

Se trata de un ejemplo de identificación polifásica y resolución del complejo de especies de *Ditylenchus dipsaci*

# *Ditylenchus gigas*, un nuevo nematodo fitopatógeno que ataca al cultivo de las habas

El nematodo del bulbo y el tallo (*Ditylenchus dipsaci*) representa un complejo de especies de difícil diagnóstico, de las cuales una es *D. dipsaci sensu stricto*, capaz de infectar gran número de especies de plantas, mientras que otras razas biológicas descritas se caracterizan por parasitar específicamente ciertas plantas (fresa, cebada, etc.).

En este artículo se detalla la descripción como nueva especie de la variante morfológica de este complejo, conocida como la raza gigante, y sus implicaciones para la identificación de este grupo de nematodos que afectan a importantes cultivos como el ajo, la cebolla o las habas, así como las medidas para su identificación y control.

J. E. Palomares-Rius<sup>1,2</sup>, B. B. Landa<sup>2</sup>  
A. Troccoli<sup>3</sup>, F. De Luca<sup>3</sup>, G. Liébanas<sup>4</sup>  
S.A. Subbotin<sup>5</sup>, N. Vovlas<sup>3</sup> y Pablo Castillo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> The James Hutton Institute, Invergowrie, Dundee, Scotland, Reino Unido.

<sup>2</sup> Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Córdoba, España

<sup>3</sup> Istituto per la Protezione delle Piante (IPP), Consiglio Nazionale delle Ricerche (C.N.R.), Bari, Italia.

<sup>4</sup> Departamento de Biología Animal, Vegetal y Ecología, Universidad de Jaén, Campus Las Lagunillas, Jaén, España

<sup>5</sup> Plant Pest Diagnostics Center (PPDC), California Department of Food and Agriculture, Sacramento, California, EE.UU.

azucarera, en los que causa necrosis y deformaciones provocando cuantiosas pérdidas (Sturhan y Brzeski, 1991; Castillo *et al.* 2007). Su hábitat se circunscribe principalmente a zonas templadas, incluyendo la cuenca Medite-

rránea. La Organización Europea y Mediterránea de Protección de Plantas (European and Mediterranean Plant Protection Organization) (EPPO) mantiene a *D. dipsaci* como especie de cuarentena tipo A2 en muchos de los países

**A**ctualmente existen más de sesenta especies reconocidas del género *Ditylenchus* (Siddiqi, 2000), de las cuales solamente algunas de ellas son parásitas de plantas superiores, mientras que la mayoría son especies que se alimentan de hongos (Sturhan y Brzeski, 1991). La especie tipo del género es el nematodo del tallo y bulbo, *Ditylenchus dipsaci*, el cual es un patógeno severo de diversas plantas a nivel mundial. Este nematodo es un parásito obligado de plantas y se alimenta de los tejidos parenquimatosos de tallos y bulbos de alrededor de quinientas especies de plantas, ocasionando daños en tallos de haba, guisante, judía, alfalfa, etc., y en bulbos de cebolla, ajo, narciso y remolacha



de esta región (EPP0, 2009). El juvenil de cuarto estadio (J4) es la forma de supervivencia del nematodo en ausencia del huésped, pudiendo soportar temperaturas inferiores a los 0°C, temperaturas estivales de hasta 55°C, o décadas deshidratado, pudiendo ser aislado de plantas completamente secas después de humedecerlas (Sturhan y Brzeski, 1991).

