

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA Y EL MAR  
ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS**

**Identificación taxonómica y molecular de especies del nematodo  
lesionador de la raíz *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae)  
asociado a cuatro cultivos de Costa Rica**

Trabajo final de graduación para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería Agronómica

**Estudiante**

Eduardo Gamboa Cortés

**Tutor**

M. Sc. Walter Peraza Padilla

**Asesores**

Dr. Ramón Molina Bravo

Lic. Tatiana Zamora Araya

Campus Omar Dengo  
Heredia, Costa Rica, 2019

**Identificación taxonómica y molecular de especies del nematodo  
lesionador de la raíz *Pratylenchus* spp. (Nematoda: Pratylenchidae)  
asociado a cuatro cultivos de Costa Rica**

Eduardo Gamboa Cortés

**Trabajo final de graduación de tesis sometida a consideración del tribunal  
examinador de la Escuela de Ciencias Agrarias para optar por el grado de  
Licenciatura en Ingeniería Agronómica**

**Trabajo final de Graduación presentado como requisito parcial para optar al grado de  
Licenciado en Ingeniería Agronómica**

**Tribunal Examinador**

---

M.Sc. Tomás Marino Herrera  
Decano FCTM

---

Dr. Evelio Granados Carvajal  
Director  
Escuela de Ciencias Agrarias

---

M. Sc. Wálter Peraza Padilla  
Director de Tesis

---

Ph.D. Ramón Molina Bravo  
Asesor

---

Lic. Tatiana Zamora Araya  
Asesora

---

Eduardo Gamboa Cortés  
Sustentante

## **DEDICATORIA**

A Dios por permite subir un peldaño profesional más. Con especial dedicatoria a mis dos grandes pilares de vida mi mamá y mi papá, por ser mi principal reflejo de trabajo, amor, constancia y esfuerzo, que con su apoyo incondicional me han impulsado a lo largo de los años a seguir mis metas y no rendirme en el camino.

A mis hermanas y hermano que juntos crecimos, soñamos y nos retamos a ser mejores personas cada día, juntos aprendimos a luchar y desarrollar los valores necesarios para en enfrentar la vida de forma positiva.

A los amigos que me regaló el largo camino de la universidad, de ellos también aprendí y fueron una agradable compañía en este proceso académico.

## AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento a los diferentes colaboradores que, de una forma u otra, permitieron la realización del presente Trabajo de Graduación:

Mi excepcional gratitud al M. Sc. Walter Peraza Padilla, por su compromiso, conocimientos y ayuda brindada durante todo este proceso. A los demás miembros que conforman este comité de trabajo de graduación, el Dr. Ramón Molina Bravo y la Lic. Tatiana Zamora Araya por su tiempo y esfuerzos invertidos en este trabajo.

También, a la M. Sc. Irena Hilje Rodríguez externar mi mayor agradecimiento por su anuencia y gran disponibilidad a colaborar con las múltiples consultas durante el proceso de esta investigación.

Gracias al Dr. Pablo Castillo Castillo, del Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Córdoba, España por la ayuda en la identificación molecular de las especies de *Pratylenchus*.

Al Laboratorio de Nematología y al Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Ciencias Agrarias, por proporcionar las instalaciones y equipo necesario que permitieron realizar estudios morfológicos, morfométricos y moleculares. Por último, agradezco a todas las personas que de una u otra manera me externaron la ayuda y el apoyo para la culminación de esta investigación.

## RESUMEN

Los nematodos del género *Pratylenchus* spp. son considerados los segundos con mayor impacto económico en los cultivos a nivel nacional. El objetivo de este estudio fue identificar especies del nematodo lesionador de la raíz *Pratylenchus* asociados al cultivo de arroz (*Oryza sativa*) en Laurel, Corredores, Puntarenas; plátano (*Musa* sp.) en Paraíso de Sixaola, Talamanca, Limón; piña (*Ananas comosus*) en dos zonas Pital de San Carlos, Alajuela y Guápiles, Limón; finalmente pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) en San Vicente de Ciudad Quesada, San Carlos, Alajuela. Con la información recopilada se pretende la toma de decisiones y el manejo de las plantaciones. Se realizaron estudios taxonómicos (morfológico, morfométrico) y moleculares. Se llevaron a cabo un total de 3500 mediciones morfométricas, que facilitaron la elaboración de un análisis estadístico descriptivo. Además, un total de 2000 microfotografías de hembras y machos que permitieron discriminar entre las especies de *Pratylenchus* asociadas a los cultivos muestreados. Los análisis PCR-RFLP del ITS1 indicaron que la especie asociada al cultivo del plátano fue *P. coffeae* con un peso molecular de 700 pb; en la plantación de arroz y cultivo de pasto estrella se encontró *P. zae* que mostró un peso molecular de 500 pb; en piña se encontró *P. brachyurus* y presentó un peso molecular de 500 pb en ambas zonas muestreadas. El análisis de RFLP con la enzima *Ded I* reveló fragmentos de 100 y 250pb para *P. coffeae*; 200 y 250 pb para *P. zae*; y 450pb para *P. brachyurus*. Las enzimas de restricción *Pst I* y *Hind III*, no permitieron la discriminación entre las tres especies de nematodos. Además, se amplificaron los segmentos de expansión D2-D3 del 28S ADNr, usando los cebadores D2A y D3B, y se amplificó la región ITS1 utilizando los cebadores 18S y rDNA1. La secuenciación generó resultados similares a la identificación morfológica, morfométrica y de PCR-FRLP para las tres especies analizadas, donde se confirmó nuevamente cada una de ellas, asociadas a los cultivos muestreados. Además, se establecieron relaciones filogenéticas entre especies de *Pratylenchus* a partir de segmentos de expansión D2-D3 de la región 28S del ARNr y genes de secuenciación de la región ITS del ARNr, utilizando los métodos de Inferencia Bayesiana (IB). De las tres especies de *Pratylenchus* identificadas en esta investigación, la especie *P. zae* asociada al cultivo de pasto estrella es el primer reporte para Costa Rica, no así para el caso del arroz en el que se encuentra altamente asociado. Para el caso de *P. coffeae* en plátano, ya existen reportes de la especie en el cultivo. En lo que respecta a las especies *P. brachyurus* es frecuente

encontrarla asociada a plantaciones de piña en el territorio nacional. Por último, la detección de especies de nematodos en plantaciones agrícolas permite el establecimiento e implementación de una estrategia de manejo que minimice los daños ocasionados por estos organismos.

## ABSTRACT

Nematodes of the genus *Pratylenchus* spp. they are considered the second with the greatest economic impact on crops nationwide. The objective of this study was to identify species of the root-bearing nematode *Pratylenchus* spp. associated with the cultivation of rice (*Oryza sativa*) in Laurel, Corredores, Puntarenas; plantain (*Musa* sp.) in Paraíso de Sixaola, Talamanca, Limón; pineapple (*Ananas comosus*) in two areas, Pital of San Carlos, Alajuela and Guápiles, Limón; finally star grass (*Cynodon nlemfuensis*) in San Vicente de Ciudad Quesada, San Carlos, Alajuela. With the collected information, the decision making and the management of the plantations is intended. Taxonomic (morphological, morphometric) and molecular studies were carried out. A total of 3500 morphometric measurements were carried out, which facilitated the elaboration of a descriptive statistical analysis. In addition, a total of 2000 microphotographs of females and males that allowed to discriminate between the *Pratylenchus* species associated with the sampled crops. The PCR-RFLP analysis of ITS1 indicated that the species associated with the plantain crop was *P. coffeae* with a molecular weight of 700 bp; in the rice plantation and star grass crop was found *P. zae* that showed a molecular weight of 500 bp; *P. brachyurus* was found in pineapple and had a molecular weight of 500 bp in both areas sampled. The analysis of RFLP with the enzyme *Ded* I revealed fragments of 100 and 250 bp for *P. coffeae*, 200 and 250 bp for *P. zae*, and 450 bp for *P. brachyurus*. The restriction enzymes *Pst* I and *Hind* III did not allow discrimination between the three species of nematodes. In addition, the D2-D3 expansion segments of the 28S rDNA were amplified, using primers D2A and D3B, and the ITS1 region was amplified using primers 18S and rDNA1. The sequencing generated similar results to the morphological, morphometric and PCR-FRLP identification for the three species analyzed, where each of them was again confirmed, associated with the sampled cultures. In addition, phylogenetic relationships were established between *Pratylenchus* species from D2-D3 expansion segments of the 28S region of the rRNA and genes from the ITS region of the rRNA, using the Bayesian Inference (IB) methods. Of the three species of *Pratylenchus* identified in this investigation, the *P. zae* species associated with the star grass crop is the first report for Costa Rica, but not for the case of rice in which it is highly associated. For the case of *P. coffeae* in plantain, there are already reports of the species in the crop. As regards *P. brachyurus* species, it is common to find it associated with pineapple plantations in the national

territory. Finally, the detection of nematode species in agricultural plantations allows the establishment and implementation of a management strategy that minimizes the damage caused by these organisms.

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	2
OBJETIVOS.....	5
General.....	5
Específicos.....	5
REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
1. Nematodos fitoparásitos.....	6
2. Género <i>Pratylenchus</i> .....	7
3. Ciclo de vida del género <i>Pratylenchus</i> .....	8
4. Síntomas que provoca <i>Pratylenchus</i> .....	10
5. Cultivos en estudio asociados con <i>Pratylenchus</i> .....	11
5.1 Cultivo de Piña.....	11
5.2 Cultivo de Plátano.....	12
5.3 Cultivo de Arroz.....	13
5.4 Cultivo de Pasto Estrella.....	14
6. Reconocimiento del género <i>Pratylenchus</i> .....	15
6.1 Identificación morfológica.....	15
6.2 Identificación molecular.....	16
METODOLOGÍA.....	17
1. Muestreo.....	17
2. Extracción de nematodos.....	18
3. Descripción morfológica y morfométrica.....	18
4. Análisis molecular.....	20
4.1 Extracción del ADN.....	20
4.2 PCR.....	20
4.3 Secuenciación.....	21
4.4 Análisis filogenéticos.....	21
4.5 Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP).....	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
1. Descripción morfométrica y morfológica.....	23
<i>Pratylenchus coffeae</i> .....	23
<i>Pratylenchus zaei</i> .....	29
<i>Pratylenchus zaei</i> .....	30
<i>Pratylenchus brachyurus</i> .....	36

<i>Pratylenchus brachyurus</i> .....	37
2. Caracterización molecular .....	44
2.1 PCR .....	44
2.2 Análisis de secuencias y filogenia.....	44
2.3 RFLP .....	50
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	51
REFERENCIAS BIBLIGRÁFICAS .....	52

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Descripción detallada de las características ambientales de cada uno de los sitios de colecta.....	17
<b>Tabla 2.</b> Medidas morfométricas de hembras y machos de la especie <i>P. coffeae</i> en estudio y su comparación con las mediciones de la población original descrita por Ryss, (1988). .....	26
<b>Tabla 3.</b> Medidas morfométricas de hembras de la especie <i>P. zaeae</i> en estudio y su comparación con las mediciones de la población original descrita por Graham (1951).....	33
<b>Tabla 4.</b> Medidas morfométricas de hembras de la especie <i>P. brachyurus</i> en estudio y su comparación con las mediciones de la población original descrita por Van der Berg, (1971).....	40
<b>Tabla 5.</b> Medidas morfológicas de hembras y machos de las especies de <i>Pratylenchus</i> de las regiones en estudio, en Costa Rica.....	43

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Clasificación taxonomica del nematodo lecionador de la raíz <i>Pratylenchus</i> sp.	7
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida del nematodo <i>Pratylenchus</i> en su hábitat suelo-raíz.	9
<b>Figura 3.</b> Fotomicrografías de <i>P. coffeae</i> en plátano.	27
<b>Figura 4.</b> Fotomicrografías de <i>P. zae</i> en pasto estrella.	34
<b>Figura 5.</b> Fotomicrografías de <i>P. zae</i> en pasto arroz.	35
<b>Figura 6.</b> Fotomicrografías de <i>P. brachyurus</i> en piña de San Carlos.	41
<b>Figura 7.</b> Fotomicrografías de <i>P. brachyurus</i> en piña de Guápiles.	42
<b>Figura 8.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % que muestra los productos de PCR generados con los imprimadores los imprimadores rDNA2 y rDNA1.58s	44
<b>Figura 9.</b> Regla concenso del 50% de un árbol de análisis de Inferencia Bayesiana (IB) y Máximum Verosimilitud (MV) generado a partir del conjunto de datos de secuencias ITS para las especies de <i>P. coffeae</i> ; <i>P. brachyurus</i> y <i>P. zae</i> .	48
<b>Figura 10.</b> Regla concenso del 50% de un árbol de análisis de Inferencia Bayesiana y Máximum Verosimilitud generado a partir de la región D2-D3 del 28s rDNA del conjunto de datos de los genes de secuencias para las especies de <i>P. coffeae</i> ; <i>P. brachyurus</i> y <i>P. zae</i> .	49
<b>Figura 11.</b> Patrones generados con la enzima de restricción Ded I mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%	50

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Patrones generados con la enzima <i>Pst</i> I mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%.....	81
<b>Anexo 2.</b> Patrones generados con la enzima <i>Hind</i> III mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%.....	82
<b>Anexo 3.</b> Secuencias obtenidas apartir de la amplificación de los dominios D2-D3 de la región 28S del ARNr e ITS del ARNr.....	83
<b>Anexo 4.</b> Secuencias obtenidas apartir de la amplificación de la región ITS del ARNr.....	86

## INTRODUCCIÓN

Costa Rica cuenta con una superficie agropecuaria de 2 406418,6 h. Esta área representa un 47, 1% del total de la superficie nacional. El 66% se encuentra ocupado por diferentes siembras, entre perennes, anuales y pastos de corta (Instituto Nacional de Estadística y Censos [INEC], 2015). Los cultivos se encuentran expuestos a la afectación de diferentes patógenos, considerados como uno de los factores que más interfiere en la productividad agrícola (Sosa *et al.*, 1997, p.15). Dentro de este factor biótico se encuentran los nematodos fitoparásitos; microorganismos que se localizan en todos los hábitats de la tierra (Araya, 2003). Los nematodos comprenden uno de los grupos más ricos en especies del reino animal, pertenecen al phylum Nematoda el cual incluye parásitos de animales, insectos, así también como grupos marinos de agua fresca y habitantes del suelo (Thorne, 1961).

En el país, no se conocen datos exactos y registros de las afectaciones de cultivos por causa de los nematodos; sin embargo, las cifras de nematicidas que se aplican puede ser un indicador. Bravo *et al.* (2015) mencionan que para el periodo 2005-2009 en América Central, del total de toneladas de ingredientes activos de productos fitosanitarios importados con acción biocida, el 4,5% fueron nematicidas: terbufos, etoprofos y oxamil. Así, por ejemplo, en el cultivo de banano se aplicaron, para el 2008, 4,37 kg ia/ha/año de etoprofos, lo que representó un 17% de la aplicación total de nematicidas en esta fruta. En el caso del cultivo del tomate, se aplicó un 32% de ingrediente activo. El uso de estos productos químicos también se realiza en cultivos como melón, banano, plátano, caña de azúcar, arroz, entre otros (Bravo *et al.*, 2013).

Dentro de los nematodos, se pueden mencionar grupos que cumplen funciones benéficas en los agroecosistemas, así como algunos nematodos fitoparásitos que causan daños a una gran variedad de cultivos (Chaves, 2014). Los fitonematodos son de importancia económica porque tienen un patrón de distribución y dinámica poblacional en el campo, que cambia dependiendo del cultivo y las prácticas de manejo (Guzman *et al.*, 2014, p. 87). Estos microorganismos producen daño mecánico y afectan los procesos fisiológicos del desarrollo de la planta, lo que reduce el vigor y la capacidad para soportar situaciones de estrés. Además,

causan pequeñas heridas que favorecen el ingreso de otros patógenos (Guzmán *et al.*, 2011, p. 22).

En los fitonematodos existe un endoparásito migratorio llamado comúnmente nematodo lesionador (*Pratylenchus* sp.), cuyo ciclo de vida incluye huevos, cuatro estados juveniles y adultos. Una característica muy importante a diferencia de otros nematodos endoparásitos es que todos los estados de desarrollo (J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub>, J<sub>3</sub> y J<sub>4</sub>) son infectivos (Chaves, 2014). Generalmente viven y se alimentan en tejidos tiernos tales como la corteza de la raíz (Anaya y Lombo, 2008, p.25).

El género *Pratylenchus* spp. es considerado el segundo con mayor impacto económico en cultivos a nivel nacional, superado únicamente por el género *Meloidogyne* sp. En Costa Rica es común encontrar poblaciones de este nematodo asociadas a cultivos agrícolas. El laboratorio de Nematología de la Escuela de Ciencias Agrarias (ECA), realiza caracterización de especies de nematodos mediante criterios morfológicos, taxonómicos y moleculares; un proceso de identificación denominado polifásico. De esta manera, se ha logrado tener un registro actualizado de las principales especies que se encuentran en Costa Rica, así como de las de interés en esta investigación.

La razón de identificar especies de *Pratylenchus* surge precisamente por el interés del Laboratorio de Nematología en trabajar en la taxonomía de fitonematodos. Sobre esa línea de investigación, existen en el laboratorio algunos estudios previos cuales han sido de importancia para continuar con la caracterización de especies. Anteriormente, Zamora (2016), identificó taxonómica y molecularmente las especies de *Pratylenchus* asociadas a una plantación de arroz, café y ornamentales, cultivos que son de interés agrómica para Costa Rica. En esta ocasión se determinaron especies asociadas a otros cultivos como plátano, piña, pasto estrella y arroz en otra localidad diferente a la muestreada por Zamora (2016). La información generada en este estudio, podrá servir de ayuda tanto para instituciones gubernamentales relacionadas con el sector agropecuario, así como para productores y extensionistas relacionados con el manejo de plagas.

Existen diferentes métodos para la identificación de nematodos. Las técnicas tradicionales de identificación (morfológicas) continúan siendo parte fundamental para la caracterización física de nematodos (García, 2006, p. 2). Sumado a estas técnicas, se encuentran las herramientas de biología molecular, utilizadas con mayor frecuencia para la separación de especies y patotipos de nematodos, por lo que ahora son de uso rutinario. Algunas de estas incluyen la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) con imprimadores específicos y la de PCR-Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) (Fargette *et al.*, 1996; Vejl *et al.*, 2002). Además, también se utiliza la secuenciación, que es una técnica que permite determinar el orden en que se enlazan las bases de una secuencia de ADN. Por medio de esta práctica, es posible disponer de secuencias completas de ADN no solo de nematodos, sino que de muchos otros genomas de animales, plantas y microorganismos (Trelles, 2009).

Actualmente, se consideran los tres métodos de identificación nematológica aptos para una caracterización taxonómica. Además, estas herramientas permiten separar especies que muchas veces son crípticas, es decir, que morfológicamente son indistinguibles, pero genéticamente son diferentes (De Luca *et al.*, 2012; Duncan *et al.*, 1999). Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue identificar morfológica y molecularmente las especies de nematodos lesionadores de la raíz *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae) asociados a una plantación de arroz (*Oryza sativa*), plátano (*Musa* sp.), piña (*Ananas comosus*) y pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) en diferentes zonas de Costa Rica.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Identificar taxonómica y molecularmente especies del nematodo lesionador de la raíz *Pratylenchus* asociadas a una plantación de arroz (*Oryza sativa*), plátano (*Musa* sp.), piña (*Ananas comosus*) y pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) para la toma de decisiones y el manejo de las plantaciones.

### **Específicos**

1. Identificar mediante técnicas morfológicas, especies de *Pratylenchus* asociadas al cultivo de arroz, plátano, piña y pasto estrella en Costa Rica.
2. Determinar mediante técnicas moleculares de PCR, PCR-RFLP y secuenciación, las especies de *Pratylenchus* asociadas a cinco cultivos de importancia agrícola en Costa Rica.

# REVISIÓN DE LITERATURA

## 1. Nematodos fitoparásitos

Son organismos generalmente microscópicos, no segmentados, bilateralmente simétricos, incoloros y cilíndricos en su sección transversal (Hernández, 2003). Se conocen alrededor de 4.105 especies de nematodos fitoparásitos, los cuales provocan pérdidas económicas anuales entre 11 y 14%. Estas pérdidas equivalen a \$80 billones de dólares al año en cultivos como leguminosas, granos, banano, yuca, coco, remolacha, caña de azúcar, papa, otras hortalizas y frutales (Guzmán *et al.*, 2012).

Estos microorganismos se pueden encontrar atacando raíces, tallos, troncos, yemas, hojas, flores y semillas, en dependencia de la especie y de la planta hospedante (Llancavil, 2007). De acuerdo con los hábitos de alimentación, los fitoparásitos se clasifican en tres grupos: a) ectoparásitos, b) semiendoparásitos y c) endoparásitos los cuales a su vez pueden ser migratorios y sedentarios (Rivera, 1991). En el caso de los endoparásitos migratorios se mueven permanentemente dentro de la planta en busca de los sitios de alimentación y durante su ciclo de vida pueden salir del tejido para volver a entrar posteriormente en otro lugar distinto (FAO, 2016).

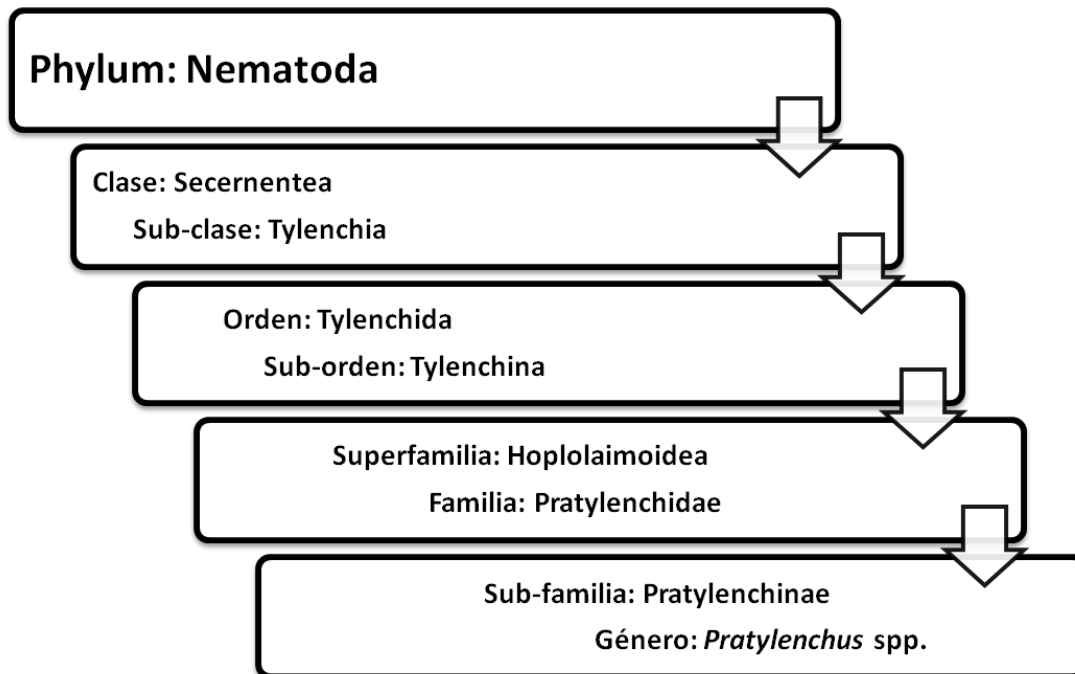
El nivel de daño que causan los nematodos depende de una amplia gama de factores tales como su densidad poblacional, la virulencia de las especies o aislados, y la resistencia (destreza de la planta de reducir la población del nematodo) o tolerancia (habilidad de la planta de rendir una cosecha a pesar del ataque del nematodo) de la planta huésped. Otros factores que también contribuyen de una u otra manera son, el clima, disponibilidad de agua, condiciones edáficas, fertilidad del suelo, y la presencia de otras enfermedades y plagas (Talavera, 2003).

En cuanto a la ocurrencia de nematodos fitoparásitos en Costa Rica, se reportan las especies *Tylenchulus semipenetrans*, *Globodera pallida*, *Radopholus similis* (Esquivel y Peraza, 2010), *Xiphinema costaricense* (Lamberti & Tajan. 1974) y más recientemente *Longidorus*

*laevicapitatus*, (Peraza *et al.*, 2016), *X. setariae*, *X. krugi* (Peraza *et al.*, 2017b), *X. tica* n. sp. (Peraza *et al.*, 2017a), y *X. poasense* n. sp. (Varela *et al.*, 2018); estas dos últimas especies, como nuevos reportes para la nematología mundial. Así mismo, se han reportado poblaciones de *Helicotylenchus* spp., *Aphelenchoides* spp., *Tylenchus* spp., *Mesocriconema* spp., *Criconemoides* spp., *Crossonema* spp., *Hemicycliophora* spp., *Xiphinema* spp., *Meloidogyne* spp. y *Pratylenchus* spp., estos dos últimos, considerados los de mayor incidencia asociados frecuentemente como parásitos importantes de diversos cultivos agrícolas y ornamentales (Esquivel y Peraza, 2010).

## 2. Género *Pratylenchus*

El nematodo fitoparásito *Pratylenchus*, se clasifica taxonómicamente según Siddiqi, (2000) de la siguiente manera:



**Figura 1.** Clasificación taxonómica del nematodo lesionado de la raíz *Pratylenchus* spp. Adaptado: (Siddiqi, 2000).

Los nematodos de este género son elongados, de 340 - 800  $\mu\text{m}$  de longitud, con un coeficiente de longitud / ancho de 15-35. *Pratylenchus* spp. se logra identificar morfológicamente por la cabeza plana, fuerte armadura cefálica y un estilete corto y grueso de 14-20  $\mu\text{m}$  de longitud

con un nudo basal prominente. El traslape de las glándulas esofágicas con el intestino, es ventral. El poro excretor aparece cerca de la unión esófago-intestinal. La vulva se ubica a un 70-80% de la longitud del cuerpo. La cola redondeada constituye de 3.5-9% de la longitud del cuerpo. Los machos, cuando están presentes, son de un tamaño menor al de las hembras (Morales, 2001).

