección. La tierra se puede sustituir por tejido vegetal picado finamente (Kleynhans, 1997).

La técnica del nebulizador de Seinhorst para bulbos y raíces se diferencia del método del embudo de Baermann en que la savia de la planta y los productos tóxicos de la descomposición se eliminan mediante lavado. Para plantas como *Narcissus* spp. debería preferirse este método al del embudo de Baermann. Con este método, se coloca un embudo de Baermann o un plato de Oostenbrink en una nube o niebla de agua para evitar el agotamiento del oxígeno. La nube se produce mediante difusores que pulverizan agua sobre el material vegetal o bien hacia arriba, de manera que las gotículas caigan suavemente sobre el material vegetal. Los nematodos vivos abandonan el tejido vegetal y son lavados hacia el embudo o el plato, donde sedimentan. Los nematodos se recogen en intervalos de 24 a 48 horas en un vaso de precipitados de vidrio abriendo la pinza de tornillo ajustada a la salida del embudo, o bien los especímenes se recogen en un tamiz de 20 µm a 25 µm. Pueden realizarse múltiples extracciones durante hasta cuatro semanas. Esta técnica se describe en Hooper (1986).

Otro método para extraer *Ditylenchus* spp. de muestras vegetales se adoptó a partir de una descripción de Oliveira *et al.* (2013). El material vegetal se corta en trozos de 1 cm que se introducen en frascos de 500 ml llenos de agua de grifo. Se perforan dos agujeros en las tapas de los frascos; uno da acceso al tubo de una bomba de acuario y el otro sirve de salida de aire. El material se mantiene durante 72 horas continuamente aireado con ayuda de la bomba. La suspensión resultante se vierte a través de un tamiz de 1 000 µm para retirar los residuos vegetales y luego a través de un tamiz de 38 µm para extraer los nematodos. En este método, la aireación de la suspensión evita la pudrición del material vegetal, de manera que la proliferación de hongos y bacterias que se alimentan de este material es mínima y muchos de los nematodos permanecen vivos. La agitación que genera la aireación de la suspensión del material vegetal ayuda a desprender más nematodos del tejido radicular y, por tanto, se consigue una estimación mucho más precisa del grado de infestación del material vegetal.

Los nematodos también se pueden extraer del material vegetal mediante el método de Coolen y D'Herde (1972). El material vegetal se lava, se corta en pedazos de aproximadamente 0,5 cm y se maceran porciones de 5 g en 20 ml de agua de grifo en una mezcladora doméstica a la velocidad de mezclado más baja durante 1 min. La desventaja de este método es que los especímenes de nematodos de mayor tamaño, como los adultos de *D. dipsaci*, pueden ser cortados en la mezcladora. La suspensión de nematodos y fragmentos de tejidos se lava a través de un tamiz de 750 µm colocado sobre otro de 45 µm. El residuo que queda en el tamiz de 45 µm se recoge y se vierte en dos tubos de centrifugadora de 50 ml. Se añade a cada tubo aproximadamente 1 ml de caolín, se agita bien la mezcla y a continuación se centrifuga durante 5 min a 3 000 rpm. El sobrenadante se decanta y se añade a los tubos una solución de sacarosa (densidad 1,13 g/cm³). La mezcla se agita bien y se centrifuga durante 1 min a 1 750 rpm. El sobrenadante se lava a través de un tamiz de 45 µm, y el residuo se recoge para estudiar los nematodos.

El procedimiento de análisis de legumbres secas y otros cultivos de leguminosas para detectar la presencia de *D. dipsaci* consta de dos pasos: 1) remojar una cantidad de semillas en agua con aireación de un día para otro y 2) realizar la extracción de una porción de las semillas empapadas con nebulización durante tres días. La presencia de nematodos en el agua de remojo y en el extracto de la nebulización se determina mediante el tamizado de las fracciones acuosas de cada uno de los dos pasos y la posterior observación al microscopio para la identificación. El proceso lleva aproximadamente siete días, pero se puede acortar a tres días eliminando el paso 2 (la extracción con nebulización). El procedimiento

modificado comprende el remojo de las legumbres en agua con aireación durante toda la noche, seguido del tamizado y la observación al microscopio para la identificación.

Para la extracción de nematodos de una muestra de tierra se puede utilizar el siguiente método (según Kleynhans, 1997). La tierra (250 ml) se lava a través de un tamiz de malla gruesa (2 mm) recogiendo el agua filtrada en un cubo de 5 litros y luego se añade agua de grifo hasta completar el volumen del cubo. La suspensión se remueve y luego se deja reposar durante 30 segundos antes de verterla a través de un tamiz de 45 μm . Este procedimiento se repite con la tierra del cubo otras dos veces, pero los tiempos de reposo se acortan, primero a 20 segundos y luego a 10 segundos. El residuo del tamiz de 45 μm se transfiere a tubos de centrifugadora de 50 ml. Si la solución de los tubos es muy arenosa se puede añadir 5 ml de caolín a los tubos (mezclando bien) para facilitar la sedimentación de los nematodos. Los tubos se centrifugan durante 7 min a 1 750 rpm. El sobrenadante de cada tubo se decanta y se desecha. Se añade a los tubos una solución de azúcar (450 g/litro de agua) y esta mezcla de azúcar y tierra se agita bien antes de volver a centrifugarla durante 3 minutos a 1 750 rpm. El sobrenadante se vierte a través de un tamiz de 45 μm y el residuo, que contiene los nematodos, se recoge en un vaso de precipitados para ser examinado. Esta es una técnica básica y, en función de la habilidad del técnico y del tipo de tierra, se podrán perder hasta el 40% de los nematodos. Otros métodos que se podrán emplear para la extracción de nematodos de muestras de tierra son la técnica de Cobb modificada por Flegg y el método del elutriador de Oostenbrink (EPPO, 2013c). En Hooper *et al.* (2005) se describen diferentes métodos de extracción adaptados en función del tamaño, la densidad y la movilidad de los nematodos.

4. Identificación

La identificación de *Ditylenchus* spp. por medios morfológicos está limitada a los especímenes adultos; en el examen deben observarse preferiblemente tanto los machos como las hembras de una especie con un microscopio de gran resolución. El uso de preparaciones microscópicas de buena calidad debería permitir identificar con certeza los especímenes de *D. dipsaci* y *D. destructor* adultos tan solo mediante el examen morfológico. La identificación morfológica de especímenes juveniles de *Ditylenchus* en una muestra solo debería utilizarse para confirmar la presencia de la especie en la muestra. Como las especies micófagas de *Ditylenchus* contaminan con frecuencia la materia vegetal en descomposición, deben tomarse precauciones al identificar especímenes tanto en muestras de material vegetal como de tierra.

4.1 Identificación morfológica

La identificación de *D. dipsaci* y *D. destructor* debería basarse preferiblemente en métodos morfológicos. Los métodos moleculares desarrollados para identificar a estas especies se pueden utilizar cuando los niveles de infestación sean bajos o cuando solo haya presencia de especímenes juveniles. Los métodos moleculares se pueden utilizar con adultos atípicos o que hayan resultado dañados, y en todas las etapas de desarrollo, incluidos los estados juveniles, en los que la identificación morfológica de la especie no es posible.

4.1.1 Preparación de los especímenes

Las preparaciones temporales, para la identificación rápida o para el estudio de características que se observan mejor en especímenes sin fijar, se realizan de la siguiente manera (Kleynhans, 1997):

- Los especímenes vivos se transfieren a una pequeña gota de agua sobre un portaobjetos.
- El portaobjetos se calienta brevemente pasándolo sobre la llama de una lámpara de alcohol, comprobando frecuentemente el movimiento de los nematodos. Se debería dejar de calentar tan pronto como los especímenes dejen de retorcerse.
- Se coloca un cubreobjetos y se sellan los bordes con esmalte de uñas. Una vez seco el esmalte, el portaobjetos con los especímenes está preparado para su estudio.

Para el microscopio óptico, se extraen los nematodos vivos de la tierra o del material vegetal, se matan con calor suave (65 °C-70 °C), se fijan con solución de FAA (35 % de agua destilada, 10 % de formol (formaldehído al 40 %), 5 % de ácido acético glacial, 50 % de alcohol al 95 %) (Andrássy, 1984), se transfieren a glicerol (Hooper *et al.*, 2005) y se montan en glicerina anhidra sobre portaobjetos con cubreobjetos, como se describe en Seinhorst (1959) y Goodey (1963).

Para la identificación mediante microscopía óptica se recomienda el uso de un microscopio diferencial de contraste de interferencia con aumentos de 500× a 1 000× (con objetivos de inmersión).

4.1.2 Caracteres morfológicos de diagnóstico

Hay claves de diagnóstico para las especies de *Ditylenchus* publicadas en Viscardi y Brzeski (1993) y en Brzeski (1998). En el Cuadro 1 (a continuación) se ofrece una clave para distinguir *Ditylenchus* spp. de otros géneros de tilénquidos y afelénquidos.

Cuadro 1. Clave para distinguir *Ditylenchus* spp. de otros géneros de tilénquidos y afelénquidos

1	Abertura de la glándula esofágica dorsal cerca de la base del estilete; bulbo medio redondeado, ovoide o ausente	Tylenchida – 2
	Abertura de la glándula esofágica dorsal en el bulbo medio; bulbo medio prominente, normalmente oblongo	Aphelenchida
2	La parte anterior del esófago (procorpus) y el bulbo medio no están unidos en una única estructura; el estilete nunca es excepcionalmente largo	3
	El procorpus se ensancha gradualmente y se fusiona con el bulbo medio; estilete muy largo, con la base a menudo situada en la parte anterior del bulbo medio	Otros géneros
3	Hembra adulta vermiforme	4
	La hembra adulta es un parásito sésil saciforme o biriforme en raíces	Otros géneros
4	Bulbo medio valvular	5
	Bulbo medio sin válvula	Otros géneros
5	Glándulas esofágicas contenidas en el bulbo basal, que no solapa o que solapa ligeramente el intestino; estructura cefálica raramente conspicua; estilete de debil a moderadamente fuerte	6
	Glándulas esofágicas de aspecto lobular que solapan el intestino; estructura cefálica marcada; estilete muy grande	Otros géneros
6	Ovario único prodélfico; vulva posterior	7
	Hembra con dos ovarios y anfidélfica; vulva ligeramente postecuatorial	Otros géneros
7	Hembra no hinchada con crustaformeria en forma de útero en columna con cuatro filas de cuatro células; en los machos, la bursa rodea un tercio o más de la cola	<i>Ditylenchus</i>
	Hembra hinchada con crustaformeria de más de 20 células	Otros géneros

Fuente: Adaptado de Heyns (1971) y Siddiqi (2000).

