

# Identificación molecular y diversidad genética de las especies de nematodos *Globodera rostochiensis* y *G. pallida* en regiones productoras de papa de Guatemala

*Molecular identification and genetic diversity of the species of nematodes Globodera rostochiensis and G. pallida in potato growing regions of Guatemala*

José A. Ruiz-Chután <sup>1,2\*</sup>, Julio E. Berdúo-Sandoval <sup>1</sup>, Sergio Melgar<sup>3</sup>, Marie Kalousová <sup>2</sup>, Bohdan Lojka <sup>2</sup>, Eloy Fernández <sup>2</sup>, Jana Žiarovská <sup>4</sup>, Amílcar Sánchez-Pérez <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala

<sup>2</sup>Department of Crop Sciences and Agroforestry, Czech University of Life Sciences Prague, Czech Republic

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala

<sup>4</sup>Department of Genetics and Plant Breeding, Research Centre AgroBioTech, Slovak University of Agriculture in Nitra, Slovak Republic.

\*Autor al que se dirige la correspondencia: [josealejandro.ruiz@icloud.com](mailto:josealejandro.ruiz@icloud.com)

Recibido: 05 de junio 2020 / Revisión: 15 de junio 2022 / Aceptado: 13 de octubre 2022

## Resumen

En Guatemala, la producción del cultivo de papa se ve afectada por los nematodos *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida*. La capacidad de ambas especies para formar quistes complica su control y provoca el aumento de sus poblaciones. En Guatemala se reporta la presencia de ambas especies de nematodos por identificación morfológica, sin embargo, no se ha realizado una confirmación molecular. Este es el primer estudio para validar la presencia de ambas especies de nematodos por PCR múltiple y la determinación de la diversidad y estructura genética de las poblaciones utilizando marcadores moleculares. Se realizaron muestreos en cuatro departamentos productores de papa del país. La identificación por PCR se realizó con el cebador común ITS5 y los cebadores PITSr3 específico para *G. rostochiensis* y PITSp4 para *G. pallida*. La caracterización molecular se realizó con el marcador AFLP. Se confirmó la presencia de las dos especies de nematodos en los cuatro departamentos. Los índices de diversidad Shannon y heterocigosidad esperada revelaron mayor diversidad genética en *G. rostochiensis* ( $H = 0.311$ ,  $He = 0.301$ ) que en *G. pallida* ( $H = 0.035$ ,  $He = 0.223$ ). Los métodos NJ, DAPC y PCA exhibieron una débil estructura entre las poblaciones de ambas especies de nematodos. Los resultados sugieren un patrón de dispersión desde Quetzaltenango hacia el resto del país, atribuido a la comercialización de semilla contaminada con nematodos. Se sugiere promover programas de socialización sobre los beneficios del uso de semilla certificada, además de constantes monitoreos moleculares para un diagnóstico certero de ambas especies de nematodos.

Palabras clave: PCR múltiple, nematodos formadores de quistes, diversidad genética, flujo genético, AFLP

## Abstract

In Guatemala, potato crop production is affected by the nematodes *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. The ability of both species to form cysts complicates their control and causes an increase in their populations. In Guatemala, both species of nematodes have been reported by morphological identification; however, molecular confirmation has not been carried out. It is the first study to validate the presence of both nematode species by multiplex PCR and determine the diversity and genetic structure of the populations using molecular markers. Sampling was carried out in four potato-producing departments of the country. PCR identification was performed with the common primer ITS5 and the primers PITSr3 specific for *G. rostochiensis* and PITSp4 for *G. pallida*. We performed molecular characterization with the AFLP marker. We confirmed the presence of the two nematode species in the four departments. Shannon diversity and expected heterozygosity indices revealed higher genetic diversity in *G. rostochiensis* ( $H = 0.311$ ,  $He = 0.301$ ) than in *G. pallida* ( $H = 0.035$ ,  $He = 0.223$ ). The NJ, DAPC, and PCA methods exhibited weak structure among populations of both nematode species. The results suggest a dispersal pattern from Quetzaltenango to the rest of the country, attributed to the commercialization of seed contaminated with nematodes. We suggest promoting socialization programs on the benefits of using certified seeds and constant molecular monitoring for an accurate diagnosis of both species of nematodes.

Keywords: Multiplex PCR, cyst-forming nematodes, genetic diversity, gene flow, AFLP



## Introducción

Después del maíz, arroz y trigo, la papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los cultivos alimenticios más importante a nivel mundial y más de la mitad de la producción proviene de países en desarrollo (Devaux et al., 2014). En Guatemala, la producción de papa es llevada a cabo principalmente por pequeños agricultores, quienes, en su mayoría, la destinan al autoconsumo y mercado nacional. Para el 2015, la distribución de la producción por departamentos se encontraba organizada entre Huehuetenango 32%, Quetzaltenango 23%, San Marcos 21%, Guatemala 6%, Sololá 4% y el resto de departamentos 14% abarcando un total de 30,000 manzanas y una producción de 11,872,600 quintales, generando 12,793 empleos permanentes (Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación [MAGA], 2016).

El cultivo de la papa es el principal hospedero de las especies de nematodos parásitos formadores de quistes *Globodera rostochiensis* (Woll) Behrens y *G. pallida* (Stone) Behrens (Flores-Choque et al., 2017; Santos et al., 1995). Estas dos especies de nematodos pueden ser devastadoras en los campos de producción del cultivo de la papa si no se controlan a tiempo, pudiendo llevar a los productores al abandono de los campos de cultivo (van de Vossen et al., 2014). Ambas especies de nematodos son consideradas entre las plagas más importantes en el cultivo de la papa por las pérdidas económicas generadas, las cuales alcanzan hasta el 12% de la producción mundial (Madani et al., 2010).

Las especies de nematodos *G. rostochiensis* y *G. pallida* son endoparásitos sedentarios que inducen sitios de alimentación modificados llamados sincitios cerca del tejido vascular en las células de la raíz (Sobczak et al., 2005). Se considera que ambas especies tienen capacidad de sobrevivir hasta por 30 años, incluso en ausencia de hospederos, debido a su capacidad de formar quistes (Ramírez-Suárez, 2014). La infección generada por ambas especies de nematodos causa crecimiento deficiente, amarillamiento, marchitamiento, deficiencias de nutrientes en campos muy infestados y acortamiento del sistema radicular (Gitty et al., 2011; Hajihassani et al., 2013).

En cuanto al centro de origen de ambas especies, se ha reportado a la región de los Andes al sur de Perú, desde donde se ha extendido hacia la mayoría de zonas productoras de papa alrededor del mundo (Grenier et al., 2010). Ambas especies de nematodos son conocidas por el daño que pueden causar al cultivo de papa, pero también por su alto potencial de dispersión (Alenda

et al., 2014; Plantard et al., 2008). Su capacidad de resistir la desecación, en la etapa de quiste, mejora considerablemente su capacidad de dispersión. Dadas las fuertes pérdidas económicas que pueden llegar a ocasionar, la especie *G. rostochiensis* ha sido cuarentenada en 106 países, mientras que la especie *G. pallida* ha sido cuarentenada en 52 países (Gamel et al., 2017).

Debido al impacto económico de estas especies de nematodos, es crucial un diagnóstico acertado a través de una identificación precisa. La identificación morfológica, basada en algunas características del segundo estado juvenil (J2) y del área perineal del quiste, ha sido utilizada, aunque con incertidumbre sobre la efectividad de los resultados (Seesao et al., 2016; Tirchi et al., 2016). A causa de la variabilidad de las principales características morfológicas y el traslape de los parámetros de diagnóstico en estas dos especies de nematodos, la identificación molecular por PCR es el método más recomendado (Powers, 2004; Quader et al., 2008). Actualmente, se han desarrollado variantes al PCR convencional a través del uso de PCR en tiempo real (Camacho et al., 2017; Nakhla et al., 2010), así como la identificación de patotipos mediante secuenciación (Mulyadi et al., 2014).