### **3. Ciclo de vida del género *Pratylenchus***

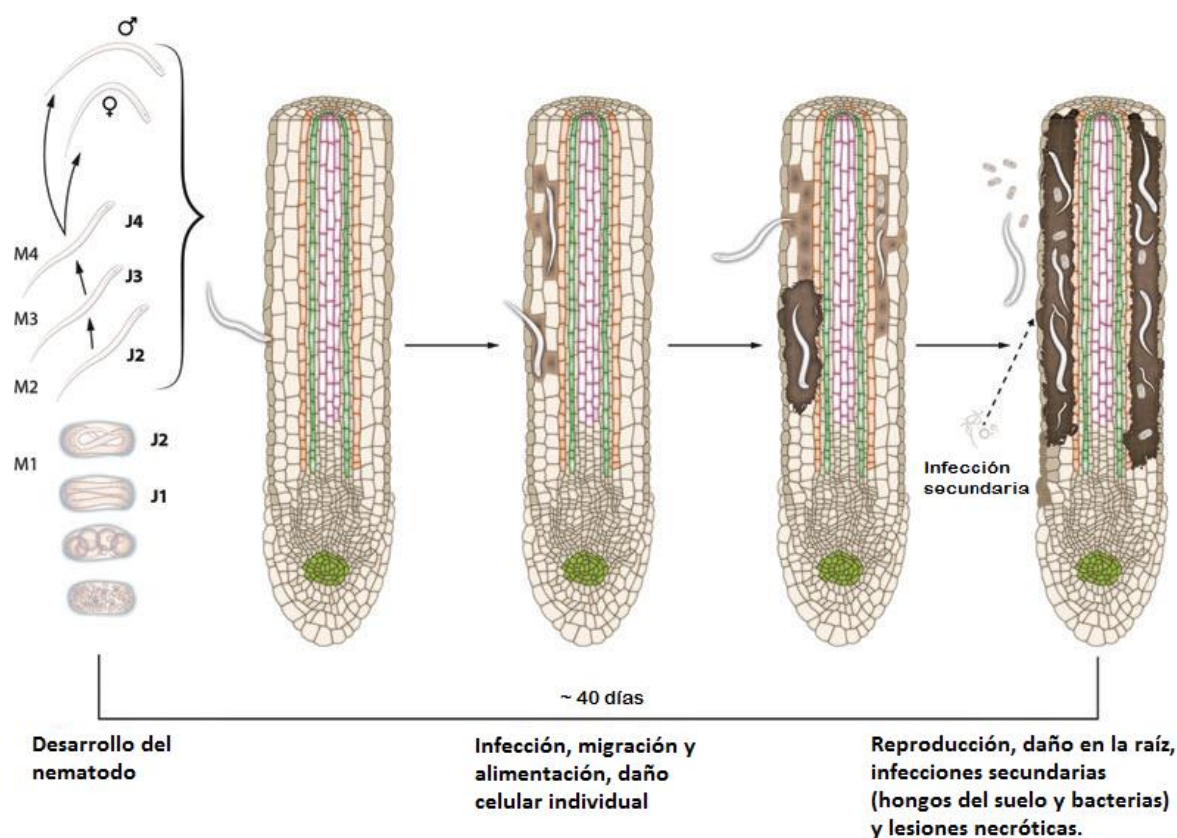
El ciclo de vida es simple y directo, las hembras ponen sus huevos por separado o en pequeños grupos en la raíz del huésped o en el suelo cerca de la superficie de la raíz (Figura 1). Hay poca información disponible sobre la duración real de los ciclos de vida de *Pratylenchus* bajo condiciones de campo natural (Castillo y Vovlas, 2007). El Servicio Agrícola y Ganadero de Chile [SAG], (2005) menciona que el ciclo completo toma alrededor de cinco semanas dependiendo del hospedero y la temperatura, la cual oscila de entre 18°C a 20°C.

Como la mayoría de los nematodos, las descripciones taxonómicas de las especies de *Pratylenchus* se basan en las características morfológicas de machos y hembras. Los juveniles por lo general tienen las mismas características de los adultos (en menor medida), excepto por la ausencia de los órganos reproductores plenamente desarrollados que son indispensables para lograr determinar una especie. Los adultos de *Pratylenchus* tienen entre 300-900 mm de longitud (dependiendo de la especie) y son relativamente robustos (la longitud del cuerpo / la anchura del cuerpo  $\cong$  20-30). La hembra adulta puede ser reconocida por una abertura en la cutícula del lado ventral (la vulva), que se encuentra aproximadamente entre 70-85% de la longitud del cuerpo (dependiendo de la especie), de la cabeza del nematodo (Davis y MacGuidwin, 2000).

El huevo se desarrolla y pasa por mudas a través de 4 estadios juveniles hasta llegar a convertirse en adulto. Este género puede sobrevivir en los rastrojos de los cultivos atacados, lo que le permite protegerse de condiciones adversas como baja humedad, altas temperaturas o aplicaciones de productos químicos (Bressani, 2012).

Este nematodo no posee un estado infectivo determinado ya que tanto los juveniles como el adulto son capaces de entrar y salir de la raíz, en especial de las zonas de elongación. Dentro del género existen especies *bisexuales* de reproducción amfimíctica como *P. penetrans*, *P. vulnus* y *P. coffeae*; y especies de reproducción partenogenética como *P. neglectus*, *P. zaeae* y *P. brachyurus* (García, 2004, p. 75).

Los nematodos del género *Pratylenchus* penetran cualquier parte de la raíz, pero prefiere zonas donde se encuentren la mayor parte de pelos absorbentes. Introducen su estilete donde digieren la pared de las células en la epidermis, luego se dirigen hacia el contenido de la célula. El mismo patrón de ataque es repetido cuando migran de un lado a otro y se alimentan de la corteza de la raíz (Morales, 2001, p. 52).



**Figura 2.** Ciclo de vida del nematodo *Pratylenchus* en su hábitat suelo-raíz. Adaptado: (Jones & Fosu-Nyarko, 2014).

#### 4. Síntomas que provoca *Pratylenchus*

*Pratylenchus* es un nematodo endoparásito migratorio, es decir, que tiene la capacidad de moverse no más de 1-2 metros de la zona de raíz que infectan, aunque muchos de las actividades agrícolas favorecen su dispersión. La migración ocurre en el suelo y sobre las plantas sólo cuando el agua está disponible. (Wallace, 1973).

El daño mecánico que estos nematodos provocan durante su alimentación sucede por la acción del estilete y secreción de saliva introducida en los tejidos de las plantas. Al perforar e introducir saliva dentro del citoplasma, extrae parte del contenido celular, lo cual incita una reacción en las células de las plantas afectadas que resulta en la muerte o debilitamiento de los extremos de las raíces y yemas, formación de lesiones y destrucción de tejidos (Agrios, 2005).

Este fitoparásito penetra la raíz a través de las células de la epidermis y en algunas ocasiones a través de los pelos radicales. Origina zonas extensas de tejido muerto que se caracterizan por su color marrón oscuro o negro, que sirven de entrada para agentes patógenos como hongos y bacterias. Por otra parte, introducen su estilete en el parénquima cortical de la raíz de cuyas sustancias se nutre. Posteriormente, este nematodo emigra al suelo en el que permanece durante el ciclo de desarrollo del cultivo, para luego buscar otras fuentes de alimentación (León, 2007).

El movimiento de plantas infectadas o partes propagadoras ha sido responsable de la diseminación de *Pratylenchus* por largas distancias, incluso intercontinentalmente. Además, dado que muchas especies son endémicas de la vegetación nativa en muchos lugares, los sitios de siembra ya pueden estar infestados con el nematodo antes del cultivo y esta puede ser una de las principales razones por las que varias especies son ahora cosmopolitas (Castillo y Vovlas, 2007).

El diagnóstico del género *Pratylenchus* frecuentemente se realiza en dos niveles; el primero se ejecuta en el campo, cuando se extraen plantas y se observa la presencia de lesiones

necróticas, mientras que la identificación de segundo nivel se realiza en laboratorios, donde se emplean estudios morfológicos, moleculares y fisiológicos (Rodríguez, Gómez, y Peteira, 2007).

En Costa Rica mediante la técnica de microscopía electrónica de rastreo (MER) se determinó la presencia de las especies *P. brachyurus*, *P. zaeae*, *P. coffeae*, y *P. penetrans* en las regiones Central Norte y Huetar Atlántica asociada a los cultivos de piña, caña de azúcar, *Aglaonema commutatum* y helecho hoja de cuero (López y Salazar, 1990). Asimismo, Zamora (2016), mediante una investigación con estudios morfológicos, morfométricos, moleculares y de microscopía electrónica, identificó las especies *P. zaeae* asociada a arroz en una plantación en Aguas Zarcas, San Carlos, Alajuela; *P. gutierrezii* en café en Carrizal de Alajuela; *P. bolivianus* en helecho en San Isidro de Alajuela y *P. pseudocoffeae* en crisantemo en San Isidro de Heredia, Costa Rica.

## **5. Cultivos en estudio asociados con *Pratylenchus***

### **5.1 Cultivo de Piña**

La planta de piña (*Ananas comosus* L.) es una monocotiledónea herbácea y perenne, que pertenece a la familia Bromeliaceae. Es originaria de América del Sur de la región de Matorral, entre Uruguay y Brasil. En Costa Rica el cultivo de esta fruta ha tenido mucho auge en los últimos años y ha llegado a ser una importante fuente de divisas con la exportación a Estados Unidos y Europa. Recientemente, se abrió el mercado en China, país que muestra una tendencia creciente en el consumo e importación de este producto, solo entre 2014 y 2015 las importaciones crecieron 64%. La tasa de crecimiento de las importaciones chinas de piña entre 2011 y 2015, se ubicó en un 38% anual promedio (Servicio Fitosanitario del Estado [SFE], 2017).

En la actualidad en Costa Rica existen 38 000 hectáreas dedicadas a este cultivo con un total de 550 productores de piña. Se produce a lo largo y ancho de 16 cantones. La principal zona productora es la Zona Norte con 17 860 hectáreas, con un equivalente al 47% del área cultivada; seguido del Atlántico con 11 780 hectáreas lo representa el 31%, y finalmente el

Pacífico con 8 360 hectáreas, lo cual constituye el 22% del área cultivada (Cámara Nacional de Productores y exportadores de Piña [CANEP], 2016).

Diferentes enfermedades se asocian a este cultivo como por ejemplo la podrición del cogollo (*Erwinia* sp.), podredumbre del corazón (*Phytophthora parasítica* y *P. cinnamoni*), clavo de la piña (*Penicillium funiculosum* y *Fusarium moniliforme*) y podredumbre blanda del fruto (*Thielaviopsis paradox*). En el caso de plagas, nematodos del género *Pratylenchus* y *Helicotylenchus* están asociados con daños severos en la raíz de la piña (Ministerio de Agricultura y Ganadería [MAG], 1991).

## 5.2 Cultivo de Plátano

Todas las especies de plátano comerciales pertenecen al orden Escitamineas, familia Musáceas. El nombre científico es *Musa AAB* y proviene de los cruces triploides de *Musa acuminata* (A) y *Musa balbisiana* (B) (Smith y Velázquez, 2004). El plátano es una planta herbácea, que consta de un tallo subterráneo (cormo ó rizoma) del cual brota un pseudotallo aéreo; el cormo emite raíces y yemas laterales que formaran los hijos o retoños (Guerrero, 2010). En Costa Rica se encuentran sembradas 10 014,5 hectáreas de las cuales solo 8 599,8 se encuentran en producción para el año 2014 (INEC, 2015).

Estados Unidos es el principal importador de plátano, son consumidos casi exclusivamente por la población inmigrante de origen Hispanoamericano y del Caribe, situación que es muy semejante por países europeos (Chaves, 2002). En Latinoamérica y el Caribe, el cultivo de plátano está en manos de pequeños y medianos productores, donde se estiman rendimientos menores a 5 ton/ha por año (Muñoz y Vargas, 2006). La producción de plátano es de gran importancia socioeconómica debido a que es motor generador de ingresos para sus productores, además de formar parte de la dieta alimenticia de muchos países de la región (Centro Internacional de Agricultura Tropical [CIAT], 2006).

Entre las enfermedades que afectan el cultivo de plátano están la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Var.), la pudrición del pseudotallo causada por la bacteria *Erwinia*

*carotovora* y nemátodos parásitos como *R. similis*. En menor grado hay afectaciones por *Helycotylenchus* y *Pratylenchus*, y muy escasamente *Meloidogyne*. En un estudio llevado a cabo por Peraza *et al.*, (2016; 2017), determinaron la presencia de *L. laevicapitatus* y *Xiphinema setariae* en una plantación de plátano orgánico en Pueblo Nuevo de Duacaré, Guácimo, Limón. Debido al eficiente grado de parasitismo de los nematodos, rara vez ocasionan por sí solos la muerte de la planta afectada. Debido a que atacan principalmente las raíces, hace que el daño que ocasionen pase desapercibido con frecuencia (Araya, 2008).

### **5.3 Cultivo de Arroz**

Existen dos especies de arroz pertenecientes a la familia de las poáceas que se cultivan, *Oryza sativa* L. y *Oryza glaberrima* Steud, siendo la primera la de mayor distribución en el mundo. Es una planta descrita como gramínea anual de tallos redondos y huecos compuesto de nudos y entrenudos. Según el Instituto Nacional de Innovación y Transferencia de Tecnología [INTA], (2009) tanto en el ámbito nacional como en el internacional el arroz es uno de los cultivos de mayor importancia ya que es un cereal clave en la alimentación de la población mundial.

En los últimos años Costa Rica ha importado volúmenes importantes de arroz en granza debido a que la producción nacional satisface únicamente entre un 50% y un 60% del consumo, lo que obliga a realizar exportaciones para llenar el faltante de este producto (INTA, 2009). El uso aparente de arroz en el período 2015/2016, se estimó en 240 749 toneladas métricas de arroz pilado para un consumo per-cápita de 49.82 kg y un promedio mensual de 120 062 toneladas. Para este período el 50.9% consumido se cubrió con arroz nacional, mientras que el arroz importado fue del 49.1% restante (Corporación Arrocería Nacional [CONARROZ], 2016).

El cultivo se enfrenta a plagas como jobotos (*Phyllophaga* spp.), abejones negros (*Eutheola bidentata*), grillo topo (*Neocurtilla hexadactyla*), la chichilla (*Blissus leucopterus*), el taladrador del arroz (*Elasmopalpus lignosellus*), barrenador (*Diatraea* sp.), novia del arroz (*Rupella albinella*) entre muchas otras. En cuanto a enfermedades son comunes *Pyricularia*

*grisea* Cav., virus de la hoja blanca, *Rhizoctonia solani* Kühn y el manchado del grano de arroz. En lo que respecta a nematodos, se han encontrado asociados géneros como *Meloidogyne*, *Helicotylenchus*, *Pratylenchus*, *Criconemella*, *Aphelenchus*, *Tylenchorhynchus*, *Xiphenema*, *Longidorus*, y *Trichodorus* (INTA, 2009).

#### **5.4 Cultivo de Pasto Estrella**

El pasto estrella es considerada como una gramínea perenne, rastrera, con largos y fuertes estolones, presenta buenos valores de proteína bruta y digestibilidad si es cortado a edades tempranas (30-42 días) y si se le aplica altas dosis de fertilizante (+ 400 kg/ha/año) (Hernández y Pereira, 1981).

Entre las estrategias de mayor difusión para el mejoramiento de la producción animal en sistemas de pastoreo, se menciona la adopción de leguminosas y el mejoramiento de la calidad nutritiva de las gramíneas mediante la selección de accesiones superiores o programas de hibridación (Lascano, 2002). Las gramíneas tropicales como la estrella africana y la bermuda son altamente sensibles a cambios en las horas luz durante el año, afectadas tanto en la producción de biomasa como el valor nutricional (Sinclair, Mislevy, & Ray, 2001). Así mismo el género *Cynodon*, se caracteriza por su capacidad de extraer sustanciales cantidades de nutrientes del suelo (Pant, Mislevy, & Rechcigl, 2004).

De acuerdo con el último Censo Agropecuario, de las 2 406 418,4 hectáreas de las fincas agropecuarias del país, 1 044 909,6 hectáreas de ellas, es decir, el 43,4% del uso de las tierras corresponden a los pastos. De ellos, el 53,3%, pertenecen a pastos naturales, el 44% a pastos mejorados el 44,6% y 2,1% corresponde a pastos de corte. Las provincias que tienen mayor superficie dedicadas a este forraje son Alajuela con 51,4% y Guanacaste con 48,0% (INEC, 2015).

El pasto estrella es susceptible al ataque de insectos como el gusano soldado (*Spodoptera frugiperda*) y “salivazo” (*Prosapia bicinata*), durante el periodo de establecimiento de los pastizales son más comunes los gusanos comedores de follaje, mientras que en pastizales ya

establecidos se encuentran chinches (*Blisus insularis*), candelillas y hormigas. Entre las enfermedades más comunes se encuentran gomosis (*Xanthomonas vasculorum*), la roya de los pastos (*Puccinia graminis*) y manchas de hoja ocasionado por hongos (*Rhizoctonia solani*) (Smith & Valenzuela, 2002). En cuanto a problemas con nematodos, existe poca o nula información sobre esta gramínea perenne; sin embargo, en una investigación realizada por Peraza *et al.*, (2016) y (2017), identificaron las especies *L. laevicapitatus* y *Xiphinema krugi* en la localidad de Sucre, Ciudad Quesada, Alajuela

## **6. Reconocimiento del género *Pratylenchus***

El diagnóstico del género *Pratylenchus* frecuentemente se realiza en dos niveles; el primer diagnóstico se ejecuta en el campo, cuando se extraen plantas y se observa la presencia de lesiones necróticas. La identificación de segundo nivel se realiza en laboratorios, donde se emplean estudios morfológicos, morfométricos y moleculares (Rodríguez, Gómez y Peteira, 2007). En Costa Rica mediante la técnica de microscopía electrónica de rastreo (MER) se determinó la presencia de las especies *P. brachyurus*, *P. zae*, *P. coffeae*, y *P. penetrans* en las regiones Central Norte y Huetar Atlántica asociada a los cultivos de piña, caña de azúcar, *Aglaonema commutatum* y helecho hoja de cuero (López y Salazar, 1990). Además, Zamora (2016), mediante una investigación con estudios morfológicos, morfométricos, moleculares y de microscopía electrónica, identificó las especies *P. zae* asociada a arroz en una plantación del cultivo en Aguas Zarcas, San Carlos, Alajuela; *P. gutierrezii* en café en Carrizal de Alajuela; *P. bolivianus* en helecho en San Isidro de Alajuela y *P. pseudocoffeae* en crisantemo en San Isidro de Heredia, Costa Rica.

### **6.1 Identificación morfológica**

Para la identificación de nematodos fitoparásitos se utilizan comúnmente claves dicotómicas que incluyen características como la forma del estilete de hembras, machos y estados infectivos, el número de anillos de la región cefálica de juveniles (J<sub>2</sub>) y machos. Asimismo, medidas morfométricas como la longitud del estilete, la distancia de la base del mismo a la desembocadura de la glándula dorsal (DGO) de hembras, machos y J<sub>2</sub> (Jaraba, Lozano y Espinosa, 2007). En el caso de *Pratylenchus*, se determina morfométricamente con el estudio

de características similares a las anteriores, más la longitud y ancho del cuerpo, longitud del esófago, estilete, cola, saco postvulvar, unión esófago-intestinal y total de bandas laterales del cuerpo que en algunas ocasiones son difíciles de observar aún para taxónomos expertos (Doucet & Cagnolo, 1998).

## **6.2 Identificación molecular**

Las herramientas moleculares permiten estudiar la variación genética mediante el uso de marcadores de ADN, que proporcionan aspectos como diversidad, comparación entre especies, relación de parentesco o relaciones filogenéticas (Jiménez y Collada, 2000). Las secuencias de los espaciadores internos transcritos ribosomales (ITS-1 e ITS-2) son los marcadores comúnmente utilizados para discriminar entre especies de nematodos, por su variabilidad y disponibilidad de cebadores universales que funcionan con la mayoría de éstos. Estos marcadores incluyen el potencial para la amplificación por PCR y secuenciación, por lo que genera información genética apropiada para investigaciones a nivel de especies (Peteira, Rodríguez, Rosales y Salazar, 2008).

El método basado en PCR, facilita el análisis del genoma de los organismos ya que consiste en duplicación de material genético. Esta duplicación se realiza con la acción de una enzima, la ADN polimerasa, cuya función consiste en sintetizar una cadena sencilla de ADN complementaria a otra cadena que sirve como plantilla, reconstruyendo así la doble cadena de ADN que contiene la información genética de la célula de interés (Cenis *et al.*, 2007).

La secuenciación por su parte logra interpretar la información contenida en las secuencias de ADN, ARN y proteínas de diversos organismos. Es la medida fundamental de la diversidad y detecta polimorfismos dentro de los elementos básicos de la cadena de ADN (Franco, Cediell, y Payán, 2008). Actualmente dicha información genómica se obtiene de forma automatizada, a través de dos protocolos fundamentales, Maxam-Gilbert (degradación química) y Sanger (secuenciación enzimática), siendo este último el de mayor uso (IPGR y Universidad Cornell, 2003).

# METODOLOGÍA

## 1. Muestreo

Se ubicaron cuatro cultivos agronómicos con historial de incidencia y presencia del nematodo *Pratylenchus* (Tabla 1). Se muestreó una plantación de plátano (*Musa* sp.) en la zona de Talamanca, Limón; una de arroz (*Oryza sativa*) en Laurel, Corredores, Puntarenas; una de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) en San Vicente de Ciudad Quesada, San Carlos, Alajuela; por último, dos plantaciones de Piña (*Ananas comosus*), una en San Carlos, Alajuela; y otra en Guápiles, Limón. Los cultivos se encontraron en periodo vegetativo de desarrollo.

**Tabla 1.** Descripción detallada de las características ambientales de cada uno de los sitios de colecta.

Cultivo	Localidad	Latitud	Longitud	Elevación (msnm)	Temperatura	Precipitación (mm/anuales)
<b>Plátano</b>	Paraíso de Sixaola, Talamanca, Limón	9°28'41.85"N	82°37'11.99"O	8	Mínima: 22°C Máxima: 30°C Media: 26°C	298
<b>Arroz</b>	Laurel, Corredores, Puntarenas	8°28'28.6"N	82°55'27.0"O	16	Mínima: 22°C Máxima: 32°C Media: 27°C	413
<b>Pasto Estrella</b>	San Vicente de Ciudad Quesada, San Carlos, Alajuela	10°17'13.85"N	84°23'5.47"O	1672	Mínima: 18°C Máxima: 26°C Media: 22°C	296
<b>Piña</b>	Pital, San Carlos, Alajuela	10°27'10.45"N	84°16'13.41"O	275	Mínima: 18°C Máxima: 26°C Media: 22°C	296
<b>Piña</b>	Guápiles, Guápiles, Limón	10°20'47.97"N	83°80'83.83"O	50	Mínima: 22°C Máxima: 30°C Media: 26°C	298

**Fuente:** Instituto Meteorológico Nacional (IMN), 2016.

Se realizaron cuatro giras de campo entre los meses de febrero a junio del 2017, donde se efectuaron muestreos en los cuatro cultivos. Se delimitó una hectárea, se retiró la materia orgánica fresca de la superficie y con la ayuda de un barreno (uckfield de 2,2 cm dediámetro interno), se recolectó a una profundidad de 20 cm, un total de 25 submuestras al azar mediante un recorrido en zig-zag. Posteriormente, las submuestras se homogenizaron entre sí para

obtener una muestra compuesta de 1 kg de suelo y 100g raíz. Las muestras se almacenaron en bolsas de polietileno y se trasladaron en una hielera al Laboratorio de Nematología y se conservaron a una temperatura ambiente entre 17-25 °C. Las muestras de raíz se guardaron en un refrigerador a una temperatura entre 5 y 7 °C evitando un máximo de cinco días de almacenamiento (Esquivel y Peraza, 2010). Con la ayuda de un GPS (Global Position System) se georreferenció cada sitio de muestreo.

## **2. Extracción de nematodos**

La extracción de nematodos se realizó mediante el método de Jenkins (1964). Se tomó una submuestra de 100 g de suelo, se colocó en una cubeta y se lavó directamente bajo un chorro de agua a presión. La suspensión resultante se agitó con una paleta de madera y se dejó reposar por 30 segundos. Seguidamente, se procedió a decantar la solución sobre un juego de tamices superpuesto de 100 y 400 mallas. La operación se repitió una vez más con el suelo remanente en la cubeta. Con la ayuda de una piseta, el suelo retenido en la criba de 400 mallas se transfirió a tubos de centrifuga de 50 mL y se centrifugaron durante 3 minutos a 8000 rpm. Una vez finalizado, se decantó cuidadosamente el sobrenadante y se agregó una solución de azúcar (484 g de azúcar disuelto en 1L agua), la cual se agitó vigorosamente con el objetivo de resuspender el suelo con el azúcar y se volvió a centrifugar durante 3 minutos a 8000 rpm.

El sobrenadante se vertió sobre una criba de 500 mallas y el exceso de azúcar se lavó con agua. Por último, se transfirieron los nematodos recuperados a un plato de conteo o siracusa para su observación. El procesamiento para extracción de los nematodos en raíz fue similar, con la diferencia de que se pesaron 10 g, se maceraron a través de una licuadora (Osterize galaxie, dual ranger 16) por 20 segundos y se trasladaron al juego de tamices de 100 y 400 mallas, donde se siguió el procedimiento ya mencionado para las muestras de suelo.

## **3. Descripción morfológica y morfométrica**

Los adultos (machos y hembras) extraídos se colocaron en una caja de conteo circular de 60 x 15 mm, la cual consistió en un recipiente plástico cuadriculado para el conteo de los nematodos. En un microscopio invertido (Olympus® CK30-F100) se pescaron 20 hembras

y 10 machos y se trasladaron a una gota de agua corriente colocada en un rectángulo con medio AA (agar-agua al 3%) de acuerdo con la metodología de Grewal, (1990). El rectángulo se colocó en un portaobjetos para la visualización de cada uno de los ejemplares. Se tomaron imágenes con una cámara Nikon DS-Fi1 adaptada a un microscopio Nikon Eclipse 80i con contraste de interferencia diferencial (DIC). Las fotografías se editaron con el programa Photoshop CS4®.

Para los estudios morfométricos se realizaron las siguientes mediciones: longitud del cuerpo ( $\mu\text{m}$ ); longitud del estilete ( $\mu\text{m}$ ); largo del conus y Orificio de la Glándula Dorsal (DGO); ubicación del poro excretor medido de la región anterior ( $\mu\text{m}$ ); longitud del esófago ( $\mu\text{m}$ ); ancho máximo del cuerpo (MBW) ( $\mu\text{m}$ ); longitud del post-corporis ( $\mu\text{m}$ ); número de anulaciones labiales; largo, tipo y forma de la cola; número de anulaciones de la cola; ancho máximo del cuerpo a nivel del ano (ABW) ( $\mu\text{m}$ ); número y estructura de líneas laterales a nivel vulvar; longitud de la vulva; longitud de la gónada anterior; longitud del saco uterino postvulvar; forma de la espermateca; longitud de la espícula y gubernáculo. Además de las medidas se calcularon los siguientes radios: a: Longitud del cuerpo/ancho del cuerpo, b: Longitud del cuerpo/ longitud del esófago; c: Longitud del cuerpo/ longitud de la cola, c': Longitud de la cola/ ancho del cuerpo a la altura del ano; V%: Longitud de la vulva /longitud del cuerpo (Souza, 2008). G1: Longitud del ovario anterior \*100 / longitud del cuerpo, MB: Distancia anterior del post-corporis \*100 / longitud del esófago, O: (Longitud del DGO / longitud del estile) \*100 y m: (Longitud del conus / longitud del estilete) \*100 (Siddiqui, 2000; Jacob y Van Bezooijen, 1984).

Con los datos obtenidos de las mediciones anteriores, se realizó un análisis estadístico descriptivo en el que se obtuvo el promedio, desviación estándar, datos máximos y mínimos de cada población de *Pratylenchus* perteneciente a cada uno de los cultivos en estudio.

## 4. Análisis molecular

### 4.1 Extracción del ADN

Se utilizaron 10 individuos adultos de *Pratylenchus* de cada cultivo muestreado, los cuales se colocaron en un contador para nematodos y se observaron bajo un microscopio invertido (Olympus® CK30-F100). Cada nematodo se transfirió con una microaguja a un tubo de microcentrifuga de 0,2 ml con 47 µl de M Tris-HCL pH. 8.0 (2.0 M) y 3 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Cada tubo con un nematodo se colocó en un baño ultrasónico (Bransonic 2510 ultrasónico, Branson Ultrasonidos) con agua destilada y se incubó durante 10 min a 60 °C. Posteriormente, se incubó durante 30 min a 60 °C en un termociclador y después se mezcló en un agitador tipo vórtex. Seguidamente, se incubó a -20°C durante 15 minutos, a 90°C durante 10 minutos, se agitó en el vórtex, se incubó 15 minutos a -20°C y por última vez a 90°C durante 10 minutos. Finalmente, se centrifugó cada tubo (perteneciente a cada población por cultivo en estudio) por 2 minutos a 2000 rpm y se tomaron 45 µl de la suspensión de ADN de cada uno y se transfirió a un nuevo tubo de microcentrifuga y se almacenó a -20°C (Solano *et al.*, 2013).

