

DETECCIÓN MOLECULAR DE MELOIDOGYNE INCOGNITA ((KOFOID Y WHITE, 1919) CHITWOOD, 1949) EN JITOMATE (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.), MÉXICO

Nadia Castañeda-Laureles

Programa de Maestría en Ciencias
Agropecuarias y Recursos Naturales,
Universidad Autónoma del Estado de
México. Toluca, Estado de México

Martha Lidya Salgado-Siclán

Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Ciencias Agrícolas, Toluca,
Estado de México
ORCID: 000-0002-7263-0621

Blanca Guadalupe Jaimes-Cruz

Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Ciencias. Toluca, Estado de
México

Irma Victoria Rivas- Manzano

Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Ciencias. Toluca, Estado de
México

All content in this magazine is licensed under a Creative Commons Attribution License. Attribution-Non-Commercial-Non-Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0).



Resumen: El género *Meloidogyne* es considerado de gran importancia económica en el mundo debido al daño que causa en el sistema radical y amplio rango de hospederos. En hortalizas, causa severos daños limitando la producción de estas. El objetivo del presente estudio fue identificar la especie del género *Meloidogyne* asociado a las agallas de la raíz del jitomate mediante la técnica molecular de PCR. Se colectó suelo y agallas de plantas de jitomate variedad comercial tipo saladette parasitadas con el nematodo, cultivadas en invernadero en el municipio de Coatepec Harinas, Estado de México. El estudio molecular se basó en la amplificación de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S del rDNA mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa. La homología de las secuencias de este estudio y comparación con las reportadas en el GenBank mostró un 97% de identidad con *Meloidogyne incognita*. El análisis filogenético indicó el agrupamiento con accesiones mundiales reportadas para *M. incognita*. La técnica molecular permitió identificar y registrar por primera vez la presencia de *Meloidogyne incognita* en cultivo de jitomate variedad comercial tipo saladette en Coatepec Harinas, Méx.

Palabras clave: *Solanum lycopersicum*, *Meloidogyne incognita*, PCR.

INTRODUCCIÓN

El jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una hortaliza que pertenece a la familia Solanaceae con alto valor alimenticio, por lo que es catalogado como un cultivo importante a nivel mundial, esto se debe a la alta demanda en el mercado y el sobresaliente valor económico de las exportaciones. A nivel nacional, la superficie sembrada de esta hortaliza fue de 48,413.83 Ha, con una producción de 3,031,668.76 ton (SIAP, 2021). En el Estado de México la superficie sembrada fue de 741.94 ha, con una producción de

25641. 4 ton, y un rendimiento de 551. 422 ton/ha (SIAP, 2020). Sin embargo, uno de los principales factores que limitan la producción y calidad del cultivo tanto en campo como en invernadero son los fitopatógenos, dentro de este grupo se incluyen a los nematodos, organismos acelomados microscópicos que succionan los nutrientes de la raíz de las plantas con su estilete. Particularmente los nematodos agalladores del género *Meloidogyne* son endoparásitos sedentarios obligados con una amplia gama de cultivos hortícolas que ataca. La reducción en la altura, producción y rendimiento de jitomate se ven afectadas por el aumento de las poblaciones del nematodo en el suelo (Salazar-Antón y Guzmán-Hernández, 2013). Así mismo, Guzmán-Plazola *et al.*, 2008, mencionan la alta presencia de nematodos agalladores en 59% de 106 cultivos hortícolas en la zona de Metztlán, Hidalgo, Méx. Se ha determinado que las especies que predominan en México son *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne hapla*, *Meloidogyne javanica* y *Meloidogyne incognita* (Cid del Prado-Vera *et al.*, 2001). Tovar-Soto (2014) menciona a *Meloidogyne chitwoodi* atacando plantas de papa, zanahoria y malezas, donde tiene restricciones cuarentenadas para México. En 2015 Martínez *et al.*, (2015) identificaron a *M. enterolobii* en cultivo de sandía y jitomate, cuyos daños duplican a los causados por *M. incognita*. En México se reconoce el 60.7% de incidencia de *M. incognita* en distintos cultivos hortícolas por lo que se considera como una de las especies altamente dañinas, en consecuencia, las pérdidas de producción en el cultivo de jitomate alcanzan valores del más del 33%, tanto en plantaciones cultivadas por métodos tradicionales como con tecnologías avanzadas (Carrillo-Fasio *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2015, Martínez-Gallardo *et al.*, 2019). Es un género con dimorfismo sexual, las hembras globosas al ser sedentarias y alimentarse