Muchos autores han indicado que *D. dipsaci* consta de un número importante de razas biológicas y poblaciones que difieren en la preferencia por el huésped y en el límite de separación de especies (Sturhan & Brzeski, 1991). Mediante estudios basados en ADN ribosómico y en la información disponible de cada una de ellas se ha podido comprobar que *D. dipsaci* representa un complejo de especies, incluyendo al menos siete especies (Subbotin *et al.*, 2005): *D. dipsaci sensu stricto* y seis probables nuevas especies identificadas como *Ditylenchus* sp. B de *Vicia faba* L., *Ditylenchus* sp. C de *Cirsium arvense* (L.) Scop., *Ditylenchus* sp. D de *Pilosella* spp., *Ditylenchus* sp. E de *Crepis praemorsa* (L.) Tausch, *Ditylenchus* sp. F de *Leontodon autumnalis* L. y *Pilosella officinarum* (L.) FW.Schultz & Sch.Bip., y *Ditylenchus* sp. G de *Plantago maritima* L. Recientemente, *Ditylenchus* sp. C de *C. arvense* ha sido descrita como una nueva especie, *D. weischeri* Chizov, Borisov & Subbotin, 2010 (Chizov *et al.*, 2010), mientras que las otras especies no han sido convenientemente estudiadas y descritas hasta el momento.

Debray & Maupas fueron los primeros en describir en 1896 una enfermedad en habas en Argelia causada por *D. dipsaci*; sin embargo, los adultos fueron considerablemente más largos que los tamaños normales descritos de esta especie. Estos autores denominaron a estas poblaciones, con un tamaño superior al descrito inicialmente para la especie, como raza gigante para diferenciarlo de las razas normales de *D. dipsaci*. La raza gigante ha sido descrita parasitando y ocasionando daños considerables en diversos países europeos y norte de África, principalmente en el Mediterráneo. Sin embargo, aunque la raza normal también puede infectar plantas de haba, es la raza gigante la que generalmente ocasiona mayores daños en las plantas y produce mayor número de semillas infestadas (Goodey, 1941; Hooper, 1971; Sikora *et al.* 2005; Sturhan y Brzeski, 1991). La raza gigante comparada con la raza normal también posee un rango más

Sintomatología del daño causado por *Ditylenchus gigas* en haba.

FIGURA 1



(a) Tallos de los ápices y hojas necrosadas y deformadas en ataques severos; (b) rango de áreas necrosadas en tallos, (c) secciones longitudinales de tallos sanos (izquierda) y dañados (derecha) mostrando necrosis internas, (d, e) vainas deformadas y de menor tamaño; (f) semillas deformadas (centro e inferior) y sanas (superior).

limitado de especies (Vovlas *et al.*, 2011). Ambas razas biológicas poseen diferente número de cromosomas (diploide en el caso de la raza normal y tetraploide en el caso de la raza gigante) y el cruce entre ambas razas produce una descendencia infértil (D'Addabbo *et al.*, 1982; Sturhan y Brzeski, 1991). Además ambas razas pueden diferenciarse mediante técnicas moleculares (Wendt *et al.*, 1993; Esquibet *et al.*, 2003; Subbotin *et al.*, 2005; Kerkhoud *et al.*, 2007; Marek *et al.*, 2010) y proteómicas (Tenente y Evans, 1997). Todas estas diferencias constatadas en los diversos estudios referidos han sido puestas en conjun-

to con estudios polifásicos (basados en identificación clásica y mediante técnicas moleculares) utilizando diversas poblaciones de la raza gigante y la raza normal, y han permitido diferenciar a la raza gigante como una especie separada de *D. dipsaci sensu stricto* (Vovlas *et al.*, 2011) a la que se ha denominado *Ditylenchus gigas* Vovlas, Troccoli, Palomares-Rius, De Luca, Liébanas, Landa, Subbotin & Castillo, 2011.

La diferenciación de la especie realizada en este último estudio está basada en el estudio pormenorizado de poblaciones de *D. gigas* del sur de Italia, España y Líbano, junto con di-

### Las plantas de haba infectadas por *D. gigas* presentan hinchazones y deformaciones en los tallos,

junto con lesiones, las cuales van de manchas de color rojizo-marrón a negro. En infecciones severas, la hoja y su peciolo pueden estar necrosados, lo cual puede confundirse con síntomas inducidos por patógenos fúngicos foliares.

FIGURA 2

Árbol filogenético obtenido mediante inferencia bayesiana mostrando las relaciones de parentesco entre las diferentes especies y razas biológicas del complejo de especies de *Ditylenchus dipsaci* utilizando la secuencia de la separación intergénica de los genes ribosómicos (ITS).



versas poblaciones de *D. dipsaci sensu stricto* del sur de Italia, España y Rusia. Los datos obtenidos con estas poblaciones y las citadas en la bibliografía fueron utilizados para la comparación de las dos especies.