### 4.2 PCR

Por medio de la PCR se amplificó el dominio D2-D3 de la región 28S del ADN ribosomal (ADNr) con los cebadores D2A (5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3') y D3B (5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA- 3') (Castillo *et al.*, 2003; He *et al.*, 2005; Palomares-Rius *et al.*, 2008). Además, se amplificó la región ITS1 entre los genes ribosomales nucleares con los cebadores rDNA2 (5'-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3') y rDNA1.58S (5'-ACGAGCCGAGTGATCCACCG-3') (Wang *et al.*, 2003). Se realizaron reacciones de PCR de 50 µl para lo cual se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 1,75 µl MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1,25 µl dNTPs 2 mM, 0,2 µl de cada imprimador a 10 mM; 0,2 µl Dream Taq polimerasa (5U/µl), 25 µl de DreamTaq buffer 10X, 15 µl de agua ultrapura y 6,6 µl de ADN. Todas las PCRs se realizaron en un termociclador Veriti™ (Applied Biosystems®) bajo las siguientes condiciones de temperatura: un primer paso de desnaturalización a 94 °C durante 2 minutos, seguido por 35 ciclos a 94 °C durante 30 s, una temperatura de 53 °C para los cebadores

rDNA2 y rDNA1.58S y 57°C para D2/D3°C durante 45 s, 72 °C durante 3 min, y un último paso de extensión a 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa TopVision™ al 1% teñido con GelRed™ (Biotium Inc.).

### 4.3 Secuenciación

De las cinco poblaciones de *Pratylenchus* en estudio, se enviaron 10 nematodos en una solución de 50 µl alcohol al 75%, y en 50 µl de DESS, al Instituto de Agricultura Sostenible (IAS) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Córdoba, España, en donde se realizaron la secuenciación y análisis filogenéticos. Los productos de PCR se purificaron previos a la secuenciación con el kit ExoSAP-IT (Affmetrix, productos USB) y la cuantificación del ADN se realizó por medio de un espectrofotómetro Nanodrop (Nanodrop Technologies, Wilmington, USA). La secuenciación se llevó acabo en un secuenciador multicapilar de ADN (analizador genético Modelo 3130XL; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando el BigDye Terminator Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystems®). Las secuencias se editaron y se alinearon con el programa BioEdit v. 7.2.5 (Hall, 1999) y se ensamblaron con el programa seqmanPRO v.9.0. Cada secuencia se comparó con otras secuencias reportadas para especies de *Pratylenchus* depositadas en el GenBank® y se calcularon los porcentajes de similitud y divergencia entre ellas. Cada secuencia obtenida en este estudio se incorporó a la base de datos del GenBank®.

### 4.4 Análisis filogenéticos

Para los análisis filogenéticos se utilizaron las secuencias de las regiones D2-D3 e ITS del ADNr de las diferentes especies de *Pratylenchus* reportadas en el GenBank. Los taxones y grupos externos que se utilizaron para analizar las secuencias de los segmentos de expansión D2-D3 de la región 28S del ADNr fueron los mismos que utilizaron Subbotin *et al.* (2008) y Palomares-Ruis *et al.* (2014). En el caso de la región ITS, se utilizó la especie *Nacobbus aberrans* como grupo externo para esta filogenia. Se hicieron alineamientos múltiples con las secuencias de los diferentes genes con el programa MAFFT v.7.205 con parámetros ya establecidos (Kato y Standley, 2013). Los análisis filogenéticos se realizaron basados en el criterio de Inferencia Bayesiana (IB) (Schwarz, 1978) por medio del programa MrBayes

v.3.1.2 (Huelsenbeck y Ronquist, 2003). Se obtuvo el mejor modelo de sustitución de nucleótidos (modelo de evolución de ADN) para generar los árboles con el programa jModelTest v.2.1.7 (Darriba *et al.*, 2012) con el Criterio Inferencia Bayesiana (IB) (Schwarz, 1978). Por último, se utilizó el programa Tree View v. 2017 (Page 1996) con 1000 reemplazos para generar los árboles filogenéticos según los modelos de sustitución con mayor probabilidad para cada alineamiento.

#### **4.5 Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP)**

Se hicieron análisis RFLP con los productos de PCR generados con los imprimadores rDNA2 (5'-TTGATTACGTCGCTGCCCTTT-3') (Powers *et al.*, 1997) y el rDNA1.58S (3'-ACGAGCCGAGTGATCCACCG-5') (Cherry *et al.*, 1997), para lo cual se utilizaron las enzimas de restricción *Ded-I*, *Hind-III* y *Pst-I* siguiendo las indicaciones del fabricante. Se tomó 1 µl de cada enzima, 1,5 µl de buffer específico para cada enzima, 7,5 µl de agua ultra pura y 5 µl del producto de PCR y se incubaron en el termociclador a 37°C durante 1 hora. Los fragmentos de PCR y RFLP se separaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2%, preparados con TBE 1X y teñidos con GelRed™ (Biotium Inc.), y se observaron en un transiluminador con luz ultravioleta.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los análisis morfológicos, morfométricos, moleculares permitieron identificar las especies de *Pratylenchus* asociadas a cuatro cultivos de importancia agrícola en Costa Rica (piña, plátano, arroz y pasto estrella). Se identificó la especie *P. coffeae* en una finca dedicada al cultivo de plátano (*Musa* sp.) en la zona de Talamanca, Limón. La especie *P. brachyurus* se encontró asociada a dos plantaciones de piña (*Ananas comosus*) en San Carlos, Alajuela y Guápiles, Limón. Finalmente, la especie *P. zaeae*, se encontró en asocio con arroz (*Oryza sativa*) en Laurel, Corredores, Puntarenas y a pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) en San Vicente de Ciudad Quesada, San Carlos.

## 1. Descripción morfométrica y morfológica

Los parámetros morfométricos establecidos por otros investigadores para las especies de *P. coffeae*, *P. brachyurus* y *P. zae*, (Tablas 2, 3, 4 y 5) coincidieron con los datos obtenidos en esta investigación; sin embargo, algunas mediciones o valores presentaron diferencias (mayores o menores) que los de la población tipo, lo que es normal en identificaciones taxonómicas. De acuerdo con Peraza *et al.*, (2013), las medidas en las poblaciones de nematodos pueden mostrar variabilidad en los parámetros morfométricos dentro de una misma especie, debido muchas veces a la superposición en algunas medidas. Asimismo, Peraza y colaboradores (2013) mencionan que las diferencias en los caracteres morfológicos pueden estar ligadas a factores ambientales que predisponen directamente el desarrollo de las poblaciones, en este caso de individuos de *Pratylenchus*.

A continuación, se presentan las medidas morfométricas, morfológicas (microfotografías) tomadas en machos y hembras de cada población de *Pratylenchus* asociada a los cultivos muestreados.

### *Pratylenchus coffeae*

(Ryss, 1988)

Cultivo: Plátano

**Mediciones:** Cuadro 2

**Descripción:** Figura 3.

#### **Hembra**

Presentó una variación en longitud y diámetro del cuerpo de 420,9 a 700,0  $\mu\text{m}$  de largo y 17,3 a 25,0  $\mu\text{m}$  de ancho (MBW), así como en la forma y grosor de la cola. Región labial con tres anillos. Borde posterior del marco labial fuertemente esclerotizado. Campo lateral con cuatro líneas, con bandas internas entre las líneas. Tamaño del estilete entre 13,6 a 18  $\mu\text{m}$ ,

con un DGO de 1,6 a 3,6  $\mu\text{m}$  de largo. Apertura del orificio del poro excretor hasta la cabeza entre 73,8-109,4  $\mu\text{m}$  de longitud. Largo del esófago entre 113,1 a 151,4  $\mu\text{m}$ . Longitud de la vulva entre 80,0 a 142,9  $\mu\text{m}$ , se ubicó a 77,5-83,1 % con respecto a la longitud total del cuerpo. Gónada anterior con una longitud entre 129,8 a 307,3  $\mu\text{m}$ . Saco uterino postvulvar entre 16,7 a 31,7  $\mu\text{m}$  de largo. Forma de la cola variable, truncada o hemisférica de 20,0 a 30,0 anillos y de 24,4 a 37,0  $\mu\text{m}$  de largo.

## **Macho**

En las muestras recolectadas se encontraron en un 50% con respecto a las hembras en estudio. El largo del cuerpo osciló entre 468,6-562,3  $\mu\text{m}$ , con un MBW de 17,0-20,1  $\mu\text{m}$  de ancho. Estile entre 13,7 a 15,7  $\mu\text{m}$  de longitud y un DGO de 2,8 a 3,7  $\mu\text{m}$  de largo; con campo lateral de cuatro líneas. Poro excretor entre 81,5 a 96,5  $\mu\text{m}$  de longitud. Esófago entre 113,0 a 136,5  $\mu\text{m}$  de largo. Espícula entre 16,4 a 23,6  $\mu\text{m}$  de largo y el gubernáculo entre 3,0 a 5,8  $\mu\text{m}$  de longitud. La cola presentó un largo de 25,9 a 33,9  $\mu\text{m}$ .

## **Diagnóstico**

*P. coffeae* se caracteriza por tener la región labial con dos anillos. La espermateca es grande ampliamente ovalada casi redonda, con una relación de 76-84 % de la posición vulvar con respecto a la longitud del cuerpo. La cola es conoide variable en la parte terminal por lo general con forma de punta. Se puede distinguir de la especie estrechamente relacionada (*P. loosi*) por la anulación del cuerpo, la posición de la vulva, la forma de la cola es truncada o hemisférica en *P. coffeae*, y sin corte ni finamente apuntado en *P. loosi* (Castillo & Vovlas, 2007).

## **Tipo de hospedante y localidad**

La especie *P. coffeae* se encontró en raíz y suelo del cultivo de plátano en la localidad Talamanca, zona Huetar Atlántica, en la provincia de Limón, Costa Rica.

## Otros hospederos y localidades

Esta especie se encuentra extendida en América Central y del Sur. Se ha reportado en ñame y plátano en Belice (Bridge *et al.*, 1996); camote (*Dioscorea cayennensis* Lam.) (Moura *et al.*, 2001), tubérculos de papa (Kubo *et al.*, 2001) y Guanabana, *Annona muricata* L. (Moura *et al.*, 1998) en Brasil; banano en Colombia (Grislaes-Lopez & Lescot, 1999), Puerto Rico (Oramas y Román, 1982); ornamentales en Costa Rica (Marbán-Mendoza y Flores, 1993), Martinica (Quénéhervé *et al.*, 1997); arroz en Cuba (Fernandez y Ortega, 1998); abacá *Musa textilis* L. en Ecuador (Bridge, 1976); café (Pourjam *et al.*, 1999) y cítricos en Honduras (Pinochet *et al.*, 1978).

En el continente africano se ha reportado asociado a plátano en Camerún (Bridge *et al.*, 1995); Costa de Marfil (Adiko, 1988; Adiko & N'Guessan, 2001) y Nigeria (Speijer *et al.*, 2001). También en café en Ghana (Pourjam *et al.*, 1999); India (Giribabu & Saha, 2003) e Irán (Pourjam *et al.*, 1997, 1999), banano en Sur África (Daneel *et al.*, 2003) y Tanzania (Rajab *et al.*, 1999).

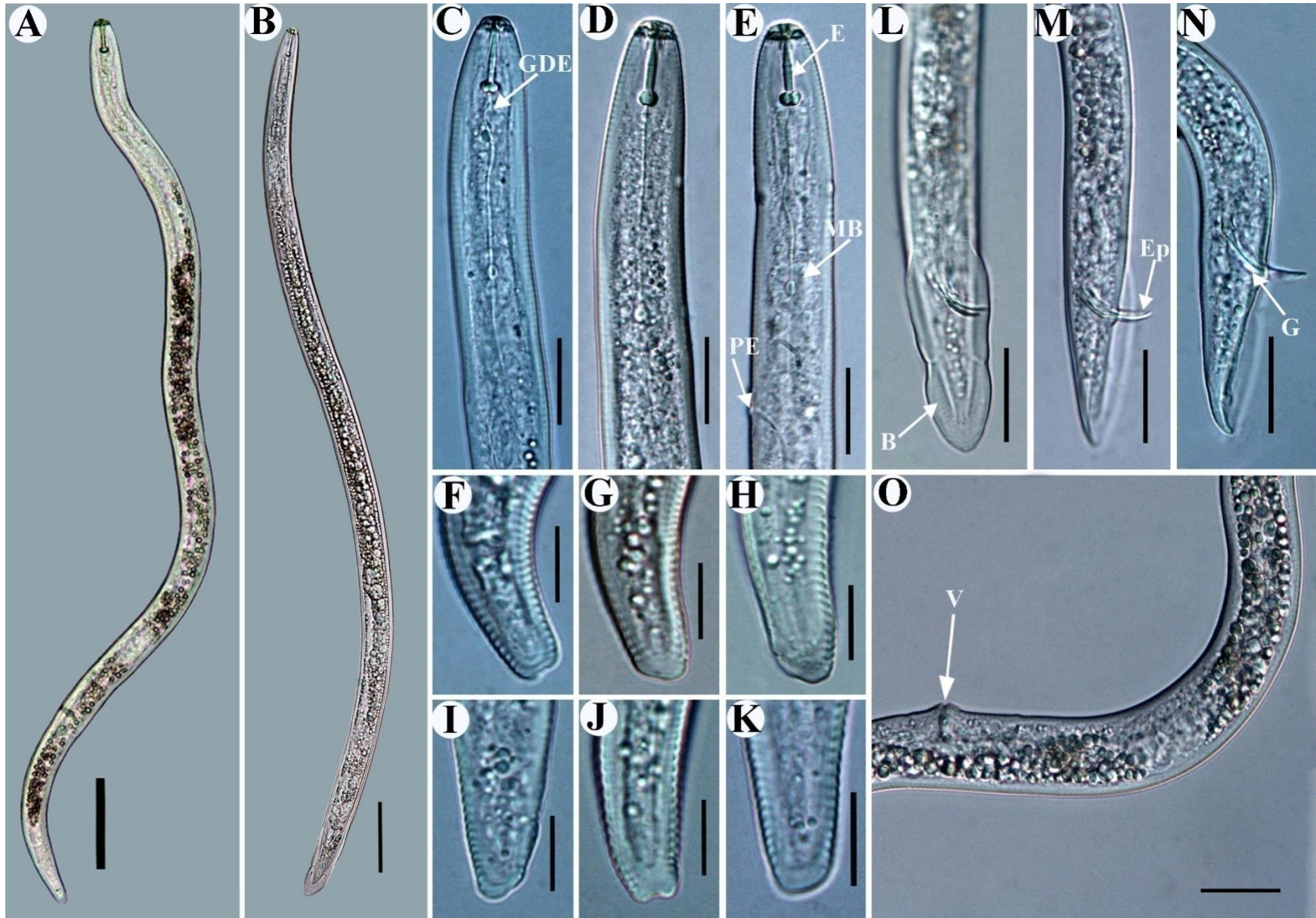
Así mismo, hay reportes de esta especie asociada a otros cultivos en otros países como banano (Chau *et al.*, 1997; Van den Berg *et al.*, 2006) y café en Vietnam (Ryss & Fam-Tkhan, 1989); en la India en los siguientes cultivos: cítricos (Bajaj & Bhatti, 1984), banano (Sundararaju *et al.*, 2002), palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) (Sundararaju & Ratnakaran, 2002), coco y nuez de areca (Rama & Dasgupta, 2000), jengibre (Rama & Dasgupta, 1998), plantas aromáticas y medicinales (Sivakumar & Vadivelu, 1997), guisante y cacahuete (Sharma *et al.*, 1992). En crisantemo en la India (Rashid & Khan, 1975), e Irán (Lee *et al.*, 2006) y finalmente, en camote en Japón (Gotoh, 1964; Iwahori & Sano, 2003).

**Tabla 2.** Medidas morfométricas de hembras y machos de la especie *P. coffeae* en estudio y su comparación con las mediciones de la población original descrita por Ryss, (1988). Localidad: Talamanca, Limón. Región Huetar Atlántica de Costa Rica. 2018.

Hospedero	Plátano ( <i>Musa Sp.</i> )		Ryss, 1988.	
	Hembra ( $\mu\text{m}$ )	Macho ( $\mu\text{m}$ )	Hembra ( $\mu\text{m}$ )	Macho ( $\mu\text{m}$ )
N°	20	10	10	10
<b>L</b>	***554,2±78,9(420,9-700,0)	515,3±32,2(468,6-562,3)	**620 (490-650)	**520 (440-600)
<b>A</b>	26,6±1,9 (23,2-30,9)	28,7±1,3 (26,9-30,7)	**28 (25-31)	**28 (25-32)
<b>B</b>	4,1±0,5 (3,2-4,9)	17,4±1,6 (14,3-19,9)	**5,9 (5,1-6,6)	**6,2 (5,6-6,9)
<b>C</b>	18,8±2,0 (14,4-21,7)	34,6±3,9 (26,3-40,7)	**21 (19-22)	**20 (18-23)
<b>c'</b>	2,3±0,2 (2,0-2,7)	2,0±0,3 (1,6-2,5)	*3,2	*2,0
<b>G1</b>	32,7±5,7 (24,0-43,9)	-	*41,5	-
<b>O</b>	18,3±3,6 (10,5-22,5)	21,8±2,6 (18,5-25,5)	*18,7	*20
<b>M</b>	43,4±3,3 (38,6-49,4)	44,4±2,7 (41,1-50,4)	*50	*40
<b>MB</b>	43,7±4,8 (34,1-52,8)	37,7±5,6 (27,1-42,4)	*41,9	*41
<b>MBW</b>	20,9±2,5 (17,3-25,0)	18,8±0,9 (17,0-20,1)	*20	*14
<b>ABW</b>	12,7±1,5 (10,8-16,8)	15,0±1,7 (12,0-17,8)	*10,0	*12
<b>Anulaciones labiales</b>	1,6±0,5 (1,0-2,0)	1,9±0,3 (1,0-2,0)	*2	*2
<b>Longitud estilete</b>	16,7±1,0 (13,6-18,0)	14,9±0,7 (13,7-15,7)	**17 (15-18)	**16 (15-17)
<b>Conus</b>	6,9±0,5 (6,1-7,8)	6,6±0,4 (6,0-7,3)	*8	*6
<b>DGO</b>	2,9±0,6 (1,6-3,6)	3,2±0,3 (2,8-3,7)	*3	*3
<b>Longitud poro excretor</b>	93,7±11,4 (73,8-109,4)	89,2±5,4 (81,5-96,5)	*65	*70
<b>Longitud esófago</b>	135,5±13,5 (113,1-151,4)	126,0±8,4 (113,0-136,5)	*106	*101
<b>Longitud post-carpus</b>	59,4±10,0 (39,0-79,9)	47,1±5,1 (36,8-53,5)	*42,5	*41,5
<b>N° líneas laterales</b>	4,1±0,2 (4,0-5,0)	4±0,0 (4,0-4,0)	*4	*4
<b>V</b>	109,4±16,9 (80,0-142,9)	-	*100	-
<b>LGA</b>	181,0±40,8 (129,8-307,3)	-	*200	-
<b>Saco uterino postvulvar</b>	24,2±4,7 (16,7-31,7)	-	*21,5	-
<b>V%</b>	80,2±1,7 (77,5-83,1)	-	**79 (76-82)	-
<b>Longitud cola</b>	29,5±2,7 (24,4-37,0)	29,8±2,8 (25,9-33,9)	*26,3	*25
<b>Anulaciones cola</b>	22,2±2,3 (20,0-30,0)	-	*26	-
<b>Longitud espícula</b>	-	18,2±2,0 (16,4-23,6)	-	**17 (16-18)
<b>Longitud gubernáculo</b>	-	3,8±0,8 (3,0-5,8)	-	**6 (5-7)

Mediadas estimadas a partir de la fig. Set. 1 N°6 (Zimmermann, 1898\*) de la descripción original de (Ryss, 1988\*\*).

\*\*\*Promedio ± Desviación Estándar (mínimo-máximo). **L** (Longitud del cuerpo). **A** (L/MBW). **B** (L/Longitud esófago). **C** (L/Longitud cola). **c'** (Longitud cola/ ABW). **G1** (Longitud gónada anterior\*100/L). **O** (DGO/Longitud estilete\*100). **m** (Longitud conus/Longitud estilete\*100). **MB** (Longitud post-carpus\*100/ Longitud esófago). **MBW** (Diámetro del ancho máximo del cuerpo). **ABW** (Diámetro del cuerpo a nivel del ano). **Anulaciones labiales** (Número de anulaciones en la base de la cabeza). **Longitud del estilete** (Longitud de la base de los nódulos hasta la parte anterior del estilete). **Conus** (Longitud de la parte media hasta la posterior del estilete) **DGO** (Longitud de la base de los nódulos hasta el orificio de la glándula dorsal). **Longitud poro excretor** (Longitud de la apertura del orificio del poro excretor hasta la cabeza). **Longitud esófago** (Longitud desde la cabeza hasta el final del esófago). **Longitud post-carpus** (Longitud de la base del corpus hasta final de esófago). **V** (Longitud de la apertura vulvar hasta la cola). **LGA** (Longitud gónada anterior) (Longitud de la apertura vulvar hasta final de la gónada anterior). **Saco uterino postvulvar** (Longitud de la apertura vulvar hasta el final del saco uterino postvulvar). **V%** ((V\*100)/L-100). **Longitud de la cola** (De la apertura anal hasta el final de la cola). **Anulaciones de la cola** (Número de anulaciones desde la apertura anal hasta final de la cola). **Longitud espícula** (Longitud de la base hasta la parte posterior de la espícula). **Longitud gubernáculo** (Longitud de la base hasta la parte posterior del gubernáculo).



**Figura 3.** Fotomicrografías de *P. coffeae* en platano. A. Hembra. B. Macho. C, D y E. Región anterior de la hembra, mostrando: Glándula Dorsal esofágica (GDE), estructura del Bulbo Medio (MB), poro excretor (PE) y estilete (E). F, G, H, I, J y K. Región posterior de la hembra. L, M, N. Vista de la cola del macho con su espícula (E), bursa (B) y gobernaculo (G). O. Región posterior de la hembra, vulva (V). Escalas: A: 50  $\mu$ m, B: 30  $\mu$ m, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O: 20  $\mu$ m).

El análisis morfométrico, junto con las descripciones realizadas por Bridge *et al.* (1996) en Belice; Moura *et al.* (2001) en Brasil; Bridge (1976) en Ecuador; Marbán-Mendoza y Flores (1993) y Ryss (1988) en Costa Rica, permitieron la identificación de la población de *P. coffeae* asociada al cultivo de plátano. Según Ryss (1988), la especie *P. coffeae* se diferencia de otras especies de *Pratylenchus* por el número de anulaciones labiales (2), porcentaje vulvar ♀ 79% (76-82%), largo del saco uterino ♂ (21,5), la forma de la cola subesférica lisa y presencia de machos que presentan un largo de la espícula de ♂ (17,0) y un gubernáculo de ♂ (6,0). Al comparar las medidas de esta investigación con la primera descripción de la especie, se observó que los especímenes presentaban dos anulaciones labiales, un porcentaje vulvar de ♀ 80,2% (77,5-83,1%), un largo del saco uterino postvulvar de ♀ (24,2) y una forma de la cola esférica con terminación irregular. Asimismo, la presencia de machos con un largo de la espícula de ♂ (18,2) y un gubernáculo de ♂ (3,8). Además, coincidieron otras medidas como largo del estilete, número de líneas laterales, ancho del ABW, los radios, c y c', largo y número de anulaciones de la cola.

De acuerdo con Silva e Inomoto, (2002) la especie *P. coffeae* está estrechamente relacionada al cultivo del café en el país; no obstante, Fernandez y Quesada, (2013) y Esquivel y Pereza, (2010) lo asocian al cultivo de banano, en la región Huetar Norte. Los nematodos fitoparásitos más importantes en musáceas son *Radopholus*, *Pratylenchus* y *Meloidogyne* (Guzmán *et al.*, 2013). Según Gowen *et al.*, (2005), *P. coffeae* se encuentra dentro de los nematodos más comunes en plantaciones de musáceas en el mundo y se caracterizan por causar la destrucción de las raíces primarias en las plantas, provocando hasta un 30% de pérdidas si no se realizan controles de las poblaciones.

## ***Pratylenchus zeae***

(Graham, 1951)

Cultivo: Pasto Estrella

**Mediciones:** Cuadro 3

**Descripción:** Figura 4.

### **Hembra**

La longitud del cuerpo varió de 306,5 a 440,9  $\mu\text{m}$  y presentó un MBW de 16,4 a 19,8  $\mu\text{m}$  de ancho. Región labial mostró tres anillos. Estilete entre 13,2 a 16,1  $\mu\text{m}$  de largo con un DGO de 2,0 a 3,0  $\mu\text{m}$  de longitud. Campos laterales con cuatro líneas extendidas hasta el final de la cola. Apertura del orificio del poro excretor hasta la cabeza entre 54,7 a 78,1  $\mu\text{m}$  de largo. Esófago con una longitud de 77,3 a 109,5  $\mu\text{m}$ . Gónada anterior entre 66,2 a 189,2  $\mu\text{m}$  de largo. Saco uterino postvulvar entre 10,1 a 26,4  $\mu\text{m}$  de longitud. Espermateca redonda y pequeña. Vulva con un largo de 87,5 a 123,0  $\mu\text{m}$  y representó un 66 a 75% con respecto a la longitud del cuerpo. Cola variable, por lo general en forma de punta, estrechamente redondeada y lisa, con una longitud de 18,4 a 26,3  $\mu\text{m}$  y entre 16 a 24 anulaciones.

### **Macho**

Los machos rara vez se encuentran presentes, en este estudio no se encontraron especímenes.

## ***Pratylenchus zeae***

(Graham, 1951)

Cultivo: Arroz

**Mediciones:** Cuadro 3

**Descripción:** Figura 5.

### **Hembra**

La longitud del cuerpo varió de 341,3 a 533,9  $\mu\text{m}$  y presentó un MBW de 16,3 a 21,6  $\mu\text{m}$  de ancho. Región labial con tres anillos. Estilete entre 13,1 a 15,7  $\mu\text{m}$  de largo con un DGO de 1,6 a 2,9  $\mu\text{m}$  de longitud. Campos laterales con cuatro líneas extendidas hasta el final de la cola. Apertura del orificio del poro excretor hasta la cabeza entre 50,6 a 86,1  $\mu\text{m}$  de largo. Esófago con una longitud entre 99,2 a 132,2  $\mu\text{m}$ . Gónada anterior entre 102,8 a 155,9  $\mu\text{m}$  de largo. Saco uterino postvulvar entre 19,0 a 34,2  $\mu\text{m}$  de longitud. Espermateca redonda y pequeña. Vulva entre 101,4 a 158,1  $\mu\text{m}$  de longitud y representó un 69 a 75% con respecto a la longitud del cuerpo. Cola variable, por lo general en forma de punta, estrechamente redondeada y lisa, con una longitud entre 17,8 a 30,7  $\mu\text{m}$  y entre 20,0 a 27,0 anulaciones.

### **Macho**

Los machos rara vez se encuentran presentes, en este estudio no se encontraron especímenes.

### **Diagnóstico**

Se caracteriza por la región labial de tres anillos. La espermateca es de forma redonda y pequeña con una relación de 68-76% de la posición vulvar con respecto a la longitud del cuerpo. La cola es conoide variable en la parte terminal por lo general con forma de punta. Se distingue de especies estrechamente relacionadas como *P. bolivianus* y *P. curvicauda*, por

la longitud del estilete, la posición de la vulva, la forma de la espermateca y de la cola. Los machos rara vez se encuentran presentes; sin embargo, no son esenciales para la reproducción. No obstante, en las ocasiones en que se encontró un macho, éste presentó una espícula delgada en forma de arco de 14 a 15  $\mu\text{m}$  de largo, con un gubernáculo de 4 a 5  $\mu\text{m}$  de longitud y márgenes de la bursa ligeramente dentados de acuerdo con Castillo y Vovlas (2007). Estudios de Inserra *et al.* (2005), mostraron similitud entre *P. jordanensis* y *P. zaeae*, lo que sugieren que el primero es un sinónimo de este último.

