

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

**Evaluación de la tolerancia de cinco líneas de café derivadas del
“Sarchimor T5296” contra el nematodo agallador *Meloidogyne exigua*
(Göeldi 1887) en etapa de almácigo, en San Isidro de Alajuela**

Tesis de Licenciatura en Ingeniería Agronómica

Estudiante:

Roy Ademar Artavia Carmona

Tutor:

M. Sc. Walter Peraza Padilla

Asesores:

M. Sc. Carlos Mario Rodríguez Solís

Lic. Orlando Mora Alfaro

Campus Omar Dengo, Heredia, Costa Rica, 2018

**Evaluación de la tolerancia de cinco líneas de café derivadas del
“Sarchimor T5296” contra el nematodo agallador *Meloidogyne exigua*
(Göeldi 1887) en etapa de almácigo, en San Isidro de Alajuela**

Estudiante:

Roy Ademar Artavia Carmona

**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. Juan Rafael Mora Camacho

Representante del Decano Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar

M.Sc. José Alonso Calvo Araya

Representante Dirección Escuela de Ciencias Agrarias

M.Sc. Walter Peraza Padilla

Director de Tesis

M.Sc. Carlos Mario Rodríguez Solís

Asesor

Lic. Orlando Mora Alfaro

Asesor

Roy Ademar Artavia Carmona

Estudiante

DEDICATORIA

A Dios en primera instancia por todas las bendiciones que me ha dado.

A mis padres, Ademar y Floribeth por todo el apoyo, comprensión y sobretodo paciencia que me han tenido a lo largo de mis años de estudio.

A mí hermana Melissa, por la ayuda que me brinda en todo momento.

Muy especialmente se la dedico a mí sobrino-ahijado Samuel Artavia Carmona, el cuál ha sido uno de mis mayores impulsos y motivaciones para el logro de ésta tesis.

A mí tía Nora, que ha esperado éste momento de culminar mis estudios con la Licenciatura.

A todos mis docentes a lo largo de la vida y muy especialmente a mí profesor tutor Walter Peraza Padilla.

A mí novia Martha Masis Rodríguez, por la motivación, ayuda que me brinda a cada instante, por apoyarme a que siga estudiando y mejorándome académicamente.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme el don de la vida, guiarme en todo momento, por todas las bendiciones que me ha dado y permitirme cumplir mi sueño de ser Ingeniero Agrónomo.

A mis padres, Ademar; por la educación, por inculcarme principios y valores fundamentales, por enseñarme a trabajar en el campo, amar las actividades y labores que se llevan a cabo en éste y por toda la ayuda incondicional. A mi madre Floribeth por toda la educación que me brindó, por guiarme y aconsejarme siempre, por su ayuda incondicional y sobretodo indicarme que existía ésta profesión “pasión” (AGRONOMÍA).

A mí hermana Melissa, por la ayuda que me brinda en todo momento y a mí sobrino-ahijado Samuel el cuál es uno de mis motores para luchar cada día.

A mí profesor tutor Walter Peraza Padilla, por adoptarme con ésta idea de tesis, por toda su ayuda y colaboración a lo largo de éste proceso. Al laboratorio de Nematología de la Universidad Nacional por todo el apoyo en materiales, equipos y facilidades brindadas para la realización y culminación de mis estudios de Licenciatura en Ingeniería en Agronomía.

A Tatiana Zamora, que me ayudó tanto con todas las actividades de la tesis. A la profesora Irena Hilje, que me ha ayudado montones con la tesis, en especial con la parte molecular.

A la profesora Gabriela Soto, que me colaboró tanto en seguir adelante con la tesis de licenciatura y me puso en contacto con don Carlos.

A la compañía Starbucks, por el apoyo económico, logístico y espacio físico para la realización del ensayo. A don Carlos, don Orlando y a Hugo, que me han colaborado muchísimo de todas las formas posibles.

A don Mainor Rojas del CICA FÉ, que siempre estuvo disponible para ayudarme con la recolección del material para el inculo.

Al profesor Eduardo Salas, por toda la colaboración con el análisis estadístico e interpretación de los datos.

A Mauricio Barboza “Puris”, que me colaboró con las mediciones en campo.

RESUMEN

Las pérdidas económicas en la producción de café por el ataque de nematodos fitoparásitos se estiman en rangos de un 10 a un 25%. Determinar variedades o líneas con capacidad de resistencia o al menos tolerancia a nematodos es necesario en los programas de mejoramiento genético, a fin de contar con un adecuado sistema de manejo integrado de plagas. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar la tolerancia de cinco líneas de café derivadas del “Sarchimor T5296” mediante la inoculación del nematodo *Meloidogyne exigua*, en la etapa de almácigo como fase elemental en los programas de mejoramiento y establecimiento del cultivo. Se evaluaron las variables de crecimiento del cafeto, [altura de la planta (cm), diámetro del tallo (mm) y número de hojas], a los 120 días después de la inoculación. Se avaluó el Índice de Agallamiento Radical (ÍAR), se pesó en fresco los sistemas radicales, se realizaron los conteos de nematodos para cada línea y se procedió a determinar el Factor de Reproducción (FR). Se encontraron diferencias significativas tanto entre líneas como entre los tratamientos (inoculado y sin inocular), principalmente para las variables altura de planta y grosor de tallo. En la variable altura de planta, el testigo Caturra (CT) presentó la menor altura de planta en ambos tratamientos (inoculado 7.27 cm y sin inocular 10.84 cm). Al comparar solo las líneas San Isidro (SI) (derivadas del Sarchimor T5296), para el tratamiento inoculado, la SI35 fue la mejor línea con una altura de planta de (12.5cm), mientras tanto la línea que creció menos en presencia de nematodos fue la SI34, (9.31 cm). Para la variable diámetro de tallo, se presentaron también diferencias significativas de las San Isidro (SI), con respecto al testigo Caturra (CT) y se presentó una diferencia significativa en el diámetro del tallo de la SI35 que fue la mejor (2.60 mm), con respecto a la SI34 que fue la de menor crecimiento (2.30 mm). La variable Índice de Agallamiento Radical (ÍAR), el porcentaje de severidad mostró que la línea SI35 fue la menos agallada (5.3%) con un comportamiento del genotipo “resistente” mientras tanto la SI34, fue la más agallada (59.9%), con un comportamiento “susceptible”. En la variable peso fresco de los sistemas radicales, la línea SI27 fue la que presentó el mayor peso radical (6.1 g), mientras tanto el testigo Caturra (CT), tuvo el menor promedio de peso radical (2.6 g). Con los conteos poblacionales de nematodos presentes en raíz, se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$), entre las líneas, donde la SI35 fue la que presentó en promedio, menor cantidad de nematodos con 167.8, mientras tanto la SI34, presentó un promedio de 1 436.3 juveniles. Con respecto al factor de reproducción (FR), las líneas SI35, SI31 y SI32, se comportaron como resistentes, mientras tanto las líneas SI27, SI34 y Caturra CT (testigo),