¹ Unas pocas especies de *Ditylenchus* que no son fitoparásitas carecen de bulbo medio valvular.

D. africanus, *D. destructor*, *D. dipsaci*, *D. gigas* y *D. myceliophagus* tienen una morfología y una morfometría similares, pero se pueden diferenciar entre sí mediante las siguientes características (Cuadro 2), siempre que sea posible medir y estudiar tanto especímenes machos como hembras.

4.1.2.1 Descripción de *Ditylenchus dipsaci*

Basado en Sturhan y Brzeski (1991), Wendt *et al.* (1995) y Brzeski (1998). Véanse los detalles y vistas de la Figura 10.

Dimensiones (criterios descritos en EPPO, 2013b). (Especímenes procedentes de avena, *Avena sativa* L., según Blake, 1962, en Hooper, 1972.). ($n = 48 \text{♀}$): $L = 1,3 \text{ mm} \pm 0,009$; $a = 62 \pm 5,6$; $b = 15 \pm 1,4$; $c = 14 \pm 2,1$; $V = 80 \pm 1,5$. ($n = 23 \text{♂}$): $L = 1,3 \text{ mm} \pm 0,017$; $a = 63 \pm 11,3$; $b = 15 \pm 1,7$; $c = 14 \pm 2,1$; $C = 72$.

Morfología general. Cuerpo recto o casi recto en relajación. Banda lateral con cuatro líneas. Región cefálica continua con el contorno del cuerpo (Figura 10B). Estilete de 10-13 μm de longitud en las hembras y 10-12 μm en los machos. Cono del estilete de aproximadamente la mitad de la longitud del estilete, nódulos redondeados y bien desarrollados. Bulbo medio muscular con engrosamientos de las paredes del lumen de 4-5 μm de longitud (Figura 10A). Bulbo basal desplazado o que solapa el intestino unos pocos micrómetros. Poro excretor opuesto a la parte posterior del ítimo o bulbo glandular. La parte postvulvar del saco uterino ocupa aproximadamente la mitad o ligeramente más de la distancia vulva-ano (Figura 10D). La bursa rodea las tres cuartas partes de la cola en los machos. Espículas de 23-28 μm de longitud. En ambos sexos, cola cónica con terminación aguda.

Caracteres morfológicos de diagnóstico. El número de líneas laterales (cuatro) (Figura 10F), el estilete comparativamente largo, la longitud del saco postvulvar y la cola aguda (Figura 10D) son los caracteres distintivos de esta especie (Andrássy, 2007). *D. dipsaci* se puede distinguir de *D. gigas* por el cuerpo más corto de las hembras (1,0-1,7 mm frente a 1,6-2,2 mm) y la mayor distancia vulva-ano (202-266 μm frente a 132-188 μm) (Vovlas *et al.*, 2011). Cuando se observan en vista lateral, la espícula está más curvada en *D. dipsaci* que en *D. destructor* (Figura 10C). En Karssen y Willemsen (2010) se ofrece más información sobre la espícula y su utilidad para la identificación de *D. dipsaci* y *D. destructor*. Debe señalarse que la semilla de *V. faba* contiene principalmente larvas en el cuarto estado.

4.1.2.2 Descripción de *Ditylenchus destructor*

Basado en Sturhan y Brzeski (1991) y Brzeski (1998). Véanse los detalles y vistas de la Figura 11.

Dimensiones (según Goodey, 1962, de especímenes procedentes de diversas plantas superiores hospedantes). ($n = 25 \text{♀}$): $L = 1,07 (0,69-1,89) \text{ mm}$; $a = 32 (18-49)$; $b = 7 (4-12)$; $c = 17 (9-30)$; $V = 80 (73-90)$. ($n = 23 \text{♂}$): $L = 0,96 (0,76-1,35) \text{ mm}$; $a = 35 (24-50)$; $b = 7 (4-11)$; $c = 14 (11-21)$; $C = 65 (40-84)$.

Morfología general. Los adultos de *D. destructor* son animales diminutos de aspecto vermiforme, de 0,8-1,4 mm de longitud, 23-47 μm de anchura y ligeramente arqueados ventralmente. Los adultos presentan una considerable variabilidad morfométrica en función del hospedante y la edad. El aspecto general de los machos y las hembras es similar. Banda lateral con seis líneas (Figura 11F) que se reducen a dos en las regiones del cuello y la cola. Cutícula y región cefálica finamente anilladas, región cefálica a menudo más estrecha que el cuerpo adyacente, en la que se distinguen unos cuatro anillos cefálicos mediante microscopía electrónica de barrido (Wendt *et al.*, 1995). Estilete de 10-12 μm de longitud, aunque ocasionalmente se han descrito especímenes con estiletes de 14 μm . Cono del estilete del 45-50% de la longitud del estilete, con nódulos definidos, redondeado e inclinado hacia atrás. Bulbo medio muscular con engrosamientos de las paredes del lumen (o válvula) de unos de 3 μm de longitud. El bulbo posterior solapa ligeramente el intestino en la porción dorsal del cuerpo, aunque ocasionalmente se observan especímenes con el bulbo glandular separado (Figura 11A). Poro excretor opuesto a las glándulas esofágicas. El saco postvulvar se extiende unas tres cuartas partes de la distancia vulva-ano (Figura 11E). Huevos dos veces más largos que anchos (Andrássy, 2007). Labios de la vulva gruesos y elevados (Figura 11B). Ovario anterior ensanchado, que a veces alcanza la región esofágica.

Parte postvulvar del saco uterino del 40-98% de la distancia vulva-ano, sin función de espermateca (Figura 11E). La bursa de los machos rodea la cola en un 50-90% de su longitud. Espículas de 24-27 μm de longitud. La forma de la espícula de *D. dipsaci* difiere de la de *D. destructor* en que presenta un túmulo ventral en la región del cálamus de la espícula (Figura 12) (Karssen y Willemsen, 2010). Testículos ensanchados cercanos a la base del esófago. En ambos sexos, cola cónica, de longitud de tres a cinco veces la anchura anal del cuerpo, normalmente curvada ventralmente y con terminación redonda.

Caracteres morfológicos de diagnóstico. *D. destructor* es similar a *D. dipsaci*, pero se diferencia de esa especie por la banda lateral con seis líneas (Figura 11F), el saco postvulvar más largo y la terminación de la cola finamente redondeada (Figura 11D). Morfológicamente, *D. destructor* se diferencia de *D. africanus* principalmente por la longitud del estilete, que puede solapar ligeramente, y la longitud de la espícula, lo cual implica que debe haber machos presentes en la población. Dado que la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es suficientemente sensible para detectar diferencias entre géneros emparentados estrechamente, Wendt *et al.* (1995) utilizaron polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) para distinguir *D. destructor* de *D. africanus*. Cuando se observan en vista lateral, la espícula está menos curvada en *D. dipsaci* que en *D. destructor* (Figura 11C).

Observaciones. Los caracteres mencionados podrán variar y la identificación hasta el nivel de la especie es casi imposible basándose en un único espécimen. Se recomienda examinar al menos un espécimen macho y uno hembra. Las líneas laterales del macho, por ejemplo, podrán en ocasiones reducirse a cuatro cerca de la cola, según un patrón similar al de *D. dipsaci*.

Cuadro 2. Análisis comparativo de caracteres diagnósticos de *Ditylenchus africanus*, *Ditylenchus destructor*, *Ditylenchus dipsaci*, *Ditylenchus gigas* y *Ditylenchus myceliophagus*.

Caracteres	<i>D. destructor</i> (según Hooper, 1973)	<i>D. africanus</i> (según Wendt <i>et al.</i> , 1995)	<i>D. myceliophagus</i> (según Hesling, 1977)	<i>D. gigas</i> (según Vovlas <i>et al.</i> , 2011)	<i>D. dipsaci</i> (según Hooper, 1972)
Longitud del cuerpo de la hembra (mm)	0,8-1,9	0,7-1,1	0,6-1,4	1,6-2,2	1,0-1,7
Número de líneas laterales	6	6-10	6	4	4
Forma de la terminación de la cola	Redondeada	Redondeada	Redondeada	De aguda a finamente redondeada	Aguda
c (longitud del cuerpo/longitud de la cola) de la hembra	14-20	8,8-16,9	8,2-17	15,7-27,6	11-20
Bulbo posterior	Corto, solapa dorsalmente	Corto, solapa dorsalmente	Corto, solapa dorsalmente	Solapa ligeramente	No solapa
Longitud del estilete (μm) de la hembra	10-14	8-10	7-8	10,5-13,0	10-12
Distancia SUP/vulva-ano (%) ¹	53-90	37-85	30-69	Aprox. 50 ²	40-70
Longitud de la espícula (μm)	24-27	17-21	15-20	23,5-28	23-28

Caracteres	<i>D. destructor</i> (según Hooper, 1973)	<i>D. africanus</i> (según Wendt <i>et al.</i> , 1995)	<i>D. myceliophagus</i> (según Hesling, 1974)	<i>D. gigas</i> (según Vovlas <i>et al.</i> , 2011)	<i>D. dipsaci</i> (según Hooper, 1972)
Longitud de la bursa (como % de la longitud de la cola)	50-70	48-66	20-55	72-76	40-70
Preferencia de hospedante ³	Plantas superiores y micelios de hongos	Cacahuetes (maníes) y hongos	Micelios de hongos	Plantas superiores	Plantas superiores y hongos

¹ SUP: saco uterino postvulvar (parte postvulvar del saco uterino).