### **Tipo de hospedante y localidad**

La especie *P. zaeae* se encontró en raíz y suelo del cultivo de pasto estrella en la localidad San Vicente de Ciudad Quesada, San Carlos, en la provincia de Alajuela, Costa Rica. Asimismo, se encontró asociado a raíz y suelo del cultivo de arroz en la localidad de Laurel, Corredores, en la provincia de Puntarenas, Costa Rica.

### **Otros hospederos y localidades**

Esta especie se encontró asociada en plantaciones de maíz en Georgia (Johnson *et al.*, 1974), Bulgaria (Stoyanov, 1977), Rusia (Ryss, 1988), Filipinas (Davide, 1988) Camerún (Noupadja, 1997), Carolina del Sur (Robbins *et al.*, 1987), Namibia (De Waele *et al.*, 1998), Argentina (Doucet & Cagnolo, 1998), Belice (Bridge *et al.*, 1996), Kenia (Van den Berg *et al.*, 2001), Canada (Kanwar *et al.*, 1996).

Además, se encontró en arroz en Camerun (Samson & Geraert, 1975), Sudáfrica (De Waele & Van Den Berg, 1988), Cuba (Fernández y Ortega, 1998), Argentina (Doucet & Cagnolo, 1998), Guinea, Benin y Togo (Coyne *et al.*, 2000), Nigeria (Babatola, 1984), Costa de Marfil (Coyne & Plowright, 2002), Belice (Bridge *et al.*, 1996), Canadá (Sharma *et al.*, 1992), Venezuela (Medina *et al.*, 2009). En caña de azúcar en Canadá (Townshend *et al.*, 1978), Mozambique (Oever *et al.*, 1998), República Dominicana (Román & Grullon, 1975); Panamá (Tarté *et al.*, 1977); Costa Rica (López y Salazar, 1990); Colombia (Agudelo & Volcy, 1998); Australia (Blair *et al.*, 1999), Martinica (Delaville *et al.*, 1996); Japón (Uehara *et al.*, 1998);

Venezuela (Crozzoli, 2002); Brasil (Dinardo-Miranda *et al.*, 2003), Costa de Marfil (Machado *et al.*, 2007), Sudáfrica (Cadet *et al.*, 2004), Brasil (Barbosa y Santos, 2009), India (Mehta y Sundararaj, 1990).

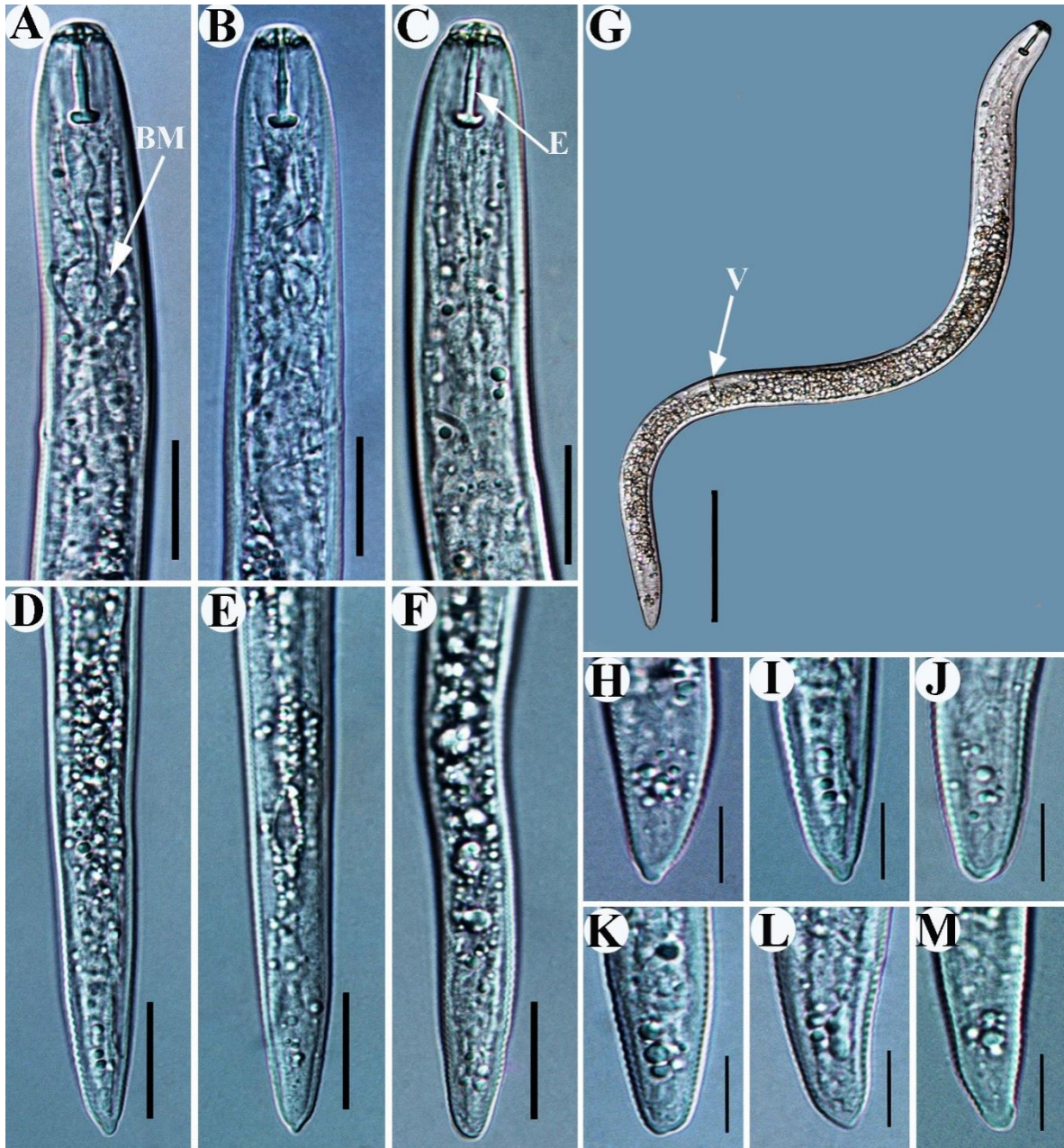
Por otra parte, se identificó su presencia en soja en Arkansas (Robbins *et al.*, 1987), Zambia (Lawn *et al.*, 1988), Egipto (Salem *et al.*, 1994) y Sudáfrica (Fourie *et al.*, 2001); en sorgo en Mississippi (Cuarezma-Teran *et al.*, 1984); algodón en Florida (Robbins *et al.*, 1989); café en Hawaii (Schenck & Schmitt, 1992); cultivos de subsistencia y malezas en Malawi (Hillocks *et al.*, 1995). *Brachiaria brizantha* (Sharma *et al.*, 2001), *Panicum maximum*, *P. purpurascens* (Lordello Mello Filho, 1970) y frijol en Brasil; sorgo (Bee-Rodríguez y Ayala, 1977) y cítricos en Puerto Rico (Crozzoli *et al.*, 1998). Gramíneas en Sudáfrica y USA, Praderas de Florida (Waeyenberge *et al.*, 2009; Waeyenberge *et al.*, 2000) y en Canadá (Yu, 2008), cultivos de leguminosas en Canadá (Ali & Askary, 2001), en diferentes cultivos en Tailandia (Toida *et al.*, 1996); garbanzo en Turquía (Di Vito *et al.*, 1994). En cultivo de papaya en Pakistán (Khan *et al.*, 2007) y en diversos cereales en Uganda (Talwana *et al.*, 2008).

**Tabla 3.** Medidas morfométricas de hembras de la especie *P. zae* en estudio y su comparación con las mediciones de la población original descrita por Graham (1951). Localidad San Vicente de Ciudad Quesada, San Carlos, Alajuela, Costa Rica. 2018.

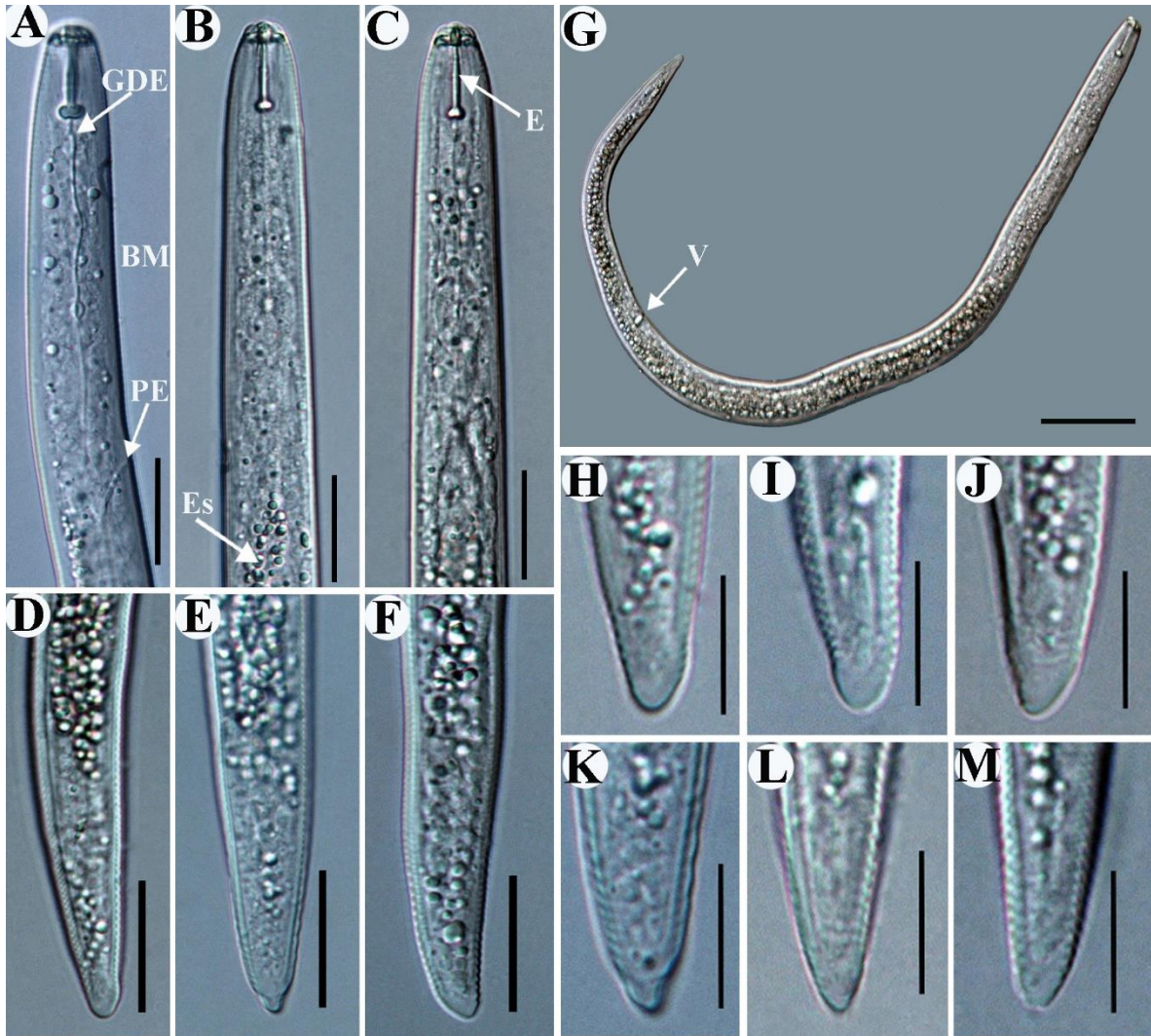
Hospedero	<i>(Cynodon nlemfuensis)</i> Hembras ( $\mu\text{m}$ )	<i>(Oryza sativa)</i> Hembras ( $\mu\text{m}$ )	Graham, 1951. Hembras ( $\mu\text{m}$ )
N°	20	20	
<b>L</b>	***354,3±28,4 (306,5-440,9)	430,2±38,6 (341,3-533,9)	**540,0 (360,0-580,0)
<b>A</b>	19,6±1,7 (15,8-23,1)	23,7±2,6 (19,4-30,9)	**27,0 (25,0-30,0)
<b>B</b>	3,7±0,3 (3,2-4,6)	3,8±0,3 (3,1-4,4)	**6,5 (5,4-8,0)
<b>C</b>	15,9±2,2 (12,7-21,0)	17,0±1,5 (14,6-19,2)	**15,2 (17,0-21,0)
<b>c'</b>	2,1±0,1 (1,9-2,4)	2,5±0,3 (1,8-2,9)	*2,5
<b>G1</b>	24,6±3,6 (19,6-31,5)	28,9±3,8 (23,5-38,4)	*21,3
<b>O</b>	17,6±2,4 (13,0-22,7)	16,6±2,4 (11,9-20,4)	-
<b>M</b>	46,7±3,7 (37,3-54,9)	46,7±3,3 (37,3-50,7)	*40,6
<b>MB</b>	39,2±3,5 (30,9-46,9)	42,0±3,2 (37,0-49,7)	*41,7
<b>MBW</b>	18,1±0,8 (16,4-19,8)	18,2±1,4 (16,3-21,6)	*23,7
<b>ABW</b>	10,7±0,7 (9,4-11,9)	10,4±0,6 (9,0-12,2)	*10,0
<b>Anulaciones labiales</b>	2,0±0,2 (1,0-2,0)	2,1±0,2 (2,0-3,0)	3
<b>Longitud estilete</b>	14,1±0,6 (13,2-16,1)	14,4±0,8 (13,1-15,7)	**15,5 (15,0-17,0)
<b>Conus</b>	6,6±0,4 (5,9-7,4)	6,7±0,7 (5,0-7,6)	*6,3
<b>DGO</b>	2,5±0,3 (2,0-3,0)	2,4±0,4 (1,6-2,9)	-
<b>Longitud poro excretor</b>	67,0±6,0 (54,7-78,1)	72,2±9,9 (50,6-86,1)	*70,0
<b>Longitud esófago</b>	95,0±7,9 (77,3-109,5)	114,2±8,4 (99,2-132,2)	*113,8
<b>Longitud post-corporis</b>	37,7±5,3 (26,8-49,2)	48,0±5,0 (40,4-58,0)	*47,5
<b>N° líneas laterales</b>	3,8±0,6 (2,0-4,0)	4,0±0,0 (4,0-4,0)	*4
<b>V</b>	105,1±9,8 (87,5-123,0)	122,9±12,2 (101,4-158,1)	*86,8
<b>Longitud gónada anterior</b>	87,1±13,2 (66,9-198,2)	123,9±15,4 (102,8-155,9)	*115,0
<b>Saco uterino postvulvar</b>	17,2±4,2 (10,1-26,4)	24,6±3,6 (19,0-34,2)	*25,0
<b>V%</b>	70±2,2 (66-75)	71±1,7 (69-75)	**71,0 (68,0-76,0)
<b>Longitud cola</b>	22,6±2,3 (18,4-26,3)	25,6±3,5 (17,8-30,7)	*25,0

Medidas estimadas a partir de la fig. 108 (Castillo y Vovlas, 2007\*) de la descripción original de (Van der Berg, 1971\*\*).

\*\*\*Promedio ± Desviación Estándar (mínimo-máximo). **L** (Longitud del cuerpo). **A** (L/MBW). **B** (L/Longitud esófago). **C** (L/Longitud cola). **c'** (Longitud cola/ ABW). **G1** (Longitud gónada anterior\*100/L). **O** (DGO/Longitud estilete\*100). **m** (Longitud conus/Longitud estilete\*100). **MB** (Longitud post-corporis\*100/ Longitud esófago). **MBW** (Diámetro del ancho máximo del cuerpo). **ABW** (Diámetro del cuerpo a nivel del ano). **Anulaciones labiales** (Número de anulaciones en la base de la cabeza). **Longitud del estilete** (Longitud de la base de los nódulos hasta la parte anterior del estilete). **Conus** (Longitud de la parte media hasta la posterior del estilete) **DGO** (Longitud de la base de los nódulos hasta el orificio de la glándula dorsal). **Longitud poro excretor** (Longitud de la apertura del orificio del poro excretor hasta la cabeza). **Longitud esófago** (Longitud desde la cabeza hasta el final del esófago). Longitud post-corporis (Longitud de la base del corpus hasta final de esófago). **V** (Longitud de la apertura vulvar hasta la cola). **LGA** (Longitud gónada anterior) (Longitud de la apertura vulvar hasta final de la gónada anterior). **Saco uterino postvulvar** (Longitud de la apertura vulvar hasta el final del saco uterino postvulvar). **V%** ((V\*100)/L-100). **Longitud de la cola** (De la apertura anal hasta el final de la cola). **Anulaciones de la cola** (Número de anulaciones desde la apertura anal hasta final de la cola). **Longitud espícula** (Longitud de la base hasta la parte posterior de la espícula). **Longitud gubernáculo** (Longitud de la base hasta la parte posterior del gubernáculo).



**Figura 4.** Fotomicrografías de *P. zae* en pasto estrella. A, B, C. Vista lateral de la parte anterior del cuerpo de la hembra mostrando estructura del Bulbo Medio (MB) y estilete (E). D, E y F. Vista lateral de la cola de la hembra. G. Hembra mostrando la vulva (V). H, I, J, K, L y M. Parte terminal de la cola de hembras. Escalas G: 50  $\mu$ m. A, B, C, D, E, F, H, I, J, K, L, M: 20  $\mu$ m).



**Figura 5.** Fotomicrografías de *P. zae* en arroz. A, B, C. Vista lateral de la parte anterior del cuerpo de la hembra mostrando: Glándula Dorsal esofágica (GDE), Bulbo Medio (MB), Poro Excretor (PE) y Estilete (E). D, E y F. Vista lateral de la cola de la hembra. G. Hembra mostrando la Vulva (V). H, I, J, K, L y M. Parte terminal de la cola de hembras. Escalas G: 40  $\mu$ m. A, B, C, D, E, F, H, I, J, K, L, M: 20  $\mu$ m).

El análisis morfométrico, junto con las descripciones realizadas Doucet y Cagnolo (1998) en Argentina; López y Salazar (1990) en Costa Rica; (Fernández y Ortega, 1998) en Cuba; Yu (2008) en Canadá y Graham (1951), permitieron la identificación de la población de *P. zae* asociada al cultivo de pasto estrella y arroz. Según Graham (1951), la especie de *P. zae* se distingue de otras especies de *Pratylenchus* por el número de anulaciones labiales (3), longitud del estilete ♀ (15,5), porcentaje vulvar ♀ 71,0% (68-76), una forma de la cola conoide puntiaguda. Al comparar las medidas de esta investigación con la primera descripción de la especie, se encontró que los especímenes presentaban tres anulaciones

labiales en pasto estrella (PE) y arroz (AR), longitud del estilete de ♀ (14,1) en PE y ♀ (14,4) en AR, porcentaje vulvar de ♀ 70% (66-75%) en PE y ♀ 71% (69-75%) en AR, una cola conoide con una pequeña protuberancia de forma puntiaguda en ambos cultivos. Además, medidas como longitud del conus, ancho de ABW, número de líneas laterales, longitud y número de anulaciones de la cola, tuvieron concordancia con la descripción original.

Es frecuente encontrar especies de *P. zae* en asocio a plantaciones arroceras de Costa Rica (López *et al.* 1987; López y Salazar 1988; Araya 2008; Guzmán *et al.* 2011). El Servicio Fitosanitario del Estado (SFE) en su informe 2013, mencionan que los nematodos de mayor importancia para el cultivo del arroz en Costa Rica son: *Hirschmanniella oryzae*, *A. besseyi*; *Criconemella* sp., *Helicotylenchus* sp., *Longidorus* sp., *M. arenaria*, *M. exigua*, *M. incognita*, *M. salasi*, *Paratrichodorus* sp., *P. zae*, *Rotylenchulus* sp., *Trichodorus* sp., *Tylenchorhynchus* sp. y *Xiphinema* sp. (Fernández y Quesada, 2013). Además, Duncan y Moens (2006), concuerdan en indicar que *P. zae* ataca plantaciones de cereales, cultivos de forraje, caña de azúcar y tabaco en regiones subtropicales.

### ***Pratylenchus brachyurus***

(Ven der Berg, 1971)

Cultivo: Piña (San Carlos, Alajuela)

**Mediciones:** Cuadro 4

**Descripción:** Figura 6.

#### **Hembra**

La longitud del cuerpo varió de 464,3 a 639,0  $\mu\text{m}$  y presentó un MBW de 19,1 a 27,7  $\mu\text{m}$  de ancho. Región labial con tres anillos. Estilete entre 15,2 a 19,1  $\mu\text{m}$  de largo con un DGO de 2,1 a 3,8  $\mu\text{m}$  de longitud. Campos laterales con cuatro líneas extendidas hasta el final de la cola. Apertura del orificio del poro excretor hasta la cabeza entre 81,3 a 117,3  $\mu\text{m}$  de largo. Esófago mostró una longitud entre 112,6 a 162,5  $\mu\text{m}$ . Gónada anterior entre 117,1 a 209,9

µm de largo. Saco uterino postvulvar entre 15,6 a 34,0 µm de longitud. Espermateca redonda y pequeña. Vulva presentó entre 72,3 a 100,4 µm de longitud y representó un 81-87% con respecto a la longitud del cuerpo. Cola variable, por lo general en forma de punta, estrechamente redondeada y lisa, con una longitud entre 22,5 a 32,7µm y entre 13 a 21 anulaciones.

### **Macho**

Los machos rara vez se encuentran presentes, en este estudio no se encontraron especímenes.

### ***Pratylenchus brachyurus***

(Ven der Berg, 1971)

Cultivo: Piña (Guápiles, Limón)

**Mediciones:** Cuadro 4

**Descripción:** Figura 7.

### **Hembra**

La longitud del cuerpo varió de 446,1 a 756,1µm y presentó un MBW de 18,7 a 32,0 µm de ancho. Región labial con tres anillos. Estilete entre 16,9 a 20,2µm de largo con un DGO de 7,0 a 9,2 µm de longitud. Campos laterales con cuatro líneas extendidas hasta el final de la cola. Apertura del orificio del poro excretor hasta la cabeza entre 76,1 a 118,4 µm de largo. Esófago entre 121,8 a 169,8 µm de longitud. Gónada anterior entre 102,6 a 279,9 µm de largo. Saco uterino postvulvar entre 15,0 a 24,4 µm de longitud. Espermateca redonda y pequeña. Vulva entre 68,5 a 102,0 µm de largo y representó un 82-87% con respecto a la longitud del cuerpo. Cola variable, por lo general en forma de punta, estrechamente redondeada y lisa, con una longitud de 23,3 a 36,4 µm y entre 14 a 21 anulaciones.

## **Macho**

Los machos rara vez se encuentran presentes, en este estudio no se encontraron especímenes.

## **Diagnóstico**

Se caracteriza por presentar una región labial de 2 anillos y con una vulva ubicada entre 82 y 89% del cuerpo. La espermateca discreta no funcional, un saco uterino después de la vulva. La cola ampliamente conoide, lisa y redondeada, truncada o espatulada en la punta. Presencia de machos es mura rara (Castillo & Vovlas 2007). Esta especie se relaciona con *P. japonicus* y *P. neobrachyurus*; sin embargo, difiere por el cuerpo y la longitud del estilete, la forma de la región labial, la forma de los mandos del estilete, la posición de la vulva y la forma de la cola de la hembra (Corbett & Clark 1983).

## **Tipo de hospedante y localidad**

La especie *P. brachyurus* se encontró en raíz y suelo del cultivo de piña en las localidades de San Carlos<sup>1</sup>, en la provincia de Alajuela, y en Guápiles<sup>2</sup>, provincia de Limón, Costa Rica.

## **Otros hospederos y localidades**

Ha sido reportada en algunos cultivos en África, por ejemplo en camote en Etiopia (Agu, 2004); arroz en Costa de Marfil (Coyne *et al.*, 1999), Guinea (Coyne *et al.*, 1996), Sur África (Van den Berg & De Waele, 1989) y plátano en Costa de Marfil (Adiko, 1988), Nigeria (Speijer *et al.*, 2001); maíz en Kania (Van den Berg *et al.*, 2001), Malawi (Khonga & Hillocks, 1996), Sur África (De Waele & Jordaan, 1988); tabaco en Madagascar (Baudin & Huu-Hai, 1973); soja en Sur África (Fourie *et al.*, 2001), Maní en Sur África (Venter *et al.*, 1992), Trigo (Jordaan *et al.*, 1992), y papa en Sur África (Koen, 1967); piña en Uganda (Bafokuzara, 1982); piña al Oeste de África (Guerout, 1975).

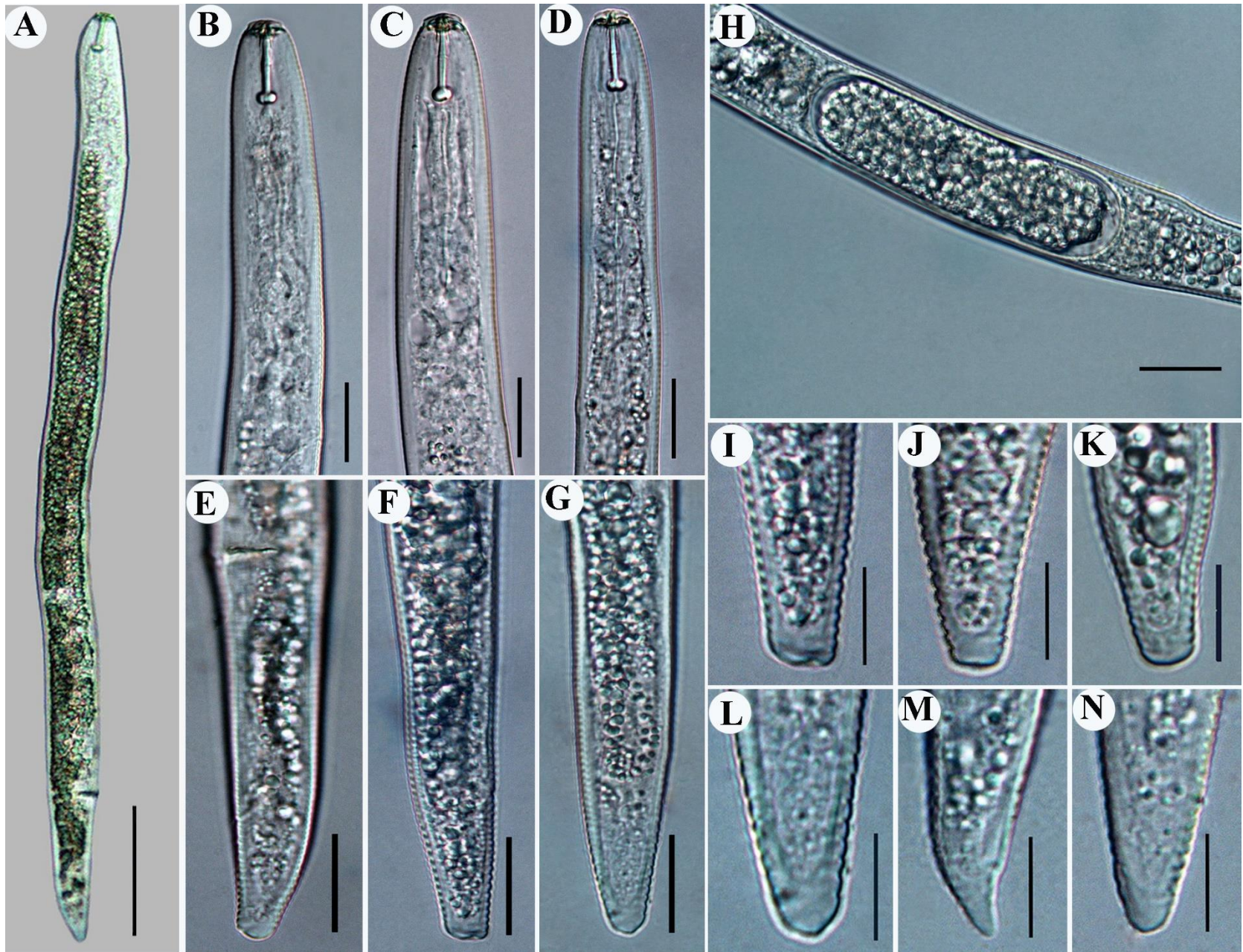
Está ampliamente distribuida en varios países de América central y sur: maíz (Lordello *et al.*, 1992; Sharma *et al.*, 2000), algodón (Tihohod *et al.*, 1991) y piña en Brasil (Monteiro & Lordello, 1972), piña en Costa Rica (Lopez y Salazar, 1990) y Venezuela (Jimenez *et al.*, 2001); pastos en Colombia (Stanton *et al.*, 1989); caucho en Costa Rica (Martinez *et al.*, 1972), café en Costa Rica (Lordello *et al.*, 1968), Brasil (Oliveira *et al.*, 1999); Cuba (Fernandez Díaz-Silveira y Ortega Herrera, 1998); caña de azúcar en Costa Rica (Lordello & de Mendoça, 1970) *Eucalyptus* spp. en Costa Rica (Lordello, 1967), algodón y soja en Costa Rica (Lordello *et al.*, 1958), Brasil (Sharma *et al.*, 2002); papas (Kubo *et al.*, 2001), frijoles (Rossi *et al.*, 2000b) y cultivos frutales en Brasil (De Souza *et al.*, 1999); cítricos en Honduras (Pinochet *et al.*, 1978), Venezuela (Crozzoli *et al.*, 1998); fresa en México (Sandoval-Hernandez & Téliz-Ortíz, 1990); cucurbitáceas en Venezuela (Naveda *et al.*, 1999), girasoles y ajonjolí en Venezuela (Sharma & Amabile, 1998a, b), guaba en Venezuela (Crozzoli *et al.*, 1991).