En el presente, existe un amplio interés por encontrar alternativas al uso de nematicidas, debido a sus impactos negativos al medio ambiente y salud humana (Kaur et al., 2016). Una de las alternativas es la utilización de genotipos de papa con resistencia genética, sin embargo, ambas especies de nematodos tienen diferentes espectros de virulencia que afectan de diversas formas los genes de resistencia (Da Conceição et al., 2003). Conocer la diversidad genética de las poblaciones de nematodos es imprescindible para advertir sobre variantes genéticas que pueden superar la protección que brindan los genes de resistencia introgresados a través de los programas de mejoramiento. Para esto, se han realizado estudios con diversos marcadores moleculares como RAPD (Chrisanfova et al., 2008), AFLP (Manduric & Andersson, 2003), SSR (Plantard et al., 2008), secuenciación de región ITS1 e ITS2 del rDNA (Nowaczyk et al., 2011) y secuenciación de genes nucleares para aproximaciones filogenéticas y (Tirchi et al., 2017) filogeográficas (Thevenoux et al., 2020).

En Guatemala existen registros morfológicos de la presencia de *G. rostochiensis* y *G. pallida*, reportándose densidades de hasta 5 quistes/g suelo en la región occidental. Esta situación representa un grave problema para los productores nacionales. Sin embargo, no se ha desarrollado un estudio de diversidad genética

de las poblaciones de ambas especies en las principales regiones de producción de papa a nivel nacional. Esta información es de vital importancia para el desarrollo de programas de mejoramiento en papa y para determinar como ha sido la dispersión de los nematodos, planteando así estrategias para su control. Por tanto, el objetivo de esta investigación fue realizar una confirmación molecular de la presencia de las especies *G. rostochiensis* y *G. pallida* por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y determinar la diversidad y estructura genética de las poblaciones de ambas especies de nematodos en las principales regiones productoras de papa del país.

## Materiales y Métodos

### Toma de muestras y extracción de quistes de *G. rostochiensis* y *G. pallida*

Durante los meses de abril a septiembre del 2019 se colectaron un total de 80 muestras de suelo distribuidas de la siguiente manera: departamento de Quetzaltenango, municipios de Concepción Chiquirichapa (diez),

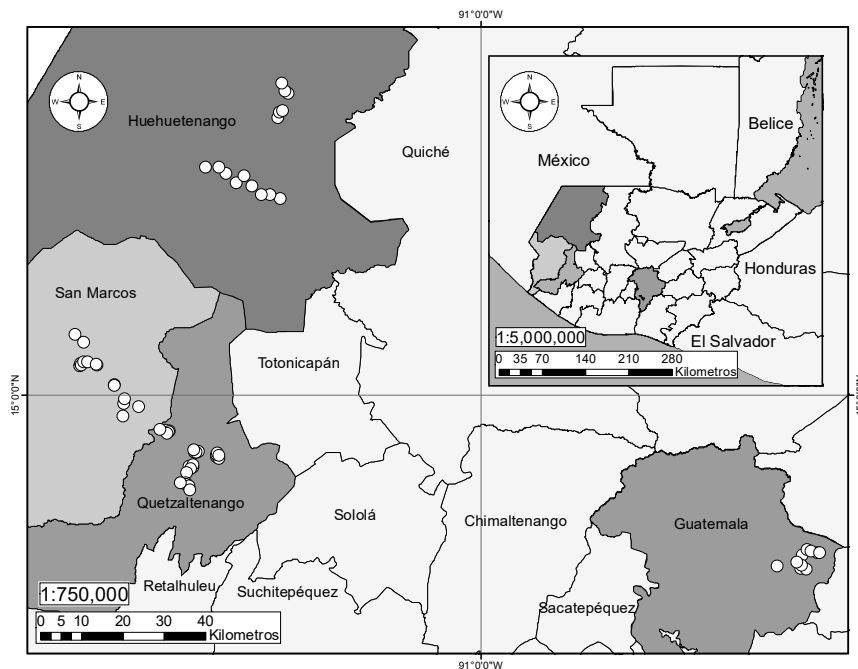
Palestina de los Altos (cinco), La Esperanza (siete), San Juan Ostuncalco (tres) y San Martín Sacatepéquez (cinco). Departamento de San Marcos, municipios de Tajumulco (cuatro), Ixchiguán (tres), San Marcos (ocho) y San Pedro Sacatepéquez (tres). Departamento de Huehuetenango, municipios de Chiantla (siete), San Juan Ixcoy (cuatro), San Pedro Soloma (cuatro) y Todos Santos Cuchumatán (cinco). Departamento de Guatemala, municipio de Palencia (doce) (Figura 1). Cada muestra fue tomada a una profundidad de 10 - 15 cm en el área de la rizófera del cultivo de papa empleando una pala previamente desinfectada con etanol al 70%. El suelo colectado fue depositado en bolsas plásticas estériles y transportado al laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía, USAC en donde se realizó la extracción de los quistes por el método del flotador de Fenwick (1940). Posteriormente fueron secados y colocados en un tubo de 1.5 mL para ser almacenados a temperatura ambiente (Figura 2).

### Extracción de ADN

Para la extracción del ADN se empleó el kit comercial Gentra® siguiendo la metodología propues-

**Figura 1**

Mapa de ubicación de las muestras colectadas en las zonas productoras de papa de la región occidental en los departamentos de Quetzaltenango, San Marcos y Huehuetenango; y la región central en el departamento de Guatemala



ta por el fabricante. Las extracciones se realizaron tomando 20 quistes por cada muestra. La calidad e integridad del ADN se determinó con el fluorómetro Quantus (Promega) y electroforesis en gel de agarosa al 0.8% con tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) (1.0 M Tris-Borato, 20mM EDTA, pH 8.3) visualizado en transiluminador (Smart Blue E4000) con luz UV.

### Identificación molecular de *G. rostochiensis* y *G. pallida*

Para la identificación molecular se realizó una PCR múltiple con el cebador común ITS5 (5'-GGAA-GTAAAAGTCGTAACAAGG-3') y el cebador específico para *G. rostochiensis* PITSr3 (5'-AGCGCAGACATGCCGCAA-3') y el cebador específico para *G. pallida* PITSp4 (5'-ACAACAGCAATCGTCGAG -3') por su alta especificidad en la identificación de ambas especies de nematodos (Bulman & Marshall, 1997). La PCR múltiple fue preparada para un volumen total de 25 µL conteniendo 20mM Tris HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.16mM de cada dNTP, 0.25µM de cada cebador, 0.6 unidades de Taq polimerasa y

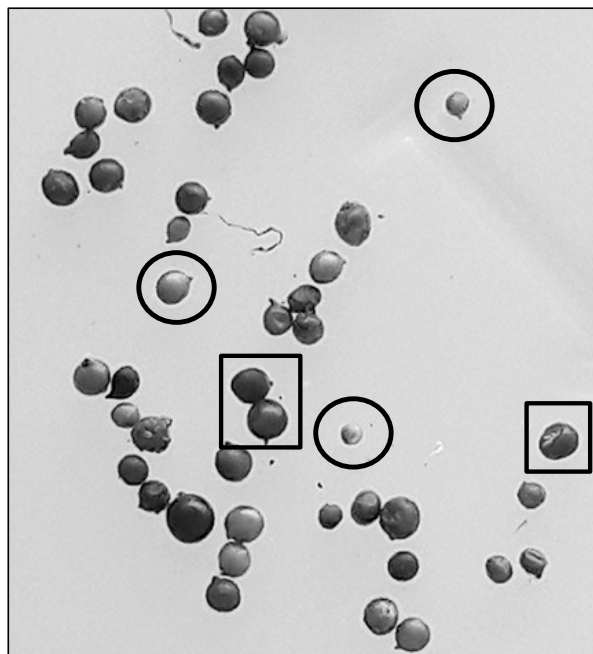
40 ng de ADN. Las condiciones para la PCR fueron las siguientes: 94 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 60 °C por 30s, 72 °C por 30 s y una extensión final de 72 °C por 5 min.