² Calculado a partir de la descripción de la especie.

³ Útil en caso de que los criterios morfológicos sean confusos.

4.2 Identificación molecular

En caso necesario, la identificación de la especie, *D. dipsaci* o *D. destructor*, podrá realizarse mediante análisis molecular, especialmente cuando las especies se puedan confundir (p. ej., *D. myceliophagus*, *D. africanus* o *D. gigas*) y no sea posible distinguirlas de manera concluyente de la especie objetivo mediante el estudio morfológico.

Para ello, la solución que contiene los especímenes de nematodo se debería almacenar preferentemente en frío (es decir, refrigerada) durante no más de unos pocos días antes de la extracción del ADN.

En este protocolo de diagnóstico, los métodos (con inclusión de las referencias a nombres comerciales) se describen según se publicaron, ya que con ello se definió el nivel inicial de sensibilidad, especificidad y/o reproducibilidad adquirido. El uso de nombres de reactivos, productos químicos o equipo en estos protocolos de diagnóstico no implica su aprobación ni la exclusión de otros que también podrán ser adecuados. Los procedimientos de laboratorio presentados en los protocolos podrán ajustarse a las normas de los laboratorios individuales, siempre que estén adecuadamente validadas.

4.2.1 *Ditylenchus dipsaci*

Se han desarrollado diversos métodos moleculares para la identificación de *D. dipsaci*.

La diversidad genética entre las especies de *Ditylenchus* y el concepto de razas en la especie *D. dipsaci* se investigaron mediante hibridación de Southern (Wendt *et al.*, 1993) y electroforesis (Tenente y Evans, 1997; Palazova y Baicheva, 2002).

Asimismo se han investigado a fondo métodos moleculares, principalmente la RCP o la RCP-PLFR para la identificación de especies y el análisis de secuencias para el análisis de la variabilidad poblacional (Leal-Bertioli *et al.*, 2000; Zouhar *et al.*, 2002).

Se han publicado seis pruebas moleculares (RCP, RCP-PLFR) que se pueden utilizar para la identificación de *D. dipsaci* y que se describen en las secciones 4.2.4 a 4.2.9. En la descripción de cada prueba se incluye su especificidad, así como el género y la especie de nematodo utilizados para evaluar la prueba.

El análisis molecular de secuencias de ADN ribosómico (ADNr) de diferentes regiones (la región ITS1-5.8S-ITS2 [donde ITS son las siglas en inglés de “espaciador transcrito interno”], el fragmento D2-D3 del gen 28S, la subunidad pequeña 18S, un fragmento del gen mitocondrial de la *citocromo c oxidasa I* [ADN mitocondrial o ADNmt] y las secuencias génicas *hsp90* [ADN nuclear o ADNn]) permite distinguir claramente *D. gigas* de *D. dipsaci* s.s. (Vovlas *et al.*, 2011).

4.2.2 *Ditylenchus destructor*

El diagnóstico de *D. destructor* mediante análisis molecular se basa en la RCP-PLFR o en la secuenciación de la región ITS del gen del ARNr.

Wendt *et al.* (1993) demostraron que la RCP-PLFR de la región ITS permitía distinguir especímenes de *D. destructor* parásitos de la papa de dos razas de *D. dipsaci* y de *D. myceliophagus* y publicaron los patrones de diagnóstico mediante PLFR de las tres especies. *D. africanus* se puede distinguir de *D. destructor* mediante una combinación de los siguientes caracteres: PLFR generados por siete enzimas de restricción en la región ITS del ADNr.

Ji *et al.* (2006) determinaron los patrones de PLFR de varias poblaciones de *D. destructor* de la batata y revelaron varias diferencias.

Powers *et al.* (2001) secuenciaron por primera vez la región ITS1 de *D. dipsaci*, pero la base de datos GenBank contiene actualmente más de 50 registros de fragmentos de ARNr de *D. destructor* obtenidos en distintas localidades y plantas hospedantes.

4.2.3 Extracción de ADN

Se transfieren varios juveniles o adultos a un microtubo y se extrae el ADN según se describe en Webster *et al.* (1990).

4.2.4 Análisis mediante RCP-PLFR de la región ITS del ADN para la identificación de *D. dipsaci* y *D. destructor*

Este análisis fue desarrollado por Wendt *et al.* (1993).

Metodología

En este análisis se utilizan como cebadores universales las siguientes secuencias de la región ITS del ADNr (según se describen en Vrain *et al.* (1992)):

18S: 5'-TTG ATT ACG TCC CTG CCG TTT-3'

26S: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA TGG-3'

Los amplicones correspondientes a *D. dipsaci* y *D. myceliophagus* tienen 900 pares de bases (pb), y el correspondiente a *D. destructor* tiene 1200 pb.

La amplificación se realiza con equipos de PCR que contiene ADN polimerasa Taq, nucleótidos y tampón de reacción, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Los parámetros de ciclado de la RCP¹ consisten en un primer ciclo de 1,5 min a 96 °C, 30 s a 50 °C y 4 min a 72 °C; 40 ciclos de 45 s a 96 °C, 30 s a 50 °C y 4 min a 72 °C; y un ciclo final de 45 s a 96 °C, 30 s a 50 °C y 10 min a 72 °C. Tras la amplificación del ADN, 2-5 µl del producto se revelan en un gel de agarosa al 1%. El remanente se almacena a -20 °C y se utiliza para analizar los PLFR. Varias enzimas de restricción son útiles para distinguir *D. destructor* y *D. dipsaci* de otras especies de *Ditylenchus*; por ejemplo, *HaeIII*, *HpaII*, *HinfI* y *RsaI* (Wendt *et al.*, 1993). En el Cuadro 3 se indica la longitud de los fragmentos de restricción generados por estas enzimas de diagnóstico.

¹ Los parámetros de ciclado de la RCP son los descritos en el artículo original (Wendt *et al.*, 1993). Las mejoras en los termocicladores y los reactivos para la RCP podrán conllevar la revisión de estos parámetros de ciclado.

Cuadro 3. Longitud aproximada (pb) de los fragmentos de restricción de la región ITS del ADNr de especies de *Ditylenchus* generados por cuatro enzimas de restricción

Enzima	<i>D. destructor</i>	<i>D. myceliophagus</i>	<i>D. dipsaci</i>	<i>D. gigas</i> ¹	<i>D. africanus</i>
Producto de la RCP sin restricción	1 200	900	900	900	1 000
<i>HaeIII</i>	450, 170	450, 200	900	800, 200	650, 540
<i>HpaII</i>	1 000	900	320, 200, 180	600, 200	950
<i>HinfI</i>	780, 180	630, 310	440, 350, 150	350, 150	450, 340, 150, 130, 100
<i>RsaI</i>	600, 250, 170	900	450, 250, 140	490, 450	690, 450

Fuente: Wendt *et al.* (1993, 1995).

pb: pares de bases; ITS: espaciador transcrito interno; RCP: reacción en cadena de la polimerasa; PLFR: polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción; ARNr: ARN ribosómico.

¹ Denominado raza gigante de *D. dipsaci* en la publicación original.

4.2.5 Prueba de RCP basada en SCAR para la identificación de *D. dipsaci*

Esta prueba de RCP basada en regiones amplificadas caracterizadas por secuencias (SCAR) desarrollada por Esquibet *et al.* (2003) se diseñó como prueba específica a nivel de especie para *D. dipsaci*, diferenciando entre las razas normal y gigante. Se evaluó respecto a *D. myceliophagus* (una población), la raza normal de *D. dipsaci* (11 poblaciones de diferentes hospedantes y procedencias) y la raza gigante de *D. dipsaci*, descrita como *D. gigas* por Vovlas *et al.* (2011) (11 poblaciones de distintas procedencias aisladas de *V. faba*).

Metodología

Los cebadores específicos para *D. dipsaci* utilizados son:

D. dipsaci (raza normal):

H05: 5' -TCA AGC TAA TCT TTT TCC CCA CT-3'

H06: 5'-CAACTG CTA TGT CGT GCT CT-3'

D. dipsaci (raza gigante, descrita como *D. gigas* por Vovlas *et al.* (2011)):

D09: 5' -CAA AGT GTT TGA TCG ACT GGA-3'

D10: 5'-CAT CCC AAA ACA AAG AAA GG-3'

El amplicón correspondiente a *D. dipsaci* (raza normal) tiene aproximadamente 242 pb y el correspondiente a *D. dipsaci* (raza gigante) 198 pb. Con ambos pares de cebadores no se observa amplificación con especies y razas distintas de la especie y raza objetivo (Esquibet *et al.*, 2003).

Los 10 µl de la mezcla de la RCP están compuestos por: 1,5 mM de MgCl₂, 250 µM de cada dNTP, 690 nM de cada cebador para la RCP dúplex (H05-H06) o (D09-D10) o 500 nM de cada cebador para la RCP múltiplex (H05-H06-D09-D10) y 0,5 U de polimerasa de ADN Taq. Los parámetros de ciclado son: desnaturalización inicial de 3 min a 94 °C; 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 59 °C y 1 min a 72 °C; y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de la RCP se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa.

4.2.6 Prueba de RCP específica para 18S e ITS1 para la identificación de *D. dipsaci*

Esta prueba desarrollada por Subbotin *et al.* (2005) se diseñó como prueba específica para *D. dipsaci* s.s. (solo la raza normal). Se evaluó respecto a *D. destructor* (una población), la raza normal de *D. dipsaci* (18 poblaciones de diferentes hospedantes y procedencias) y *Ditylenchus* sp. (12 poblaciones de distintos hospedantes y procedencias).