resultaron ser susceptibles, según la clasificación de Oostembrink. La línea más promisoría para futuras investigaciones, fue la SI35 ya que mostró las características más sobresalientes en las variables evaluadas.

ABSTRACT

The economic losses in coffee production by the attack of phytonematodes are estimated in ranges of 10 to 25%. To determinate varieties or lines with resistance or at least tolerance to nematodes is highly necessary in genetic improvement programs in order to have an adequate integrated pest management system. Therefore, the objective of this research was to evaluate the tolerance of five coffee lines derived from the "Sarchimor T5296" by inoculation of the nematode *Meloidogyne exigua*, in the stage of seedbed as an elementary stage in the breeding and planting programs. We assessed the growth variables of coffee plant (height (cm), stem diameter (mm) and number of leaves), at 120 days after inoculation. The Radical Gill Index (ÍAR) was appraisals, the radical systems were weighed in fresh, the nematode counts were made for each line and the reproduction factor (FR) was determined. Significant differences were found both between lines and between treatments (inoculated and no inoculated), mainly for the variables plant height and stem thickness. In the variable plant height, the Caturra (CT) control presented the lowest plant height in both treatments (inoculated 7.27 cm and not inoculated 10.84 cm). When comparing only the lines San Isidro (SI) (derived from the Sarchimor T5296), for the inoculated treatment, the SI35 was the best line with a plant height of (12.5 cm), meanwhile the line that grew less in the presence of nematodes was the SI34, (9.31 cm). For the variable stem diameter, in the same way there were significant differences of the San Isidro (SI), with respect to the control Caturra (CT) and showed a significant difference in the diameter of the stem of the SI35 that was the best (2.60 mm), with regarding the SI34 that was the worst (2.30 mm). The variable Radical Gill Index (ÍAR), the percentage of severity showed that the SI35 line was the least gill (5.3%) with a behavior of the genotype "resistant" meanwhile the SI34, was the most Gill (59.9%), with a behavior "susceptible". In the fresh weight variable of the radical systems, the SI27 line was the one that presented the highest radical weight on average 6.1 g, meanwhile the Caturra (CT) witness, had the lowest average of radical weight (2.6 g). With the population counts of nematodes present at the root, statistically significant differences were presented ($P < 0.05$), between the lines, where the SI35 was the one that presented in average lower quantity of nematodes with 167.8, meanwhile the SI34, presented an average of 1436.3 juveniles. With respect to the reproduction factor (FR), the lines SI35, SI31 and SI32, behaved as resistant, meanwhile the lines SI27, SI34 and Caturra CT (control), were susceptible, according to the classification of Oostembrink. The most promising line for future research is the SI35, which showed the most outstanding characteristics in the variables evaluated.

Tabla de contenidos

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
RESUMEN	V
ABSTRACT.....	VII
LISTA DE CUADROS	XI
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE ANEXOS	XIV
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
GENERAL.....	3
ESPECÍFICOS	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Aspectos históricos del café	4
Historia y origen del café en América	4
Historia del origen del café en Costa Rica.....	4
Clasificación botánica del café.....	5
Origen de la planta	5
Descripción de la planta	5
Importancia del cultivo de café	6
Datos del mercado mundial de café.....	7
Situación nacional del cultivo de café	12
Área sembrada.....	12
Productividad	12
Consumo	13
Exportaciones.....	13
Precios.....	14
Variedad Sarchimor.....	15
Antecedentes de esta variedad.....	15
Sarchimor T5296.....	16
¿Qué son los nematodos fitoparásitos?.....	16
Importancia	17
Características generales de los nematodos	17
Clasificación de los nematodos de acuerdo a sus hábitos alimenticios o formas de parasitismo	18

Nematodos en el cultivo de café.....	19
Género: <i>Meloidogyne</i>	20
Ciclo de vida de <i>Meloidogyne</i> spp.....	21
<i>Meloidogyne exigua</i> (Göeldi 1887)	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
Localización del ensayo	26
Condiciones meteorológicas.....	27
Tipo de sustrato	27
Material vegetal utilizado en el ensayo	28
Selección de las líneas San Isidro, a partir del Sarchimor T5296	28
Siembra de las semillas y obtención de plantas de almácigo de café.....	28
Material para la inoculación (obtención del inóculo)	29
Reproducción de <i>M. exigua</i> en un hospedante alternativo.....	30
Inoculación del material	31
Variables evaluadas:.....	32
Variables de crecimiento	32
Índice de Agallamiento Radical (IAR)	33
Análisis del peso fresco de las raíces.....	34
Análisis de la población final de nematodos en raíces.....	34
Análisis de la población final de nematodos en sustrato.....	34
Análisis del Factor de Reproducción.....	34
Análisis físico del sustrato.....	35
Identificación de la especie de <i>Meloidogyne</i>	35
Identificación morfológica y morfométrica de juveniles (J ₂) de <i>Meloidogyne</i>	35
Identificación de la especie mediante análisis moleculares	36
Diseño experimental.....	38
Análisis estadístico	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
Variables de crecimiento de las plantas de almácigo de café.....	40
Altura de la planta	40
Diámetro del tallo.....	43
Número de hojas	44
Índice de Agallamiento Radical (ÍAR)	46
Porcentaje de severidad	49