### Sintomatología de la enfermedad

Las plantas de haba infectadas por *D. gigas* presentan hinchazones y deformaciones en los tallos, junto con lesiones, las cuales van de manchas de color rojizo-marrón a negro (figura 1); las manchas pueden envolver el tallo y pueden alcanzar hasta 8 cm. La coloración de

las manchas parece ser dependiente del cultivar y de los factores ambientales (Sikora et al., 2005). En infecciones severas, la hoja y su peciolo pueden estar necrosados, lo cual puede confundirse con síntomas inducidos por patógenos fúngicos foliares. También se puede producir una muerte de los tallos principales, estimulando la formación de rebrotes en la planta, produciendo una recuperación parcial de la misma. Las vainas se vuelven de un color marrón oscuro por la infección, distorsionando y disminuyendo el tamaño de las mismas. Las semillas en las fases más avanzadas de la infección son más oscuras, más pequeñas, y con punteado necrótico en la superficie (figura 1). Los nematodos en las semillas suelen localizarse por debajo de la cubierta de la semilla o testa, en las depresiones producidas por la radícula (Hooper, 1983b), pudiéndose localizar hasta 10.000 nematodos en una sola semilla (Sikora et al., 2005). Desde el punto de vista histopatológico, las áreas necrosadas están infectadas por nematodos y su migración y alimentación en las capas de células subepidérmicas provocan la separación de las células y el ensanchamiento de los espacios intercelulares.

### Diagnóstico diferencial

*Ditylenchus gigas* puede ser distinguido de las otras especies del género *Ditylenchus* por varias características morfológicas y moleculares.

Los caracteres diagnósticos más importantes son la longitud del cuerpo (1,6-2,29 mm), los campos laterales compuestos de cuatro líneas, sin bandas transversales, estilete delicado

(11,5-13,0 µm de longitud) con nódulos compuestos por proyecciones posteriores, y un largo saco uterino post-vulvar (81-150 µm de longitud) (figura 2). *Ditylenchus gigas* es morfológicamente similar a *D. dipsaci sensu stricto* y *D. weischeri*, de los cuales se diferencia por presentar un mayor tamaño (1,5-2,2 vs 1-1,7 y 1,2-1,6 mm, respectivamente), así como por una mayor longitud entre la vulva y el ano (202-266 vs 132-188 y 172-240 µm, respectivamente). Así mismo, *D. gigas* se diferencia de las especies más relacionadas por diferencias en las secuencias de ADN ribosómico (fragmentos de ADN conservado entre especies) (región ITS1-5,8S-ITS2, el fragmento D2-D3 del gen de la subunidad 28S del ribosoma, y la subunidad 18S del ribosoma), el gen nuclear hsp90 (Heat Shock protein 90) y el gen mitocondrial COI (gen citocromo oxidasa I). Las diferencias entre las especies del género están discutidas con mayor detalle en el artículo de Vovlas et al. (2011).

### Relaciones filogenéticas

Las recientes técnicas moleculares (secuenciación de fragmentos conservados de ADN) permiten caracterizar especies con similares características morfológicas, como es el caso de las diferentes razas biológicas de *D. dipsaci*. Mediante distintos métodos de cálculo de las diferencias en las secuencias de ADN, se pueden establecer relaciones de parentesco evolutivo entre especies relacionadas. Estas relaciones de parentesco permiten determinar la homogeneidad de la especie (puede por ejemplo relacionarse con la resistencia de la especie a pesticidas o susceptibilidad de variedades resistentes a la enfermedad) y aprovechar las posibles similitudes de genes entre especies para diseñar herramientas de control más efectivas. En el caso de *D. gigas*, se ha constatado utilizando diversas secuencias de ADN que la homogeneidad de la especie es considerable y

**La mejor medida de manejo de la enfermedad es evitar la introducción de *D. gigas* en la parcela.**

Por este motivo se debe vigilar la presencia del nematodo en los lotes de semillas y solo sembrar semilla certificada libre del patógeno, y evitar el transporte de suelo contaminado con la maquinaria agrícola

todas las secuencias de ADN obtenidas en diversos estudios son muy similares y están muy relacionadas entre sí. *Ditylenchus gigas* está relacionado con el resto de razas biológicas de *D. dipsaci* y presenta una gran homogeneidad en sus poblaciones basadas en las secuencias de ADN ribosómico de las poblaciones estudiadas (figura 2).