Metodología

Los cebadores específicos para *D. dipsaci* utilizados son:

rDNA2: 5' -TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3' (Vrain *et al.*, 1992)

DitNF1: 5'-TTA TGA CAA ATT CAT GGC GG-3'

El amplicón correspondiente a *D. dipsaci* s.s. (no incluye la raza gigante, más tarde llamada *D. gigas*) tiene aproximadamente 263 pb. No se observa amplificación con especies distintas de la especie objetivo.

Los 25 µl de la mezcla de la RCP están compuestos por: 1× de tampón de RCP 10× con 15 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 60 nM de cada cebador y 1 U de polimerasa de ADN Taq. La RCP se realiza en un termociclador de tipo Peltier de 96 pocillos (PTC100, MJ Research²) con los siguientes parámetros de ciclado: una fase inicial de 4 min a 94 °C; 35 ciclos de 15 s a 94 °C, 30 s a 57 °C y 30 s a 72 °C; y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de la RCP se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa.

4.2.7 Prueba de RCP específica para ADNr 5.8S para la identificación de *D. dipsaci*

Esta prueba desarrollada por Marek *et al.* (2005) se diseñó como prueba específica para *D. dipsaci*. Se evaluó respecto a *D. dipsaci* (tres poblaciones europeas de diferentes hospedantes) y poblaciones de géneros no buscados (*Globodera pallida*, *Bursaphelenchus xylophilus*, *Rhabditis* spp.).

Metodología

Se crearon dos pares de cebadores específicos para la identificación de *D. dipsaci*, pero el más sensible (detección de 10 pg de ADN objetivo) fue:

PF1: 5' -AAC GGC TCT CTT GGC TTC TAT-3'

PR1: 5'-ATT TAC GAC CCT TAG CCA GAT-3'

Con este par de cebadores el amplicón correspondiente a *D. dipsaci* tiene aproximadamente 327 pb.

Los 25 µl de la mezcla de la RCP están compuestos por: tampón de Taq 1×, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 10 pmol de cada cebador (par de cebadores PF1-PR1) y 1,5 U de polimerasa de ADN Taq (Fermentas²). La prueba de RCP se realiza en un termociclador de tipo Peltier de 96 pocillos (PTC200, MJ Research²) con los siguientes parámetros de ciclado: 3 min a 94 °C; 30 ciclos de 2 min a 94 °C, 30 s a 62 °C y 2 min a 72 °C; y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de la RCP se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa.

² En este protocolo de diagnóstico, los métodos (con inclusión de las referencias a nombres comerciales) se describen según se publicaron, ya que con ello se definió el nivel inicial de sensibilidad, especificidad y/o reproducibilidad adquirido. El uso de nombres de reactivos, productos químicos o equipo en estos protocolos de diagnóstico no implica su aprobación ni la exclusión de otros que también podrán ser adecuados. Los procedimientos de laboratorio presentados en los protocolos podrán ajustarse a las normas de los laboratorios individuales, siempre que estén adecuadamente validadas.

4.2.8 Prueba de RCP específica para ADNr 5.8S e ITS para la identificación de *D. dipsaci*

Esta prueba desarrollada por Kerkoud *et al.* (2007) se diseñó como prueba específica para *D. dipsaci*. Se evaluó respecto a *D. dipsaci* (diez poblaciones de diferentes hospedantes y procedencias), *D. africanus*, *D. destructor*, *D. myceliophagus*, *Aphelenchoides ritzemabosi* (una población por cada especie) y *Ditylenchus* sp. (según la publicación y actualmente descrita como *D. gigas*) (diez poblaciones de distintas procedencias aisladas de *V. faba*).

Metodología

Se utilizan dos pares de cebadores específicos, uno para la identificación de *D. dipsaci* solamente y otro para la identificación de *D. gigas* y *D. dipsaci*. La utilización de ambos pares de cebadores permite distinguir a *D. gigas* de *D. dipsaci*. Estos cebadores son:

Primer par de cebadores:

DdpS1: 5' -TGG CTG CGT TGA AGA GAA CT-3'

rDNA2: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3' (Vrain *et al.*, 1992)

El amplicón correspondiente a *D. dipsaci* tiene aproximadamente 517 pb. No se observa amplificación de especies no buscadas, incluida *D. gigas*.

Segundo par de cebadores:

DdpS2: 5' -CGA TCA ACC AAA ACA CTA GGA ATT-3'

rDNA2: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3' (Vrain *et al.*, 1992)

El amplicón correspondiente a *D. dipsaci* y *D. gigas* tiene aproximadamente 707 pb.

Los 20 µl de la mezcla de la RCP están compuestos por 1,5 mM de tampón de amplificación con una concentración final de 5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada cebador (en la RCP simplex con DdpS1-rDNA2 o DdpS2-rDNA2; en la RCP dúplex, la concentración final de cebador DdpS1 es de 0,5 µM, mientras que es de 1 µM para DdpS2 y rDNA2) y 1 U de polimerasa de ADN Taq (MP Biomedicals²). La RCP se realiza en un termociclador de tipo Peltier de 96 pocillos (GeneAmp 9600 PCR System, Perkin Elmer²) con los siguientes parámetros de ciclado: 1 min a 94 °C; 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 45 s a 72 °C; y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de la RCP se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa.

4.2.9 Prueba de RCP basada en SCAR para la identificación de *D. dipsaci*

Esta prueba de RCP basada en SCAR desarrollada por Zouhar *et al.* (2007) se diseñó como prueba específica para *D. dipsaci*. Se evaluó solamente respecto a *D. dipsaci* (diez poblaciones europeas de diferentes hospedantes).

Metodología

Se diseñaron dos pares de cebadores específicos para la identificación de *D. dipsaci*:

Primer par de cebadores:

DIT_2 forward: 5' -GCA ATG CAC AGG TGG ATA AAG-3'

DIT_2 reverse: 5'-CTG TCT GTG ATT TCA CGG TAG AC-3'

Con este par de cebadores el amplicón correspondiente a *D. dipsaci* tiene aproximadamente 325 pb.

Segundo par de cebadores:

DIT_5 forward: 5' -GAA AAC CAA AGA GGC CGT AAC-3'

DIT_5 reverse: 5'-ACC TGA TTC TGT ACG GTG CAA-3'

Con este par de cebadores el amplicón correspondiente a *D. dipsaci* tiene aproximadamente 245 pb.

Los 25 µl de la mezcla de la RCP están compuestos por: tampón de RCP 1× (Fermentas²), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 10 pmol de cada cebador (bien del par de cebadores DIT_2 o del DIT_5), 1,5 U de polimerasa de ADN Taq (Fermentas²) y 50 ng de ADN como molde. La RCP se realiza en un termociclador de tipo Peltier de 96 pocillos (PTC200, MJ Research²) con los siguientes parámetros de ciclado: 3 min a 94 °C; 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 30 s a 60 °C y 1 min a 72 °C; y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de la RCP se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa.

4.2.10 Controles para las pruebas moleculares

Para considerar fidedigno el resultado de las pruebas, en cada serie de aislamiento de ácidos nucleicos y de amplificación del ácido nucleico de la plaga objetivo o del ácido nucleico objetivo se deberían tener en cuenta los controles adecuados, que dependerán del tipo de prueba utilizada y del grado de certidumbre necesario. Deberían utilizarse, como mínimo, un control positivo de ácido nucleico, un control negativo de amplificación y un control negativo de extracción.

Control positivo de ácido nucleico. Este control se utiliza para hacer un seguimiento de la eficiencia de la amplificación (así como de la extracción). Se podrá utilizar ácido nucleico previamente preparado (almacenado) del nematodo objetivo.

Control negativo de amplificación (control sin molde). Este control es necesario para la RCP convencional a fin de descartar falsos positivos por contaminación durante la preparación de la mezcla de reacción. El agua de calidad apta para RCP que se utilizó para preparar la mezcla de reacción se añade en la fase de amplificación.

Control negativo de extracción. Este control se utiliza para hacer un seguimiento de la contaminación durante la extracción del ácido nucleico. El control comprende la extracción del ácido nucleico y la posterior amplificación solamente del tampón de extracción. Cuando se prevé analizar un gran número de muestras positivas se recomienda utilizar varios controles.

4.2.11 Interpretación de los resultados de la RCP convencional

La RCP específica del patógeno solo se considerará válida si se cumplen los dos criterios siguientes:

- el control positivo produce un amplicón del tamaño correcto para la especie de nematodo objetivo,
- no se producen amplicones del tamaño correcto para la especie de nematodo objetivo en el control negativo de extracción ni en el control negativo de amplificación.

5. Registros

Los registros y las pruebas deberían conservarse según lo descrito en la NIMF 27 (*Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas*).

En los casos en los que otras partes contratantes puedan verse afectadas en forma desfavorable por el diagnóstico, los registros y las pruebas (en particular, especímenes preservados o montados en portaobjetos, fotografías de estructuras morfológicas distintivas, extractos de ADN y fotografías de geles, según corresponda) deberían conservarse por lo menos durante un año.

6. Puntos de contacto para información adicional

Puede obtenerse información adicional sobre este protocolo en las siguientes fuentes:

Biosystematics Division, ARC-PPRI, Private Bag X134, Queenswood, 0121 República de Sudáfrica (Antoinette Swart; correo electrónico: SwartA@arc.agric.za).

Plant Pest Diagnostic Center, California Department of Food and Agriculture, 3294 Meadowview Road, Sacramento, CA 95832-1448, Estados Unidos de América (Sergei Subbotin; correo electrónico: subbotin@ucr.edu).