Variable peso fresco del sistema radical.....	52
Análisis del conteo de nematodos	54
Factor de Reproducción (FR)	58
Análisis morfológicos y morfométricos para la identificación de la población de <i>M. exigua</i>	59
Identificación de <i>M. exigua</i> mediante análisis moleculares	62
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	62
Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP)	63
Secuenciación de <i>M. exigua</i>	63
Análisis de PCR para reconfirmar la especie	65
Análisis físico del sustrato.....	66
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	67
LITERATURA CITADA.....	69
ANEXOS	83
.....	84

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Total de la producción mundial de los 14 principales países productores-exportadores, en miles de sacos de 60 kg.....	8
Cuadro 2. Consumo mundial de café, del año 2000 al 2015.	10
Cuadro 3. Promedios de precios anuales, indicador compuesto ICO en US\$/qq	11
Cuadro 4. Producción nacional, cosecha 2000/2001 a la 2015/2016.....	12
Cuadro 5. Consumo per cápita en Costa Rica, según el registro del 2000 al 2013.....	13
Cuadro 6. Exportaciones realizadas del 2000 al 2016. Volumen en miles de sacos de 60 kg.	14
Cuadro 7. Condiciones meteorológicas cercanas al área de estudio. Datos 2016.....	27
Cuadro 8. Tratamientos utilizados en el ensayo.....	31
Cuadro 9. Escala para el Índice de Agallamiento Radical (ÍAG)	33
Cuadro 10. Análisis de las variables de crecimiento al final del ensayo.	40
Cuadro 11. Contingencias para Índice de Agallamiento Radical (ÍAR) para las líneas San Isidro (SI) y Caturra (CT). San Isidro de Alajuela, 2016.....	47
Cuadro 12. Porcentajes de severidad por cada línea para el Índices de Agallamiento Radical (ÍAR), mediante el uso de la escala planteada por Sañudo <i>et al.</i> (2003). San Isidro de Alajuela, 2016.	50
Cuadro 13. Pesos frescos (g) de los sistemas radicales de cada línea San Isidro (SI) y Caturra (CT). San Isidro de Alajuela, 2016.....	52
Cuadro 14. Promedio del conteo de huevos y juveniles en raíz y sustrato para cada una de las líneas San Isidro (SI) y Caturra (CT) (Testigo). San Isidro de Alajuela, 2016.	55
Cuadro 15. Factor de reproducción del nematodo <i>Meloidogyne exigua</i> , en el tratamiento “inoculado” a las plantas de café en etapa de almácigo, San Isidro de Alajuela.....	58
Cuadro 16. Medidas morfométricas de juveniles (J ₂) de una población de <i>M. exigua</i> proveniente de plantas de café de la finca del CICAFFÉ. San Pedro de Barva, Heredia, 2016.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Los 20 países mayores productores de café verde a nivel mundial, durante los periodos de cosecha del 2013 a 2015, en toneladas métricas (tons).	8
Figura 2. Principales 15 países exportadores de Café, periodo 2013/14 y 2014/15, en toneladas métricas (tons).	9
Figura 3. Principales países consumidores de café, datos en toneladas, para los meses de junio 2012 a julio 2013, el mismo periodo de meses 2013 a 2014 y 2014 a 2015.	11
Figura 4. Precios indicativos diarios por grupos de café, según la OIC, para el periodo entre julio 2013 y julio 2015.	14
Figura 5. Ciclo de vida de los nematodos agalladores del género <i>Meloidogyne</i>	22
Figura 6. Ubicación del invernadero en donde se encontraban las plantas del almácigo de café, durante todo el periodo de la investigación.	26
Figura 7. Diagrama de la selección de las líneas San Isidro utilizadas en el ensayo, desde el inicio de la formación del híbrido hasta la generación seis que fue la utilizada en esta investigación. ...	28
Figura 8. Diagrama del diseño experimental utilizado y ubicación de las unidades experimentales (tubetes con plantas) durante el periodo del ensayo.	39
Figura 9. Plantas de café en los tubetes a los 120 días después de la inoculación. Plantas de la izquierda de cada fotografía corresponden al tratamiento inoculado y en el tubete de la izquierda la planta sin inocular con los nematodos <i>Meloidogyne exigua</i> . La A. son las plantas de la línea SI35, la B. son las plantas SI31, la C. son de la línea SI32, las plantas de la D. son de la SI27, las de la E. son las plantas de la SI34 y la F. son las plantas de la variedad Caturra (testigo).	45
Figura 10. Sistemas radicales de plantas de café de las líneas San Isidro (SI) y Caturra (CT), a los 120 días después de la inoculación con <i>M. exigua</i> . A. SI35, B. SI31, C. SI32, D. SI27. E. SI34, F. Caturra (CT)-testigo. San Isidro de Alajuela. 2016.	51
Figura 11. Diseños perineales de hembras de <i>M. exigua</i> extraídas de agallas de raíces de café. CICA FÉ, San Pedro de Barva, Heredia. 2016.	59
Figura 12. Fotomicrografías de la población de <i>M. exigua</i> identificada en una plantación de café. A y B. Región anterior de juveniles o J ₂ . C y D. Región posterior de J ₂ . E y F. Región anterior y posterior de un macho. G. Forma aberrante (J ₃). H. Juvenil completo de <i>M. exigua</i> . San Pedro de Barva, Heredia, 2016. Escala: A-F= 20 μ m, G y H= 30 μ m.	61
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, de los productos de la amplificación (PCR) de la región mitocondrial COII/16S con los imprimadores C ₂ F ₃ /1108 (Powers y Harris 1993). M:	XII

marcadores de peso molecular GeneRuler de 100 pb; carriles dos, tres, seis y siete: dos juveniles (2J₂) de *M. exigua*; carriles cuatro y ocho: machos (Ma); carriles cinco y nueve: formas aberrantes (FA). San Pedro Barva, Heredia, CICAFAÉ, Costa Rica. 2017. 62

Figura 14. Resultado de electroforesis en gel de agarosa al 2%, con los patrones RFLP generados con la enzima de restricción *DraI*. M: marcador GeneRuler de peso molecular 50 pb; carriles dos, cuatro y seis: Producto de PCR sin cortar con la enzima (PNC); Carriles tres, cinco y siete fragmentos generados con la enzima *DraI*. 63