## Identificación molecular

La identificación clásica (basada en criterios morfológicos) de las especies de nematodos fitoparásitos de plantas puede y debe verse respaldada por el estudio de secuencias de ADN, las cuales presentan varias ventajas frente a otros métodos como: i) no se ven modificadas por las diferencias fisiológicas a las que ha sido sometido el individuo (por ejemplo, diferencias en tamaño, etc.); ii) permiten ser aplicadas en estadios del patógeno difíciles de identificar por métodos tradicionales como juveniles o fases de huevo; y iii) son más sensibles.

En el caso de este complejo de especies, con similitudes morfológicas y diferencias de plantas huéspedes, se han utilizado varias herramientas moleculares para su identificación, incluso a nivel de especie, como es el caso de *D. gigas* y *D. dipsaci sensu stricto*. Diversos sets de cebadores para amplificar la secuencia diana, junto con enzimas de restricción de ADN específicos permiten separar *D. gigas* de *D. dipsaci sensu stricto* (Kerkoud et al., 2007), como se ha demostrado en las poblaciones estudiadas de Líbano, España e Italia (Vovlas et al., 2011). Otros estudios han obtenido cebadores para la identificación específica de *D. dipsaci sensu stricto* derivados de marcadores SCAR (Zouhar et al., 2007) y cebadores para PCR convencional y a tiempo real con la región ITS de *D. dipsaci sensu stricto* (Subbotin et al., 2005). Sin embargo, actualmente la secuenciación de fragmentos de ADN específicos y su comparación con las secuencias depositadas en la base de datos, puede permitir la separación inequívoca de especies de este complejo.

## Medidas de control

*Ditylenchus gigas* produce daños mayores en el cultivo de las habas que los ocasionados por *D. dipsaci sensu stricto*. Sin embargo, no se han estudiado los niveles económicos de daño de *D. gigas*, pero como dato orientativo, el

**Este trabajo ha permitido separar definitivamente una de las razas biológicas del complejo de especies de *Ditylenchus dipsaci*, la cual causa principalmente daños en las habas. El uso de la identificación polifásica permite la clara e inequívoca separación de las especies**

nivel de daño de *D. dipsaci sensu stricto* en cebolla, apio y zanahoria es de tan solo 2 nematodos/100 g de suelo (Decker, 1969). *Ditylenchus gigas* tiene un rango más limitado de huéspedes que *D. dipsaci sensu stricto*, aunque se ha encontrado parasitando malas hierbas, destacando a *Avena sterilis*, *Vaccaria pyramidata* y *Verbena supina*, incluso a la planta parásita *Orobanche crenata* (Abbad y Bachikh, 2001). Los muestreos de suelo deben ser superficiales, ya que se ha demostrado que *D. gigas* y *D. dipsaci sensu stricto* pueden migrar por la superficie del suelo, después de lluvias y que estos nematodos no producen daños en las raíces. En las condiciones ambientales españolas los muestreos deben realizarse en los

primeros 10 cm de suelo (Nombela et al., 1985). Los muestreos pueden realizarse en plantas en crecimiento aislándose de las lesiones necróticas de los tallos u hojas, siendo los mejores momentos de muestreo en invierno, donde las temperaturas son más moderadas y existe más humedad. En semillas se recomienda el uso de aproximadamente 150 g de semillas en 500 ml de agua durante aproximadamente 12-24 h (Hooper, 1983a), posteriormente el número de nematodos se puede examinar por decantación o filtrado en tamiz de 25 µm. También es recomendable para detectar niveles bajos en las semillas la puesta en remojo de éstas con una posterior maceración y el uso de un embudo Baermann modificado (añadiendo por ejemplo papel