Charlottetown Laboratory – Potato Diseases, Canadian Food Inspection Agency, 93 Mount Edward Rd, Charlottetown PEI, C1A 5T1, Canadá (Harvinder Bennypaul; correo electrónico: bennypaulhs@inspection.gc.ca).

Podrán presentar una solicitud de revisión de un protocolo de diagnóstico las organizaciones nacionales de protección fitosanitaria (ONPF), las organizaciones regionales de protección fitosanitaria (ORPF) o los órganos auxiliares de la Comisión de Medidas Fitosanitarias (CMF) a través de la Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (ippc@fao.org), que a su vez remitirá la solicitud al Grupo técnico sobre protocolos de diagnóstico (GTPD).

7. Agradecimientos

El presente protocolo fue redactado por Antoinette Swart (Unidad de nematología, División de biosistemática, ARC-PPRI, República de Sudáfrica), Eliseo Jorge Chaves (INTA-Estación Experimental de Balcarce, Laboratorio de Nematología, Argentina) y Renata C.V. Tenente (EMBRAPA, Recursos Genéticos y Biotecnología, Brasil).

La descripción de las técnicas moleculares fue realizada por Sergei Subbotin (Centro de diagnóstico de plagas vegetales, Departamento de Alimentos y Agricultura de California, 2294 Meadowview Road, Sacramento, CA 95832-1448, Estados Unidos de América).

Los siguientes nematólogos mejoraron el protocolo con sus observaciones:

- Harvinder Bennypaul (Agencia Canadiense de Inspección de Alimentos, Canadá)
- Johannes Hallmann (Instituto Julius Kühn, Alemania)
- Mikhail Pridannikov (Centro de Parasitología, Instituto de Zoología y Evolución A.N. Severtsov, Rusia)
- P. Castillo (Instituto de Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, España).

8. Referencias

La presente norma refiere a las Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias (NIMF). Las NIMF se encuentran disponibles en el Portal fitosanitario internacional (PFI): <https://www.ippc.int/es/core-activities/standards-setting/isnims>.

Andrássy, I. 1984. *Klasse Nematoda (Ordnungen Monhysterida, Desmoscolecida, Araeolaimida, Chromadorida, Rhabditida)*. En *Bestimmungsbücher zur Bodenfauna Europas*, págs. 24-25. Stuttgart (Alemania), Gustav Fischer Verlag. 509 págs.

Andrássy, I. 2007. *Free living nematodes of Hungary (Nematoda Errantia) II*. En *Pedazoologica Hungarica*, n.º 4, págs. 145-154. Budapest, Museo de historia natural de Hungría y Grupo de investigación de zoología sistemática de la Academia Húngara de las Ciencias. 496 págs.

Andrássy, I. y Farkas, K. 1988. *Kertészeti növények fonálféreg kártevői*. Budapest (Hungría), Mezőgazdasági Kiadó, págs. 181-198. 418 págs.

Barker, J.R. y Lucas, G.B. 1984. *Nematode parasites of tobacco*. En *Plant and insect nematodes* (W.R. Nickle, ed.), págs. 213-242. Nueva York (Estados Unidos de América), Marcel Dekker Inc. 925 págs.

Bridge, J. y Hunt, D. 1986. *Nematodes*. En *Pest control in tropical onions*, págs. 65-77. Londres (Reino Unido), Instituto de desarrollo tropical e investigación y Oficina de la Administración de Desarrollo de Ultramar, Instituto de desarrollo tropical e investigación, 109 págs.

Brodie, B.B. 1998. *Potato*. En *Plant and nematode interactions* (K.R. Barker, G.A. Pederson y G.L. Windham, eds.), págs. 567-594. Madison, WI (Estados Unidos de América), American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. y Soil Science Society of America, Inc. 772 páginas.

- Brown, D.J.F., Dalmaso, A. y Trudgill, D.L.** 1993. *Nematode pests of soft fruits and vines*. En *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture* (K. Evans, D.L. Trudgill y J.M. Webster, eds.), págs. 427-462. Wallingford (Reino Unido), CABI. 656 págs.
- Brzeski, M.W.** 1998. *Nematodes of Tylenchina in Poland and temperate Europe*. Varsovia (Polonia), Museo e Instituto de Zoología, Academia Polaca de las Ciencias. 397 págs.
- Chizhov, V.N., Borisov, B.A. y Subbotin, S.A.** 2010. *A new stem nematode, Ditylenchus weischeri sp.n. (Nematoda: Tylenchida), a parasite of Cirsium arvense (L) Scop. in the Central Region of the Non-Chernozem Zone of Russia*. *Russian Journal of Nematology*, 18, págs. 95-102.
- Cook, R. y Yeates, G.W.** 1993. *Nematode pests of grassland and forage crops*. En *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture* (K. Evans, D.L. Trudgill y J.M. Webster, eds.), págs. 305-350. Wallingford (Reino Unido), CABI. 656 págs.
- Cooke, D.** 1993. *Nematode parasites of sugarbeet*. En *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture* (K. Evans, D.L. Trudgill y J.M. Webster, eds.), págs. 133-169. Wallingford (Reino Unido), CABI. 656 págs.
- Coolen, W.A. y D'Herde, C.J.** 1972. *A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue*. Gante (Bélgica), Ministerio de Agricultura, Centro de Investigación Agrícola Estatal. 77 págs.
- Courtney, W.D.** 1962. *Stem nematode of red clover in the Pacific Northwest*. *Bulletin of the Washington State Agricultural Experiment Station*, 640, págs. 1-17.
- Dallimore, C.E. y Thorne, G.** 1951. *Infection of sugar beets by Ditylenchus destructor Thorne, the potato rot nematode*. *Phytopathology*, 41, págs. 872-874.
- De Ley, P. y Blaxter, M.** 2003. *A new system for Nematodes: Combining morphological characters with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa*. *Nematological Monographs and Perspectives*, 2, págs. 1-21.
- Edwards, E.E.** 1937. *On the eelworm disease of primulas caused by Anguillula dipsaci, Kühn*. *Journal of Helminthology*, 15, págs. 221-232.
- EPPO** (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas). 2013a. *PQR: EPPO Plant Quarantine Data Retrieval System*. (Disponible en: <http://www.eppo.org/DATABASES/pqr/pqr.htm>).
- EPPO** (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas). 2013b. *Diagnostic protocols for regulated pests. Pictorial glossary of morphological terms in nematology*. Documento técnico de la EPPO N.º 1056 (Rev. 4). (Disponible en: http://www.eppo.int/QUARANTINE/diag_activities/EPPO_TD_1056_Glossary.pdf).
- EPPO** (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas). 2013c. *Nematode extraction*. EPPO Standard PM 7/119(1). *EPPO Bulletin*, 43, págs. 471-485.
- Esquibet, M., Grenier, E., Plantard, O., Andaloussi, F.A. y Caubel, G.** 2003. *DNA polymorphism in the stem nematode Ditylenchus dipsaci: Development of diagnostic markers for normal and giant races*. *Genome*, 46, págs. 1077-1083.
- Evans, K. y Trudgill, D.L.** 1992. *Pest aspects of potato production Part 1. The nematode pests of potato*. En *The potato crop* (P.M. Harris, ed.), 2.ª edición, págs. 438-475. Londres (Reino Unido), Chapman and Hall. 909 págs.
- Ferris, J.M. y Ferris, V.R.** 1998. *Biology of plant parasitic nematodes*. En *Plant and nematode interactions* (K.R. Barker, G.A. Pederson y G.L. Windham, eds.), págs. 21-36. Madison, WI (Estados Unidos de América), American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. y Soil Science Society of America, Inc. 772 páginas.
- Filipjev, I.N.** 1936. *On the classification of the Tylenchinae*. En *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 3, págs. 80-82.
- Flegg, J.J.M. y Hooper, D.J.** 1970. *Extraction of free-living stages from soil*. En *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes* (J.F. Southey, ed.), Technical Bulletin 2, págs. 5-22. Londres (Reino Unido), Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 148 págs.