Figura 15. Alineamiento múltiple de secuencias parciales de la región entre el gen de la subunidad II de la citocromo oxidasa (COII) y el 16S del ADNmt ribosomal de varias especies de *Meloidogyne*. Sólo se muestran los nucleótidos polimórficos; (.) indica un nucleótido idéntico, (-) indica un gap o espacio en la secuencia. 64

Figura 16. Resultado de electroforesis en gel de agarosa al 1%, de los productos de la amplificación (PCR) de la región mitocondrial COII/16S con los imprimadores ex-D15-F y ex-D15-R (Randig *et al.* 2002). M: marcador de peso molecular GeneRuler de 100 pb. Carriles dos y cuatro: Formas aberrantes (FA), carril tres: macho (Ma), carriles cinco y seis: dos juveniles (2J₂), carril siete: control negativo (CN) agua. CICAFAÉ, Costa Rica, 2017..... 65

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Diagrama de la infección radical causada por <i>Meloidogyne</i> spp.....	83
Anexo 2. Análisis de la variable altura de planta en las tres fechas 0, 60 y 120 días de la inoculación con <i>Meloidogyne exigua</i> , para cada línea San Isidro y la variedad Caturra.	84
Anexo 3. Análisis de la variable diámetro del tallo en las tres fechas 0, 60 y 120 días de la inoculación con <i>Meloidogyne exigua</i> , para cada línea San Isidro y la variedad Caturra.	85
Anexo 4. Análisis de la variable número de hojas en las tres fechas 0, 60 y 120 días de la inoculación con <i>M. exigua</i> para cada línea San Isidro y la variedad Caturra.	86
Anexo 5. Variables de Crecimiento a los 120 días después de la Inoculación n=30.	87
Anexo 6. Cuadro del análisis físico del sustrato.	87

INTRODUCCIÓN

El café pertenece a la familia Rubiaceae y al género *Coffea*, el cual cuenta con más de 6 000 especies. Esta planta es de gran importancia económica, tanto a nivel nacional como internacional (Rodríguez 2011).

Los nematodos son un grupo muy diverso de animales, con apariencia de gusanos y de diversos tamaños; en el caso de los que parasitan plantas, son microscópicos. Son animales acuáticos, encontrándose en prácticamente todos los ambientes. Los nematodos pueden ser parásitos de plantas o animales, además de aquellos llamados comúnmente de vida libre (Coyne *et al.* 2014), los cuales incluyen especies bacteriófagas, micófagas, depredadoras y omnívoras.

Los nematodos fitoparásitos representan uno de los principales problemas fitosanitarios que afectan las plantaciones agrícolas y el cultivo de café no está exento (Durán 2012). Los dos géneros de fitonematodos de mayor importancia en los cafetales de América Central son los géneros *Meloidogyne* y *Pratylenchus* (Luc *et al.* 1990).

El género *Meloidogyne* es conocido como el nematodo agallador y es un endoparásito sedentario, es decir, completa su ciclo de vida hasta llegar a adulto dentro de la raíz. Dentro de las principales especies de éste género que se reportan en las plantaciones de café son *M. arabicida*, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. mayaguensis* y *M. exigua*; ésta última con amplia distribución en plantaciones cafetaleras (García 2012). En el caso de *Pratylenchus*, es conocido como el nematodo lesionador de la raíz y es un endoparásito migratorio que daña los pelos radicales, donde ocasiona necrosis y pérdida de raíces absorbentes (Calderón 2013). De acuerdo con Rojas (2010); Rojas y Salazar (2013), se reportan las especies *P. gutierrezii*, *P. brachyurus* y *P. coffea*, ésta última la más importante en el país.

Existen medidas para combatir el problema de los nematodos en los cultivos, entre las principales se encuentran: a) desinfección y limpieza de las herramientas así como la maquinaria que se utiliza en finca, b) combate de plantas arvenses que pueden ser hospederas alternas de los nematodos, c) incorporación de materia orgánica, d) destrucción o extracción de la finca, de los residuos de cosecha, e) rotación de cultivos, f) combate químico, g) uso de hongos como controladores

biológicos h) uso de extractos de plantas con potencial repelente o el combate de poblaciones de nematodos y i) el uso de variedades resistentes (Román y Acosta 1984; Verdejo-Lucas 2009). En cuanto al uso de variedades resistentes, es una de las más baratas, eficiente y ecológicamente correcta para reducir el problema que ocasionan los nematodos fitoparásitos (Salgado y Rezende 2010).

Las pérdidas económicas en la producción de café se estiman en rangos de un 10 a un 25% debido al ataque de nematodos fitoparásitos (Rojas y Salazar 2013; Bertrand *et al.* 1997). Por lo tanto, determinar variedades o líneas con capacidad de resistencia o al menos tolerancia a nematodos es necesario en los programas de mejoramiento genético, a fin de contar a futuro con un adecuado sistema de manejo integrado de plagas en las fincas y en este caso en particular al nematodo fitoparásito *M. exigua* (Rodríguez 2011; Anthony *et al.* 2003). Según Morera y Flores (1987), en una investigación realizada en el país con algunas de las variedades “Sarchimor”, observaron resultados prometedores con respecto a resistencia a la roya, tolerancia a nematodos y buena producción. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar la tolerancia de cinco líneas de café derivadas del “Sarchimor T5296” mediante la inoculación del nematodo *M. exigua*, en la etapa de almácigo como etapa elemental en los programas de mejoramiento y establecimiento del cultivo.

OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar la tolerancia de cinco líneas de café derivadas del “Sarchimor T5296” contra el nematodo agallador *M. exigua*, en la etapa de almácigo, en San Isidro de Alajuela.

ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de *M. exigua* sobre el crecimiento y desarrollo de cinco líneas de café derivadas del “Sarchimor T5296” y una variedad de Caturra en etapa de almácigo.
- Determinar la tolerancia o susceptibilidad de cinco líneas de café derivadas del “Sarchimor T5296” en etapa de almácigo y la variedad Caturra (testigo) inoculadas con el nematodo agallador *M. exigua*.
- Comparar el índice de agallamiento y la población final de *M. exigua* de una variedad de Caturra susceptible al nematodo con cada una de las cinco líneas de “Sarchimor T5296” que muestre el grado de tolerancia o resistencia.
- Comparar el índice de agallamiento y la población de *M. exigua* de las cinco líneas de “Sarchimor T5296” que conduzca la selección de la línea más tolerante.