Las muestras se amplificaron en un termociclador Bio Rad® PTC-200. Todos los productos de PCR generados fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio (0.1 µg/mL) en amortiguador TAE 1X, empleando un transiluminador de luz UV. Para la determinación del tamaño de los fragmentos obtenidos se utilizó un marcador de peso molecular de 3 kb (SibEnzyme Ltd.®). Las reacciones que generaron un fragmento de 434 pb fueron clasificadas como positivas para *G. rostochiensis*. Las reacciones que generaron un fragmento de 265 pb fueron clasificadas como positivas para *G. pallida*. Las reacciones que generaron un fragmento de 434 y 265 pb fueron clasificadas como positivas para ambas especies (Figura 3).

Las muestras de ADN que resultaron positivas para ambas especies en una misma PCR múltiple, fueron descartadas para el protocolo de AFLP para evitar que existiera mezcla de ADN de dos especies en una misma muestra.

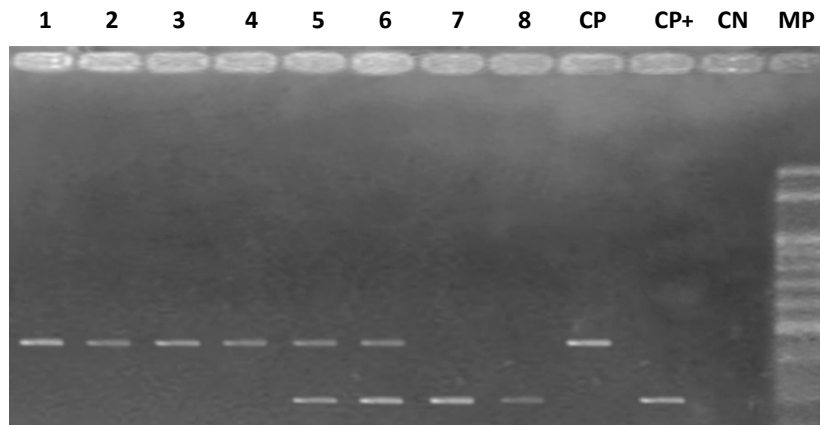
### Figura 2

*Quistes de G. rostochiensis y G. pallida extraídos de campos de producción del cultivo de papa en el departamento de Quetzaltenango. Quistes remarcados dentro de cuadrados son ejemplos de G. rostochiensis. Quistes remarcados dentro de círculos son ejemplos de G. pallida*



**Figura 3**

Productos amplificados por PCR con el cebador común ITS5 y el cebador PITsR3 específico para *G. rostochiensis* y el cebador PITSp4 específico para *G. pallida*



*Nota.* Carriles 1 – 4 muestras positivas para *G. rostochiensis* provenientes de Quetzaltenango, San Marcos, Huehuetenango y Guatemala respectivamente. Carriles 5 – 6 muestras positivas para *G. rostochiensis* y *G. pallida* provenientes de Quetzaltenango y Huehuetenango. Carriles 7 – 8 muestras positivas para *G. pallida* provenientes de San Marcos y Quetzaltenango. CP = control positivo para *G. rostochiensis*. CP+ = control positivo para *G. pallida*. CN = control negativo (agua bidestilada estéril). MP = marcador de peso molecular DNA Ladder 3 Kb (SibEnzyme Ltd.®).

### Protocolo de AFLP para análisis de diversidad genética

Para realizar el genotipado de las muestras se utilizó el marcador molecular AFLP (Vos et al., 1995) siguiendo el protocolo descrito por Marché y colaboradores (2001) utilizando los cebadores E-TC + M-CAG durante la amplificación selectiva. Los productos de la PCR selectiva se visualizaron en un gel de poliacrilamida al 5% para poder observar las bandas amplificadas. La tinción del gel se realizó con nitrato de plata (Karam et al., 2006). El gel se dejó secar por 2 días y posteriormente se realizó la lectura del perfil de las bandas.

### Análisis de datos

#### Delimitación molecular de *G. rostochiensis* y *G. pallida*

Para confirmar la presencia de ambas especies de *Globodera*, se creó una matriz binaria de presencia (1) ausencia (0) para cada uno de los loci amplificados a partir del perfil de bandas obtenido del gel de

poliacrilamida. La matriz se exportó al programa Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis Past v3.18 (Ryan et al., 2001) para generar un dendrograma tipo Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987) basado en la distancia genética de Dice y visualizado con el programa FigTree v1.4.3 (Rambaut, 2008).

La delimitación molecular de *G. rostochiensis* y *G. pallida* obtenida por el método NJ, se corroboró con un análisis discriminante de componentes principales (DAPC) (Jombart et al., 2010). El procedimiento utilizó la función `find.cluster` para identificar el número óptimo de grupos genéticos (K) con el método del codo a través del Criterio de Información Bayesiana (BIC) empleando el paquete `adegenet` v.2.1.6 (Jombart, 2008). Los grupos obtenidos se visualizaron con un diagrama de densidad sobre la primera función discriminante y un gráfico de barras exhibiendo el grado de ascendencia genética a cada grupo dado por la probabilidad posterior del DAPC.

#### Diversidad genética inter e intra-específica

La matriz binaria fue convertida en un objeto de clase `genind` utilizando el paquete `poppr` v.2.9.3

(Kamvar et al., 2014) implementado en el programa R v.4.2.0 (R Core Team, 2022). Para determinar la diversidad genética inter e intra-específica se calcularon los índices de diversidad de Shannon (H), Simpson ( $\lambda$ ) y heterosigosidad esperada (He) (diversidad de Nei) con el paquete poppr. El porcentaje de loci polimórficos (PLP) y número de alelos diferentes (Na) fueron estimados con el programa GenoDive v3.0 (Meirmans, 2020).

### Estructura genética de las poblaciones

Para explorar la estructura de las poblaciones de cada especie, se generaron dendrogramas de tipo NJ de cada una de las especies de nematodos siguiendo la metodología antes descrita. Para comparar la estructura genética obtenida con el NJ se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con el paquete ade4 v.1.7 (Bougeard & Dray, 2018). También se empleó un DAPC con la información a priori de los sitios de muestreo utilizando la función dapc del paquete adegenet. El número correcto de componentes principales y funciones discriminantes retenidas se confirmó con una función de validación cruzada (Xval.dapc).

### Diferenciación poblacional

La diferenciación genética de las poblaciones de cada especie se exploró más a fondo mediante el análisis de varianza molecular (AMOVA) implementado en el paquete poppr. Los componentes de covarianza se utilizaron para calcular los índices de fijación  $\Phi$  y la diferenciación de poblaciones (Grünwald & Hoheisel, 2006). La significancia se evaluó con una prueba de aleatorización utilizando 10,000 permutaciones. Para evaluar el aislamiento por distancia, se aplicó la prueba de mantel sobre las matrices de distancias genéticas y geográficas utilizando 10,000 permutaciones con el paquete ade4 v.1.7 (Bougeard & Dray, 2018). La diferenciación de poblaciones por pares se examinó con el índice  $\Phi_{PT}$  con 10,000 permutaciones en el paquete mmod v.1.3.3 (Winter, 2012).