**Tabla 4.** Medidas morfométricas de hembras de la especie *P. brachyurus* en estudio y su comparación con las mediciones de la población original descrita por Van der Berg, (1971). Localidad San Vicente de Ciudad Quesada<sup>1</sup>, San Carlos, Alajuela y Guápiles<sup>2</sup>, Limón, Costa Rica. 2018.

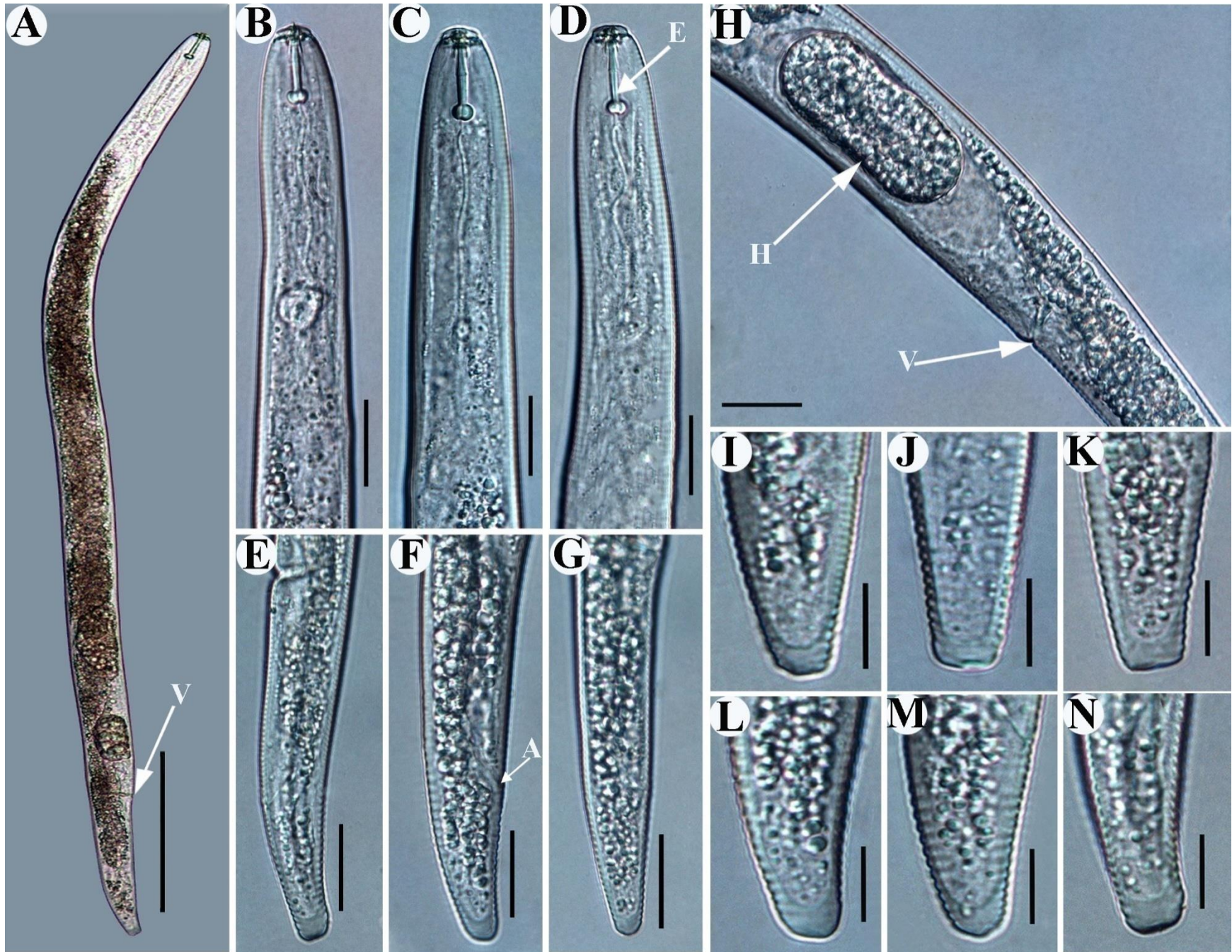
Hospedero	( <i>Ananas comosus</i> ) <sup>1</sup> Hembras ( $\mu\text{m}$ )	( <i>Ananas comosus</i> ) <sup>2</sup> Hembras ( $\mu\text{m}$ )	Van der Berg, 1971 Hembra ( $\mu\text{m}$ )
N°	20	20	**12
<b>L</b>	***555,4±54,7 (464,3-639,0)	575,6±73,3 (446,1-756,1)	**560 (520-600)
<b>A</b>	23,3±2,0 (18,2-25,9)	23,1±2,0 (18,3-26,5)	**20 (18-23)
<b>B</b>	4,0±0,5 (2,9-4,8)	4,0±0,5 (3,3-5,5)	**3,9 (3,4-5,2)
<b>C</b>	20,6±2,9 (14,4-25,6)	19,5±2,0 (15,7-24,1)	**19 (16-23)
<b>c'</b>	2,0±0,2 (1,7-2,3)	2,0±0,2 (1,5-2,6)	*2,4
<b>G1</b>	28,8±5,0 (18,3-37,8)	30,5±5,6 (20,3-38,3)	*18,3
<b>O</b>	14,6±2,2 (11,8-21,1)	15,0±2,5 (11,1-20,2)	*12,5
<b>M</b>	43,7±2,9 (38,0-48,3)	44,4±3,1 (39,3-51,7)	*50
<b>MB</b>	45,1±5,7 (33,8-55,3)	43,3±5,4 (26,3-50,7)	*40,6
<b>MBW</b>	23,9±2,2 (19,1-27,7)	25,0±3,5 (18,7-32,0)	*21
<b>ABW</b>	13,9±1,1 (12,0-15,7)	14,9±1,7 (11,9-17,9)	*14
<b>Anulaciones labiales</b>	2,0±0,0 (2,0-2,0)	2,0±0,0 (2,0-2,0)	*2
<b>Longitud estilete</b>	17,6±1,0 (15,2-19,1)	18,4±1,0 (16,9-20,2)	**19 (18-21)
<b>Conus</b>	7,7±0,6 (6,5-8,7)	8,1±0,6 (7,0-9,2)	*6,5
<b>DGO</b>	2,6±0,4 (2,1-3,8)	2,8±0,5 (2,1-3,9)	*3
<b>Longitud poro excretor</b>	102,5±8,4 (81,3-117,3)	98,7±11,0 (76,1-118,4)	*97,4
<b>Longitud esófago</b>	139,1±17,2 (112,6-162,5)	143,2±11,5 (121,8-169,8)	*155,3
<b>Longitud post-corporis</b>	62,3±7,7 (49,1-76,2)	62,1±9,6 (40,9-82,1)	*63,1
<b>N° líneas laterales</b>	4,0±0,0 (4,0-4,0)	4,0±2,1 (4,0-4,0)	*4
<b>V</b>	85,4±9,2 (72,3-100,4)	86,7±9,0 (68,5-102,0)	*94,7
<b>Longitud gónada anterior</b>	159,1±28,2 (117,1-209,9)	176,1±42,3 (102,6-279,9)	*102,7
<b>Saco uterino postvulvar</b>	23,6±4,4 (15,6-34,0)	18,6±2,1 (15,0-24,4)	*30,3
<b>V%</b>	85±1,5 (81-87)	85±1,3 (82-87)	**86 (84-87)
<b>Longitud cola</b>	27,2±3,1 (22,5-32,7)	29,7±3,5 (23,3-36,4)	*33
<b>Anulaciones cola</b>	16,2±2,4 (13,0-21,0)	17,9±1,8 (14,0-21,0)	*19

Medidas estimadas a partir de la fig. 108 (Castillo y Vovlas, 2007\*) de la descripción original de (Van der Berg, 1951\*\*).

\*\*\*Promedio  $\pm$  Desviación Estándar (mínimo-máximo). **L** (Longitud del cuerpo). **A** (L/MBW). **B** (L/Longitud esófago). **C** (L/Longitud cola). **c'** (Longitud cola/ ABW). **G1** (Longitud gónada anterior\*100/L). **O** (DGO/Longitud estilete\*100). **m** (Longitud conus/Longitud estilete\*100). **MB** (Longitud post-corporis\*100/ Longitud esófago). **MBW** (Diámetro del ancho máximo del cuerpo). **ABW** (Diámetro del cuerpo a nivel del ano). **Anulaciones labiales** (Número de anulaciones en la base de la cabeza). **Longitud del estilete** (Longitud de la base de los nódulos hasta la parte anterior del estilete). **Conus** (Longitud de la parte media hasta la posterior del estilete) **DGO** (Longitud de la base de los nódulos hasta el orificio de la glándula dorsal). **Longitud poro excretor** (Longitud de la apertura del orificio del poro excretor hasta la cabeza). **Longitud esófago** (Longitud desde la cabeza hasta el final del esófago). Longitud post-corporis (Longitud de la base del corpus hasta final de esófago). **V** (Longitud de la apertura vulvar hasta la cola). **LGA** (Longitud gónada anterior) (Longitud de la apertura vulvar hasta final de la gónada anterior). **Saco uterino postvulvar** (Longitud de la apertura vulvar hasta el final del saco uterino postvulvar). **V%** ((V\*100)/L-100). **Longitud de la cola** (De la apertura anal hasta el final de la cola). **Anulaciones de la cola** (Número de anulaciones desde la apertura anal hasta final de la cola). **Longitud espícula** (Longitud de la base hasta la parte posterior de la espícula). **Longitud gubernáculo** (Longitud de la base hasta la parte posterior del gubernáculo).



**Figura 6.** Fotomicrografías de *P. brachyurus* en piña de San Carlos. A. Hembra mostrando la Vulva (V). B, C, D Vista lateral de la parte anterior del cuerpo de la hembra, mostrando estilete (E), Glándula Dorsal Esofágica (GDE). E, F y G. Vista lateral de la cola de la hembra. M. Vulva (V). H. Huevo dentro del cuerpo de la hembra (H). I, J, K, L, M y N. Parte terminal de la cola de hembras. Escalas A: 100  $\mu$ m. B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q: 20  $\mu$ m).



**Figura 7.** Fotomicrografías de *P. brachyurus* en piña de Guápiles A. Hembra mostrando la Vulva (V). B, C, D Vista lateral de la parte anterior del cuerpo de la hembra, mostrando estilete (E). E, F y G. Vista lateral de la cola de la hembra mostrando el Ano (A). H. Huevo dentro del cuerpo de la hembra (H) y Vulva (V). I, J, K, L, M y N. Parte terminal de la cola de hembras. Escalas A: 100  $\mu$ m. B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q: 20  $\mu$ m.

El análisis morfométrico, junto con las descripciones realizadas por Fourie *et al.*, (2001) en Sur África; López y Salazar (1990) en Costa Rica; (Stanton *et al.*, 1989) en Colombia, (Pinochet *et al.*, 1978) en Honduras y Van der Berg (1989), permitieron la identificación de la población de *P. brachyurus* asociada al cultivo de piña. Según Van der Berg (1989), la especie de *P. brachyurus* se distingue de otras especies de *Pratylenchus* por el número de anulaciones labiales (2), longitud del estilete ♀ (19), porcentaje vulvar ♀ 86% (84-87), una forma de la cola conoide puntiaguda. Al comparar las medidas de esta investigación con la primera descripción de la especie, se encontró que los especímenes presentaban dos anulaciones labiales, longitud del estilete de ♀ (17,6) para piña<sup>1</sup> y ♀ (18,4) para piña<sup>2</sup>, porcentaje vulvar de ♀ 85% (81-87) para piña<sup>1</sup> y ♀ 85% (82-87) para piña<sup>2</sup>, una cola redondeada con una terminación lisa para ambas muestras. Además, medidas como longitud del conus, ancho de ABW, número de líneas laterales, longitud y número de anulaciones de la cola, tuvieron concordancia con la descripción original.

En Costa Rica *P. brachyurus* se encuentra asociado al cultivo de pimienta en Muelle de San Carlos, Alajuela (Sandoval, 2015) y en piña (Lopez y Salazar, 1990). En estudios realizados por Guzmán *et al.*, (2013) los géneros *Pratylenchus* y *Helicotylenchus* también fueron los nematodos con mayor número de individuos detectados en las regiones Huertar Norte y Huertar Atlántica en el cultivo de piña.

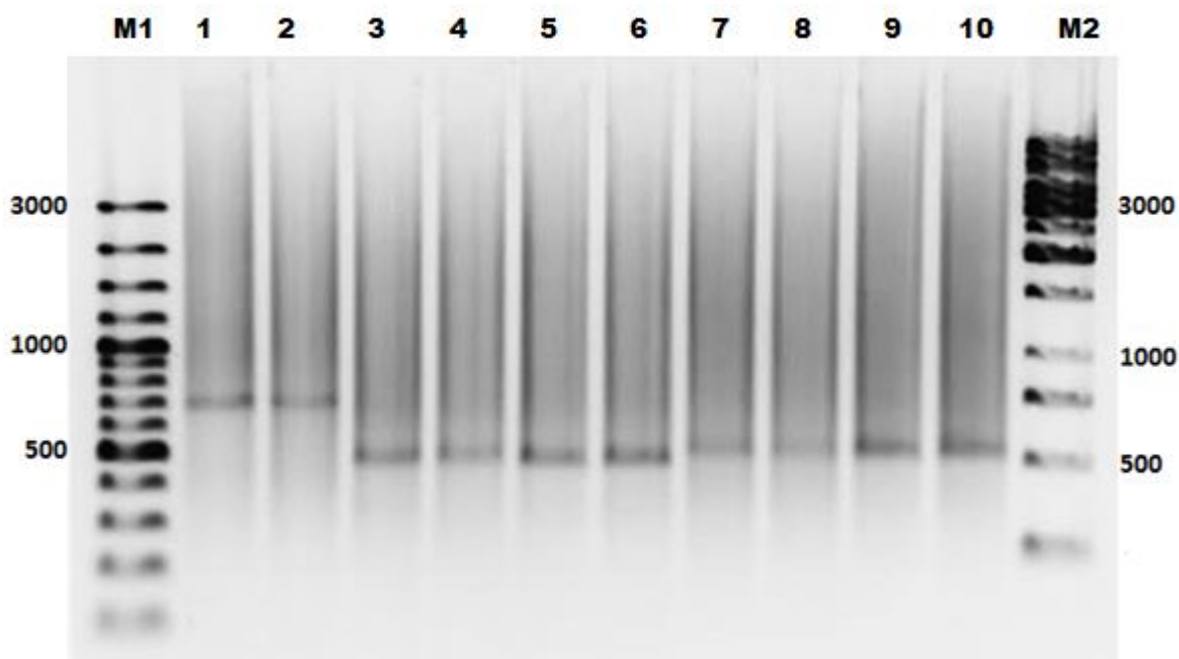
**Tabla 5.** Medidas morfológicas de hembras y machos de las especies de *Pratylenchus* de las regiones en estudio, en Costa Rica.

<b>Especie</b>	<i>Pratylenchus coffeae</i>	<i>Pratylenchus brachyurus</i>	<i>Pratylenchus zae</i>
<b>Hospedero</b>	Plátano	Piña	Arroz/Pasto estrella
<b>Macho</b>	Presente	Ausente	Ausente
<b>Estructura de líneas laterales</b>	Líneas lisas	Líneas lisas	Líneas lisas
<b>Forma de espermateca</b>	Redondeada o esférica	Ausente o reducida	Ausente o reducida
<b>Forma de la cola</b>	Cilíndrica o subesférica	Cónica/Cilíndrica	Conoide
<b>Tipo de cola</b>	Lisa	Lisa	Lisa

## 2. Caracterización molecular

### 2.1 PCR

Se generaron productos de PCR de aproximadamente 500 pb y 700 pb con los imprimadores rDNA2 y rDNA1.58s respectivamente. Los análisis de las poblaciones de *Pratylenchus* mostraron diferencias de acuerdo con el cultivo muestreado. Los nematodos asociados al cultivo de plátano generaron fragmentos de 700 pb mientras que los de arroz y pasto estrella de 500 pb. Por su parte los nematodos asociados al cultivo de piña mostraron fragmentos de aproximadamente 550 pb (Figura 8).



**Figura 8.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % que muestra los productos de PCR generados con los imprimadores rDNA2 y rDNA1.58s, a partir de hembras y machos de *Pratylenchus* Pozos 1 y 2: Plátano (*P. coffea*); Pozos 3 y 4: arroz (*P. zaeae*); Pozos 5 y 6: Pasto estrella (*P. zaeae*); Pozos 7 y 8: Piña ubicada en San Carlos (*P. brachyurus*) y Pozos 9 y 10: Piña ubicada en Guápiles (*P. brachyurus*). M1: Marcador de peso molecular de 100pb. M2: Marcador de peso molecular de 1 Kb. Heredia, 2018.

### 2.2 Análisis de secuencias y filogenia

Las secuencias de la región D2-D3 del ADNr del 28S de las especies de *Pratylenchus* en estudio, concuerdan con las especies de *Pratylenchus* depositadas en el GenBank por otros

investigadores como Tuyet *et al.*, (2017); Peraza *et al.*, (2016); Ribeiro, Joseph, Mengistu, Dias-Arieira & Campos, (2016) y Zhao, (2011).

Se identificó *Pratylenchus coffeae* (PL001 y PL002) en esta investigación procedente de una plantación de plátano de Paraíso de Sixaola, Talamanca, Limón y mostró 99% de similitud con el acceso *P. coffeae* KC857658, depositado en el GenBank por Tuyet y colaboradores, (2017), el cual se encontró asociado a un cultivo de *Musa acuminata* en Vietnam.

Las secuencias de la región D2-D3 identificaron a *Pratylenchus zae* (AR002) en San Vicente de Ciudad Quesada, San Carlos, Alajuela asociado a un cultivo de pasto estrella. Este es el primer reporte de *P. zae* en pasto estrella en Costa Rica. También se identificó dicha especie asociada al cultivo de arroz ubicado en Laurel de Corredores, Puntarenas. Esta secuencia mostró 98% de similitud con las accesiones *P. zae* KT971361, encontrada en San Carlos, Alajuela, Costa Rica en arroz y reportada por Peraza *et al.*, (2016), *P. zae* JN020932 y JN020931 asociadas a la planta *Cymbopogon* sp. en China (Zhao, 2011).

Se identificó *P. brachyurus* en dos cultivos de piña (PÑ003), uno localizado en Pital de San Carlos, Alajuela y el otro en Guápiles, Limón. Estos mostraron 97% y 98 % de similitud respectivamente, con la secuencia de las accesiones *P. brachyurus* EU130842 de Japón asociada al cultivo de *Cerasus* sp. (Subbotin *et al.*, 2008) y *P. brachyurus* MH142615 de China asociado a un cultivo de *Alocasia macrorrhizos* (Hou, 2018).

Las relaciones filogenéticas entre las especies de *Pratylenchus*, inferidas a partir de los análisis de las regiones D2-D3 e ITS, basadas en el criterio de Inferencia Bayesiana (IB) se muestran en las figuras 9 y 10, respectivamente. Se encontraron agrupamientos similares en la topología del D2-D3 y la del ITS.

El programa jModelTest determinó que los mejores modelos de sustitución de nucleótidos para generar los árboles filogenéticos fueron el GTR+I+G y el TVM+I+G con el criterio de IB, para los segmentos de expansión D2-D3 del 28S ADNr y la región ITS, respectivamente.

En el árbol filogenético donde se incluyeron las secuencias de la región ITS (Figura 8), muestra a *P. coffeae* (PL001 y PL002) de este estudio, que agrupa con la accesión *P. coffeae* KR106212 que se obtuvo de un cultivo de *Dioscorea opposita* Thunb, en China (Huang & Jiang, 2015 - datos sin publicar) y con la accesión *P. coffeae* KY424204 de China (Wang, Zhuo, and Liao, 2017 - datos sin publicar). En el caso de PE001 y AR002 agruparon con las accesiones de *P. zae* KY424186 encontrada en China, por Wang, Zhuo, and Liao, (2017 - datos sin publicar), y JN020935 de Saipan, Estados Unidos proveniente de una planta de *Cymbopogon* sp. (Zhao, 2011- datos sin publicar).

Por su parte, PÑ003 agrupó con las accesiones *P. brachyurus* KY828251 de Bélgica (Janssen, Karssen, Orlando, Subbotin & Bert, 2017) y *P. brachyurus* MG738356 de China proveniente de plantas de *Melastoma dodecandrum* (Wang & Liao, 2018 - datos sin publicar).

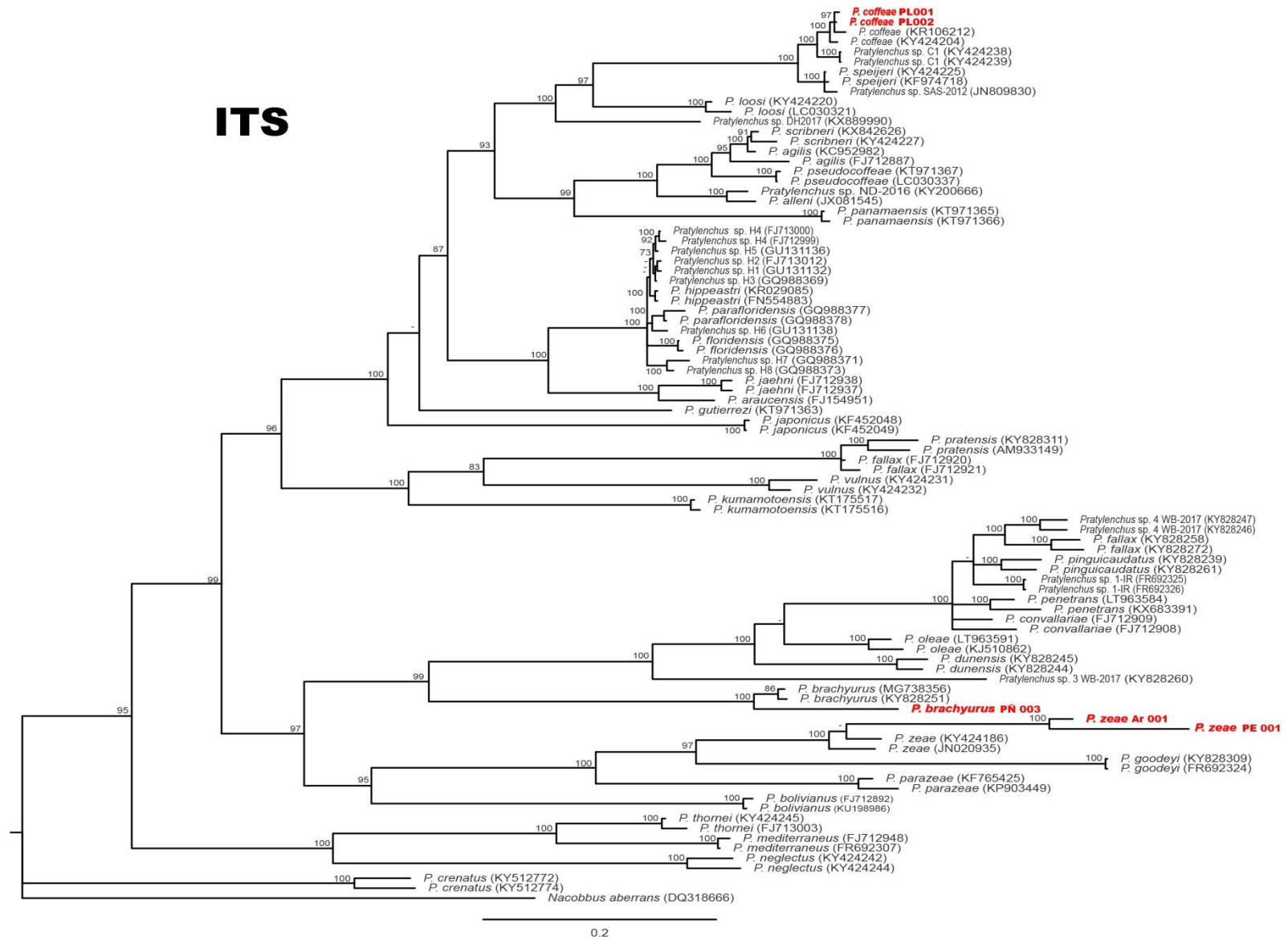
El dendrograma generado para las secuencias de la región D2-D3 (Figura 10) mostró que *P. Coffeae* (PL001 y PL002) agrupó con la accesión *P. coffeae* LT965041 procedente de un cultivo de plátano en Sudáfrica (De Luca, 2017). En el caso de *P. zae* (AR001, AR002 y PE001) agrupó con las accesiones de *P. zae* KY424263 encontradas en China (Wang, Zhuo, and Liao, 2017 - datos sin publicar), y en JN020932, JN020931 de Saipan, Estados Unidos proveniente de la planta *Cymbopogon* sp. (Zhao, 2011- datos sin publicar).

*Pratylenchus brachyurus* (PÑ002 y PÑ003) agrupó con las accesiones *P. brachyurus* KY424286 de China (Wang, Zhuo, & Liao, 2017 - datos sin publicar) y *P. brachyurus* KT948328 de Brasil (Ribeiro, Joseph, Mengistu, Dias-Arieira & Campos. 2016 - datos sin publicar).