REVISIÓN DE LITERATURA

Aspectos históricos del café

El *Coffea arábica* es nativo de regiones tropicales ubicadas en las tierras altas (más de 1 000 m.s.n.m), en Etiopía y Sudán (León 2000). Los persas lo llevaron a Arabia y Yemen en los años 575 y 890, los nativos africanos lo extendieron a Mozambique y Madagascar. Posteriormente los holandeses y portugueses lo llevaron a otras regiones de Asia y África (DaMatta y Rodríguez 2007; Mora 2008).

Historia y origen del café en América

El cultivo de café en América se ubica en el siglo XVIII, el año 1720 es la fecha probable de la introducción del café a América, cuando las primeras semillas de la especie *C. arábica*, de la variedad *Typica* ingresan a las islas de Surinam y Martinica. De estas primeras semillas descienden los cafetos a las Antillas y posteriormente, en 1727 el cultivo se extendió a Brasil. Finalmente, a inicios del siglo XIX el cultivo ya se encontraba por todo América Tropical (Cruz 2013; Oficina del Café 1979; León 2000).

Historia del origen del café en Costa Rica

Se menciona como posible fecha de introducción de las primeras semillas de café a nuestro país el año 1808. Desde entonces, se empezó a sembrar en nuestras tierras y ha sido el eje central del ser y quehacer del costarricense (ICAFE s.f; Oficina del Café 1979).

El presbítero Félix Velarde fue el principal precursor del café, ya que en su testamento dice ser “poseedor de un solar sembrado de café y distribuía semillas entre los vecinos, invitándolos a sembrarlas” (Mora 2008). También se detalla que don Mariano Montealegre y Jerónima Fernández fueron los primeros grandes cafetaleros del país, convirtiéndose don Mariano en el principal impulsador del cultivo de café en la década de 1830-1840 (Oficina del Café 1979).

La primera exportación de café que realizó Costa Rica, fue 1 quintal de grano a Panamá en 1820. Posteriormente en 1832 se exportó a Chile, de donde era reempacado para venderlo a Inglaterra bajo el nombre de “Café Chileno de Valparaíso” y ya eran cantidades mayores alrededor de 500 a 1 000 sacos de grano (MAG 2007; Mora 2008).

Clasificación botánica del café

El café, se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliata

Familia: Rubiaceae

Género: *Coffea*

Especies: *arabica*, *canephora*, *liberica* y *dewevrei*

Origen de la planta

El *C. arabica* se originó debido a la fusión de dos especies (*Coffea eugenioides* y *C. canephora*) en África Oriental. Posteriormente, se originaron dos variedades de café del tipo Arábigo: 1) *Coffea arabica* var. *typica* la cual fue la primer variedad cultivada en América y Asia y 2) *Coffea arabica* var. *bourbon* (Cárdenas 2007). El origen de esta especie (*C. arabica*) es reciente y su mecanismo de reproducción por autofecundación le da a esta una baja diversidad genética, por lo que el mejoramiento genético de esta especie es difícil (Anthony *et al.* 2003; Cros *et al.* 1998).

Descripción de la planta

Las plantas de cafeto son árboles o arbustos perennes, tropicales, que pueden llegar a medir más de 10 m de altura en los bosques. Su ciclo de vida puede alcanzar hasta 20-25 años, que sería lo ideal con un adecuado manejo y podas. Ésta planta bajo las condiciones adecuadas de manejo del cultivo, alcanza su máxima productividad entre los 6 y 8 años de edad (Arcilla 2011; ICO s.f).

Es un arbusto grande con hojas simples, ovaladas, opuestas y de color verde oscuro. Las flores son pequeñas, de color blanco, parecida al jazmín, y de vida muy corta, ya que a los tres días de florecer, estas caen y dan paso al fruto, el cual es una drupa ovalada, pequeña de color verde durante su estado inmaduro, posteriormente toma coloración rojiza o amarilla cuando está maduro (cereza). En el interior de cada drupa hay generalmente dos semillas (granos de café) separadas por un surco y rodeadas de una savia, cada semilla está recubierta por una capa de color crema llamada pergamino (ICO s.f; Café de Colombia 2010).

Importancia del cultivo de café

El género *Coffea*, al cual pertenece el cultivo de café, es uno de los principales productos que se comercializa en los mercados mundiales más importantes, de materias primas y de futuros (bolsa de valores), especialmente en Londres y en Nueva York, donde ocupa el segundo lugar únicamente por detrás del petróleo (Monroig 2015).

Este cultivo es crucial para la economía y la política de muchos países en desarrollo, siendo el principal producto agrícola de consumo a nivel mundial. Genera económicamente más de US\$ 90 billones de dólares en 2007, a lo largo de la cadena productiva (Rodríguez 2011; ICAFE 2012). Se estima que entre 2013 y 2015, solamente las exportaciones de Café representaron un valor aproximado a los US\$ 22 billones (European Coffee Federation (ECF) 2016).

El café se cultiva en aproximadamente 70 países alrededor del mundo, 45 de los cuales son miembros exportadores de la Organización Internacional del Café (OIC/ICO) y se encargan del 97% de la producción mundial de este grano, el 3% restante lo producen otros países que no son miembros de la OIC (MAG 2007; ICAFE 2012). El área mundial dedicada a la producción es de 13.2 millones de km² (Onzima *et al.* 2002). Alrededor del 70% de la producción mundial, proviene de pequeñas unidades productivas familiares con áreas menores a las 10 ha (CEDRSSA 2014).

Se estima que aproximadamente el 8% de la población mundial, es decir, 125 millones de personas están relacionadas de manera directa o indirecta con el comercio del café, en alguno o varios de los procesos de la agrocadena del mismo (desde la siembra hasta el consumo final) (DaMatta y Rodríguez 2007). En Centroamérica tiene un impacto significativo tanto económico como social,

siendo fuente importante de ingresos y empleo para alrededor de 300 000 familias productoras y cerca de 1 millón de asalariados permanentes y temporales, los cuales desempeñan funciones a lo largo de los eslabones de la agrocadena (Canet y García 2010).