producen enzimas que genera que las células de la raíz proliferen y se desarrollen de manera anormal (Peraza-Padilla *et al.*, 2013). Este proceso de alimentación genera en la célula hiperplasia e hipertrofia que conlleva a la formación de agallas en la raíz. Por el contrario, los machos salen de la raíz y permanecen en el suelo (Miyashita *et al.*, 2014). Debido a la presencia de agallas en el sistema radical, prevalece un déficit en el crecimiento, falta de vigor, clorosis y marchitez en hojas que da como resultado una limitada producción, sin dejar fuera el nivel poblacional del nematodo que influye de manera preponderante (Manzanilla-López y Marbán-Mendoza, 2012). Para su identificación a nivel de género o especie se emplean técnicas taxonómicas basadas en caracteres fenotípicos. Sin embargo, la variación intraespecífica presente en este género y similitudes morfológicas entre especies dificulta su identificación. El empleo de nuevas metodologías para su confiable caracterización se lleva a cabo mediante técnicas moleculares, que facilitan el diagnóstico y permiten una identificación precisa con base en su información genética y no se limita a una etapa de desarrollo en particular. Se han empleado diferentes metodologías en la identificación de nematodos como la reacción en cadena de la polimerasa, conocida por sus siglas en inglés PCR, así Powers and Harris (1993), lograron la discriminación de cinco especies de *Meloidogyne* empleando la región que codifica para la subunidad II del citocromo oxidasa (COII) y el gen 16S rRNA seguido de una digestión con endonucleasas de restricción que permitió un patrón característico para cada especie. Por otro lado, Peraza *et al.*, (2013) realizan PCR-RFLPS que dispone enzimas de restricción empleando la región intergénica (IGS) del genoma mitocondrial y el gen ribosomal 16S. Por su parte Ramírez (2014), emplea la amplificación de segmentos

de expansión D2 y D3 del gen 28S ADNr. Así mismo Jaramillo-Pineda *et al.*, (2015), utilizan las regiones espaciadoras transcrita (ITS) internas del ADNr 18S y 28S como marcadores genéticos para la identificación de especies empleando juveniles J2 de *Meloidogyne*. De igual manera Romero *et al.*, (2019) hacen uso de PCR utilizando cebadores específicos para diferentes especies de *Meloidogyne* en hembras adultas extraídas de agallas. Así también, la detección e identificación simultánea de distintas especies de *Meloidogyne* empleando PCR múltiple de un solo paso a partir de agallas individuales, ha mostrado ser una técnica sensible, robusta y precisa (Hu, *et al.*, 2011).

El objetivo de este estudio fue identificar mediante PCR la presencia de *Meloidogyne* sp., asociada al cultivo de jitomate en Coatepec Harinas, Estado de México.

MATERIALES Y MÉTODOS

COLECTA DE MUESTRAS

La colecta de muestras de raíces agalladas de plantas de jitomate variedad comercial tipo saladette, cultivadas en invernadero ubicado en Coatepec Harinas, Méx (18°53'23.70" N, 99°45'49.31" O), se realizó durante mayo-junio 2018. Se tomaron muestras de suelo y raíz a una profundidad de 25 cm y se colectaron en bolsas de propileno de 2 kg y se procesaron en el laboratorio para su respectivo análisis.

Las raíces con agalla se seleccionaron, se lavaron con agua corriente y con aguja de disección se extrajeron hembras maduras globosas con masa de huevecillos, con ayuda de un microscopio estereoscópico IROSCOPE Z-14T (magnificación 40X).

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

La extracción de ADN a partir de huevecillos se realizó a través del protocolo descrito por Yu *et al.*, (2011) y adaptado y modificado por Ramírez (2014), en la cual la