Los imprimadores rDNA2-rDNA1.58S y la región ITS1 para la identificación de especies de *Pratylenchus* han sido utilizados por investigadores alrededor del mundo. Machado, Ferraz y Olivera, (2007); Machado *et al.*, (2015) han identificado en Brasil *P. brachyurus*, *P. zae*, *P. coffeae*, *P. penetrans*, *P. jaehni* utilizando estos cebadores universales ubicados entre los genes 18S y 5.8S rDNA. Además (Zamora, 2016) utilizó por primera vez estos imprimadores

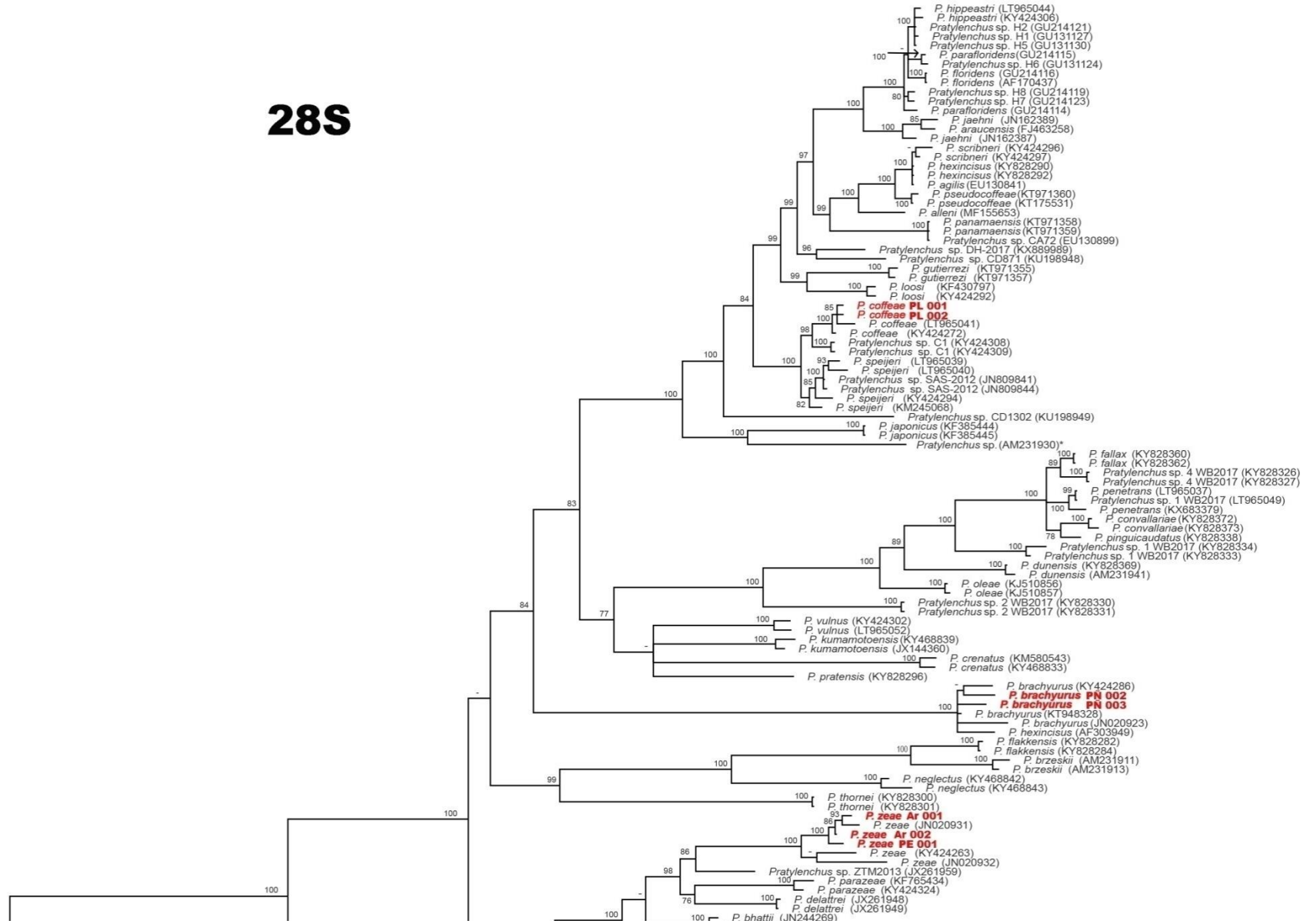
para poder discriminar entre las especies *P. gutierrezii*; *P. bolivianus* y *P. pseudocoffeae* en Costa Rica.

De acuerdo con lo anterior los datos para *P. coffeae* y *P. brachyurus* llegan a sumarse a los pocos registros para Costa Rica en la diferenciación de especies con los cebadores rDNA2 que conforma la subunidad ribosomal del gen 18s, en la región ITS1 (Powers *et al.* 1997) y el rDNA1.58S que se sitúa en el gen 5.8s que flanquea la región ITS1 (Cherry *et al.* 1997; Zamora, 2016).



**Figura 9.** Regla concenso del 50% de un árbol de análisis de Inferencia Bayesiana (IB) y Máximo Verosimilitud (MV) generado a partir del conjunto de datos de secuencias ITS para las especies de *Pratylenchus coffeae*; *P. brachyurus* y *P. zeae*. Códigos generados para identificación con el cultivo Plátano (PL001, PI002), Piña (PÑ003), Arroz (Ar001) Pasto Estrella (PE001).

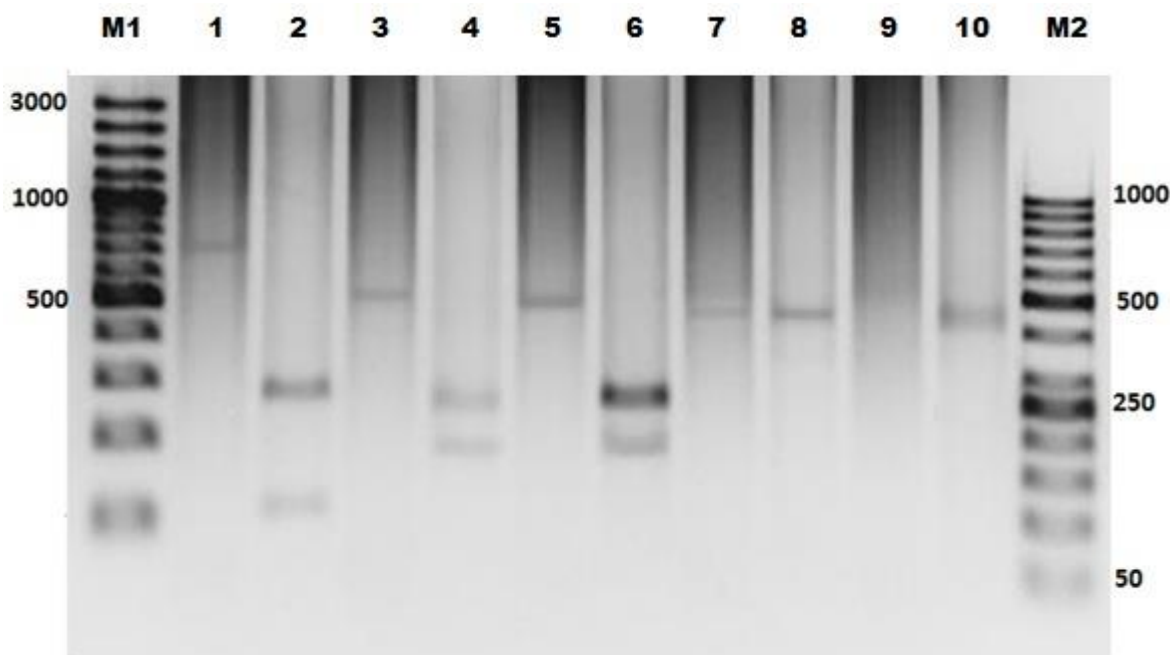
28S



**Figura 10.** Regla concenso del 50% de un árbol de análisis de Inferencia Bayesiana y Máximo Verosimilitud generado a partir de la región D2-D3 del 28s rDNA del conjunto de datos de los genes de secuencias para las especies de *Pratylenchus coffeae*; *P. brachyurus* y *P. zaeae*. Códigos generados para identificación con el cultivo Plátano (PL001, PI002), Piña (PÑ002, PÑ003), Arroz (Ar001, Ar002) Pasto Estrella (PE001).

### 2.3 RFLP

Los análisis con la enzima *Ded I* (Figura 11) mostró que la enzima cortó las secuencias de dos de las tres especies de nematodos en estudio. Los carriles 1, 3, 5, 7 y 9 representan los productos de PCR antes de cortar con la enzima de restricción. El carril 2 que corresponde a *P. coffeae* en plátano muestra un patrón de dos fragmentos con pesos moleculares de 100 y 250 pb luego de cortar con *Ded I*. Los carriles 4 y 6 muestran fragmentos de 200 y 250 pb en *P. zaeae* asociado a arroz y pasto estrella respectivamente. Los pozos 8 y 10 corresponden al fragmento amplificado de ADN de *P. brachyurus* en piña sin cortar debido a que en la secuencia de esta especie no hay sitio de corte para la enzima *Ded I*.



**Figura 11.** Patrones generados con la enzima de restricción *Ded I* mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Carriles 1, 3, 5, 7 y 9: productos de PCR de la región ITS entre los genes 18s y 5.8s amplificada. Carriles: 2, 4, 6, 8 y 10: productos de PCR tratados con la enzima. Carril 2: fragmentos generados para *P. coffeae* en plátano, carril 4: fragmentos generados para *P. zaeae* en arroz, carril 6: fragmentos generados para *P. zaeae* en pasto estrella, carril 8: fragmentos generados para *P. brachyurus* en piña de San Carlos y carril 10: fragmentos generados para *P. brachyurus* en piña de Guápiles. M1: marcador de peso molecular 100pb. M2: marcador de peso molecular 50pb. Heredia, 2018.

La prueba de RFLP con las enzimas de restricción *Pst I* (anexo 1) y *Hind III* (anexo 2) no permitió ver diferencias entre las especies debido a que no cortaron ninguna de las secuencias

de *Pratylenchus*. Los carriles 1, 3, 5, 7 y 9 representan los productos no cortados (PNC) y los carriles 2, 4, 6, 8 y 10 corresponden a los productos de PCR luego de ser tratados con la enzima.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se utilizaron técnicas morfológicas (fotografías), taxonómicas, PCR-RFLP y secuenciación, que permitieron una acertada tipificación de especies pertenecientes al género *Pratylenchus*. Estas herramientas facilitaron la correcta identificación de cada una de las poblaciones de *Pratylenchus*.

Las especies de *Pratylenchus* identificadas fueron *P. zae* en el cultivo de arroz de Laurel, Corredores, Puntarenas y en pasto estrella de San Vicente de Ciudad Quesada, San Carlos, Alajuela. La especie *P. brachyurus* se encontró en el cultivo de piña en Pital de San Carlos, Alajuela y en el cultivo de piña en Guápiles, Guápiles, Limón. Por último, se encontró también *P. coffeae* en el cultivo de plátano en Paraíso de Sixaola, Talamanca, Limón.

La identificación de especies en los cultivos estudiados es clave para evitar la infección de nuevos cultivares u otras zonas productivas por medio de la venta de semillas en el caso del plátano y pasto estrella, o incluso por el traslado de la maquinaria agropecuaria, conociendo la capacidad de *Pratylenchus* de alimentarse de multitudinarios hospedantes.

Es la primera vez que se reporta a *P. zae* en el cultivo de pasto estrella en el país. No se descarta la posibilidad de encontrar esta u otra especie de *Pratylenchus* asociada a algún pasto en el territorio nacional. Por lo anterior, sería importante incluir más gramíneas forrajeras de relevancia agronómica, para ampliar la información y optimizar su manejo agronómico.

Esta investigación se incluyó cinco cultivos distribuidos en las regiones Brunca, Huetar Atlántico y Huetar Norte. Se recomienda a futuro, incluir otras regiones con el objetivo de conocer cuáles especies de *Pratylenchus* podrían estar asociadas a otros cultivos y así ampliar el rango de hospederos y de especies de nematodos asociadas a ellas e incentivar el uso de

diferentes practicas culturales y de mecanización a los productores de zonas rurales de nuestro país para el manejo de estas poblaciones de nematodos.

La información generada en este estudio sirve como premisa para desarrollar otras investigaciones relacionadas en la búsqueda de plagas (en este caso nematodos), asociadas a otros cultivos y cómo estas plantas reaccionan ante la presencia de un agente patógeno en la búsqueda de resistencia o tolerancia a dichos patógenos. Además, la información generada en esta investigación sirve para determinar el impacto en el rendimiento del cultivo a través de la densidad poblacional de nematodos encontrada. Por otra parte, conociendo cuál especie se encontró en un cultivo, permitirá realizar pruebas de hospedantes diferenciales y llegar a conocer si una misma especie tiene afinidad o predilección por un mismo cultivo.

Desde el punto de vista de la biología molecular, en este estudio se logró la secuenciación de regiones conservadas de cada una de las poblaciones de nematodos identificadas. Gracias a ello, podrán servir de insumo para la elaboración de cebadores específicos que permitan caracterizar una especie en un determinado cultivo de manera precisa y certera.

En colaboración con el Instituto de Agricultura Sostenible (IAS) que pertenece al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Córdoba, España, se logró cumplir con los objetivos propuestos en esta investigación. En este caso, los convenios de cooperación con instituciones internacionales permitieron ampliar los conocimientos en la identificación de nematodos fitoparásitos, por lo que refleja la importancia de estrechar alianzas científicas tanto a nivel nacional como internacional en la búsqueda de alianzas estratégicas.

## **REFERENCIAS BIBLIGRÁFICAS**

Adiko, A. (1988). Plant-parasitic nematodes associated with plantain, *Musa paradisiaca* (AAB), in the Ivory Coast. *Revue de Nématologie*, 11, 109-113.

Adiko, A. y N'guessan, A. (2001). Evolution of the nematofauna of plantain, *Musa AAB*, in Côte d'Ivoire. *Infomusa*, 10, 26-27.

- Agrios, G. (2005). *Plant pathology*. 5a ed. Academic Press, Burlington, MA.
- Agu, C. (2004). Effect of *Meloidogyne incognita* and *Pratylenchus brachyurus* on leaf growth of sweet potato. *Tropical Science*, 44, 48-50.
- Agudelo, M. y Volcy, C. (1998). Población de nematodos fitoparásitos dos municipios cañeros de Antioquia. *Fitopatología Colombiana*, 21:89-96.
- Ali, S. y Askary, T. (2001). Taxonomic status of phytonematodes associated with pulse crops. *Current Nematology*, 12, 75-84.
- Anaya, O., y Lombo, V. (2008). Identificación de nematodos fitoparásitos asociados al cultivo de ñame espino (*Dioscorea rotundata*) en el corregimiento de mateo Pérez – Sampues, municipio del departamento de Sucre. Colombia: Sincelejo-Sugre.
- Araya, E. (2008). Identificación, cuantificación y caracterización de densidades poblacionales de nematodos asociados al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.) en la región Huetar Norte (cantones de los Chiles y San Carlos) de Costa Rica (Tesis de Licenciatura). Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Alajuela.
- Araya, J. (2008). *Agro-cadena de plátano caracterización de la agro-cadena*. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Recuperado de <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00082.pdf>
- Araya, M. (2003). *Manejo Convencional y alternativo de la Sigatoca negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de musáceas en los trópicos: Situación actual del manejo de nematodos en banano (Musa AAA.) y plátano (Musa AAB) en el trópico americano*. Guayaquil, Ecuador: INIBAP.
- Babatola, J. (1984). Rice nematode problems in Nigeria: their occurrence, distribution and pathogenesis. *Tropical Pest Management*, 30: 256-265.
- Bafokuzara, N. (1982). Nematodes associated with pineapples in Uganda. *Nematropica*, 12, 45-49.
- Bajaj, H. & Bhatti, D. (1984). New and known species of *Pratylenchus Filipjev*, 1936 (Nematoda: Pratylenchidae) from Haryana, India, with remarks on intraspecific variations. *Journal of Nematology* 16, 360-367.
- Barbosa, B. & Santos, J. (2009). Study of the host-pathogen relationships of *Meloidogyne incognita* (kofoid & white) chitwood, *M. javanica* (treub) chitwood and *Pratylenchus*

- brachyurus* (Godfrey) filipjev & schuurmans stekhoven in sugar cane. *Nematología Brasileña*, 33(4): 19.
- Baudin, P. & Huu-Hai, V. (1973). Les maladies du tabac à Madagascar. *Agronomie Tropicale*, (II) 28, 189-207.
- Bee-Rodríguez, D. y Ayala, A. (1977). Nematodes associated with sorghum in Puerto Rico. *Nematropica*. 7(2):16-20.
- Benson, D., Karsch-Mizrachi, L., Lipman, D., Ostell, J., Wheeler, D. (2006). *GenBank*. Recuperado de: [http://nar.oxfordjournals.org/content/35/suppl\\_1/D21.full](http://nar.oxfordjournals.org/content/35/suppl_1/D21.full)
- Blair, B., Stirling, G., y Whittle, P. (1999). Distribution of pest nematodes on sugarcane in South Queensland and relationship to soil texture, cultivar, crop age and region. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 39(1):43-49.
- Bravo D., De la Cruz M., Herrera L., y Ramírez F. (2013). Uso de plaguicidas en cultivos agrícolas como herramienta para el monitoreo de peligros en salud. *UNICIENCIA*, 27(1), 1-26.
- Bravo, V., Canto, N., Berrocal, S., Tatis, A., Ramírez, F., Mejía, W., De la Cruz, E., Altamirano, T. (2015). Importación de plaguicidas y peligros en salud en América Central durante el periodo 2005 – 2009. *UNICIENCIA*, 29(2), 84-106p.
- Bressani. (2012). Nematodo *Pratylenchus* spp. Recuperado de [http://fitopatologia01.blogspot.com/2012\\_06\\_01\\_archive.html](http://fitopatologia01.blogspot.com/2012_06_01_archive.html).
- Bridge, J. (1976). Plant-parasitic nematodes from the lowlands and highlands of Ecuador. *Nematropica*, 6, 18-23.
- Bridge, J., Hunt, D. & Hunt, P. (1996). Plant-parasitic nematodes of crops in Belize. *Nematropica*, 26, 111-119.
- Bridge, J., Price, N. & Kofi, P. (1995). Plant-parasitic nematodes of plantain and other crops in Cameroon, West Africa. *Fundamental and Applied Nematology*, 18, 251-260.
- Cadet, P., Guichaoua, L., Spaul, V. (2004). Nematodes, bacterial activity, soil characteristics and plant growth associated with termitaria in a sugarcane field in South África. *Applied Soil Ecology*, 25:193-206.

- Cámara Nacional de Productores y exportadores de Piña. (2016). *Piña de Costa Rica, Historia*. Recuperado de <http://canapep.com/historia/>
- Castillo, P & Vovlas, N. (2007). *Pratylenchus (Nematoda: Pratylenchidae): Diagnosis, Biology, Pathogenicity and Management*. Eds. DJ Hunt; RN Perry. Brill Leiden-Boston.
- Castillo, P., Vovlas, N., Subbotin, S., & Troccoli, A. (2003). A new root-knot nematode, *Meloidogyne baetica* n. sp. (Nematoda: Heteroderidae), parasitizing wild olive in Southern Spain. *Phytopathology*, 93, 1093-1102
- Cenis, L., Sánchez-Escribano, E., García, J., Pérez, J., y Guirao, P. (2007). *Biología molecular aplicada a la hortofruticultura: la Técnica PCR*. Agricultura Agropecuaria. Recuperado de: [http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf\\_agri/agri\\_1996\\_766\\_401\\_403.pdf](http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_agri/agri_1996_766_401_403.pdf)
- Centro Internacional de Agricultura Tropical. (2006). Fortalecimiento de cadenas de valor en plátano: innovaciones tecnológicas para reducir agroquímicos. Propuesta presentada al Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria (Fontagro). Recuperado de [http://www.fontagro.org/sites/default/files/prop\\_06\\_05.pdf](http://www.fontagro.org/sites/default/files/prop_06_05.pdf).
- Chau, N., Thanh, N., De Waele, D. & Geraert, E. (1997). Plant-parasitic nematodes associated with banana in Vietnam. *International Journal of Nematology*, 7, 122-126.
- Chaves, E. (2014). Densidad y diversidad de nematodos fitoparásitos y de suelo en sistemas orgánicos y convencionales de café en asocio con banano en el Valle Central y Occidental de Costa Rica. Turrialba, Costa Rica: CATIE.
- Chaves, J. (2002). Sostenibilidad productiva del cultivo de Plátano en Costa Rica. (Tesis Posgrado). Universidad Estatal a Distancia. Costa Rica.
- Cherry, T., Szalanski, A., Todd, T., & Powers, T. (1997). The Internal Transcribed Spacer Region of *Belonolaimus* (Nemata: Belonolaimidae). *Nematology*, 29(1), 23-29.
- Corbett, D. & Clark, S. (1983). Surface features in the taxonomy of *Pratylenchus* species. *Revue de Nématologie*, 6, 85-98.
- Corporación Arrocera Nacional. (2016). Informes estadísticos 2015/2016. Recuperado de [https://www.conarroz.com/UserFiles/File/INFORME\\_ANUAL\\_ESTADISTICO\\_2015%202016.pdf](https://www.conarroz.com/UserFiles/File/INFORME_ANUAL_ESTADISTICO_2015%202016.pdf)

- Coyne, D., & Plowright, R. (2002). Assessment of the importance of individual plant-parasitic nematode species in a community dominated by *Heterodera sacchari* on upland rice in Côte d'Ivoire. *Nematology*, 4(6):661-669.
- Coyne, D., Hunt, D., Plowright, R. & Darboe, M. (2000). Further observations on nematodes associated with rice in Côte d'Ivoire, The Gambia, Guinea and Togo. *International Journal of Nematology*, 10(2):123-130.
- Coyne, D., Plowright, R. & Fofana, I. (1996). Preliminary investigations of nematodes associated with rice in Guinea, Benin and Togo. *Afro-Asian Journal of Nematology*, 6, 70-73.
- Coyne, D., Plowright, R., Twumasi, J. & Hunt, D. (1999). Prevalence of plant-parasitic nematodes associated with rice in Ghana with a discussion of their importance. *Nematology*, 1, 399-405.
- Crozzoli, P., Casassa, P., Rivas, G., & Matheus, C. (1991). Nematodos fitoparasitos asociados al cultivo del guayabo en el Estado Zulia, Venezuela. *Fitopatología venezolana* 4, 2-6.
- Crozzoli, R. (2002.) Especies de nematodos fitoparasiticos en Venezuela. *Interciencia*. 27(7):354-364.
- Crozzoli, R., Lamberti, F., Greco, N., Rivas, D. (1998). Nematodos Fitoparásitos asociados con los cítricos en Venezuela. *Nematología mediterránea*, 26:31-58.
- Cuarezma-Teran, J., Trevathan, L., Bost, S. (1984). Nematodes associated with sorghum in Mississippi. *Plant Diseases*, 68:1083-1085.
- Daneel, M., Dillen, N., Husselman, J., Jager, K. y De Waele, D. (2003). Results of a survey on nematodes of *Musa* in household gardens in South Africa and Swaziland. *Infomusa*, 12, 8-11.
- Darriba, D., Taboada, G., Doallo, R., Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9: 772.
- Davide, R. (1988). Nematode problems affecting agriculture in the Philippines. *Journal of Nematology* 20(2): 214-218.

- Davis, E. & MacGuidwin, E. (2000). Lesión la enfermedad del nematodo. Recuperado de <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/Nematodes/Pages/LesionNematodePortuguese.aspx>
- De Luca, F. (2017). Direct Submission. Institute for Sustainable Plant Protection, Via Amendola 122/D, Bari, 70126, Italy. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LT965041>
- De Luca, F., Troccoli, A., Duncan, L., Subbotin, S., Waeyenberge, L., Coyne, D., Brentu, F., Inserra, R. (2012). *Pratylenchus speijeri* n. sp. (Nematoda: Pratylenchidae) a new root-lesion nematode pest of plantain in West Africa. *Nematology*, 14, 987–1004p.
- De Souza, J., Maximiniano, C. & Campos, V. (1999). Nematoides asociados a plant as frutíferas em alguns estados Brasileiros. *Ciencia e Agrotecnologia*, 23, 353-357.
- De Waele, D. & Jordaan, E. (1988). Plant-parasitic nematodes on field crops in South Africa. *Revue de Nématologie*, 11, 65-74.
- De Waele, D., & Van Den Berg, E. (1988). Nematodes associated with upland rice in South Africa, with a description of *Hemicycliophora oryzae* sp. n. (Nemata: Criconematoidea). *Revue de Nématologie*, 11(1):45-51.
- De Waele, D., Mcdonald, A., Jordaan, E., Orion, D., Van Den Berg, E., Loots, G. (1998). Plant-parasitic nematodes associated with corn and pearl millet in Namibia. *African Plant Protection*, 4(2):113-117.
- Delaville, L., Rossi, J. & Quénehervé, P. (1996). Plant row and soil factors influencing the microspatial patterns of plant-parasitic nematodes on sugarcane in Martinique. *Fundamental and Applied Nematology*, 19:321-328.
- Di Vito, M., Greco, N., Oreste, G., Saxena, M., Singh, K., Kusmenoglu, I. (1994). Plant parastic nematodes of legumes in Turkey. *Nematologia Mediterranea*, 22(2):245-251.
- Dinardo-Miranda, L., Gil, M., & Menegatti, C. (2003). Danos causados por nematoides a variedades de cana de acucar em cana planta. *Nematologia Brasileira*, 27(1):69-73.
- Doucet, M. & Cagnolo, S. (1998). Variabilidad intra e inter – especifica de caracteres morfo métricos en poblaciones del orden Tylenchida (Nematoda) provenientes de Argentina. *Nematología Mediterránea*, 26:231-236.

- Duncan, L., Inserra, R., Thomas, W., Dunn D., Mustika, I., Frisse, L., Mendes, M., Morris, K., Kaplan, T. (1999). Molecular and morphological analysis of isolates of *Pratylenchus coffeae* and closely related species. *Nematropica*, 29, 61–80.
- Duncan, L. & Moens, M. (2006). Migratory endoparasitic nematodes. In: Perry, R.N. y Moens, M. (Eds). *Plant nematology*. Wallingford, UK, CABI Publishing, pp. 123-152.
- Esquivel, A. y Peraza, W. (2010). Nematodos fitoparásitos asociados a cultivos agrícolas de Costa Rica. *Proyecto # 23756*. Heredia, Costa Rica. Universidad Nacional.
- Fargette, M., Phillips, M., Blok, V., Waugh, R., Trudgill, D. (1996). An RFLP study of the relationships between species, populations and resistance-breaking lines of tropical species of *Meloidogyne*. *Fundamental & Applied Nematology*, 19(2), 193-200.
- Fernández, M. & Ortega, J. (1998). An overview of nematological problems in Cuba. *Nematropica*, 28(2):151-164.
- Fernández, S., y Quesada, S. (2013). Nematodos asociados a los cultivos de Costa Rica. Ministerio de Agricultura y Ganadería: Servicio Fitosanitario del Estado. Alajuela, Costa Rica. 49p.
- Fourie, H., Mc Donald, A., Loots, G. (2001). Plant-parasitic nematodes in field crops in South Africa. 6. Soybean. *Nematology*, 3:447-454.
- Franco, L., Cediell, F., Payán, C. (2008). Breve historia de la bioinformática. *Colombia médica*, 39(1), 117-120.
- García, A. (2006). Identificación de especies de nematodos fitopatógenos de los géneros *Globodera* spp. y *Meloidogyne* spp. por medio de dos técnicas moleculares. Cartago, Costa Rica: CIA.
- García, M. (2004). Estudio de la distribución horizontal de los nematodos fitoparásitos en áreas cultivadas con café de la cabecera municipal de San Vicente Pacaya, Escuintla. (Tesis Lic.) Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Giesbrecht, S., y Aquino, A. (2009). Control alternativo de nematodos en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* mill.), en condiciones de invernadero. Recuperado de <http://www.agr.una.py/revista/index.php/ria/article/view/37>

- Giribabu, P. & Saha, M. (2003). Studies on nematode communities at different depths, altitudes and periods of year in coffee plantation. *Annals of Plant Protection Sciences*, 11, 360-363.
- Gotoh, A. (1964). Studies on the control of root rot nematode disease of sweet potato caused by *Pratylenchus coffeae*. *Bulletin of the Miyazaki Agricultural Experiment Station*, 5, 1-121.
- Gowen, S., Quénéhervé, P. & Fogain, R. (2005). Nematode parasites of bananas and plantains. En: Luc, M., Sikora, R.A. & Bridge, J. (Eds.). *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. 2 ed. Wallingford, CABI Publishing. p. 611-645.
- Grewal, P. (1990). The use of agar as a cover-glas support for mounting nematodos. *Review Nematology*, 13(1):121-122.
- Grislaes-López, F. y Lescot, T. (1999). Encuesta diagnostico multifactorial sobre plátano en la zona cafetera central de Colombia. Una visión analítica de la realidad agronómica del cultivo del plátano en la zona central. *Boletín Técnico Cenicafe*, 18, 66.
- Guerout, R. (1975). Nematodes of pineapple: a review. *Pest Articles and News Summaries*, 21, 123-140.
- Guerrero, M. (2010). *Guía Técnica del Cultivo de Plátano*. Programa MAG-CENTA-FRUTALES. El salvador.
- Guzmán, O. (2011). El nematodo Barrenador (*Radopholus similis* [Cobb] Thorne) del banano y plátano. *Revista Luna Azul*, 32, 137-153.
- Guzmán, O., Castaño, J., y Villegas, B. (2012). Principales nematodos fitoparásitos y síntomas ocasionados en cultivos de importancia económica. *Agronomía*, 20(1), 38-50.
- Guzman, V., Varela, I., Hernández, S., Durán, J., Montero, W. (2014). Principales géneros de nematodos fitoparásitos asociados a plátano y piña en las regiones Huetar Norte y Huetar Atlántica de Costa Rica. *Tecnología en Marcha*, 27(1), 87.
- Guzman, V., Varela, I., Hernández, S., Durán, J., Montero, W. (2011). Nematodos fitoparásitos asociados al arroz en las regiones Huetar Norte y Huetar Atlántica de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 22(1). 22.