## Resultados

De las muestras analizadas para la identificación molecular de las dos especies de nematodos con la PCR múltiple, 47 fueron positivas solo para *G. rostochiensis*, 18 fueron positivas solo para *G. pallida* y 15 fueron positivas para ambas especies. Las muestras positivas

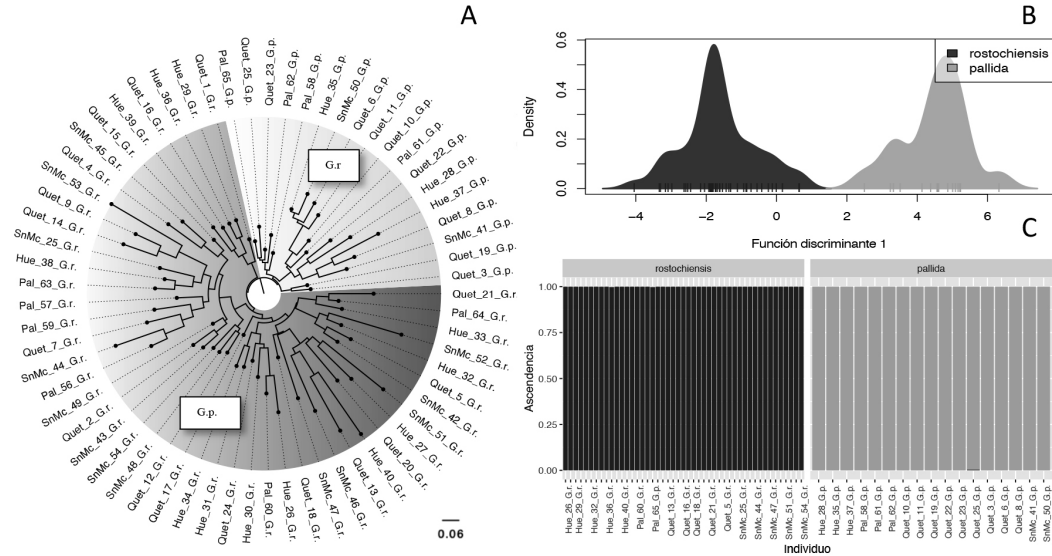
para *G. rostochiensis* amplificaron bandas de 434 pb y para *G. pallida* las bandas amplificadas fueron de 265 pb (Figura 3). En el departamento de Quetzaltenango 16 muestras fueron positivas solo para *G. rostochiensis*, 9 fueron positivas solo para *G. pallida* y 5 fueron positivas para ambas especies. En el departamento de San Marcos 13 muestras fueron positivas solo para *G. rostochiensis*, 2 fueron positivas solo para *G. pallida* y 3 fueron positivas para ambas especies. En el departamento de Huehuetenango 12 muestras fueron positivas solo para *G. rostochiensis*, 3 fueron positivas para *G. pallida* y 4 fueron positivas para ambas especies. En el departamento de Guatemala 6 muestras fueron positivas solo para *G. rostochiensis*, 4 fueron positivas solo para *G. pallida* y 3 fueron positivas para ambas especies.

El análisis de delimitación molecular permitió identificar dos grupos principales a partir del dendrograma NJ, los cuales correspondieron a cada una de las especies de nematodos en este estudio. El grupo G.r. reunió a todas las muestras correspondientes a *G. rostochiensis*, mientras que el grupo G.p. reunió a todas las muestras de *G. pallida* (Figura 4A). El método DAPC fue consistente con los resultados obtenidos con el dendrograma NJ al sugerir la presencia de dos grupos ( $K = 2$ ) que se ajustaron a las dos especies de nematodos (Figura 4B). Las probabilidades posteriores de ascendencia a cada grupo corroboraron la presencia de ambas especies y la efectividad del DAPC para la delimitación de las dos especies (Figura 4C). En ambas especies de nematodos, el dendrograma NJ mostró una tendencia a la asociación de las muestras provenientes del occidente del país. También se observó una tendencia similar con las muestras provenientes del municipio de Palencia. Para el caso de las muestras provenientes del departamento de Quetzaltenango, se observó mayor grado de dispersión en comparación a los otros departamentos (Figura 4A).

La exploración de la diversidad genética de las especies de nematodos mostró que *G. rostochiensis* presenta mayor diversidad que *G. pallida*. La especie *G. rostochiensis* exhibió valores de PLP, Na, H,  $\lambda$  y He de 86, 1.720, 0.311, 0.970 y 0.301, respectivamente. La especie *G. pallida* mostró valores de PLP (64), Na (1.30), H (0.035),  $\lambda$  (0.941) y He (0.223) (Tabla 1). A nivel de *G. rostochiensis* la población de Quetzaltenango mostró el mayor valor de Na (1.120) y  $\lambda$  (0.938), mientras que la población de San Marcos presentó el mayor valor de H (0.357) y He (0.358). La población de palencia mostró los valores más bajos para todos los

**Figura 4**

Delimitación molecular de la especie *G. rostochiensis* y *G. pallida* a partir de la caracterización con el marcador molecular AFLP



*Nota.* Basada en Panel A: Dendrograma Neighbor-Joining (NJ). Panel B: Diagrama de distribución de densidades del análisis discriminante de componentes principales (DAPC). Panel C: Gráfico de barras que exhibe la probabilidad posterior de asignación a cada especie identificada por el DAPC. Al nombre de cada muestra se antepuso el sitio de colecta para facilitar su ubicación geográfica, Quet = Quetzaltenango, SnMc = San Marcos, Hue = Huehuetenango, Pal = Palencia; y la terminación G.r o G.p para indicar *G. rostochiensis* o *G. pallida*, respectivamente.

Tabla 1

Medidas de la diversidad genética de las especies *G. rostochiensis* y *G. pallida* y sus respectivas poblaciones

		N	PLP	Na	H	$\lambda$	He
Especie	<i>G. rostochiensis</i>	47	86	1.720	0.311	0.979	0.301
	<i>G. pallida</i>	17	64	1.300	0.252	0.941	0.223
	Total	64	75	1.510	0.340	0.984	0.291
<i>G. rostochiensis</i>	Población						
	Palencia	7	54	0.580	0.273	0.857	0.301
	Quetzaltenango	16	66	1.120	0.281	0.938	0.291
	San Marcos	13	80	0.360	0.357	0.923	0.358
	Huehuetenango	12	60	0.460	0.247	0.917	0.252
Total	48	65	0.630	0.289	0.979	0.301	
<i>G. pallida</i>	Población						
	Palencia	8	20	1.120	0.012	0.575	0.204
	Quetzaltenango	3	54	1.600	0.245	0.867	0.308
	San Marcos	3	14	1.304	0.085	0.5	0.219
	Huehuetenango	3	20	1.200	0.108	0.667	0.248
Total	17	27	1.315	0.137	0.938	0.298	

*Nota.* N= número de muestras analizadas, PLP = porcentaje de loci polimórficos, Na = número de alelos diferentes, H = índice de diversidad de Shannon,  $\lambda$  = índice de diversidad de Simpson, He = heterocigosidad esperada (diversidad genética de Nei)

índices de diversidad genética (Tabla 1). A nivel de *G. pallida* la población de Quetzaltenango presentó los valores más elevados de PLP (54), Na (1.6), H (0.245),  $\lambda$  (0.867) y He (0.308). Por otra parte, la población de Palencia exhibió los menores valores de Na (1.12), H (0.012),  $\lambda$  (0.575) y He (0.204).

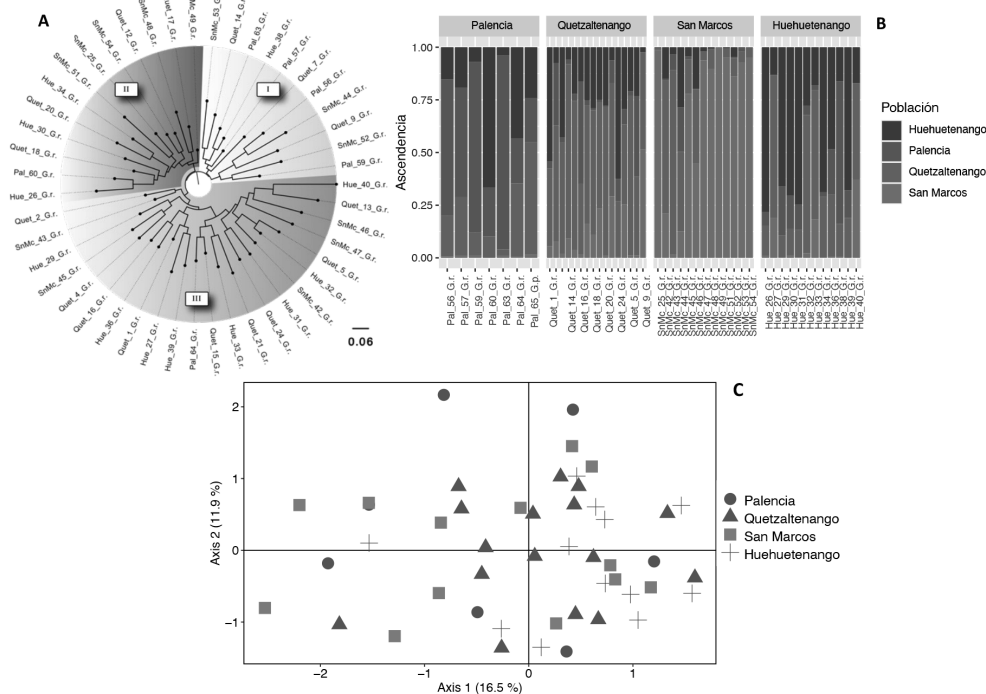
Respecto a la estructuración genética de las poblaciones de *G. rostrchiensis*, se identificaron 3 grupos principales en el dendrograma NJ (Figura 5A). El grupo I incluyó once muestras. La mayor parte de estas provinieron del municipio de Palencia, con la presencia de algunas muestras de la región occidental. El grupo II y III incluyeron 36 muestras provenientes de la región occidental con los departamentos de Quetzaltenango, San Marcos y Huehuetenango. La excepción fueron 2 muestras provenientes del municipio de Palencia. El DAPC exhibió una baja estructuración en las poblaciones al identificar que la probabilidad posterior de ascendencia de cada muestra está compuesta por una considerable mezcla de las diferentes poblaciones geográficas (Figura 5B). En el PCA, los dos