Actualmente se conocen más de 100 especies de *Coffea*, de las cuales *C. arabica* L. y *C. canephora* Pierre son las únicas dos especies cultivadas. La *C. arabica* aporta el 58% de la producción mundial y la *C. canephora* el 42% (Cruz 2013).

En Centro América la caficultura es la principal actividad económica de la región, representando en la mayoría de los países el principal producto de exportación. Se cultiva en áreas extensas sobre la vertiente pacífica, el centro de los países y un poco sobre las regiones orientales, desarrollándose en altitudes desde los 500 hasta los 1 800 m, principalmente en zonas montañosas con pendientes pronunciadas (Jaehn 1990).

Datos del mercado mundial de café

A nivel mundial la producción de café ha crecido 73% entre 1980 y 2014. El café robusta es el que presenta el mayor crecimiento que el arábica, con tasas de 194% y 30%, respectivamente (CEDRSSA 2014).

Producción

De la producción de 2010 a 2012, el 61.7% correspondió a la especie arábica y 38.3% a la especie robusta (ECF 2016). De acuerdo con datos de producción de la OIC para el periodo 2013-2015, ubican a Brasil como el principal productor, seguido de Vietnam y Colombia (Figura 1). En el caso de Costa Rica, se ubica en la posición número 14, por debajo de los países de la región Honduras, Guatemala y Nicaragua. Algunos de estos países producen y comercializan café de las dos principales especies, arábica y robusta. Costa Rica solamente produce café de la especie arábica.

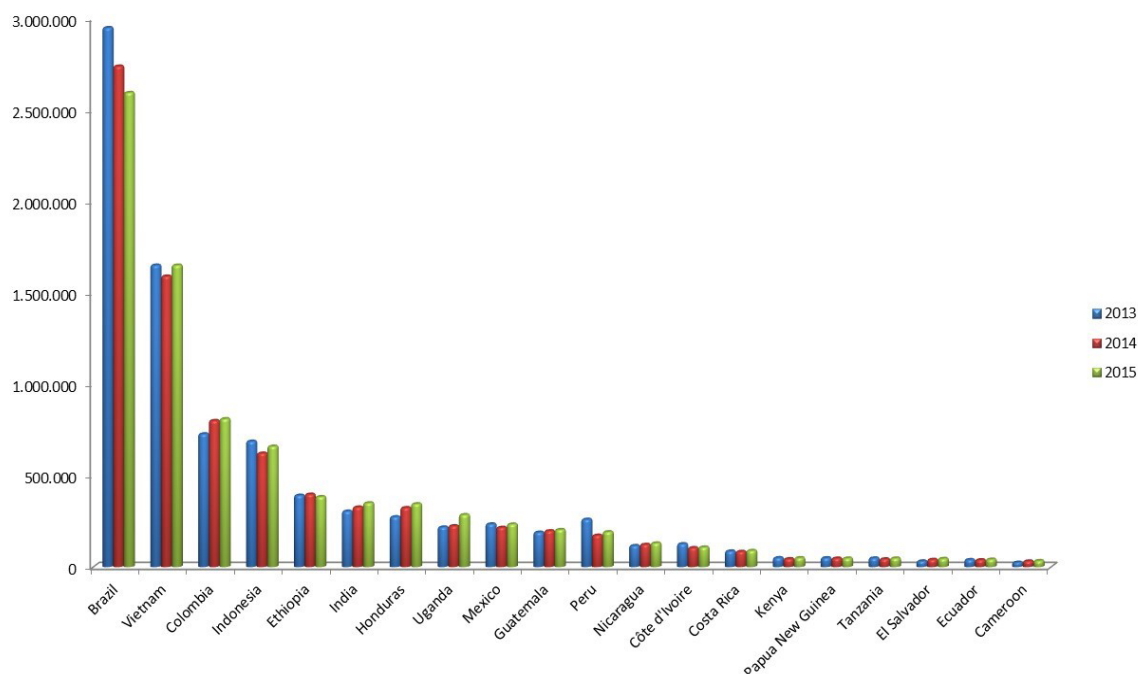


Figura 1. Los 20 países mayores productores de café verde a nivel mundial, durante los periodos de cosecha del 2013 a 2015, en toneladas métricas (tons).

Fuente: Tomado de ECF 2016.

Cuadro 1. Total de la producción mundial de los 14 principales países productores-exportadores, en miles de sacos de 60 kg.

Año de cosecha	*A/ R	2009/ 2010	2010/ 2011	2011/ 2012	2012/ 2013	2013/ 2014	2014/ 2015	2015/ 2016	2016/ 2017	Total de 2009 a 2017
Brasil	A/R	43 977	53 428	50 592	55 420	54 698	52 299	50 376	55 000	415 790
Vietnam	R/A	17 825	20 000	26 500	23 402	27 610	26 500	28 737	25 500	196 073
Colombia	A	8 098	8 523	7 652	9 927	12 163	13 339	14 009	14 500	88 211
Indonesia	R/A	11 380	9 129	10 644	11 519	11 265	11 418	12 317	10 000	87 672
Etiopia	A	6 931	7 500	6 798	6 233	6 527	6 625	6 714	6 600	53 930
India	R/A	4 827	5 033	5 233	5 303	5 075	5 450	5 800	5 333	42 054
Honduras	A	3 603	4 331	5 887	4 686	4 578	5 258	5 766	5 934	40 043
Perú	A	3 286	4 069	5 373	4 453	4 338	2 883	3 301	3 800	31 503
México	A	4 109	4 001	4 563	4 327	3 916	3 591	2 800	3 100	30 407
Guatemala	A/R	3 835	3 950	3 850	3 763	3 189	3 310	3 420	3 500	28 817
Uganda	R/A	2 894	3 267	3 115	3 914	3 633	3 744	3 650	3 800	28 017
Nicaragua	A	1 871	1 638	2 193	1 991	1 941	1 898	2 137	2 100	15 769
Costa de Marfil	R	1 795	982	1 966	2 072	2 107	1 750	1 893	2 000	14 564
Costa Rica	A	1 447	1 581	1 776	1 658	1 444	1 408	1 634	1 486	12 434

Datos tomados de ICO 2017. *A: Arábica, R: Robusta.