- Hall, T. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Research*, 41:95-98.
- He, Y., Subbotin, S., Rubtsova, T., Lamberti, F., Brown, D., Moens, M. (2005). A molecular phylogenetic approach to Longidoridae (Nematoda: Dorylaimida). *Nematology*, 7, 111-124.
- Hernández, M. y Pereira, E. (1981). Pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*). Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey” Perico, Matanzas, Cuba. *Pastos y Forrajes*, 4(2).
- Hernández, R. (2003). *Los nematodos parásitos de la piña: opciones para su manejo*. Habana, Cuba. Instituto de investigaciones en fruticultura tropical.
- Hillocks, R., Siddiqi, M., & Khonga, E. (1995). *Nematodes associated with subsistence crops in southern Malawi*. *Afro-Asian Journal of Nematology*. 5:14-19.
- Hou, X. (2018). Direct Submission. Plant Protection Institute, Fujian Agriculture and Forestry University, Cangshan District, Fuzhou, Fujian 350002, China. Recuperado de [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MH142615.1?report=genbank&log\\$=nucl\\_top&blast\\_rank=12&RID=J0BSVZYF015](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MH142615.1?report=genbank&log$=nucl_top&blast_rank=12&RID=J0BSVZYF015)
- Huang, T. & Jiang, J. (2015). Identification of the pathogen causing *Pratylenchus coffeae* of *Dioscorea opposita* Thunb. Jiangxi Agricultural University, College of Agronomy, Zhimin street 1101, Nanchang, Jiangxi 330045, China. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KR106212>
- Huelsenbeck, J. & Ronquist, F. (2003). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics applications note*, 17(8): 754-755.
- Humphreys, D. (2010). *Determinación de nematodos fitoparásitos asociados al cultivo del ñame (*Dioscorea spp.*) y el yampí (*Dioscorea trifida*) en las regiones Huetar Atlántica, Huetar Norte y Brunca de Costa Rica* (Tesis M.Sc.). Universidad de Costa Rica, San José.
- Insera, R., Duncan, L.W., Dunn, D., Handoo, Z., Troccoli, A., Rowe, J. (2005). *Pratylenchus jordanensis* a junior synonym of *P. zae*. *Nematropica*, 35:161-170.
- Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos., y Universidad Cornell. (2003). *Tecnologías de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética de*

*plantas: Tecnologías basadas en el ADN, Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción.* Recuperado de:  
[http://www2.bioversityinternational.org/Publications/Molecular\\_Markers\\_Volume\\_1\\_es/PDF/III\\_2.pdf](http://www2.bioversityinternational.org/Publications/Molecular_Markers_Volume_1_es/PDF/III_2.pdf)

Instituto Meteorológico Nacional. (2016). *Datos climáticos.* Recuperado de:  
[http://www.imn.ac.cr/IMN/MainAdmin.aspx?\\_\\_EVENTTARGET=LinksInfoClimatic](http://www.imn.ac.cr/IMN/MainAdmin.aspx?__EVENTTARGET=LinksInfoClimatic)

Instituto Nacional de Estadística y Censos. (2015). *VI CENSO NACIONAL AGROPECUARIO 2014.* Recuperado de  
<http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00338.pdf>

Instituto Nacional de Innovación y Transferencia de Tecnología. (2009). *Manual de recomendaciones técnicas para el cultivo de arroz.* Recuperado de  
<http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00177.pdf>

Iwahori, H. & Sano, Z. (2003). Distribution of main plant-parasitic nematodes in sweet potato and taro fields in Kyushu and Okinawa, Japan. 3. Survey in the northern part in Kyushu Island (Fukuoka, Saga, Nagasaki and Ohita Prefs.). *Kyushu Plant Protection Research*, 49, 83-87.

Jacob, J. & Van Bezooijen, J. (1984). *A manual for practical work in nematology.* Netherlands. Wageningen Agricultural University.

Janssen, T., Karssen, G., Orlando, V., Subbotin, S. and Bert, W. (2017). Molecular characterization and species delimiting of plant-parasitic nematodes of the genus *Pratylenchus* from the Penetrans group (Nematoda: Pratylenchidae). Biology, Ghent University, Ledeganckstraat 35, Ghent 9000, Belgium. Recuperado de  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY828251>

Jaraba, D., Lozano, Z., y Espinosa, M. (2007). Nematodos agalladores asociados al cultivo de papaya (*Carica papaya* L.) en el departamento de Córdoba, Colombia. *Agronomía Colombiana*, 25(124-130).

Jenkins, W. (1964). A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter*, 49(137-153).

Jiménez, N., Crozzoli, R., Petit, P. y Greco, N. (2001). Nematodos fitoparasiticos asociados con el cultivo de la pina, Ananas comosus, en los estados Lara y Trujillo, Venezuela. *Nematologia Mediterránea*, 29, 13-17.

- Jiménez, P. y Collada, C. (2000). Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Forest Systems: Investigación agraria: sistemas y recursos forestales*, 2, 237-248.
- Johnson, A., Dowler, C., & Hauser, E. (1974). Seasonal population dynamics of selected plant-parasitic nematodes on four monocultured crops. *Journal of Nematology*, 6(4):187-190.
- Jones M & Fosu-Nyarko J. (2014). Molecular biology of root lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) and their interaction with host plants. *Ann Appl Biol* 1(64):163–181
- Jordaan, E., Van Den Berg, E., & De Waele, D. (1992). Plantparasitic nematodes on field crops in South Africa. *Fundamental and Applied Nematology*, 15: 531-537.
- Kanwar, R., Rana, B., Walia, K., & Walia, R. (1996). Studies on the pathogenic potential of *Heterodera zea* and *Pratylenchus zea* on corn in Haryana. *Indian Journal of Nematology*, 26(1):7-14.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14): 3059-3066.
- Khan, A., Sayed, M., Shahid Shaukat, S. (2007). Nematodes associated with papaya in Sindh (Pakistán). *Sarhad Journal of Agricultural*, 23(1): 145-148.
- Khonga, E. & Hillocks, R. (1996). Soilborne diseases in corn-based cropping systems in southern Malawi: incidence and farmers' perceptions. *African Plant Protection*, 2, 131-138.
- Koen, H. & Hogewind, W. (1967). Symptoms and characteristics of *Pratylenchus brachyurus* infestation on stored potatoes. *South African Journal of Agricultural Science*, 10, 543-550.
- Kubo, R., Inomoto, M., Silva, R. & Antedomenico, S. (2001). Symptoms caused by *Meloidogyne incognita*, *Pratylenchus brachyurus* and *P. coffeae* on tubers of potato cv. Monalisa and cv. Bintje. *Summa Phytopathologica*, 27, 331-333.
- Lascano, C. (2002). Caracterización de las pasturas para maximizar producción animal. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 10(2):126-132.

- Lawn, D., Noel, G., & Sinclair, J. (1988). Plant-parasitic nematodes and *Neocosmospora vasinfecta* var. *africana* associated with soybeans in the Republic of Zambia. *Nematropica*, 18(1):33-34.
- Leblanc, H. & Arce, J. (2007). *Producción de raíces y tubérculos: los ñames cultivados en la región atlántica de Costa Rica*. Guácimo, Costa Rica: Universidad EARTH.
- Lee, J., Choi, D., Park, B. & Kim, D. (2006). Occurrence of rootlesion nematodes *Pratylenchus* spp., from *chrysanthemum* in Korea. *Journal of Nematology* 38, 279.
- León, D. (2007). *Diagnóstico y dinámica poblacional de nematodos en el cultivo de piña (Ananas comosus) (L.) Merr., Finca el Tremedal S.A. San Carlos*. (Tesis de Grado). Instituto Tecnológico de Costa Rica, sede regional San Carlos. San Carlos, Alajuela, Costa Rica.
- Llancavil, A. (2007). *Capacidad de Ditylenchus dipsaci y Ditylenchus destructor para infestar y desarrollarse en seis especies vegetales*. (Tesis Licenciatura). Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- López, R y Salazar, L. (1990). Morfología de algunos *Pratylenchus* spp. (Nemata: Pratylenchidae) encontrados en Costa Rica, vista con el microscopio electrónico de rastreo. *Agronomía Costarricense*, 14(2):189-196.
- López, R y Salazar, L. (1988). Nematodos asociados al arroz (*Oryza sativa* L.) en Costa Rica. VII. *Pratylenchus zeae*. *Agronomía Costarricense*, 12(2): 183-190.
- López, R., Salazar, L., Azofeifa, J. (1987). Nematodos asociados al arroz (*Oryza sativa* L.) en Costa Rica V. frecuencia y densidades poblacionales en las principales zonas productoras I. *Agronomía Costarricense*, 11(2):215-220.
- Lordello, L. & Mehlo Filho, A. (1970). Mais um nematoide ataca a cafeeiro. *Revista de Agricultura*, 45:1.
- Lordello, L. & Mendonca, M. (1970). Nematodes associated with roots of sugar cane in Piauí, Brazil. *Revista Brasileira de Biologia*, 30, 617-618.
- Lordello, L. (1967). A root-lesion nematode attacking Eucalyptus trees. *Revista de Agricultura*, 42, 11-13.

- Lordello, L. (1968). Nematoides associados a uma doenca do cacauero. *Revista de Agricultura*, 43, 1.
- Lordello, L., Zamith, A. & Arruda, H. (1958). Nematode parasites of soybean and cotton roots and its implication in crop rotation. *Revista de Agricultura*, 33, 161-166.
- Lordello, R., Lordello, A. & Sawazaki, E. (1992). Flutacao e controle de *Pratylenchus* spp. em milho. *Summa Phytopathologica*, 18, 146- 152.
- Machado, A., Ferraz, L., Oliveira, C. (2007). Development of a Species-Specific Reverse Primer for the Molecular Diagnostic of *Pratylenchus brachyurus*. *Nematropica*, 37:249-257.
- Machado, A., Siqueira, K., Ferraz, L., Inomoto, M., Bessi, R., Harakava, R & Oliveira, C. (2015). Characterization of Brazilian populations of *Pratylenchus brachyurus* using morphological and molecular analyses. *Trop. plant pathol.* DOI: 10.1007/s40858-015-0013-0
- Marbán-Mendoza, N. & Flores, L. (1993). Prospección fitonematologica en ornamentales de follaje de Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas*, 32, 1-4.
- Martínez, A., Lordello, L. & Lordello, R. (1972). Nota sobre os nematoides que atacam a seringueira no estado de Sao Paulo. *Revista de Agricultura*, 47:159-160.
- Medina, A., Crozzoli, R., y Perichi, G. (2009). Nematodos fitoparásitos asociados a los arrozales en Venezuela. *Nematología Mediterranea*, 37:59-66.
- Mehta, U. & Sundararaj, P. (1990). Distribution of seven species of *Pratylenchus* in sugarcane fields of Tamil Nadu. *Indian Journal of Nematology*, 20(2):211-213.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (1991). *Aspectos Técnicos sobre Cuarenta y Cinco Cultivos Agrícolas de Costa Rica*. Recuperado de [http://www.mag.go.cr/biblioteca\\_virtual\\_ciencia/tec-pina.pdf](http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/tec-pina.pdf)
- Molina, J. (2007). *Efecto de la compostación de bulbos de ajo (Allium sativum L.) infestados con Ditylenchus dipsaci (Kühn) Filipjev en la sobrevivencia del nematodo*. (Tesis Licenciatura). Universidad Austral de Chile. Valdivia-Chile.
- Monteiro, A. & Lordello, L. (1972). Nematoides parasitos do abacaxizeiro. *Revista de Agricultura Piracicaba*, 47, 163.

- Morales, D. (2001). *Poblaciones de nematodos fitoparásito (Pratylenchus sp. y Meloidogyne sp.) en plantaciones mixtas de café y musáceas*. (Tesis Lic.). Zamorano.Honduras.
- Moura, R., Pedrosa, E. & Guimaraes, L. (2001). Novos dados sobre a etiologia da easca preta do inhame no nordeste do Brasil. *Nematologia Brasileira*, 25, 235-237.
- Moura, R., Pedrosa, E., Lira, R., Menezes, M., Freire, F. & Cardoso, J. (1998). A etiologia da morte subita da gravioleira (*Annona muricata*). *Fitopatologia Brasileira*, 23, 173-175.
- Muñoz Ruiz, C. y Vargas Jarquín, E. (2006). Manejo de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* var. *Difformis Morelet*) en plátano cv. “Curarré” en San Carlos, Zona Norte. *Tecnología en Marcha*, 18(3): 38-52.
- Naveda, I., Crozzoli, R., Greco, N. y Zambrano, B. (1999). Nematodos fitoparasiticos asociados con cucurbitaceas en la Peninsula de Paraguana, estado Falcon, Venezuela. *Fitopatologia venezolana*, 12, 14-17.
- Noupadja, P. (1997). Plantain/corn intercropping. *InfoMusa*, 6:24-26.
- Oever, R., Van Den Berg, E., & Chirruco, J. (1998). Plant parasitic nematodes associated with crops grown by smallholders in Mozambique. *Fundamental and Applied Nematology*, 21(6):645-654
- Oliveira, C., Inomoto, M., Vieira, A. & Monteiro, A. (1999). Effect of initial population densities of *Pratylenchus brachyurus* on the growth of *Coffea arabica* cv. Mundo Novo and *C. canephora* cv. *Apota*. *Nematropica*, 29, 215-221.
- Oramas, D. & Román, J. (1982). Plant parasitic nematodes associated with plantain (*Musa acuminata*×*M. balbisiana*, AAB) in Puerto Rico. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, 66: 52-59.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2016). *Manejo de Nematodos Endoparásitos: Proyecciones Futuras*. Recuperado de <http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1054/cuf0018s.pdf>
- Page, R. (1996). TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357–358.

- Palomares-Rius J., Subbotin, S., Landa, B., Vovlas, N., Castillo, P. (2008). Description and molecular characterisation of *Paralongidorus litoralis* sp. n. and *P. paramaximus* Heyns, 1965 (Nematoda: Longidoridae) from Spain. *Nematology*, 10(1), 87-101
- Palomares-Rius, J., Guesmi, I., Horrigue-Raouani, N., Cantalapiedra-Navarrete, C., Liébanas, G., & Castillo, P. (2014). Morphological and molecular characterisation of *Pratylenchus oleae* n. sp. (Nematoda: Pratylenchidae) parasitizing wild and cultivated olives in Spain and Tunisia. *European Journal of Plant Pathology*, 140, 53-67.
- Pant, H., Mislevy, P., & Rechcigl, J. (2004). Effect of Phosphorus and Potassium on Forage Nutritive Value and Quantity: Environmental Implications. *Agronomy Journal*, 96:1299-1305.
- Peraza, W., Zamora, T., Archidona-Yuste, A., Cantalapiedra-Navarrete, C., Liebanas, G., Palomares-Rius, J. and Castillo, P. (2017). Root-lesion nematodes of the genus *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae) from Costa Rica with molecular identification of *P. gutierrezi* and *P. panamaensis* topotypes. *European. Journal of Plant Pathology*. 145, 973-998 Recuperado de [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KT971361.1?report=genbank&log\\$=nuclt op&blast\\_rank=32&RID=J5H60PNT014](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KT971361.1?report=genbank&log$=nuclt op&blast_rank=32&RID=J5H60PNT014)
- Peteira, B., Rodríguez, M., Rosales, C., & Salazar, E. (2008). *Uso de las técnicas moleculares en la identificación de nematodos entomopatógenos y sus bacterias simbiotes*. Recuperado de: <http://ftp.censa.edu.cu/ict/PUBLICACIONES%20DE%20IMPACTO/Uso%20de%20las%20tecnicas%20moleculares%20en%20la%20identificacion.pdf>
- Pinochet, J. & Rowe, P. (1978). Reaction of two banana cultivars to three different nematodes. *Plant Disease Reporter*, 62, 727-729.
- Pinochet, J., Sanchez, L., & Laffite, R. (1978). Plant parasitic nematodes associated with citrus in Honduras. *FAO Plant Protection Bulletin*, 26, 58-62.
- Pourjam, E., Kheiri, A. & Geraert, E. (1997). The genus *Pratylenchus* Filipjev, 1936 (Tylenchida: Pratylenchidae) from North of Iran. *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent* 62, 741-756.
- Pourjam, E., Waeyenberge, L., Moens, M. & Geraert, E. (1999). Morphological, morphometrical and molecular study of *Pratylenchus coffeae* and *P. loosi* (Nematoda:

- Pratylenchidae). *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent* 64, 391-401.
- Powers, T., Todd, T., Burnell, A., Murray, P., Flemming, C. (1997). The rDNA Internal Transcribed Spacer Region as a Taxonomic Marker for Nematodes. *Journal of Nematology*, 29(4):441-450.
- Quénéhervé, P., Van Den Berg, E., Topart, P. & Hostachy, B. (1997). Analyse écologique de la spécificité parasitaire des nématodes phytoparasites associés à quelques plantes ornementales cultivées à la Martinique. *Nematologica*, 43, 214-227.
- Rajab, K., Salim, S. & Speijer, P. (1999). Plant-parasitic nematodes associated with *Musa* in Zanzibar. *African Plant Protection*, 5, 105-110.
- Rama, K. & Dasgupta, M. (1998). Population ecology and community structure of plant parasitic nematodes associated with ginger in West Bengal. *Indian Journal of Nematology* 28, 10-14.
- Rama, K. & Dasgupta, M. (2000). Population ecology and community structure of plant parasitic nematodes associated with coconut and arecanut in northern West Bengal. *Indian Journal of Nematology*, 30, 175-182.
- Rashid, A. & Khan, A. (1975). Studies on the lesion nematode, *Pratylenchus coffeae*, associated with chrysanthemum. *Indian Phytopathology*, 28, 22-28.
- Ribeiro, L., Joseph, S., Mengistu, T., Dias-Arieira, C. and Campos, H. (2016). Understanding the molecular variability among different *Pratylenchus brachyurus* isolates from Brazil based on sequence analysis of ITS-SSU and D2-D3 LSU-rDNA. Submitted (22-OCT-2015) Agronomy, State University of Maringa, Avenida Colombo 5790 Bloco J45 2 Piso, Maringa, Parana 87020 Brazil. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KT948328>
- Riley, I. & Kelly, S. (2002). Endoparasitic nematodes in cropping soils of Western Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 42(1):49-56.
- Rivera, G. (1991). *Conceptos introductorios a la Fitopatología*. San José, Costa Rica: EUNED.
- Robbins, R., Riggs, R., & Von Steen, D. (1987). Results of annual phytoparasitic nematode surveys of Arkansas soybean fields, 1978-1986. *Annals of Applied Nematology*, 1:50-55.

- Robbins, R., Riggs, R., & Von Steen, D. (1989). Phytoparasitic nematode surveys of Arkansas cotton fields, 1986-88. *Journal of Nematology*, 21:619-623.
- Rodríguez, M., Gómez, L., & Peteira, B. (2007). *Meloidogyne mayaguensis* Rammah y Hirschmann, plaga emergente para la agricultura tropical y subtropical. *Revista Protección Vegetal*, 22(3).
- Román, J. & Grullon, L. (1975). Nematodes associated with sugarcane in the Dominican Republic. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, 59(2):138-140.
- Rossi, C., Ferraz, L., Berti, A., Araujo, A. & Marcon, L. (2000). Pratilencoses do feijoeiro: levantamento de ocorrência no Sudoeste Paulista e hospedabilidade de cultivares a *Pratylenchus zae*. *Revista de Agricultura Piracicaba*, 75(3):395-404.
- Ryss, A. (1988). *World fauna of the root parasitic nematodes of the family Pratylenchidae (Tylenchida)*. Leningrad, USSR, 367 pp.
- Ryss, A. y Fam-Tkhan, B. (1989). Plant-parasitic nematodes of the genus *Pratylenchus* from Vietnam. *Trudy Zoologicheskogo Instituta, Akademiya Nauk SSSR* 194, 60-64.
- Salem, A., El-Morshedy, M., El-Zawahry, A. (1994). Nematodes associated with soybean (*Glycine max*) in upper Egypt. *Fundamental and Applied Nematology*, 17(5):401-404.
- Samson, L. y Geraert, E. (1975). La faune nématologique des rizières du Cameroun. I. Ordre des Tylenchides. *Revue de Zoologie Africaine*, 89:536-554.
- Sandoval-Hernandez, J. y Téliz-Ortíz, D. (1990). Nematodos asociados al cultivo de la fresa en Zamora, Mich. e Irapuato, Gto. *Revista Chapingo*, 15, 98-101.
- Sandoval, R. (2015). *Determinación molecular de especies de Pratylenchus asociados a cultivos agrícolas de Costa Rica*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de Costa Rica. San Jose, Costa Rica.
- Schenck, S & Schmitt, D. (1992). Survey of nematodes on coffee in Hawaii. *Journal of Nematology*, 24(4S):771-775.
- Seinhorst, J. (1959). A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica*, 4, 67-69

- Servicio Agrícola y Ganadero de Chile. (2005). *Informativo Fitosanitario N°3*. Ministerio de Agricultura de Chile. Recuperado de <http://historico.sag.gob.cl/common/asp/pagAtachadorVisualizador.asp?argCryptedData=GP1TkTXdhRJAS2Wp3v88hBJ5EiFdOdZG&argModo=&argOrigen=BD&argFlagYaGrabados=&argArchivoId=4034>
- Servicio Fitosanitario del Estado. (2017). Piña costarricense con luz verde para ingresar a China. Recuperado de <https://www.sfe.go.cr/Prensa2017/CP%2007%20Pi%C3%B1a%20costarricense%20con%20luz%20verde%20para%20ingresar%20a%20China.pdf>
- Sharma, N., Edward, J.C., Misra, S., & Chandrashekar, M. (1992). Studies on phytonematodes associated with important rice growing tracts of India. *Current Nematology*, 3(2):107-109.
- Sharma, R. y Amabile, R. (1998). Fitonematoides asociados a genotipos de girassol em condicoes de Cerrado. *Nematologia Brasileira*, 23, 88-92.
- Sharma, R., Cavacalcante, M., De J., Valentim, J. (2001). Nematoides associados ao capim *Brachiaria brizantha* cv. Marandu no Estado do Acre, Brasil. *Nematologia Brasileira*, 25(2):217-222.
- Sharma, R., Cavalcante, M. De J., Moura, G., De M., Valentim, J. (2002). Nematoides associados a genotipos de soja cultivados no Acre, Brasil. *Nematologia Brasileira*, 26, 109-111.
- Sharma, R., Da Silva, J., Resck, D. & Gomes, A. (2000). Dinamica de Populacao de fitonematoides em solo tratado com lodo de esgoto em cultivos de milho. *Nematologia Brasileira*, 24, 37-40.
- Siddiqi, M. (2000). *Tylenchida parasites of plants and insects*. 2nd edition. Wallingford, UK, CABI Publishing.
- Silvia, R. & Inomoto, M. (2002). Host-Ranger Characterization of two *Pratylenchus coffeae* isolates from Brazil. *Journal Nematology*, 34(2): 135
- Sinclair, R., Mislevy, P., & Ray, D. (2001). Short photoperiod inhibits winter growth of subtropical grasses. *Planta*, 213:488-491.
- Sivakumar, M. & Vadivelu, S. (1997). Parasitic nematodes associated with medicinal and aromatic plants. *Indian Journal of Nematology*, 27, 58- 62.

- Smith, E. y Velázquez, M. (2004). *Opciones Tecnológicas para la producción de Plátano (Musa AAB) para exportación en la región atlántica de Costa Rica*. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Limón, Costa Rica.
- Smith, J., Valenzuela, H. (2002). *Stargrass*. Cooperative Extension Service, College of Agriculture and Human Resources, University of Hawaii, Manoa, USA.
- Solano, F., Beacham, J., Thomas, S., Steinberger, Y., Hanson, S. (2013). Assessment of soil nematode biodiversity in preserved soil samples nematodes. *Phytopathology*, 103(2), 2-136.
- Solano, S., Esquivel, A., Molina, R., Morera, B. (2015). Identificación de especies de Meloidogyne asociadas a plantas ornamentales de altura en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 26(2): 247-256.
- Sosa, M., Perdomo, F., Brathwaite, C., Salazar, J. (1997). *Técnicas para el Diagnóstico de enfermedades en las Plantas*. Mexico: IICA.
- Souza, R. (2008). *Plant-Parasitic Nematodes of Coffee. Brazil*. Springer.
- Speijer, P., Rotimi, M. y De Waele, D. (2001). Plant parasitic nematodes associated with plantain (*Musa* spp., AAB-group) in southern Nigeria and their relative importance compared to other biotic constraints. *Nematology*, 3, 42.
- Stanton, J., Siddiqi, M. y Lenne, J. (1989). Plant-parasitic nematodes associated with tropical pastures in Colombia. *Nematropica*, 19, 169-175.
- Stoyanov, D. (1977). Parasitic species of nematodes on corn. *Rastitelna Zashchita*, 25:23-24.
- Subbotin, S., Ragsdale, E., Mullens, T., Roberts, PA., Mundo-Ocampo, M., Baldwin, J. (2008). A phylogenetic framework for root lesion nematodes of the genus *Pratylenchus* (Nematoda): evidence from 18S and D2-D3 expansion segments of 28S ribosomal RNA genes and morphological characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(2): 491-505.
- Sundararaju, P. & Ratnakaran, K. (2002). Factors influencing the prevalence of the root-lesion nematode, *Pratylenchus coffeae* on oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Indian Journal of Nematology* 32, 16-19.