- Goodey, J.B.** 1952. *The influence of the host on the dimensions of the plant parasitic nematode, Ditylenchus destructor.* *Annals of Applied Biology*, 30, págs. 468-474.
- Goodey, J.B.** 1963. *Soil and freshwater nematodes.* Harpenden (Reino Unido), Departamento de Nematología, Estación Experimental de Rothamsted y London, Methuen & Co. Ltd. 544 págs.
- Griffin, G.D.** 1985. *Nematode parasites of alfalfa, cereals and grasses.* En *Plant and insect nematodes* (W.R. Nickle, ed.), págs. 243-322. Nueva York (Estados Unidos de América), Marcel Dekker Inc. 925 págs.
- Hesling, J.J.** 1974. *Ditylenchus myceliophagus.* *CIH descriptions of plant-parasitic nematodes*, Set 3, No. 36. St Albans (Reino Unido) Commonwealth Institute of Helminthology (CIH). 4 págs.
- Heyns, J.** 1971. *A guide to the plant and soil nematodes of South Africa.* Ciudad del Cabo (Sudáfrica), A.A. Balkema. 233 págs.
- Hooper, D.J.** 1972. *Ditylenchus dipsaci.* *CIH descriptions of plant-parasitic nematodes*, Set 1, No. 14. St Albans (Reino Unido) Commonwealth Institute of Helminthology (CIH). 4 págs.
- Hooper, D.J.** 1973. *Ditylenchus destructor.* *CIH descriptions of plant-parasitic nematodes*, Set 2, No. 21. St Albans (Reino Unido) Commonwealth Institute of Helminthology (CIH). 4 págs.
- Hooper, D.J.** 1986. *Extraction of nematodes from plant tissue.* En *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes* (J.F. Southey, ed.), Reference Book 402, 6.ª ed., págs. 51-58. Londres (Reino Unido), Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 202 págs.
- Hooper, D.J., Hallmann, J. y Subbotin, S.A.** 2005. *Methods for extraction, processing and detection of plant and soil nematodes.* En *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture* (M. Luc, R.A. Sikora y J. Bridge, eds.), 2.ª ed., págs. 53-86. Wallingford (Reino Unido), CABI. 871 págs.
- Jeske, A., Budziszewska, M., Dobosz, R., Stenowiak, A., Protasewicz, D., Wieczorek, P. y Obrepalska-Stęplowska, A.** 2013. *A comparative and phylogenetic study of the Ditylenchus dipsaci, Ditylenchus destructor and Ditylenchus gigas populations occurring in Poland.* (Comunicación breve) *Journal of Phytopathology*, 162, págs. 61-67.
- Ji, L., Wang, J.C., Yang, X.L., Huang, G.M. y Lin, M.S.** 2006. *[PCR-RFLP patterns for differentiation of three Ditylenchus species.]* *Revista de la Facultad de Agricultura de Nanjing*, 29, págs. 39-43 (en chino).
- Johnson, C.S.** 1998. *Tobacco.* En *Plant and nematode interactions* (K.R. Barker, G.A. Pederson y G.L. Windham, eds.), págs. 487-522. Madison, WI (Estados Unidos de América), American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. y Soil Science Society of America, Inc. 772 páginas.
- Karssen, G. y Willemsen, N.M.** 2010. *The spiculum: An additional useful character for the identification of Ditylenchus dipsaci and D. destructor (Nematoda: Anguinidae).* *EPPO Bulletin* 40, págs. 211-212.
- Kerkoud, M., Esquibet, M. y Plantard, O.** 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, págs. 323-332.
- Kleynhans, K.P.N.** 1997. *Collecting and preserving nematodes. A manual for a practical course in nematology by SAFRINET, the southern African (SADC) LOOP of BioNET-INTERNATIONAL, ARC.* Pretoria (Sudáfrica), Institución de investigación para la protección vegetal. 52 págs.
- Kühn, J.** 1857. *Über das Vorkommen von Anguillulen in erkrankten Blütenköpfen von Dipsacus fullonum L., Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, 9, págs. 129-137.
- Leal-Bertioli, S.C.M., Tenente, R.C.V. y Bertioli, D.J.** 2000. *ITS sequence of populations of the plant-parasitic nematode Ditylenchus dipsaci.* *Nematologia Brasileira*, 24, págs. 83-85.
- Marek, M., Zouhar, M., Rysanek, P. y Havranek, P.** 2005. *Analysis of ITS sequences of nuclear rDNA and development of a PCR-based assay for the rapid identification of the stem nematode Ditylenchus dipsaci (Nematoda: Anguinidae) in plant tissues.* *Helminthologia*, 42, págs. 49-56.

- McDonald, A.H. y Nicol, J.M.** 2005. *Nematode parasites of cereals*. En *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture* (M. Luc, R.A. Sikora y J. Bridge, eds.), 2.ª ed., págs. 131-192. Wallingford (Reino Unido), CABI. 896 págs.
- Mollov, D.S., Subbotin, S.A. y Rosen, C.** 2012. *First report of Ditylenchus dipsaci on garlic in Minnesota*. *Plant Disease*, 96, pág. 1707.
- Nemapix.** pág. 1999. J.D. Eisenback y U. Zunke, eds. *A journal of nematological images*, Vol. 2. Blacksburg, Virginia (Estados Unidos de América), Mactode Publications.
- Nemapix.** 2000. J.D. Eisenback y U. Zunke, eds. *A journal of nematological images*, Vol. 1., 2.ª ed. Blacksburg, Virginia (Estados Unidos de América), Mactode Publications.
- Nemapix.** pág. 2002. J.D. Eisenback y U. Zunke, eds. *A journal of nematological images*, Vol. 3. Blacksburg, Virginia (Estados Unidos de América), Mactode Publications.
- Netscher, C. y Sikora, J.W.** pág. 1990. *Nematodes in vegetables*. En *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture* (M. Luc, R.A. Sikora y J. Bridge, eds.), 2.ª ed., págs. 237-283. Wallingford (Reino Unido), CABI. 896 págs.
- Oliveira, R.D.L., Santin, Â.M., Seni, D.J., Dietrich, A., Salazar, L.A., Subbotin, S.A., Mundo-Ocampo, M., Goldenberg, R. y Barreto, R.W.** 2013. *Ditylenchus gallaeformans sp.n. (Tylenchida: Anguinidae): A neotropical nematode with biocontrol potential against weedy Melastomataceae*. *Nematology*, 15, págs. 179-196.
- Palazova, G. y Baicheva, O.** 2002. *Electrophoretic studies of Ditylenchus dipsaci (Kuhn, 1857) Filipjev, 1936 from two hosts: Allium sativum and Allium cepa*. *Experimental Pathology and Parasitology*, 5, págs. 39-40.
- Palmisano, A.M., Tacconi, R. y Trotti, G.C.** 1971. *Sopravvivenza di Ditylenchus dipsaci (Kühn) Filipjev Nematoda: tylenchidae) al processo digestivo nei suini, equini e bovini*. *Redia*, 52, págs. 725-737.
- Potter, J.W. y Olthof, T.H.A.** 1993. *Nematode pests of vegetable crops*. En *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture* (K. Evans, D.L. Trudgill y J.M. Webster, eds.), págs. 171-208. Wallingford (Reino Unido), CABI. 656 págs.
- Powers, T.O., Szalanski, A.L., Mullin, P.D., Harris, T.S., Bertozzi, T. y Griesbach, J.A.** 2001. *Identification of seed gall nematodes of agronomic and regulatory concern with PCR-RFLP of ITS1*. *Journal of Nematology*, 33, págs. 191-194.
- Rivoal, R. y Cook, R.** 1993. *Nematode pests of cereals*. En *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture* (K. Evans, D.L. Trudgill y J.M. Webster, eds.), págs. 259-304. Wallingford (Reino Unido), CABI. 656 págs.
- Roberts, H.** 1981. *New or unusual host-plant records for plant-parasitic nematodes, 1977-80*. *Plant Pathology*, 30, 182.
- Rojankovski, E. y Ciurea, A.** 1986. *Contributions to the study of interactions between the potato rot nematode, Ditylenchus destructor Thorne, and fungi in the potato disease complex*. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz*, 22, págs. 101-106.
- Seinhorst, J.W.** 1959. *A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin*. *Nematologica*, 4, págs. 67-69.
- Siddiqi, M.R.** 2000. *Tylenchida parasites of plants and insects*, 2.ª ed. Wallingford (Reino Unido), CABI. 864 págs.
- Sikora, R.A., Greco, N. y Silva, J.F.V.** 2005. *Nematode parasites of food legumes*. En *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture* (M. Luc, R.A. Sikora y J. Bridge, eds.), 2.ª ed., págs. 259-318. Wallingford (Reino Unido), CABI. 896 págs.
- Sousa, A.I., Gomes, V.F. y Tenente, R.C.V.** 2003. *Tratamento físico aplicado as sementes de melao (Cucumis melo L.), importadas da Holanda, na erradicação de Ditylenchus dipsaci (Kuhn, 1857) Filipjev, 1936*. *Nematologia Brasileira*, 27, págs. 223-225.

- Southey, J.F.** 1993. *Nematodes of ornamental and bulb crops*. En *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture* (K. Evans, D.L. Trudgill y J.M. Webster, eds.), págs. 463-500. Wallingford (Reino Unido), CABI. 656 págs.
- Sturhan, D. y Brzeski, M.W.** 1991. *Stem and bulb nematodes, Ditylenchus spp.* En *Manual of Agricultural Nematology*, (W.R. Nickle, ed.), págs. 423-464. Nueva York (Estados Unidos de América), Marcel Decker Inc. 1064 págs.
- Subbotin, S.A., Madani, M., Krall, E., Sturhan, D. y Moens, M.** 2005. *Molecular diagnostics, taxonomy and phylogeny of the stem nematode Ditylenchus dipsaci species complex based on the sequences of the ITS-rDNA*. *Phytopathology*, 95, págs. 1308-1315.
- Tenente, R.C.V. y Evans, A.A.F.** 1997. *Electrophoresis of proteins from several races of Ditylenchus dipsaci recovered from dried infested courgette tissue*. *Nematologia Brasileira*, 21, págs. 84-91.
- Thorne, G.** 1945. *Ditylenchus destructor, n. sp., the potato rot nematode, and Ditylenchus dipsaci (Kuhn, 1857) Filipjev, 1936, the teasel nematode (Nematoda: Tylenchidae)*. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 12, págs. 27-33.
- Van der Vegte, F.A. y Daiber, K.C.** 1983. *A preliminary report on the occurrence of Ditylenchus destructor on the ornamental Liatris spicata and efforts to eradicate the former*. *Actas del 6.º Simposio y Asamblea General de la Sociedad Nematológica del África Austral*.
- Viglierchio, D.R.** 1971. *Race genesis in Ditylenchus dipsaci*. *Nematologica*, 17, págs. 386-392.
- Viscardi, T. y Brzeski, M.W.** 1993. *DITYL: Computerized key for species identification of Ditylenchus (Nematoda: Anguinidae)*. *Fundamental and Applied Nematology*, 16, págs. 389-392.
- Vovlas, N., Troccoli, A., Palomares-Rius, J.E., De Luca, E., Lieke, G., Landa, B.B., Subbotin, S.A. y 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, págs. 762-775.
- Vrain, T.C., Wakarchuk, A.C., Levesque, A.C. y Hamilton, R.I.** 1992. *Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the Xiphinema americanum group*. *Fundamental and Applied Nematology*, 15, págs. 563-573.
- Webster, J. M., Anderson, R. V., Baillie, D. J., Beckenbach, K., Curran, J. y Rutherford, T.** 1990. *DNA probes for differentiating isolates of the pinewood nematode species complex*. *Revue de Nématologie*, 13, págs. 255-263.
- Wendt, K. R., Swart, A., Vrain, T. C. y Webster, J. M.** 1995. *Ditylenchus africanus sp.n. from South Africa: A morphological and molecular characterization*. *Fundamental and Applied Nematology*, 18, págs. 241-250.
- Wendt, K. R., Vrain, T. C. y Webster, J. M.** 1993. *Separation of three species of Ditylenchus and some host races of D. dipsaci by restriction fragment length polymorphism*. *Journal of Nematology*, 25, págs. 555-563.
- Zouhar, M., Marek, M., Douda, O., Mazáková, J. y Ryšánek, P.** 2007. *Conversion of sequence-characterized amplified region (SCAR) bands into high-throughput DNA markers based on RAPD technique for detection of the stem nematode Ditylenchus dipsaci in crucial plant hosts*. *Plant Soil and Environment*, 53, págs. 97-104.
- Zouhar, M., Marek, M., Licinio, J. y Ryšánek, P.** 2002. *Using point mutations in rDNA for differentiation of biotypes of Ditylenchus dipsaci from the Czech Republic*. *Plant Protection Science*, 38 (Especial 2), págs. 358-360.