Fuente: Elaboración propia.

Exportaciones

Durante los 12 meses de diciembre a noviembre, en ambos periodos de cosechas, 2013/14 y 2014/15. El total de las exportaciones disminuyó en 1.3% de 6.71 a 6.62 millones de toneladas. A continuación, se muestra el total de exportaciones a los principales países de destino (Figura 2).

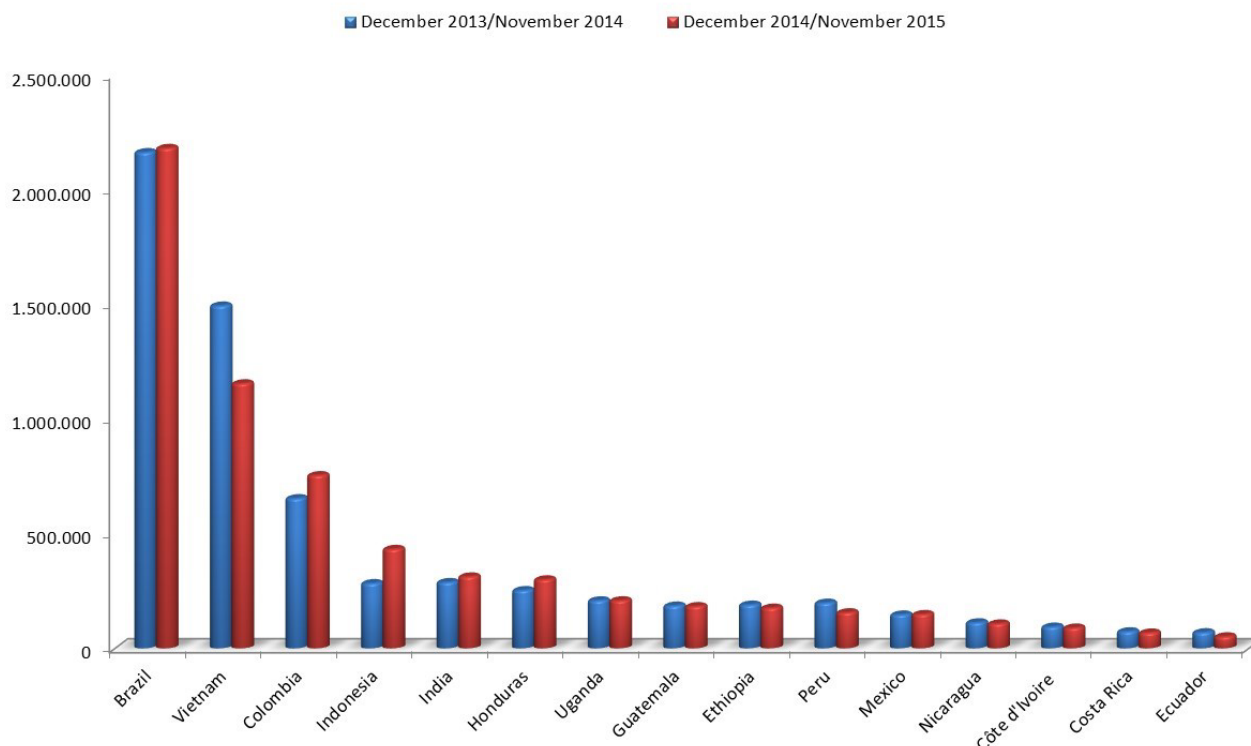


Figura 2. Principales 15 países exportadores de Café, periodo 2013/14 y 2014/15, en toneladas métricas (tons).

Fuente: tomada de ECF 2016.

Consumo mundial de café

Se estima que alrededor de 400 000 millones de tazas de café se ingieren en el mundo por año (Monroig 2015). En el año 2000, existía un consumo mundial de 106 538 sacos de 60 kg. De acuerdo con estos datos, de esta fecha al 2013, hubo un incremento de 38 764 sacos de 60 kg, lo que indica que año con año el consumo a nivel mundial de esta bebida incrementa (Cuadro 2).

Cuadro 2. Consumo mundial de café, del año 2000 al 2015. Cantidad en miles de sacos de 60 kg.

Año	Consumo Mundial
2000	106 538
2001	110 558
2002	111 871
2003	114 654
2004	120 702
2005	121 464
2006	125 377
2007	130 039
2008	133 608
2009	132 489
2010	138 369
2011	140 173
2012	143 348
2013	148 003
2014	150 339
2015	151 149

Fuente: Elaboración propia, datos tomados de ICO 2017.

El consumo en 2014 fue de 9.01 millones de toneladas y 150.3 millones de sacos de 60 kg. Estados Unidos es el principal importador y consumidor (por volumen) (Coffee IQ 2017). Los países Europeos son los que más consumen café, con consumos per cápita (kg/persona) de 9.5 en Finlandia, 7.3 en Noruega, 6.7 en los países bajos, 6.1 en Eslovenia y 5.5 en Austria (Figura 3) (Coffee IQ 2017).