primeros ejes acumularon 28.4% de la variación total y las muestras se agruparon independientemente del origen geográfico (Figura 5C) confirmando el patrón identificado con el dendrograma NJ y DAPC.

De igual manera, en el análisis NJ para *G. pallida* también se identificaron 3 grupos principales (Figura 6A). El grupo I se conformó de cuatro muestras provenientes del municipio de Palencia y algunas muestras de Quetzaltenango. Los otros dos grupos incluyeron nueve muestras del occidentes del país con los departamentos de Quetzaltenango, San Marcos y Huehuetenango. La probabilidad posterior de ascendencia de cada muestra a su población geográfica de origen identificada por el DAPC, nuevamente mostró una débil estructuración de las poblaciones analizadas (Figura 6B) al igual que el dendrograma NJ. Los dos primeros ejes del PCA acumularon el 35.7% de la variación total y la mayoría de las muestras no mostraron un patrón de asociación hacia su origen geográfico (Figura 6C) reafirmando la disposición identificada en el dendrograma NJ y DAPC.

**Figura 5**

*Estructura genética de las poblaciones de G. rostrchiensis*

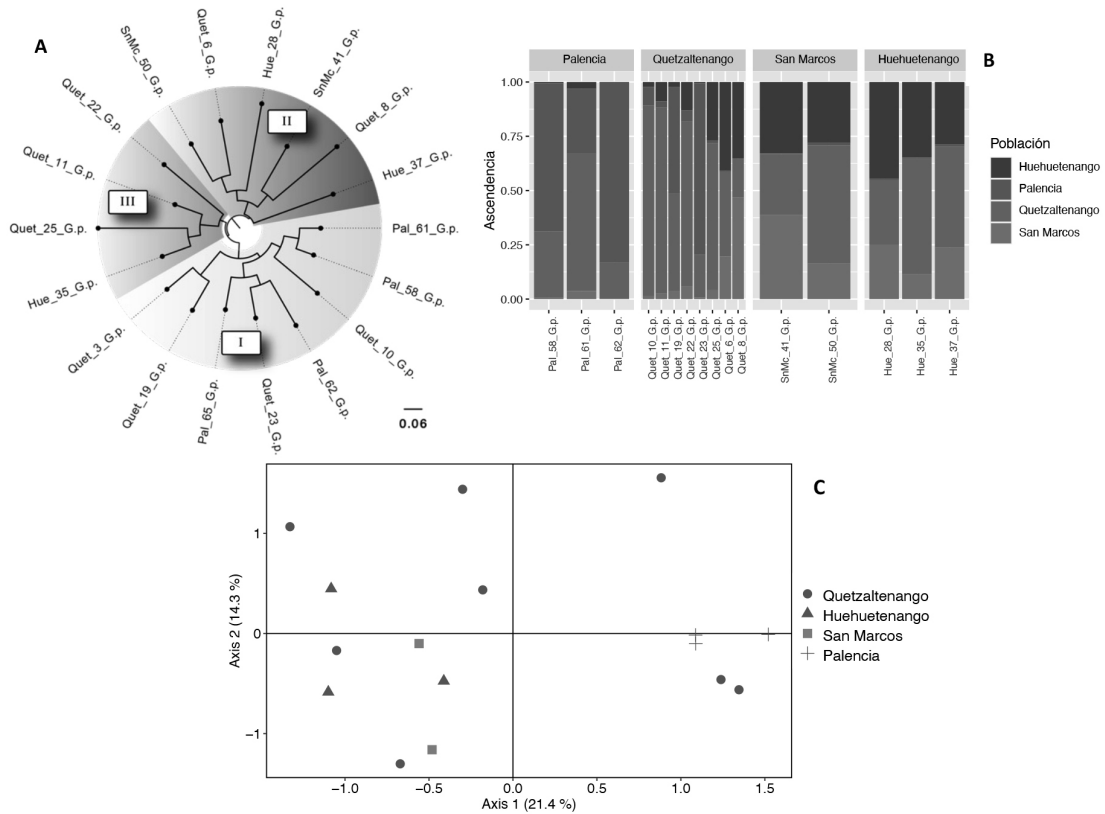


*Nota.* Basada en Panel A: Dendrograma Neighbor-Joining (NJ). Panel B: Asignación de probabilidades de cada muestra obtenida con el análisis discriminante de componentes principales (DAPC). Panel C: Diagrama de dispersión del análisis de componente principales (PCA). Los grupos diferenciados dentro del dendrograma están identificados como I, II y III.



**Figura 6**

Estructura genética de las poblaciones de *G. pallida*



*Nota.* Basada en Panel A: Dendrograma Neighbor-Joining (NJ). Panel B: Asignación de probabilidades de cada muestra obtenida con el análisis discriminante de componentes principales (DAPC). Panel C: Diagrama de dispersión del análisis de componente principales (PCA). Los grupos diferenciados dentro del dendrograma están identificados como I, II y III

La baja estructura de las poblaciones en ambas especies fue confirmada con el análisis de diferenciación poblacional a través del AMOVA. Para el caso de *G. rostochiensis* el AMOVA indicó que la diversidad genética ocurre mayormente dentro de las poblaciones (98.6%) y solamente 1.4% de la variación se presenta entre las poblaciones. El estadístico  $\Phi_{PT}$  utilizado para estimar la divergencia entre poblaciones, mostró un valor bajo (0.001) y no significativo ( $p > .05$ ) (Tabla 2). El análisis de diferenciación genética por comparación pareada confirmó la ausencia de divergencia poblacional en *G. rostochiensis* ya que ninguna comparación fue estadísticamente significartiva ( $p > .05$ ) (Tabla 3).

En cuanto a *G. pallida*, el AMOVA indicó que la diversidad genética también se presenta mayormente

dentro de las poblaciones (96%) y solamente 4% de la variación es exhibida entre las poblaciones. Al igual que *G. rostochiensis*, el análisis de diferenciación genética por comparación pareada confirmó la ausencia de divergencia poblacional en *G. pallida* ya que no hubo comparación estadísticamente significativa ( $p > .05$ ) (Tabla 4). Esta situación sugiere un alto flujo genético entre las poblaciones en ambas especies de nematodos. El análisis de aislamiento por distancia a través de la prueba de mantel no mostró una correlación significativa ( $p > .05$ ) entre la distancia geográfica y genética para las poblaciones en ambas especies de nematodos, confirmando la ausencia de estructura poblacional y el alto flujo genético entre poblaciones.