- Sundararaju, P., Mustaffa, M., Kumar, V., Cannayane, I. y Priya, B. (2002). Effect of organic farming on plant parasitic nematodes infesting banana cv. Karpuravalli. *Current Nematology*, 13, 39-43.
- Swofford, D. (2003). *PAUP\*. Phylogenetic Analysis using Parsimony (\*and other methods)*, version 4.0b 10. Sunderland: Sinauer Associates.
- Talavera, R. (2003). *Manual De Nematología Agrícola. Introducción al análisis y al control nematológico para agricultores y técnicos de agrupaciones de defensa vegetal*. Instituto de formación agraria y pesquera. Brasil.
- Talwana, H., Butseya, M., Tusiime, G. (2008). Occurrence of plant parasitic nematodes and factors that enhance population build-up in cereal-based cropping systems in Uganda. *African Crop Science Journal*, 16(2): 119-131.
- Tarté, R., Cerrud, D., Rodríguez, I., Osorio, J. (1977). Presencia y parasitismo de *Pratylenchus zeae* en caña de azúcar en Panamá con indicaciones sobre la susceptibilidad relativa de algunos cultivares. *Turrialba*, 27:259-266.
- Thorne, G. (1961). *Principles of nematology*. Estados Unidos. McGraw-Hill Book Company, Inc.
- Tihohod, D., Ferraz, L. & Barbosa, J. (1991). Manejo de fitonematoides do algodoeiro 1. Comparacao entre metodos de amostragem. *Nematologia Brasileira*, 15, 112-120.
- Toida, Y., Tangchitsomkid, N., Keereewan, S., Mizukubo, T. (1996). Nematode species attacking crops in Thailand with measurements of second-stage juveniles of *Meloidogyne spp.* *JIRCASJournal*, 3:59-68.
- Townshend, JL., Potter, JW., & Willis, CB. (1978). Ranges of distribution of species of *Pratylenchus* in northeastern North America. *Canadian Plant Disease Survey*, 58:80-82.
- Trelles, O. (2009). *Secuenciación del AND: Bioinformática básica*. Recuperado de: [http://ocw.unia.es/ciencias-de-la-vida/bioinformatica-basica/materiales/bloque-4/04-1-Sequencing-1-v2\\_Lectura%20del%20ADN%20de%20los%20organismos.pdf](http://ocw.unia.es/ciencias-de-la-vida/bioinformatica-basica/materiales/bloque-4/04-1-Sequencing-1-v2_Lectura%20del%20ADN%20de%20los%20organismos.pdf)
- Tuyet, N., Waeyenberge, L., Elsen, A., Nhi, H. and De Waele, D. (2017). Molecular characterisation of *Pratylenchus coffeae* populations from Vietnam. *Russ. J. Nematol.* 22 (2), 121-130. Recuperado

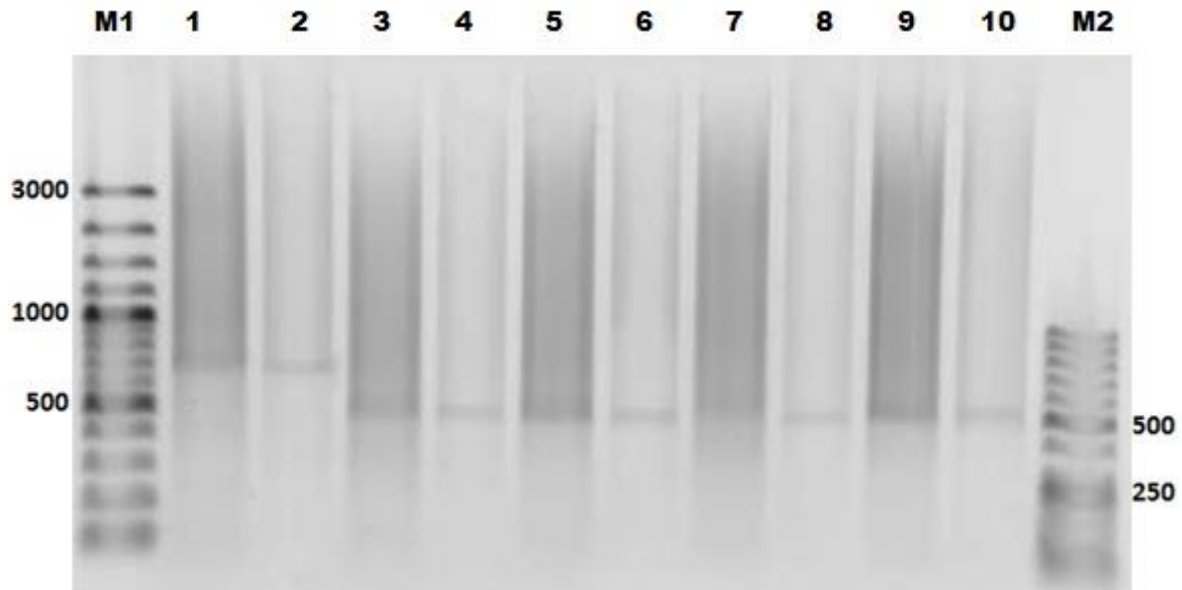
de[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KC857658.1?report=genbank&log\\$=nucletop&blast\\_rank=3&RID=J5GA1W4R015](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KC857658.1?report=genbank&log$=nucletop&blast_rank=3&RID=J5GA1W4R015)

- Uehara, T., Mizukubo, T., Kushida, A., Momota, Y. (1998). Identification of *Pratylenchus penetrans* (COBB) by PCR Using ITS-Based Species-Specific Primers. *Japanese Journal of Nematology*, 28(1/2): 1-7.
- Van Den Berg, E. y De Waele, D. (1989). Further observations on nematodes associated with rice in South Africa. *Phytophylactica*, 21, 125- 130.
- Van Den Berg, E., Marais, M., Kandji, S., Mounport, D., N'diaye, B., Cadet, P. (2001). Plant-parasitic nematodes associated with corn-bean intercropping systems in Kenya. *African Plant Protection*, 7(2):81-84.
- Van Den Bergh, I., Nguyet, D., Tuyet, N., Nhi, H., De Waele, D. (2006). Influence of *Pratylenchus coffeae* and *Meloidogyne* spp. on plant growth and yield of banana (*Musa* spp.) in Vietnam. *Nematology*, 8, 265-271.
- Vejl, P., Skupinová, S., Sedlák, P., Domkářová, J. (2002). Identification of PCN species (*Globodera rostochiensis*, *G. pallida*) by using of ITS-1 region's polymorphism. Rostlinná Výroba. *Czech University of Agriculture in Prague & Potato Research Institute, Havlíčkův Brod, Czech Republic*. 48(11), 486-489.
- Venter, C., De Waele, D. & Van Eeden, C. (1992). Plant-parasitic nematodes on field crops in South Africa. 4. Groundnut. *Fundamental and Applied Nematology*, 15, 7-14.
- Waeyenberge, L., Ryss, A., Moens, M., Pinochet, J., Vrain, T. (2000). Molecular characterization of 18 *Pratylenchus* species using rDNA restriction fragment length polymorphism. *Nematology*, 2(2):135-142.
- Waeyenberge, L., Viaene, N., & Moens, M. (2009). Species-specific duplex PCR for the detection of *Pratylenchus penetrans*. *Nematology*, 11(6):847-857.
- Wallace, H. (1973). *Nematode Ecology and plant disease*. Londonn: Edward Arnold publishers Limited.
- Wang, H. & Liao, J. (2018). Morphological and Molecular Identification of a Species of Root Lesion Nematode Parasitizing *Melastoma dodecandrum*. Department of Eco-Engineering, Guangdong Eco-Engineering Poly. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MG738356>

- Wang, H., Zhuo, K. and Liao, J. (2017). Barcoding Root-Lesion Nematodes: a Comprehensive Study of 12 Species of the Genus *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae). Plant Pathology, South China Agricultural University, Wushan, Guangzhou, Guangdong 510642, China. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY424272>
- Wang, K., McSorley, R., & Gallaher, R. (2003). Effect of *Crotalaria juncea* amendment on nematode communities in soil with different agricultural histories. *Journal of Nematology*, 35, 294-301.
- WingChing, R., Salazar, L., Flores, L., y Rojas, A. (2008). *Reconocimiento de nematodos en pastos tropicales en las comunidades de Sucre y San Vicente, cantón de San Carlos*. *Agronomía Costarricense*, 32(2), 129-136.
- Yu, Q. (2008). Species of *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae) in Canada: description, distribution and identification. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 30(3): 1-9.
- Zamora, T. (2016). *Identificación morfológica, morfométrica y molecular de cuatro especies de Pratylenchus (Nematoda: Pratylenchidae) de Costa Rica*. (Tesis Licenciatura). Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica.
- Zhao, L. (2011). Molecular identification of *Pratylenchus zae* using rDNA D2D3 sequences. Plant Quarantine Lab. of Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of the People's Republic of China, No. 66 Huacheng Road, Guangzhou, Guangdong 510623, China. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JN020931>
- Zimmermann, A. (1898). De nematoden der koffiewortels. Deel I. *Mededelingen uit 's Lands Plantentuin*. 27, 1-64.

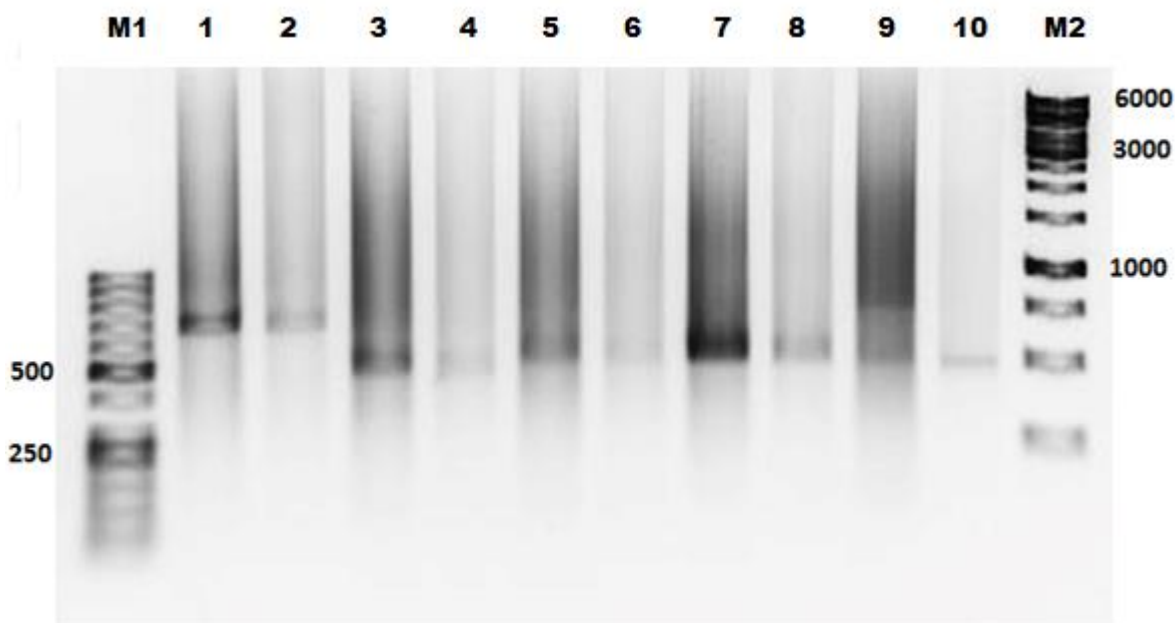
## Anexos

**Anexo 1.** Patrones generados con la enzima *Pst* I mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%.



**Figura 12.** Patrones generados con la enzima de restricción *Pst*I mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Carriles 1, 3, 5, 7 y 9: productos de PCR de la región ITS entre los genes 18s y 5.8s amplificada. Carriles: 2, 4, 6, 8 y 10: productos de PCR tratados con la enzima. Carril 2: fragmentos generados para *P. coffeae* en plátano, carril 4: Fragmentos generados para *P. zea*e en arroz, carril 6: Fragmentos generados para *P. zea*e en pasto estrella, carril 8: Fragmentos generados para *P. brachyurus* en piña de San Carlos y carril 10: Fragmentos generados para *P. brachyurus* en piña de Guápiles. M1: Marcador de peso molecular 100pb. M2: Marcador de peso molecular 50pb. Heredia, 2018.

**Anexo 2.** Patrones generados con la enzima *HindIII* mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%.



**Figura 13.** Patrones generados con la enzima de restricción *HindIII* mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Carriles 1, 3, 5, 7 y 9: productos de PCR de la región ITS entre los genes 18s y 5.8s amplificada. Carriles: 2, 4, 6, 8 y 10: Productos de PCR tratados con la enzima. Carril 2: Fragmentos generados para *P. coffeae* en plátano, carril 4: Fragmentos generados para *P. zea* en arroz, carril 6: Fragmentos generados para *P. brachyurus* en piña de San Carlos, carril 8: Fragmentos generados para *P. brachyurus* en piña de Guápiles y carril 10: Fragmentos generados para *P. zea* en pasto estrella. M1: Marcador de peso molecular 50pb. M2: Marcador de peso molecular 1pb. Heredia, 2018.

**Anexo 3.** Secuencias obtenidas apartir de la amplificación de los dominios D2-D3 de la región 28S del ARNr e ITS del ARNr.

>Secuencia. Muestra de Plátano. Paraíso de Sixaola, Talamanca, Limón Costa Rica. *P. coffeae*. D2D3 723 bp.

```
GTACCGTGAGGGAAAGTTGAAAAGCACTTTGAAGAGAGAGTTAAAGAGGACGTGAAA  
CCGATGAGGTGGAAACGGACAGAGCTAGCGTATCTGGCCTGCATTACAGCTTGTGCGGT  
CGCTACCGATGAATCGCTGATCTCCAGATTGGGACTGTTGACTAGTCGGTCGGTGGCTG  
TATAGTGCATTTGCAGGTGGAGTGCGTTCGAGGCATCCGGGATGGCGGCATGAACTCAG  
CTTTGAGGCCAGCTTGCTGGTACCTGGGCTGGGGGACTTTGTGCTGTTTCGTTCTGGGTG  
TTCACACACAATTGAAGGGGGCTTTGGTAGGGTGCCGAGCTGGGTGTTCGGTGGCGGTC  
GCTTGGCAGACGTACTGTGCACACAGTTCGGTCCTTGCCGAGCTCACTCCATCTATCTC  
GGCGTAAAAGCTGGTCATCTTTCCGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTTTATC  
GTGTGCGCGAGTCATTGGGCGTTCAAACCCAAAGGCGCAATGAAAGTGAACGTTTCC  
GTTAGGAGCCAACGTGCGATCCTGGTACCACGGTGGCCGGGCGCAGCATGGCCCCAT  
CCTGACTGCTTGCAGTGGGGTGGAGGAAGAGCGTACGCGGTGAGACCCGAAAGATGGT  
GAACTATTCCTGAGCAGGATAAAGCCAGAGGAAACTCTGGTGGAAAGTCCGAAGCGATT  
CTGACGTGCAAATCGATCGTCTGAC
```

>Secuencia. Muestra de Plátano. Paraíso de Sixaola, Talamanca, Limón Costa Rica. *P. coffeae*. D2D3 720 bp.

```
ATTCGATTACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGAAAAGCACTTTGAAGAGAGAGTTAAAG  
AGGACGTGAAACCGATGAGGTGGAAACGGACAGAGCTAGCGTATCTGGCCTGCATTCA  
GCTTGTGCGGTCGCTACCGATGAATCGCTGATCTCCAGATTGGGACTGTTGACTAGTCG  
GTCGGTGGCTGTATAGTGCATTTGCAGGTGGAGTGCGTTCGAGGCATCCGGGATGGCGG  
CATGAACTCAGCTTTGAGGCCAGCTTGCTGGTACCCGGGCTGGGGGACTTTGTGCTGTT  
CGTTCTGGGTGTTACACACACAATTGAAGGGGGCTTTGGTAGGGTGCCGAGCTGGGTGT  
CGGTGGCGGTCGCTTGCAGACAGTACTGTGCACACAGTTCGGTCCTTGCCGAGCTCACT  
CCATCTATCTCGGCGTAAAAGCTGGTCATCTTTCCGACCCGTCTTGAAACACGGACCAA  
GGAGTTTATCGTGTGCGCGAGTCATTGGGCGTTCAAACCCAAAGGCGCAATGAAAGT  
GAACGTTTCCGTTAGGAGCCAACGTGCGATCCTGGTACCACGGTGGCCGGGCGCAGC  
ATGGCCCCATCCTGACTGCTTGCAGTGGGGTGGAGGAAGAGCGTACGCGGTGAGACCC  
GAAAGATGGTGAAC TATTCCTGAGCAGGATAAAGCCAGAGGAAACTCTGGTGGAAAGTC  
CGAAGCGATTCTGACGTGCA
```

> Secuencia. Muestra de Arroz. Laurel, Corredores, Puntarenas. Costa Rica. *P. zea*. D2D3  
736 bp

GCGGGAATTCGATTACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGCAAAGCACTTTGAAGAGAGA  
GTAAAGAGGACGTGAAACCGATGAGGTGGAAACGGATAGAGCCAGCGTATCTGGCC  
TGATTCAACCGCTCGCGGGAAGCGCTCGTGCAGCTGGCGACCCAGATTGGGACAGT  
TGTGCGAGTCATGCTGGACGCGAGTGGTGCATTTGCAGGTCGAGTGCGCCGAGAGGCT  
CGGGGCAGCAGTGTGAGCCCGGTTTTGAGGCCAGCTTGCTGGTACCCGGACTTGGGGG  
AGTGTGTTTTGCTTTGAGTGCAAGGATGGGCATGGCTTACGGGCCCGGTTATGGCCGA  
GCTGTGGGTCGGCGGCGGTCGCTTGCACACGTGCTGTGCCAGCAGTTCGGTCCTGGTC  
GAGCTCCCACACTGCCTGTTCTCGGTGTAAGAGCTGGTCATCTCTCCGACCCGTCTTGA  
AACACGGACCAAGGAGTTTATCGTGTGCGCGAGTCATTGGGCGTTGAAAACCCAAAGG  
CGCAATGAAGTGAAGTGCCACGCAAGTGGCTGATGTGCGATCGGGTGTTCGCGGAGC  
ACCTGCGCAGCATGGCCCCATTCTGGCTGCTTGCAGCGGGGTGGAGGAAGAGCGTGC  
CGATGAGACCCGAAAGATGGTGAAGTATTCTGAGCAGGATGAAGCCAGAGGAACT  
CTGGTGGAAGTCCGAAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCG

> Secuencia. Muestra de Arroz. Laurel, Corredores, Puntarenas. Costa Rica. *P. zea*. D2D3  
739 bp

GCGGGAATTCGATTACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGCAAAGCACTTTGAAGAGAGA  
GTAAAGAGGACGTGAAACCGATGAGGTGGAAACGGATAGAGCCAGCGTATCTGGCC  
TGATTCAACCGCTCGCGGGAAGCGCTCGTGCAGCTGGCGACCCAGATTGGGACAGT  
TGTGCGAGTCATGCTGGACGCGAGTGGTGCATTTGCAGGTCGAGTGCGCCGAGAGGCT  
CGGGGCAGCAGTGTGAGCCCGGTTTTGAGGCCAGCTTGCTGGTACCCGGACTTGGGGG  
AGTGTGTTTTGCTTTGAGTGCAAGGATGGGCATGGCTTACGGGCCCGGTTATGGCCGA  
GCTGTGGGTCGGCGGCGGTCGCTTGCACACGTGCTGTGCCAGCAGTTCGGTCCTGGTC  
GAGCTCCCACACTGCCTGTTCTCGGTGTAAGAGCTGGTCATCTCTCCGACCCGTCTTGA  
AACACGGACCAAGGAGTTTATCGTGTGCGCGAGTCATTGGGCGTTGAAAACCCAAAGG  
CGCAATGAAAGTGAAGTGCCACGCAAGTGGCTGATGTGCGATCGTGTGTTCCACGGAA  
CACCTGCGCAGCATGGCCCCATCTGGCTGCTTGCAGCGGGGTGGAGGAAGAGCGTGC  
GCGATGAGACCCGAAAGATGGTGAAGTATTCTGAGCAGGATGAAGCCAGAGGAAAC  
TCTGGTGGAAGTCCGAAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTC

>Secuencia. Muestra de Pasto Estrella.San Vicente de Ciudad Quesada, San Carlos, Alajuela.  
Costa Rica. *P. zea*. D2D3 731 bp.

AATTCGATTACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGCAAAGCACTTTGAAGAGAGAGTTAAA  
GAGGACGTGAAACCGATGAGGTGGAAACGGATAGAGCCAGCGTATCTGGCCTGTATTC  
AACCGCTCGCGGGAAGCGCTCGTGCAGCTGGCGACCCAGATTGGGACAGTTGTGCGA  
GTCATGCTGGACGCGAGTGGTGCATTTGCAGGTCGAGTGCGCCGAGAGGCTCGGGGCA  
GCAGTGTGAGCCCGTTTTGAGGCCAGCTTGCTGGTACCCGGACTTGGGGGAGTGTG  
TTTTGCTTTGAGTGCAAGGATGGGCATGGCTTACGGGCCCGATTATGGCCGAGCTGTGA  
GTCGGCGGCGGTCGCTGCGACACGTGCTGTGCCAGCAGTTCGGTCCTGATCGAGCTCT  
CATACTGCCTGTTCTCGGTGTAAGAGCTGGTCATCTCTCCGACCCGTCTTGAAACACGG  
ACCAAGGAGTTTATCGTGTGCGCGAGTCATTGGGCGTTGAAAACCCAAAGGCGCAATG  
AAAGTGAAGTGCCACGCAAGTGGCTGATGTGCGATCGTGTGTTCCACGGAACACCTGC  
GCAGCATGGCCCCATCTGGCTGCTTGCAGCGGGGTGGAGGAAGAGCGTGC GCGATGA  
GACCCGAAAGATGGTGAAGTATTCTGAGCAGGATGAAGCCAGAGGAACTCTGGTG  
AAGTCCGAAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATC

> Secuencia. Muestra de Piña. Pital, San Carlos, Alajuela. Costa Rica. *P. brachyurus*. D2D3  
762 bp.

CGTGAGGGAAAGTTGCAAAGCACTTTGAAGAGAGAGTTAAAGAGGACGTGAAACCGG  
TGAGGTGGAAACGGATAGAGTCAGCGTATCCGACTTGTATTTCAGCTGCGTAGTGTTAC  
GGCCTCCGGTGCTGGCGTCTCCAGATTGGGAACAGTGCTGGTTCGGCCGAGAGCTGTGC  
TGTGCATTTGCAGGTGGAGTGCCTCGAGACTCATGTGGTGGCGTCACAACTTTGTTTT  
GAGGCCAGCTTGTGGTACCCGAACCTGGGCTAGTGATGTTACGCATATGTGTGTTTGG  
GTGAATGGCTTACGGGCACAGGTTGGGCCCGATCAAAGGGTCGGCGGCGGTACATGT  
GACACGTGCTGCTCAATTTGTTTCGGTCCAGCTTGGGCTCACTGTTCTCACTCTCGGCGT  
AGAAGCTGGTCATCTATCCGACCCGTCTTGAACACGGACCAAGGAGTTTATCGTGTG  
CGCAAGTCATTGGGTGTTCAAACCTAAAGGCGCAATGAAAGTGAATGTCTCCGCAAG  
GAGTTGATGTGTGACCCTGTTGGCCACGGCTGGCGGGGGCAACATGGCCCCATTCGGA  
TTGCTTGCAATCGGGTGGCGGAAGAGCGTACGCGACGAGACCCGAAAGATGGTGAAC  
ATTCTGAGCAGGATGAAGCCAGAGGAACTCTGGTGAAGTCCGAAGCGATTCTGAC  
GTGCAAATCGATCGTCTGACTTGGGTATAGGGGCGAAAGACTAATCGAACCATCTAGT  
AGCTGG

> Secuencia. Muestra de Piña. Guápiles, Guápiles, Limón. Costa Rica. *P. brachyurus*. D2D3  
755 bp.

GGAAACGGATAGAGCCAGCGTATCTGGCCTGTATTCAACCGCTCGCGGGAAGCGCTCG  
TGCAGCTGGCGACCCAGATTGGGACAGTTGTGCGAGTCATGCTGGACGCGAGTGGTG  
CATTTGCAGGTCGAGTGCGCCGAGAGGCTCGGAGCAGCAGTGTGAGCCCGGTTTTGAG  
GCCAGCTTGTGGTACCCGACTTGGGGGAGTGCTGTTTGTGTTTGTGAGTGCAACGAAGG  
GCATGGCTTACGGGCCCGGTTATGGCCGAGCTGTGGGTCGGCGGCGGTGCTTGCAGC  
ACGTGCTGTGCCAGCAGTTCGGTCTGCTGAGCTCCCATATTGCCTATTCTCGGTGTA  
AGAGCTGGTCATCTCTCCGACCCGTCTTGAACACGGACCAAGGAGTTTATCGTGTGCG  
CGAGTCATTGGGCGTTGAAAACCCAAAGGCGCAATGAAAGTGAAGTGCCACGCAAGT  
GGCTGATGTGCGATGKGTGTTCCACGGAACACAACCGCAGCATGGCCCCATCCTGGC  
TGCTTGCAGCGGGGTGGAGGAAGAGCGTGCAGCAGTGCAGACCCGAAAGATGGTGAAC  
ATTCTGAGCAGGATGAAGCCAGAGGAACTCTGGTGAAGTCCGAAGCGATTCTGAC  
GTGCAAATCGATCGTCTGACTTGGGTATAGGG



>Secuencia. Muestra de Pasto Estrella.San Vicente de Ciudad Quesada, San Carlos, Alajuela. Costa Rica. *P. zae*. ITS 559 bp.

```
CTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGTTTCCGTAGGTGAACCTGCTGCTG
GATCATTACACGCACCGTGATGGTCACACTATGCAGAACGGCTTGTTGAAACAAGCGC
GCTTCCAATGCAGCCTGGAAGTGAACGGCTAACGCTGGTGTCTGTGTGTCGCTGAGCA
GACTGTCTTCGTCCGTGGTTGTGATGAGGGCAGACGTTAGGACTGTGTGCAAAGCAGC
CGCATGCAGTTTAAGACTCAATGAGCCCACAGCTACGGGGCCGCCAGCATTTATTTTTT
CAATAATTTTTTAAACAAACAAGAAATTTAATCTTATCGGTGGATCACTCGGCTCGTG
GGTCGATGAAGAGCGCAGCTAACTGCGATAACTAGTGTGAACCGCAGAAACATTGAAC
ACTAAAGTCTCGAATGCACATTGCGCCATTGGAGTCATATCCGCTGGAGCGCCTGGTTC
AGGGTCATGAAAGGACACAAACGAGAACTTTGCTGGAAATTGAGAATATTCATATGA
GCAGAACTGTATGCGTAGATTTATGCTGGAAAT
```

> Secuencia. Muestra de Piña. Pital, San Carlos, Alajuela.Costa Rica. *P. brachyurus*. D2D3 627 bp.

```
CGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCTGCTGGATCATTACACAAAAGAATGTAAT
GTTCTCAAGAATCGCGAACAAGCCACTTTTCTGCTTAAAATAAGTGGCACGCAACTCGT
TGTTTGGATGGTGCACGATGTTGTGAACGGCTAACGCTGGCCTCTGGATGTTGTTGAG
CAATTGTATTCGTCCGTGGTTGTGATGAGGCAACATGGTAGGGCCCGAGCTGAAGATG
ACAATGCTCATGTGGTTTAACATTTAATGATCCCCCAGGCAATTGGGGCCGCCAGCAAC
CCATTTTTTCAATAATTTTTTTTTGCAAAACAAATTCTAATCTTATCGGTGGATCACTC
CGCTCGTGAGTCTATAAAGAACGCACCTAACTGCGATACATCGCGCGAGCTGCACAAA
CCTAGCGCACAAAGAGCTTCCAATGCACATTGCGCCATTGGATTCACATCCTCAGGCACG
CCTGGTTCAGGGTCATAACCAAAAACAATCAAAACGATATCTGTGTGATAGATTATGGG
CGACTCATGTGTGTTTTTAAAAAATGTGTTGTGTATTCCATGAGTGTGAGGAGGCAG
GATTTGTTGATCAAAGATGTAAAGAACAATGAATTATTG
```