9. Figuras



Figura 1. Semilla de *Vicia faba* infestada por *Ditylenchus dipsaci*, con presencia de masas algodonosas (o “lana de nematodos”).

Fotografía por gentileza de G. Caubel, Nemapix (1999).



Figura 2. *Allium sativum* infestado por *Ditylenchus dipsaci*.

Fotografía por gentileza de G. Caubel, Nemapix (1999).



Figura 3. Plantas jóvenes de *Allium cepa* infestadas por *Ditylenchus dipsaci*.
Fotografía por gentileza de E. Hennig, State Plant Health and Seed Inspection Service, Torun (Polonia).



Figura 4. Bulbo de ajo infestado por *Ditylenchus dipsaci*.
Fotografía por gentileza de G. Caubel, Nemapix (2002).



Figura 5. Plantas de *Narcissus* spp. infestadas por *Ditylenchus dipsaci*.
Fotografía por gentileza de G. Caubel, Nemapix (1999).



Figura 6. Sección transversal de bulbo de *Narcissus* sp. infestado por *Ditylenchus dipsaci*. Fotografía por gentileza de C.W. Laughlin, *Nemapix* (2002).

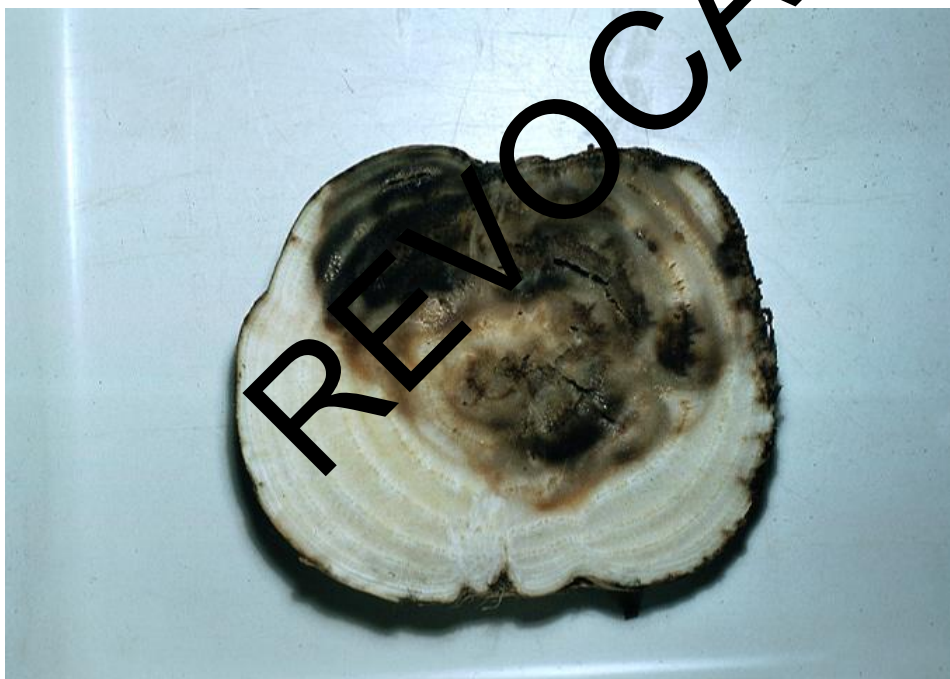


Figura 7. Sección transversal de remolacha azucarera infestada por *Ditylenchus dipsaci*. Fotografía por gentileza de C. Hogger, *Nemapix* (1999).



Figura 8. Sección transversal de papa infestada por *Ditylenchus destructor* comparada con una papa no infestada. Fotografía por gentileza de S. Ayoub, Nemapix (2000).

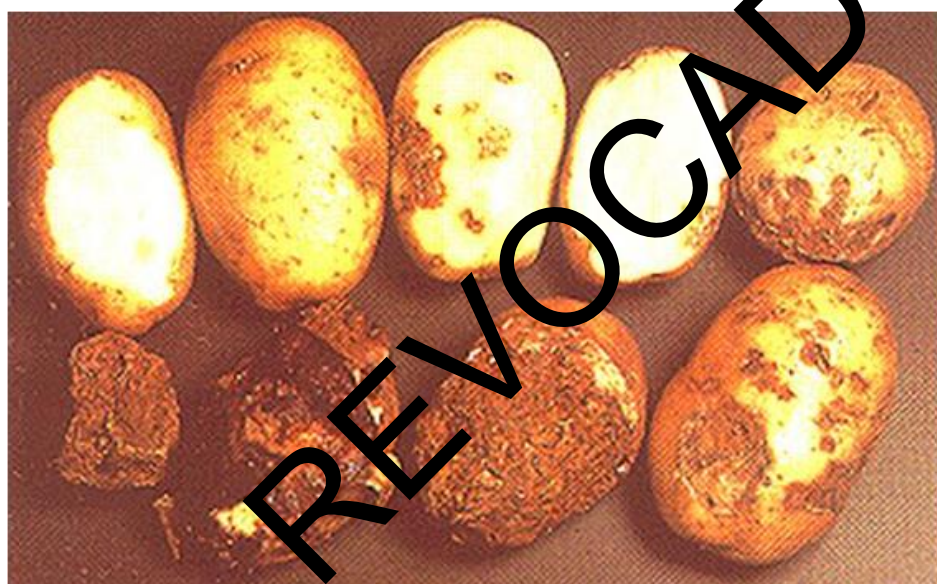


Figura 9. Papas con distintos grados de infestación por *Ditylenchus destructor*. Fotografía por gentileza de H. Andersen.

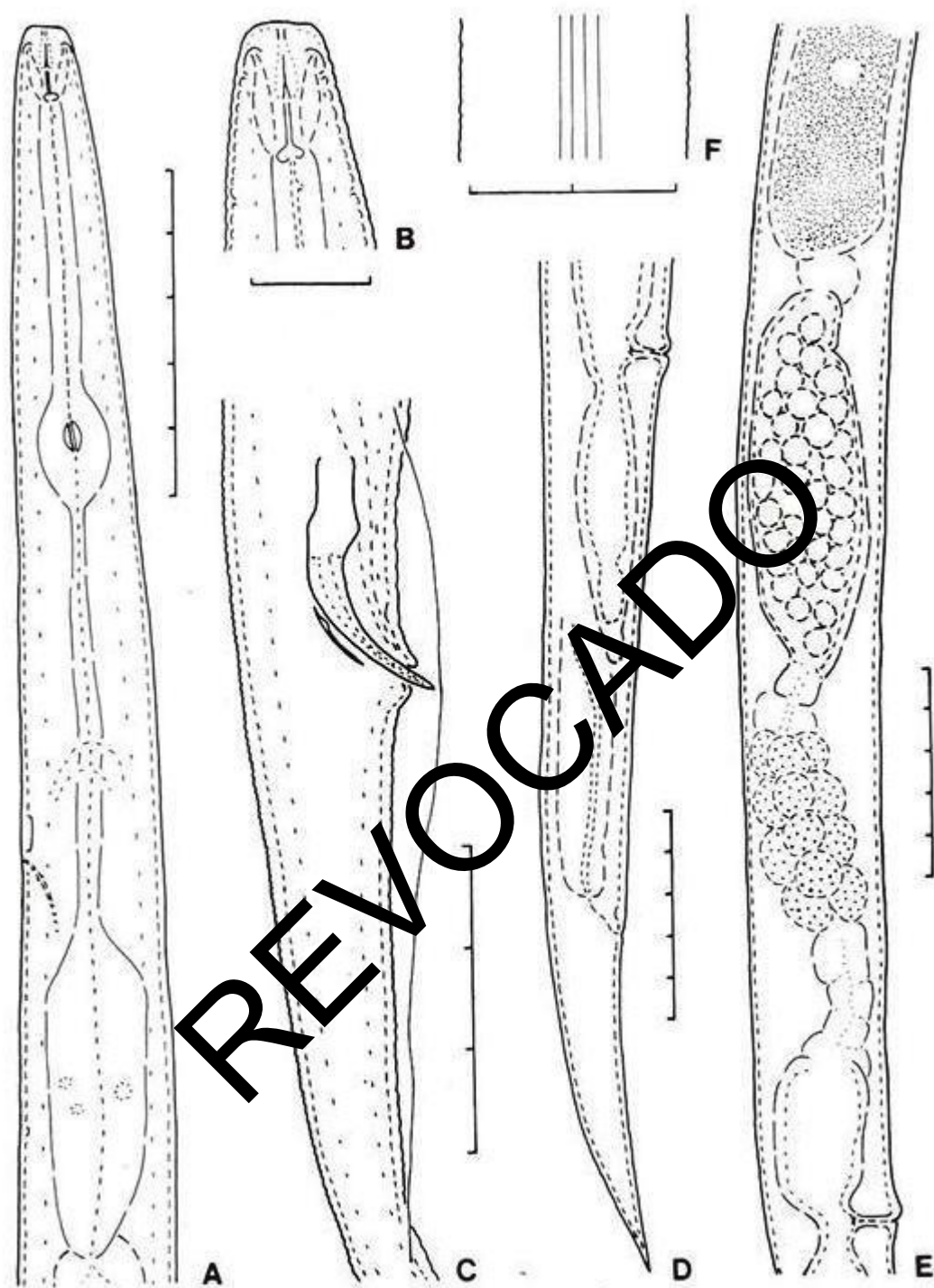


Figura 10. *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936 (según Sturhan y Brzeski, 1991). A) hembra, región esofágica; B) región cefálica de la hembra; C) macho, región de las espículas; D) hembra, región caudal; E) parte del aparato reproductor de la hembra, y F) banda lateral en la región media. Cada unidad de las barras de medida equivale a 10 μm .