**Tabla 2***Detalle del análisis molecular de varianza AMOVA*

Nivel jerárquico	Suma de cuadrado	Componente de la varianza	Porcentaje de variación	$\Phi$ Phi	<i>p</i>
<i>G. rostochiensis</i>					
Entre poblaciones	19.285	0.03	1.4	$\Phi_{PT} = 0.001$	.502
Dentro de poblaciones	284.798	6.473	98.6		
<i>G. pallida</i>					
Entre poblaciones	16.317	0.218	4	$\Phi_{PT} = 0.045$	.266
Dentro de poblaciones	60.389	4.645	96		

**Tabla 3**

*Análisis de diferenciación por comparación pareada de poblaciones de G. rostochiensis. Valores por debajo de la diagonal indican la magnitud de diferenciación ( $\Phi_{PT}$ ). Valores por encima de la diagonal indican el valor de probabilidad*

Población	Palencia	Quetzaltenango	San Marcos	Huehuetenango
Palencia	--	0.430	0.428	0.337
Quetzaltenango	0.000	--	0.452	0.464
San Marcos	0.000	0.000	--	0.260
Huehuetenango	0.012	0.000	0.051	--

**Tabla 4**

*Análisis de diferenciación por comparación pareada de poblaciones de G. pallida. Valores por debajo de la diagonal indican la magnitud de diferenciación ( $\Phi_{PT}$ ). Valores por encima de la diagonal indican el valor de probabilidad*

Población	Palencia	Quetzaltenango	San Marcos	Huehuetenango
Palencia	--	0.157	0.079	0.090
Quetzaltenango	0.075	--	0.367	0.483
San Marcos	0.259	0.000	--	0.466
Huehuetenango	0.341	0.000	0.000	--

## Discusión

El marcador molecular AFLP fue utilizado debido a la alta capacidad en la identificación de regiones polimórficas en estudios de diversidad genética de ambas especies de nematodos (Marché et al., 2001; Qin et al., 2000). Por otra parte, con los datos obtenidos en la identificación molecular, se confirma la presencia de ambas especies de nematodos en el país, las cuales habían sido previamente descritas mediante caracterización morfológica. Con esto se valida la eficiencia de los cebadores específicos para la identificación precisa de las dos especies de nematodos (Gorgadze et al., 2019).

Los resultados moleculares de la investigación, replican las experiencias reportadas en otros estudios donde se ha confirmado la presencia de ambas especies de nematodos como Costa Rica (García et al., 2009) Venezuela, (Casanova et al., 2012), Canadá (Mimee et al., 2017) y Portugal (Camacho et al., 2017) entre otros ejemplos. Cabe mencionar que, la identificación molecular para ambas especies de nematodos, dada su importancia a nivel mundial, es recomendada por la Organización Europea y Mediterránea de Protección Vegetal (EPPO, 2017).

Los resultados mostraron que 15 de las 80 muestras analizadas manifiestan la presencia de ambas especies de nematodos. Esto se relaciona con la problemática que viven los agricultores ya que, al no ser especies antagonistas, cada una desarrolla su ciclo, incrementando el número de quistes hasta el punto de infestación completa de las áreas (Douda et al., 2014; Gamel et al., 2017). Cuando esto sucede, el tubérculo de papa experimenta una reducción severa en su tamaño, por lo que no es posible su comercialización y genera pérdidas económicas significativas a los productores. Además, la presencia de poblaciones de ambas especies, supone una fuerte problemática al emplear variedades de papa con resistencia a solo una de las especies (Tirchi et al., 2017). A nivel nacional, se dispone de materiales resistentes únicamente a *G. rostochiensis*, lo que representa una debilidad en la estrategia de control de *G. pallida*.

Los diferentes índices de diversidad revelaron que existen una alta diversidad genética en cada una de las especies analizadas, así como una mezcla de alelos entre las poblaciones, deducido a partir de la débil estructuración genética identificada. La diversidad genética en las poblaciones *G. rostochiensis* ( $He = 0.252 - 0.358$ ,  $PLP = 54 - 80$ ) fue similar a la reportada en poblaciones rusas ( $He = 0.14 - 0.23$ ,

$PLP = 44 - 96$ ) (Chrisanfova et al., 2008), lo cual coincide con el hecho de que en ambos casos la especie ha sido introducida y los valores de diversidad son propios de un efecto fundador. Por otra parte, las poblaciones de *G. pallida* exhibieron valores de diversidad genética ( $He = 0.204 - 0.308$ ) menores a la reportada en poblaciones peruanas ( $He = 0.59 - 0.70$ ) (Montarry et al., 2019). Esta situación se explica debido a que el centro de origen de *G. pallida* se ubica en la región andina entre Perú, Chile y Bolivia (Grenier et al., 2010) por lo que los índices de diversidad son mayores debido a la existencia de una mayor cantidad de variantes alélicas.

El análisis de estructura poblacional permitió establecer algunos patrones y escenarios sobre la dispersión de las especies de nematodos en las poblaciones de estudio. En ambas especies se observó una alta similitud genética y tendencia al agrupamiento de las muestras de la región central, aunque con inclusión de muestras del occidente del país. Por otra parte, la mayoría de las muestras de occidente de los departamentos de Huehuetenango y San Marcos mostraron cercanía genética. Sin embargo, las muestras del departamento de Quetzaltenango fueron las más dispersas, encontrándose relacionadas con los otros departamentos, lo que significa que existen alelos que han sido compartidos desde este punto hacia el resto de las poblaciones debido al flujo genético. Respecto a esta situación, cabe mencionar que la habilidad de dispersión de los nematodos por sí solos, es baja (Cantalapiedra-Navarrete et al., 2014; Roux et al., 2016). Esto deja al factor humano como el principal responsable de la dispersión de ambas especies de nematodos (Alenda et al., 2014). Este escenario se confirmó a través de los análisis de aislamiento por distancia, el cual indicó la ausencia de una correlación significativa entre la distancia genética y geográfica, así como el análisis de diferenciación poblacional que mostró la falta de divergencia genética entre las poblaciones de ambas especies de nematodos. Esto sugiere que las poblaciones analizadas de ambas especies de nematodos pueden considerarse como metapoblaciones.

El alto grado de mezcla en los sitios de procedencia de las muestras propone una débil estructura poblacional debido a un constante flujo genético entre las poblaciones analizadas, evidenciando la dispersión de los nematodos entre las zonas muestreadas (Picard et al., 2004). Para ambas especies fue común observar la presencia de muestras de Quetzaltenango en los grupos formados por los dendrogramas, DAPC y PCA. Esto se debe a que Quetzaltenango es el mayor distribuidor

de semilla a nivel nacional, no obstante, basado en las observaciones de campo durante la toma de muestras, es frecuente el incumplimiento de las normas y regulaciones fitosanitarias para la producción de semilla certificada. De este modo, la distribución de semilla contaminada con nematodos, desde este punto al resto del país, es el principal mecanismo de dispersión de *G. rostochiensis* y *G. pallida*. Esto es lo que ha ocasionado la escasa diferenciación genética de las poblaciones identificada en los análisis de estructuración.

Esta situación aumenta el riesgo del incremento en la diversidad genética de las poblaciones de ambos nematodos, ya que además de la mutación como fuente de incremento de diversidad, el flujo genético introduce alelos nuevos a las poblaciones. Por esta razón, es fundamental reducir al mínimo la conectividad genética entre las poblaciones con el objetivo de evitar el desarrollo de variantes genéticas más virulentas y con el potencial de superar la resistencia de los genotipos de papa. Este hecho también resalta la importancia de apoyar los programas de mejoramiento de papa a nivel nacional, ya que los genotipos desarrollados en otros países pueden ser susceptibles a la variantes genéticas de *G. rostochiensis* y *G. pallida* desarrolladas en las poblaciones guatemaltecas.

El fenómeno de dispersión, entre las poblaciones de estas dos especies de nematodos, también ha sido reportado en otros estudios con marcadores moleculares en poblaciones de América del Sur, Reino Unido y Turquía (Hoolahan et al., 2012; Toktay et al., 2020). Es importante mencionar que las principales zonas de producción de papa en Guatemala se ubican en las regiones occidental y central, las cuales están geográficamente distantes por aproximadamente 200 - 300 km. Esto remarca la acción antropogénica en la dispersión de *G. rostochiensis* y *G. pallida*.