masa de

huevecillos se depositaron en tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, posteriormente se añadió 150 µl de solución buffer de extracción (200 mM Tris-HCl, pH 8.0, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS), se sometió a lisis mecánica con micropistilos estériles y congelación de -20°C por 20 min, se agregó 50 µl de Acetato de Sodio pH 5.8 3M, se incubó a -20°C por 10 min y las fases se separaron por centrifugación a 13,200 rpm por 5 min. El sobrenadante se transfirió tubo de microcentrífuga e incubó a -20°C por 20 min. El ADN se precipitó con 100 µl de Isopropanol y se centrifugó por 15 min a 13,200 rpm. Para mantener la solubilidad diferencial del ADN se añadió 200 µl de etanol al 70% y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min. El ADN se recuperó en 30 µl de agua libre de DNasas y RNasas. La cuantificación y pureza de ADN se llevó a cabo utilizando 1 µl de ADN en un espectrofotómetro NuDrop Modelo NAS-99, y se visualizó la integridad y cantidad de la macromolécula en una electroforesis horizontal en gel de agarosa (1%) teñido con el intercalante bromuro de etidio (BrEt) y finalmente se observó en el transluminador digital Syngene™.

AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL ADN RIBOSOMAL Y PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE ADN

Mediante la reacción de la cadena polimerasa (PCR), se amplificaron los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S del rDNA con los iniciadores:

D2A (5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAA GTTG- 3')

D3B (5' TCGGAAGGAACCAGCTACTA- 3') (Nunn, 1992). La reacción de PCR se realizó mediante el kit *Taq* PCR Master Mix (QIAGEN), con un volumen final de 30 µl. (12,5 µl *Taq* PCR Master Mix 2X [2,5 U *Taq* DNA polimerasa, Buffer PCR 1X, dNTP 200

µM], 1 µl de cada iniciador (10 µM), 5 µl de ADN (982.3 ng/µl) y se completó con agua libre de grado molecular estéril. La reacción de PCR se realizó en un termociclador PTC-100 MJ Research, con ligeras modificaciones y bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 95 °C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 63 °C por 45 s, 72 °C por 1 min y finalizando con una extensión final de 72 °C por 10 min (Ye *et al.*, 2015). Los productos amplificados se visualizaron en gel de agarosa al 1% en solución buffer TAE 1X. La purificación de los productos de PCR se llevó a cabo mediante el kit de purificación PCR QIAquick (QIAGEN) de acuerdo a las condiciones del fabricante.

SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Los productos amplificados por PCR fueron enviadas para secuenciar en la Facultad de Estudios Superiores FES-Iztacala UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México). Las secuencias fueron editadas con el programa Chromas (Versión 2.6.5) y posteriormente se analizaron con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para determinar la homología con las secuencias reportadas en el banco de genes GenBank NCBI. Las secuencias se ensamblaron en el programa DNASTAR Lasergene para la realización de las secuencias consenso. Posteriormente se realizó la búsqueda de secuencias registradas en el banco de genes del GenBank NCBI, de especies de *Meloidogyne* de la región 28S del rDNA. Se realizó un análisis filogenético a partir del alineamiento múltiple de secuencias de especies cercanamente relacionadas, las cuales fueron alineadas con la herramienta bioinformática MUSCLE (Multiple Sequence Alignment <EMBL-EBI). Los alineamientos de especies seleccionadas de *Meloidogyne* spp., en la construcción del árbol consenso y

las distancias evolutivas se calcularon con el método de máxima verosimilitud (Tamura *et al.*, 2004) empleando el software MEGA10 y se manejó la accesión de *Pratylenchus thornei* como taxón externo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras de raíz con síntomas de agallas colectadas de la plantación de jitomate cultivado en invernadero permitieron la extracción hembras globosas y masa de huevecillos del nematodo. La presencia de agallas individuales o agrupadas dejaron observar la deformación del sistema radical central y raíces laterales de las plantas infectadas (Figura 1).

En México, diversos autores refieren al género *Meloidogyne* spp., como el principal nematodo que causa significativa reducción del rendimiento y producción del jitomate, atribuyendo a *M. incognita* como el agente primario en pérdidas agrícolas y económicas (Carrillo-Fasio *et al.*, 2000; Cid del Prado-Vera *et al.*, 2001). Por su parte, Tapia- Vásquez *et al.*, (2022), menciona que los nematodos que forman agallas como *M. incognita* son una amenaza para la agricultura en México. Este nematodo se establece en el sistema vascular de la raíz lo que ocasiona los síntomas de clorosis, marchitez, retraso en el crecimiento y la notoria presencia de agallas (Sikandar *et al.*, 2020)

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

La extracción del ADN total a partir de masas de huevecillos de *Meloidogyne incognita* fue de excelente calidad e integridad como lo mostró la electroforésis en gel de agarosa al 1%. La amplificación del ADN ribosomal con los iniciadores D-2/D-3 mostró un fragmento específico de 700 pb para *Meloidogyne incognita* (Figura 2). El control negativo, como era de esperarse, no amplificó ninguna banda. De manera similar Zeng *et al.*, (2014), refieren

la amplificación con los cebadores D2/D3 del 28S con un tamaño de 764 pb. Por otro lado, Ye *et al.*, (2015), emplearon la misma región D-2/D-3 del gen 28S en la identificación de especies de *Meloidogyne*, destacando la importancia de cebadores más específicos, para diferenciar especies en poblaciones mezcladas.