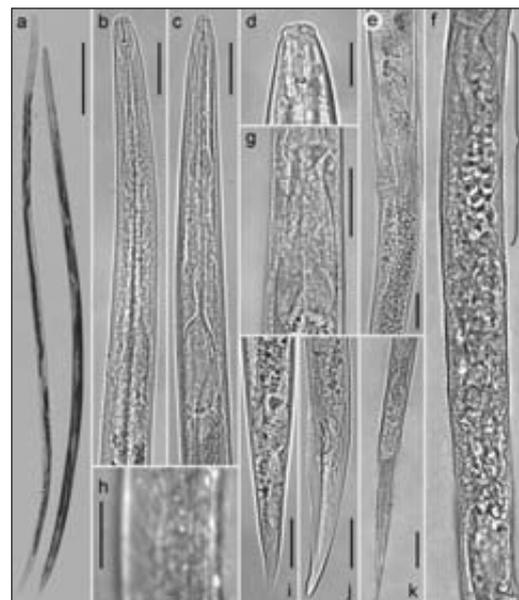
que impida la completa inmersión del tejido para evitar condiciones anaeróbicas del tejido) (Augustin y Sikora, 1989). La deshidratación de los tejidos de las plantas permite que los juveniles de cuarto estadio se agrupen formando una lana de nematodos con sus cuerpos deshidratados (anhidrobiosis), lo que les da ventajas en la supervivencia de la especie en los restos vegetales del cultivo.

La mejor medida de manejo de la enfermedad es evitar la introducción de *D. gigas* en la parcela. Por este motivo se debe vigilar la presencia del nematodo en los lotes de semillas y solo sembrar semilla certificada libre del patógeno, y evitar el transporte de suelo contaminado con la maquinaria agrícola. También se ha observado la supervivencia de nematodos en los tallos desecados y en semillas infectadas, que han pasado el tracto intestinal de ganado bovino y porcino, pero no en ganado ovino (Palmisano et al., 1971; Augustin, 1985).

Una vez introducido el nematodo

**FIGURA 3**

Microfotografías de *Ditylenchus gigas* Vovlas et al. 2011.



a) Hembra y macho adultos; b,c) región esofágica; d) detalle del estilete; e, f) detalle del sistema genital femenino mostrando la espermateca (dentro de la llave); g) detalle del bulbo basal; h) detalle de los campos laterales; i, k) cola de la hembra; j) cola del macho.

en una parcela, las rotaciones de tres años sin plantas huéspedes (incluyendo malas hierbas huéspedes) permiten una reducción de las pérdidas producidas por *D. dipsaci sensu stricto*. Las rotaciones largas de hasta ocho años pueden erradicar la enfermedad para el caso de *D. gigas* con un rango más limitado de huéspedes; sin embargo, el control de *D. dipsaci sensu stricto* con un número mayor de huéspedes puede ser más complicado. La aplicación de nematicidas en el caso de las habas está muy restringida y solo está permitido el uso de metam sodio (MARM, 2011). La aplicación de nematicidas en la semilla de siembra no permite tampoco una erradicación completa de los nematodos, sobre todo si hay elevados niveles de infección en éstas (Powell, 1974; Augustin, 1985). La solarización ha mostrado buenos resultados en el control de *D. dipsaci sensu stricto* en ajo en Israel (Siti *et al.*, 1982) y cebolla en Italia (Greco y Brandonisio, 1990). En Castilla-La Mancha la solarización ha sido testada con el cultivo de ajo, dando resultados positivos (Andrés *et al.*, 2002), por lo que esta medida podría también ser utilizada en cultivos de haba, debido a que el cultivo no está presente en verano y los nematodos están fundamentalmente presentes en capas superficiales del suelo. Si bien, esta medida puede ser difícil de aplicar en el caso de haba de grano debido a la escasa rentabilidad del cultivo.