La determinación de la diversidad genética en las poblaciones de nematodos es un factor determinante para el planteamiento de programas de mejoramiento de papa que, en conjunto con otras prácticas de control, ayudan a mitigar el daño de estos nematodos (Bhardwaj et al., 2012; López et al., 2015). Tras confirmar la presencia y determinar la estructura y diversidad genética de las poblaciones de *G. rostochiensis* y *G. pallida* en el país, es importante realizar esfuerzos, a través de instituciones especializadas, para capacitar a los productores de semilla en la implementación de tecnologías que mejoren los estándares fitosanitarios. Con esto se reducirá el riesgo de la comercialización de semilla de papa contaminada con las especies de

nematodos formadores de quistes. Por último, es fundamental remarcar que el flujo genético entre las poblaciones de nematodos promueve el aumento de la diversidad genética al propiciar el intercambio de alelos que pueden dar origen a nuevas variantes genéticas más agresivas y difíciles de controlar. Ante esta situación, es fundamental minimizar la dispersión de los nematodos y para esto se sugiere el desarrollo de programas que promuevan el uso de semilla de papa certificada libre de nematodos. Además, para garantizar que se están estableciendo medidas que eviten la dispersión de los nematodos y otras enfermedades asociadas al cultivo de papa, se debe continuar con los monitoreos moleculares para evaluar los patrones de dispersión.

## Agradecimientos

A la Dirección General de Investigación (Digi) por financiar la presente investigación a través de la partida presupuestaria 4.8.63.4.48.

## Contribución de los autores

Coordinación, elaboración y revisión del Documento: JAR-C, JEB-S, AS-P, SM  
 Diseño de la recolección de datos o del trabajo en campo: JAR-C, JEB-S, ASP  
 Recolección o contribución de datos o realización del trabajo de campo: JAR-C, JEB-S  
 Limpieza, sistematización, análisis o visualización de datos: JAR-C, MK, BL  
 Participación en análisis de datos, estructura y en la escritura del documento: JAR-C, JEB-S, SM, JZ, EF, ASP

## Materiales suplementarios

Este artículo no tiene archivos complementarios.

## Referencias

Alenda, C., Montarry, J., & Grenier, E. (2014). Human influence on the dispersal and genetic structure of French *Globodera tabacum* populations. *Infection, Genetics and Evolution*, 27, 309-317. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.07.027>

- Bhardwaj, V., Umamaheshwari, R., Sharma, R., Kaushik, S. K., Joseph, T. A., Singh, B. P., & Gebhardt, C. (2012). Potato cyst nematode (PCN) resistance: Genes, genotypes and markers- an update. *Journal of Breeding and Genetics*, *44*(2), 202-228.
- Bougeard, S., & Dray, S. (2018). Supervised multiblock analysis in R with the ade4 package. *Journal of Statistical Software*, *86*(1), 1-17. <https://doi.org/10.18637/jss.v086.i01>
- Bulman, S., & Marshall, J. (1997). Differentiation of Australasian potato cyst nematode (PCN) populations using the polymerase chain reaction (PCR). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, *25*(123-129).
- Camacho, M., Nóbrega, F., Lima, A., Mota, M., & Inácio, M. (2017). Morphological and molecular identification of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* in Portuguese potato fields. *Nematology*, *19*(8), 883-889. <https://doi.org/10.1163/15685411-00003094>
- Cantalapiedra-Navarrete, C., Castillo, P., & Palomares-Rius, J. E. (2014). Cryptic species in plant-parasitic nematodes. *Nematology*, *16*(10), 1105-1118. <https://doi.org/10.1163/15685411-00002831>
- Casanova, M., Jiménez-Pérez, N., Hernández, A., & Crozzoli, R. (2012). Especies de *Globodera* asociadas con el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) en Venezuela. *Fitopatología Venezolana*, *16*(1), 16-23.
- Chrisanfova, G., Charchevnikov, D., Popov, I., Zinovieva, S., & Semyenova, S. (2008). Genetic variability and differentiation of three Russian populations of potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Russian Journal of Genetics*, *44*(5), 533-538. <https://doi.org/10.1134/S1022795408050049>
- Da Conceição, I. L. P. M., Dos Santos, M. C. V., De Olivereria Abrantes, I. M., & De Almeida Santos, M. S. N. (2003). Using RAPD markers to analyse genetic diversity in Portuguese potato cyst nematode populations. *Nematology*, *5*(1), 137-143. <https://doi.org/https://doi.org/10.1163/156854102765216759>
- Devaux, A., Kromann, P., & Ortiz, O. (2014). Potatoes for sustainable global food security. *Potato Research*, *57*(3-4), 185-199. <https://doi.org/10.1007/s11540-014-9265-1>
- Douda, O., Zouhar, M., Renčo, M., & Marek, M. (2014). Molecular and morphological exploration of a mixed population of two potato-parasiting nematode species, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Helminthologia*, *51*(1), 3-6. <https://doi.org/10.2478/s11687-014-0201-3>
- EPPO. (2017). PM 7/40 (4) *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. *EPPO Bulletin*, *47*(2), 174-197. <https://doi.org/10.1111/epp.12391>
- Fenwick, D. W. (1940). Methods for the recovery and counting of cysts of *Heterodera schachtii* from soil. *Journal of Helminthology*, *18*(4), 155-172. <http://dx.doi.org/10.1017/S0022149X00031485>
- Flores-Choque, Y. Y., Bravo, R., Lima, I., & Machaca, C. (2017). Prospección de nematodos fitoparásitos en cultivo de papa (*Solanum Tuberosum* L.) de la región Puno. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, *19*(1), 11-20. <https://doi.org/10.18271/ria.2017.251>
- Gamel, S., Letort, A., Fouville, D., Folcher, L., & Grenier, E. (2017). Development and validation of real-time PCR assays based on novel molecular markers for the simultaneous detection and identification of *Globodera pallida*, *G. rostochiensis* and *Heterodera schachtii*. *Nematology*, *19*(7), 789-804. <https://doi.org/10.1163/15685411-00003086>
- García, D., García, C., Montero, Z., Salazar, L., & Brenes, A. (2009). Morphological and molecular identification of potato cyst-forming nematode *Globodera pallida* in soil samples from Costa Rica. *Revista Latinoamericana de la Papa*, *15*(1), 38-45.
- Gitty, M., Tanha maafi, Z., Arjmandian, A., & Pishavar, S. (2011). Occurrence of potato golden cyst nematode in Iran and its distribution in Hamedan province. *Agricultural Biotechnology*, *2*(1), 53-61.
- Gorgadze, O., Gaganidze, D., Nazarashvili, N., Abashidze, E., & Gvritishvili, E. (2019). Identification of potato cyst nematodes