ANÁLISIS FILOGENÉTICO

El análisis filogenético se infirió con el método de máxima verosimilitud bajo el modelo de Tamura-Nei y bajo el criterio de máxima parsimonia con un arranque de 1000 bootstrap (repeticiones). La homología de las tres secuencias de este estudio estableció un porcentaje de identidad del 97%, dato que se obtuvo mediante el Blast (Basic Local Alignment Search Tool –NCBI), cuya similitud correspondió con la especie *Meloidogyne incognita*. El índice de consistencia (CI) fue de 0.84 y el índice de retención (RI) de 0.73. Así también, permitió relacionarlas con otras especies cercanas, por ser una región altamente conservada.

El alineamiento múltiple se realizó con 19 secuencias de las cuales 3 secuencias son de este estudio. El cladograma obtenido agrupó a las secuencias en dos clados, el primer grupo agregó a distintas especies de *Meloidogyne* spp de diversas latitudes, mientras que el segundo clado incluyó a las especies de este estudio con la accesión LC030364 de Japón de *Meloidogyne incognita* con una alta relación. La secuencia del grupo externo *Pratylenchus thornei* se mantuvo independiente, como se esperaba (Figura 6). Los resultados mostraron que las especies determinadas en este estudio se agruparon estrechamente con especies de *Meloidogyne incognita*, así como otras especies identificadas en otras partes del mundo. Nuestros resultados concuerdan con Zeng *et al.*, (2014), al mencionar que el segmento de expansión D2/D3, es útil en el reconocimiento



Figura 1. Síntomas de agallas en plantas de jitomate variedad comercial tipo saladette cultivadas bajo invernadero en Coatepec Harinas, México.

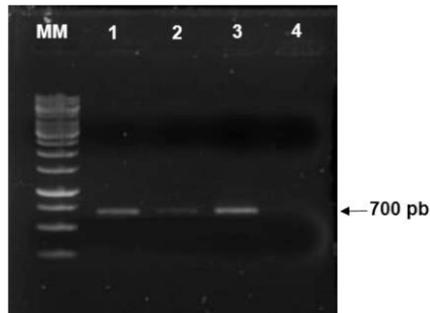


Figura 2. Amplificación de los fragmentos de expansión del gen 28S del rDNA. MM: marcador molecular 1Kb; 1, 2, 3: amplificado a partir de masa de huevos de *Meloidogyne incognita*; 4: control negativo (agua grado molecular). Visualización en gel de agarosa al 1%.

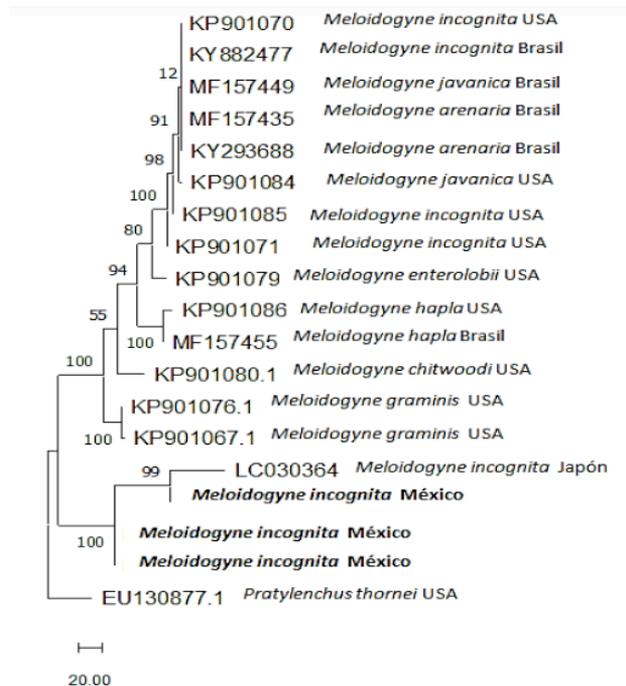


Figura 3. Cladograma de secuencias de los segmentos de expansión D2-D3 del 28S del rDNA, de especies de *Meloidogyne* sp., generado por el alineamiento combinado de *Maximum Likelihood* y máxima parsimonia en el programa MEGA X (versión 11). Bootstrap (repeticiones)= 1000; Índice de consistencia (CI)= 0.84 y el Índice de Retención (RI) de 0.73.