Finalmente, hay que indicar que la medida de control de este nematodo más rentable, eficiente y respetuosa con el medio ambiente es la utilización de cultivares resistentes. A este respecto, se han detectado fuentes de resistencia a *D. gigas* en líneas provenientes de planes de mejora del Icarda (International Center for Agricultural Research in the Dry Areas) y del INRA (Institute National de la Recherche Agronomique) (Caubel *et al.*, 1998). Sin embargo, algunas líneas se han mostrado susceptibles a algunas poblaciones de *D. gigas*, lo cual puede indicar que puede existir cierta variabilidad del patógeno aún sin detectar (Abbad, 2001).

## Conclusiones

Este trabajo ha permitido separar definitivamente una de las razas biológicas del complejo de especies de *Ditylenchus dipsaci*, la cual causa principalmente daños en las habas. El uso de la identificación polifásica

(combinación de diferentes herramientas como la identificación clásica y la basada en análisis de fragmentos de ADN) permite la clara e inequívoca separación de las especies y es un buen ejemplo de la combinación de nuevas técnicas basadas en el ADN para la correcta identificación de las especies. Esta correcta identificación puede permitir la planificación de estrategias para un correcto manejo de la infestación de la parcela debido al rango más restringido de huéspedes de *D. gigas*. ●

## Agradecimientos

Los autores agradecen a C. Cantalapiedra-Navarrete, J. Martín Barbarroja, y G. León Ropero del IAS-CSIC por la asistencia técnica, F. Mossa y M. Mossa por proveer plantas de haba de la localidad tipo y D. Rubiales Olmedo (IAS-CSIC), J. Jawhar (LARI), y M. Di Vito (IPP-CNR) por las poblaciones española, libanesa e italiana de Ostuni de *Ditylenchus gigas*, respectivamente. Este estudio ha sido parcialmente financiado por MIUR/FAR No. 2628 Molecular Biodiversity Laboratory.