- (*Globodera rostochiensis*, *Globodera pallida*) spread in Samtskhe - Javakheti and Samegrelo - Zemo Svaneti regions of Georgia. *International Journal of Development Research*, 9(5), 27669-27673.
- Grenier, E., Fournet, S., Petit, E., & Anthoine, G. (2010). A cyst nematode “species factory” called the Andes. *Nematology*, 12(2), 163-169. <https://doi.org/10.1163/138855409X12573393054942>
- Grünwald, N. J., & Hoheisel, G. A. (2006). Hierarchical analysis of diversity, selfing, and genetic differentiation in populations of the oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology*, 96(10), 1134-1141. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-1134>
- Hajihassani, A., Ebrahimian, E., & Hajihassani, M. (2013). Estimation of yield damage in potato caused by Iranian population of *Globodera rostochiensis* with and without aldicarb under greenhouse conditions. *International Journal of Agriculture and Biology*, 15(2), 352-356.
- Hoolahan, A. H., Blok, V. C., Gibson, T., & Downton, M. (2012). A comparison of three molecular markers for the identification of populations of *Globodera pallida*. *Journal of Nematology*, 44(1), 7-17.
- Jombart, T. (2008). ADEGENET: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24(11), 1403-1405. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>
- Jombart, T., Devillard, S., & Balloux, F. (2010). Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, 11, Artículo 94. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94>
- Kamvar, Z. N., Tabima, J. F., & Grünwald, N. J. (2014). Poppr: An R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*, 2, Artículo e281. <https://doi.org/10.7717/peerj.281>
- Karam, D., Westra, P., Niessen, S. J., Ward, S. M., & Figueiredo, J. E. F. (2006). Assessment of silver-stained AFLP markers for studying DNA polymorphism in proso millet (*Panicum miliaceum* L.). *Revista Brasileira de Botânica*, 29(4), 609-615. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042006000400011>
- Kaur, T., Jasrotia, S., Ohri, P., & Manhas, R. K. (2016). Evaluation of in vitro and in vivo nematicidal potential of a multifunctional streptomycete, *Streptomyces hydrogenans* strain DH16 against *Meloidogyne incognita*. *Microbiological Research*, 192, 247-252. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.07.009>
- López, M., Riegel, R., Lizana, C., & Behn, A. (2015). Identification of virus and nematode resistance genes in the chilota potato Genebank of the universidad austral de Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 75(3), 320-327. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392015000400008>
- Madani, M., Subbotin, S. A., Ward, L. J., Li, X., & De Boer, S. H. (2010). Molecular characterization of canadian populations of potato cyst nematodes, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* using ribosomal nuclear RNA and cytochrome *b* genes. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 32(2), 252-263. <https://doi.org/10.1080/07060661003740033>
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. (2016). El Agro en cifras, 2016.
- Manduric, S., & Andersson, S. (2003). Potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis* and *G. pallida*) from Swedish potato cultivation - An AFLP study of their genetic diversity and relationships to other European populations. *Nematology*, 5(6), 851-858. <https://doi.org/10.1163/156854103773040754>
- Marché, L., Valette, S., Grenier, E., & Mugniéry, D. (2001). Intra-species DNA polymorphism in the tobacco cyst-nematode complex (*Globodera tabacum*) using AFLP. *Genome*, 44(6), 941-946. <https://doi.org/10.1139/gen-44-6-941>
- Meirmans, P. G. (2020). Genodive version 3.0: Easy-to-use software for the analysis of genetic data of diploids and polyploids. *Molecular Ecology Resources*, 20(4), 1126-1131. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13145>
- Mimee, B., Soufiane, B., Dauphinais, N., & Bélair, G. (2017). A qRT-PCR method to evaluate viability of potato cyst nematode (*Globodera* spp.). *Canadian Journal of Plant Pathology*, 39(4), 503-513. <https://doi.org/10.1080/07060661.2017.1382574>

- Montarry, J., Bardou-Valette, S., Mabon, R., Jan, P. L., Fournet, S., Grenier, E., & Petit, E. J. (2019). Exploring the causes of small effective population sizes in cyst nematodes using artificial *Globodera pallida* populations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286(1894), Artículo 20182359. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2359>
- Mulyadi, S., Bambang, R., & Triman, B. (2014). Molecular and pathotype identification of potato cyst nematodes. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*, 18(1), 17-23.
- Nakhla, M., Owens, K., Li, W., & Wei, G. (2010). Multiplex Real-Time PCR assays for the identification of the potato cyst and tobacco cyst nematodes. *Plant Disease*, 94(8), 959-965. <https://doi.org/https://doi.org/10.1094/PDIS-94-8-0959>
- Nowaczyk, K., Dobosz, R., Budziszewska, M., Kamasa, J., & Obrepalska-Stepłowska, A. (2011). Analysis of diversity of golden potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis*) Populations from Poland using molecular approaches. *Journal of Phytopathology*, 159(11-12), 759-766. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01837.x>
- Picard, D., Plantard, O., Scurrah, M., & Mugniéry, D. (2004). Inbreeding and population structure of the potato cyst nematode (*Globodera pallida*) in its native area (Peru). *Molecular Ecology*, 13(10), 2899-2908. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02275.x>
- Plantard, O., Picard, D., Valette, S., Scurrah, M., Grenier, E., & Mugniéry, D. (2008). Origin and genetic diversity of Western European populations of the potato cyst nematode (*Globodera pallida*) inferred from mitochondrial sequences and microsatellite loci. *Molecular Ecology*, 17(9), 2208-2218. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03718.x>
- Powers, T. (2004). Nematode molecular diagnostics: From bands to barcodes. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 367-383. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140348>
- Qin, L., Overmars, H., Helder, J., Popeijus, H., Rouppe van der Voort, J., Groenink, W., van Koert, P., Schots, A., Bakker, J., & Smant, G. (2000). An efficient cDNA-AFLP-based strategy for the identification of putative pathogenicity factors from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(8), 830-836. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.8.830>
- Quader, M., Nambiar, L., & Cunnington, J. (2008). Conventional and real-time PCR-based species identification and diversity of potato cyst nematodes (*Globodera* spp.) from Victoria, Australia. *Nematology*, 10(4), 471-478. <https://doi.org/10.1163/156854108784513860>
- R Core Team. (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Rambaut, A. (2008). FigTree v1.1.1: Tree figure drawing tool.
- Ramírez-Suárez, A. (2014). Especies cuarentenadas de nematodos fitoparásitos para México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32(Suplemento), 39-40.
- Roux, C., Fraïsse, C., Romiguier, J., Anciaux, Y., Galtier, N., & Bierne, N. (2016). Shedding light on the grey zone of speciation along a continuum of genomic divergence. *PLoS Biology*, 14(12), Artículo e2000234. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000234>
- Ryan, P. D., Hammer, Ø., & Harper, D. A. (2001). Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 5-7. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.05.025>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Santos, M. S. N., Evans, K., Abreu, C. A., Martins, F. F., & Abrantes, I. M. (1995). A review of potato cyst nematodes in Portugal. *Nematologia Mediterranea*, 23(1), 35-42.
- Seesao, Y., Gay, M., Merlin, S., Viscogliosi, E., Aliouat-Denis, C., & Audebet, C. (2016). A review of methods for nematode identification. *Journal of Microbiological Methods*, 138, 37-49. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.05.030>

- Sobczak, M., Avrova, A., Jupowicz, J., Phillips, M. S., Ernst, K., & Kumar, A. (2005). Characterization of susceptibility and resistance responses to potato cyst nematode (*Globodera* spp.) infection of tomato lines in the absence and presence of the broad-spectrum nematode resistance Hero gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(2), 158-168. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-0158>
- Thevenoux, R., Folcher, L., Esquibet, M., Fouville, D., Montarry, J., & Grenier, E. (2020). The hidden diversity of the potato cyst nematode *Globodera pallida* in the south of Peru. *Evolutionary Applications*, 13(4), 727-737. <https://doi.org/10.1111/eva.12896>
- Tirchi, N., Mokabli, A., Troccoli, A., de Luca, F., & Fanelli, E. (2017). Distribution and identification of potato cyst nematodes from Ain Defla region, Algeria Tirchi. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences*, 9(3), 9-20. <https://doi.org/10.2113/gselements.7.5.313>
- Tirchi, N., Troccoli, A., Fanelli, E., Mokabli, A., Mouhouche, F., & de Luca, F. (2016). Morphological and molecular identification of potato and cereal cyst nematode isolates from Algeria and their phylogenetic relationships with other populations from distant their geographical areas. *European Journal of Plant Pathology*, 146, 861-880. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0965-z>
- Toktay, H., Evlice, E., Imren, M., Özer, G., Ali, M. A., & Dababat, A. (2020). Characterization of potato golden cyst nematode populations (*Globodera rostochiensis*) in Turkey. *International Journal of Agriculture and Biology*, 23(6), 1095-1100. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.1390>
- van de Vossenbergh, B. T. L. H., Voogd, J. G. B., Westenberg, M., & Karssen, G. (2014). Comparison of three conventional PCR test (Bulman & Marshall, 1997) versions for the molecular identification of *Globodera pallida* and *G. rostochiensis* cysts and juveniles. *EPPO Bulletin*, 44(1), 27-33. <https://doi.org/10.1111/epp.12101>
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper. (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4407-4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>
- Winter, D. J. (2012). Mmod: An R library for the calculation of population differentiation statistics. *Molecular Ecology Resources*, 12(6), 1158-1160. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2012.03174.x>