del género, mas no logró discriminar especies tropicales incluyendo a *M. incógnita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, por lo que los autores refieren al uso de cebadores más específicos a la especie en cuestión. De la misma manera nuestro árbol concuerda con Ye *et al.*, (2015), donde establece un árbol filogenético basado en 43 secuencias mundiales del segmento D2/D3 de 28S ADNr, en el que señala a *M. incógnita* en un cado bien definido con *M. arenaria*, *M. javanica*, *M. paranaensis* y *M. konaensis*, sin embargo, logran la distinción de mezclas de cuatro especies de *Meloidogyne*, cuando emplean cebadores específicos a la región D2/D3 de 28S ADNr. Es importante emplear iniciadores específicos para cada especie del género *Meloidogyne*, con aquellas secuencias del rDNA altamente conservadas. La dispersión de *M. incognita* en diversos cultivos hortícolas, anuales y perennes confirma el amplio rango de cultivos susceptibles, su alta capacidad de adaptación a condiciones de temporal y riego, conllevan a una similitud filogenética de distribución mundial. La inferencia filogenética puede ser compleja debido a factores evolutivos, incluida la heterogeneidad de la composición de nucleótidos entre los taxones.

CONCLUSIONES

La determinación de especies parasitas de cultivos de importancia mundial como lo es *Meloidogyne incognita*, empleando herramientas moleculares permite de manera más rápida y certera enfrentar los retos en la detección, diversidad genética, diseminación y estrategias de control de esta plaga.

El diagnóstico molecular empleando los segmentos de expansión D2-D3 del 28S del rDNA utilizando masa de huevecillos, confirmó la identidad de *Meloidogyne incognita* en esta solanácea.

La homología de las secuencias de este estudio y comparación con las reportadas en

el GenBank mostró un 97% de identidad con *Meloidogyne incógnita*.

La confirmación de *Meloidogyne incognita* en agalla de raíz en jitomate variedad comercial tipo saladette, provenientes de la zona de Coatepec Harinas, Mex compromete la fitosanidad de esta hortaliza en invernaderos de esa región.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de estudios de Maestría.