## Bibliografía ▼

- Abbad, A. F. 2001. Screening of *Vicia faba* for resistance to the "giant race" of *Ditylenchus dipsaci* in Morocco. *Nematologia Mediterranea* 29: 29-33.
- Abbad, A. F. y Bachikh, J. 2001. Studies on the host range of *Ditylenchus dipsaci* in Morocco. *Nematologia Mediterranea* 29: 51-57.
- Andrés, M. F. 2002. Comparación de métodos físicos, químicos y culturales para el control del nematodo endoparásito *Ditylenchus dipsaci* en el cultivo del ajo de Castilla la Mancha. *Phytoma-España*, 138: 109-111.
- Augustin, B. 1985. Biologie, Verbreitung und Bekämpfung des Stengelälchens, *Ditylenchus dipsaci* (Kühn), Filipjev and *Vicia faba* L. in Syrien und anderen Ländern des Nahen Ostens und Vorderafrikas. Tesis doctoral, University of Bonn, Germany.
- Augustin, B. y Sikora, R. A., 1989. Zur Methodik des Nachweises von *Ditylenchus dipsaci* in Körnerlegumenosen-saatgut. *Gesunde Pflanzen* 5: 189-192.
- Castillo P, Vovlas, N., Azpilicueta, A., Landa, B. B., y Jiménez-Díaz, R. M. 2007. Host-parasite relationships in fall-sown sugar beets infected by the stem and bulb nematode, *Ditylenchus dipsaci*. *Plant Disease* 91: 71-79.
- Caubel, G., Bossis, M., Esquibet, M., Esnault, R., Le-Guen, J., Maurin, G., Romane, G. y Le-Guen, J. 1998. Resistance of *Vicia faba* to stem nematode, *Ditylenchus dipsaci*. En: 3rd European Conference on Grain Legumes. Opportunities for High Quality, Healthy and Added-value Crops to Meet European Demands, Valladolid, Spain, p. 237.
- Debray, F. y Maupas E. F. 1896. Le *Tylenchus devastatrix* Kühn et la maladie vermiculaire des fèves en Algérie. *Algerie agricole*: 55 pp.
- Decker, H. 1969. *Phytonematologie*. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin, Germany.
- EPPO, 2009. EPPO A1 and A2 lists of pests recommended for regulation as quarantine pests. <http://www.eppo.org/QUARANTINE/quarantine.htm>
- Goodey, T. 1941. Observations on a giant race of the stem eelworm *Anguillulina dipsaci*, attacking broad beans, *Vicia faba* L. *Journal of Helminthology* 19: 114-122.
- Greco, N. y Brandonisio, A. 1990. Effect of soil solarization and SIP 5561 on *Heterodera carotae* and *Ditylenchus dipsaci* on yield of carrot and onion. *Nematologia Mediterranea* 18: 189-193.
- Hooper, D. J. 1971. Stem eelworm (*Ditylenchus dipsaci*), a seed and soil-borne pathogen of field beans (*Vicia faba*). *Plant Pathology* 20: 25-27.
- Hooper, D. J. 1983a. Observations on stem nematode, *Ditylenchus dipsaci*, attacking field beans, *Vicia faba*. *Rothamsted Report for 1983* 2: 239-260.
- Hooper, D. J. 1983b. Nematode pests of *Vicia faba* L. En: *Hebblethwaite, P. D. ed. The Faba Bean (Vicia faba L.)*. Butterworths, London, pp. 347-370.
- Kerkoud, M., Esquibet, M., Plantard, O., Arvillon, M., Guimier, C., Franck, M., Lechappe, J., y Mathis, R. 2007. Identification of *Ditylenchus* species associated with Fabaceae seeds based on a specific polymerase chain reaction of ribosomal DNA-ITS regions. *European Plant Pathology* 118: 323-32.
- MARM 2011: <http://www.marm.es/es/agricultura/temas/medios-de-produccion/productos-fitosanitarios/registro/productos/forexi.asp?pag=5&s=4&s=3&s=2&e=0&plagEfecto=-1&cuUso=0104010703000000&ambUti=01&solEsp=on>
- Nombela, G., Navas, A., y Bello, A. 1985. *Ditylenchus dipsaci* en los cultivos de leguminosas y cereales en la Región Central. *Boletín de Sanidad Vegetal - Plagas* 11: 205-216.
- Palmisano, A. M., Tacconi, R., y Trotti, G. C. 1971. Sopravvivenza di *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev (Nematoda: Tylenchidae) al processo digestiva nei suini, equini e bovini. *Re dia* 52: 725-737.
- Powell, D. F. 1974. Fumigation of field beans against *Ditylenchus dipsaci*. *Plant Pathology* 23: 110-113.
- Siddiqi, M. R. 2000. *Tylenchida parasites of plants and insects*. 2nd edición. Wallingford, UK, CAB International.
- Sikora, R. A., Greco, N., Velosa Silva, J. F. 2005. Nematode parasites of food legumes. En Luc, M., Sikora, R. A., Bridge, J. eds. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Wallingford, UK: CAB International, 259-318.
- Siti, E., Cohn, E., Katan, J., y Mordechai, M. 1982. Control of *Ditylenchus dipsaci* in garlic bulb and soil treatments. *Phytoparasitica* 10: 93-100.
- Sturhan, D., y Brzeski, M. W. 1991. Stem and bulb nematodes, *Ditylenchus* spp. En: Nickle, W. R. ed. *Manual of Agricultural Nematology*. New York, USA, Marcel Dekker, 423-464.
- Subbotin, S. A., Madami, 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 internal transcribed spacer-DNA. *Phytopathology* 95: 1308-1315.
- Vovlas, N., Troccoli, A., Palomares-Rius, J. E., De Luca, F., Liébanas, G., Landa, B. B., Subbotin, S. A., Castillo, P. 2011. *Ditylenchus gigas* n. sp. Parasitizing broad bean: a new stem nematode singled out from the *Ditylenchus dipsaci* species complex using a polyphasic approach with molecular phylogeny. *Plant Pathology* 60: 762-775.
- Zouhar, M., Douda, O., Mazakova, J., y Rysanek, 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: 97-104.