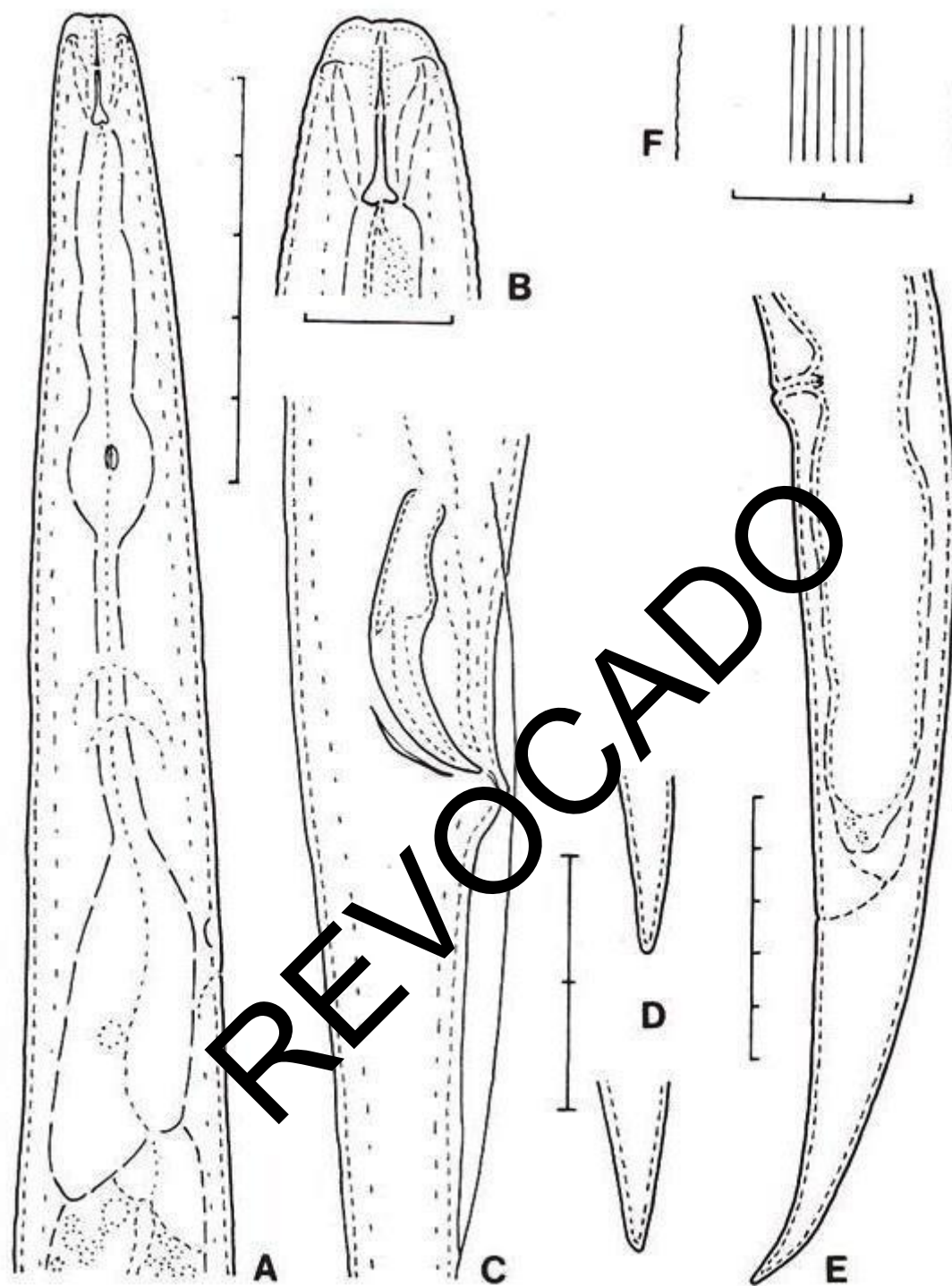


Figura 11. *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945 (según Sturhan y Brzeski, 1991). A) hembra, región esofágica; B) hembra, región cefálica; C) macho, región de las espículas; D) terminación de la cola de dos hembras; E) hembra, región caudal, y F) banda lateral en la región media. Cada unidad de las barras de medida equivale a 10 μm .

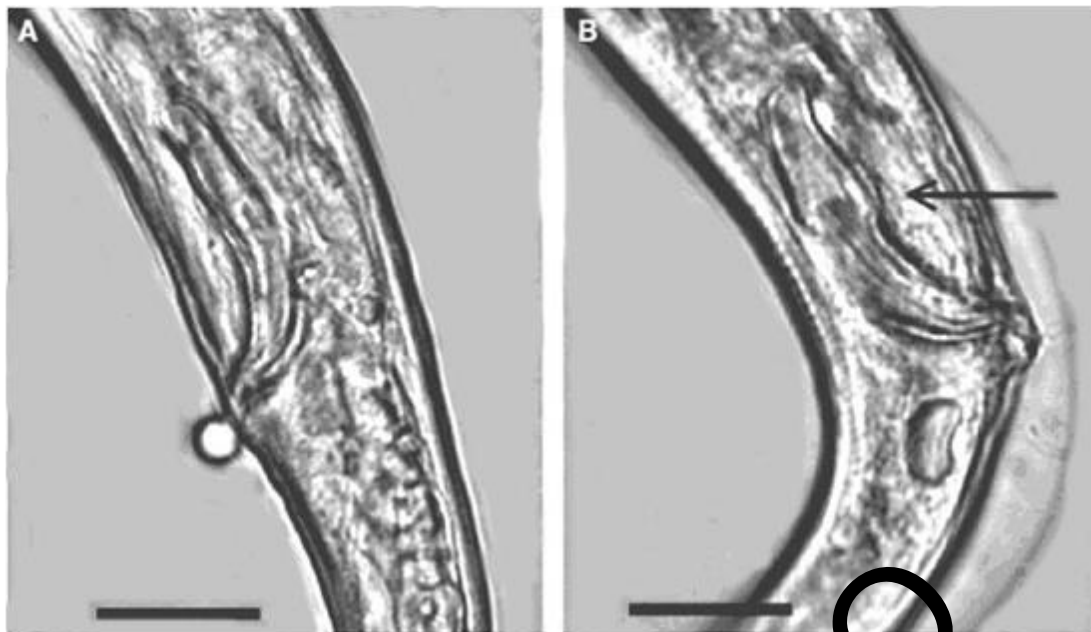


Figura 12. Espícula de *Ditylenchus*: A) *D. dipsaci* y B) *D. destructor*. La flecha señala el tumor. Las barras de escala equivalen a 12 µm.

Fotografía por gentileza de Karssen y Willemsen (2010).

Historia de la publicación

Esta no es una parte oficial de la norma

2006-04: En la primera reunión de la CMF (2006) se añadió el tema al programa de trabajo (Nematodos, 2006-008).

2004-11: El CN añadió la cuestión: *Ditylenchus destructor* / *D. dipsaci* (2004-017).

2010-07: Proyecto presentado en la reunión del GTPD.

2013-04: Consulta de expertos.

2013-06: Proyecto presentado en la reunión del GTPD.

2014-05: El CN aprobó presentar el texto para consulta a los miembros (2014_eSC_May_11).

2014-07: Consulta a los miembros.

2015-04: El GTPD aprobó el proyecto para someterlo al CN (2015_eTPDP_Apr_03).

2015-06: El CN aprobó el período de notificación del PD (2015_eSC_Nov_02).

2015-08: El CN aprobó el PD en nombre de la CMF (no se recibieron objeciones formales).

NIMF 27. Anexo 8. *Ditylenchus dipsaci* y *Ditylenchus destructor* (2015). Roma, CIPF, FAO.

Última modificación de la historia de la publicación: 2016-01.

CIPF

La Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) es un acuerdo internacional de sanidad vegetal que tiene como objetivo proteger las plantas cultivadas y silvestres previniendo la introducción y propagación de plagas. Los viajes y el comercio internacional hoy son más abundantes que nunca antes. En el desplazamiento de personas y mercancías por todo el mundo, los acompañan organismos que representan riesgos para las plantas.

La organización

- ◆ Hay más de 180 partes contratantes de la CIPF
- ◆ Cada parte contratante tiene una organización nacional de protección fitosanitaria (ONPF) y un contacto oficial de la CIPF
- ◆ Nueve organizaciones regionales de protección fitosanitaria (ORPF) obran para facilitar la aplicación de la CIPF en los países
- ◆ La CIPF se enlaza con las organizaciones internacionales pertinentes a fin de contribuir a la creación de capacidades regional y nacional
- ◆ La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) proporciona la Secretaría de la CIPF



Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF)

Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Roma, Italia
Tel. +39 06 5705 4812 - Fax: +39 06 5705 4819
Correo electrónico: ippc@fao.org - Web: www.ippc.int