REFERENCIAS

- Carrillo-Fasio, J.A., García-Estrada, R.S., Allende-Molar, R., Márquez-Zequera, I. y J.E. Cruz-Ortega. 2000. **Identificación y distribución de especies del nematodo nodulador (*Meloidogyne* spp.) en hortalizas, en Sinaloa, México.** Revista Mexicana de Fitopatología 18:115-119.
- Cid del Prado V. I., Tovar-Soto A. y J. Hernández. 2001. **Distribución de especies y razas de *Meloidogyne* en México.** Revista Mexicana de Fitopatología, 19(2):32-39.
- Guzmán-Plazola R.A., Hernández-Flores B., Franco-Navarro F. y M. H. Cadena. 2008. **Nematodos Agalladores en la Vega de Metztilán, Hidalgo, México: Identificación, distribución espacial y relación con factores edáficos.** Nematropica 38:47-61.
- Hu M. X., K. Zhuo and J.L. Liao. 2011. **Multiplex PCR for the simultaneous identification and detection of *Meloidogyne incognita*, *M. enterolobii* and *M. javanica* using DNA extracted directly from individual galls.** Phytopathology 101: 1270-1277.
- Jaramillo-Pineda J, Guerrero-Olazarán M, Fuentes-Garibay J.A., Viader-Salvadó J.M, Meza-García J.L, L.H. Morales-Ramos 2015. **Identificación de especies de *Meloidogyne* utilizando la secuenciación de regiones espaciadoras transcritas internas de ADN ribosomal de estadios juveniles.** Revista Mexicana de Fitopatología 33:1-11.
- Manzanilla-López R. H. y N. Marbán-Mendoza 2012. **Practical plant nematology.** Mundi-Prensa. Montecillos, Texcoco. México. 883 pp.
- Martínez G. J., Díaz V. T., Allende M. R., García E. R.S. y Carrillo F.J.A. 2015. **Primer reporte de *Meloidogyne enterolobii* parasitando tomate en Culiacán, Sinaloa México.** Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 11: 2165-2168.
- Martínez-Gallardo J. A., Díaz-Valdez T, Allende-Molar R, Retes-Manjarrez J.E., J.A. Carrillo-Fasio. 2019. **Identificación y distribución de *Meloidogyne* spp. en tomate de Sinaloa México.** Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 10: 453- 459.
- Miyashita N., Tetsuo Y., Takayuki K. y K. Hironori. 2014. **The Feeding Behavior of Adult Root-knot Nematodes (*Meloidogyne incognita*) in Rose Balsam and Tomato.** Journal of Nematology 46(3):296–301.
- Nunn G. B. 1992. **Nematode molecular evolution: an investigation of evolutionary patterns among nematodes based upon DNA sequences.** Ph.D.Thesis. University of Nottingham, UK.
- Peraza-Padilla W., Rosales-Flores J., Esquivel-Hernández A., Hilje-Rodríguez I., Molina-Bravo R. y Castillo-Castillo P. 2013. **Identificación morfológica, morfométrica y molecular de *Meloidogyne incognita* en higuera (*Ficus carica* L.) en Costa Rica.** Agronomía Mesoamericana 24(2):337-346.
- Powers T.O and T.S. Harris, 1993. **A Polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species.** Journal of Nematology 25(1): 1-6.
- Ramírez S.A. 2014. **Nematodos de importancia cuarentenaria en papa para México. Protocolos de diagnóstico.** SAGARPA. SENASICA. Dirección General de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. México. 81p.
- Romero B. M., Macías C. M.G., Carrillo F. A., Rojas, C.M., Hernández R. J.S., Duarte, O. J de D. 2019. **Identificación y distribución de especies de *Meloidogyne* en Baja California Sur, México.** Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 10(2): 337-349.
- Salazar-Antón W. y T. Guzmán-Hernández. 2013. **Efecto de poblaciones de *Meloidogyne* sp. en el desarrollo y rendimiento del tomate.** Agronomía Mesoamericana 24(2):419-426.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2020. **Avance mensual de la producción agropecuaria y pesquera.** Consulta en línea el 10 de julio del 2022 en http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecAvanceProd.jsp
- SIAP. 2021. **Anuario Estadístico de la Producción Agrícola.** Recuperado de la red http://nube.siap.gob.mx/avance_agricola/.

Sikandar A, M.Y. Zhang, Y.Y. Wang, X.F. Zhu, X.Y. Liu, H.Y. Fan, Y.H. Xuan and Y.X. Duan. 2020. **Review article: *Meloidogyne incognita* (Root Knot nematode) a risk to agricultura.** Applied Ecology and Environment Research 18(1):1679-1690.

Tamura K., Nei M., and S. Kumar. 2004. **Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method.** Proceedings of the National Academy of Sciences 101:11030-11035.

Tapia-Vásquez I, Montoya-Martínez A.C, De los Santos-Villalobos S, Ek-Ramos M.J, Montesinos-Matías R. and C. Martínez-Anaya. 2022. **Root-knot nematodes (*Meloidogyne spp.*) a threat to agricultura in México: biology, current control strategies, and perspectives.** World Journal of Microbiology and Biotechnology 38:26.

Tovar-Soto A. 2014. **Géneros y especies de importancia en la agricultura en México.** XVI Congreso Internacional y XLI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Revista Mexicana de Fitopatología Vol. 32 (Suplemento).

Ye W., Zeng Y. and J. Kerns. 2015. **Molecular Characterization and Diagnosis of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne spp.*) from Turfgrasses in North Carolina, USA.** PLOS ONE 10(11): 1-16.

Yu H., D. Chronis, S. Lu and X. Wang. 2011. **Chorismate mutase: an alternatively spliced parasitism gene and a diagnostic marker for three important *Globodera* nematode species.** European Journal of Plant Pathology 129: 89-102.

Zeng Y, W Ye and J. Kerns. 2014. **First report and morphological and molecular characterization of *Meloidogyne incognita* from *Radermachera sinica* in China.** Nematologica 44: 118-129.