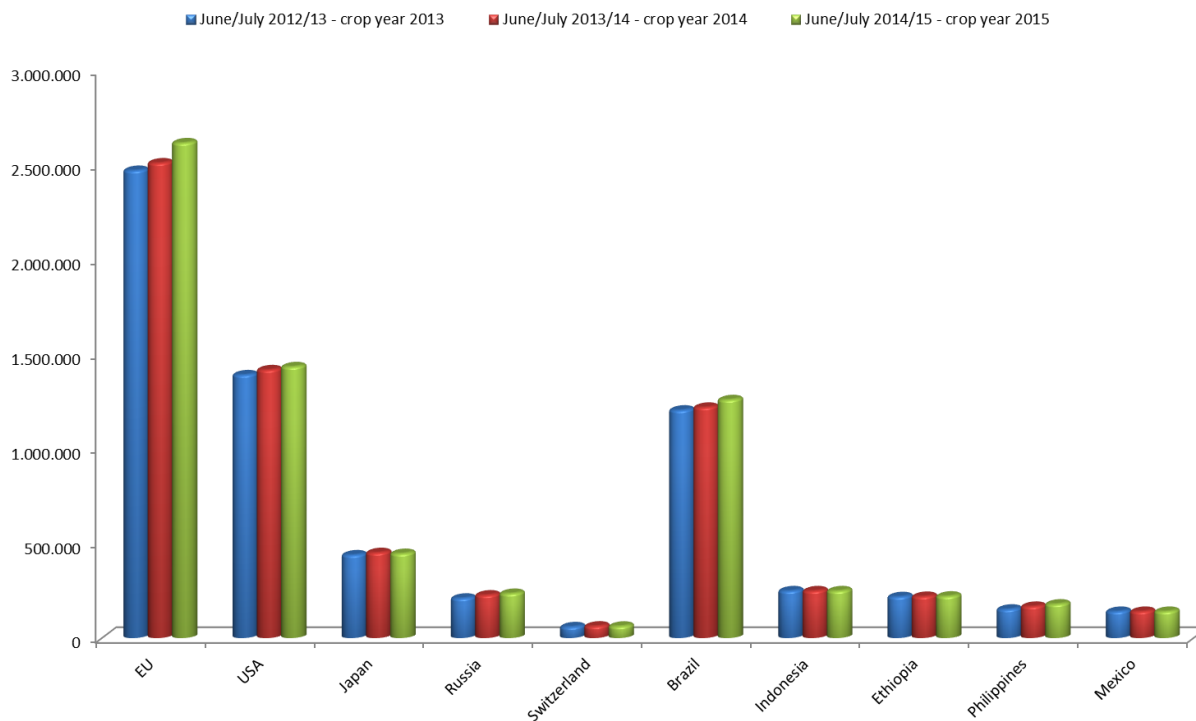


Figura 3. Principales países consumidores de café, datos en toneladas, para los meses de junio 2012 a julio 2013, el mismo periodo de meses 2013 a 2014 y 2014 a 2015.

Fuente: Tomado de ECF 2016.

Precios Internacionales del café

Estos precios son promedios anuales y son en base a un indicador compuesto establecido por la Organización Internacional del Café (Cuadro 3).

Cuadro 3. Promedios de precios anuales, indicador compuesto ICO en US\$/qq

Año	Precio en US\$/qq
2006	95.75
2007	107.68
2008	124.25
2009	115.67
2010	147.24
2011	210.39
2012	156.34
2013	119.51
2014	155.26
2015	124.67
2016	127.31

Fuente: Elaboración propia, datos tomados de ICO 2017.

Situación nacional del cultivo de café

El café ha sido el motor de desarrollo social en Costa Rica, en términos de empleos de la Agrocadena del café, compuesta por más de 50 000 familias productoras, 145 beneficiadores, 55 tostadores y 60 exportadoras. La relación café-trabajo impregna al 8% de nuestra fuerza laboral, donde origina un gran impacto y beneficio social (Café de Costa Rica 2011).

Área sembrada

Según el último Censo Nacional Agropecuario 2014, se reportan un total de **22 961** fincas en donde la actividad principal es el cultivo de café. Estas fincas generalmente cuentan con extensiones menores a cinco hectáreas. La mayoría de las fincas cafetaleras en nuestro país, se encuentran en la provincia de San José, un total de 9 676 fincas (Instituto Nacional de Estadística y Censo (INEC) 2015; ICAFE 2015).

Productividad

En el Cuadro 4 se encuentran los datos de producción de café en Costa Rica, los cuales se reflejan en miles de sacos de 60 kg de café oro (Cuadro 4).

Cuadro 4. Producción nacional, cosecha 2000/2001 a la 2015/2016

Año Cosecha	Producción en sacos de 60kg
2003-2004	1 783
2004-2005	1 887
2005-2006	1 778
2006-2007	1 580
2007-2008	1 771
2008-2009	1 287
2009-2010	1 304
2010-2011	1 392
2011-2012	1 462
2012-2013	1 571
2013-2014	1 444
2014-2015	1 408
2015-2016	1 492

Fuente: Elaboración propia, datos tomados de ICO 2017.

Consumo

El consumo per cápita de café en Costa Rica en kg/por persona, para el periodo del 2000 al 2013 ha sido un poco inestable a lo largo de estos últimos 13 años. Se estima que existe un consumo por persona promedio de 3.8 kg, muy por debajo del consumo per cápita del mayor consumidor mundial, Finlandia con 9.5 kg por persona, pero se ubica en segundo lugar en América Latina (Cuadro 5) (Coffee IQ 2017).

Cuadro 5. Consumo per cápita en Costa Rica, según el registro del 2000 al 2013

Año	Consumo per cápita
2000	4.52
2001	3.86
2002	3.65
2003	3.40
2004	4.17
2005	5.04
2006	4.77
2007	4.19
2008	3.54
2009	3.15
2010	3.12
2011	3.53
2012	3.46
2013	3.37

Fuente: Elaboración propia, datos tomados de ICO 2015.

Exportaciones

El volumen de las exportaciones realizadas según los periodos de cosechas, de los años 2000 al 2014, presentó un descenso del año 2000 al 2007, y para el año 2008 se dió un pequeño incremento, pero luego continuó la tendencia a la baja en los niveles de exportación (Cuadro 6).

Cuadro 6. Exportaciones realizadas del 2000 al 2016. Volumen en miles de sacos de 60 kg.

Año Cosecha	Exportaciones
2006-2007	1 371
2007-2008	1 402
2008-2009	1 301
2009-2010	1 170
2010-2011	1 209
2011-2012	1 384
2012-2013	1 380
2013-2014	1 237
2014/2015	1 145
2015/2016	995

Fuente: Elaboración propia, datos tomados de ICO 2017.

Precios

Los precios en los distintos grupos de café, a excepción de los robusta, presentaron la misma tendencia a lo largo de los periodos de julio 2013 a julio 2015. Únicamente se observó un pequeño descenso de julio 2013 a enero 2014 y un posterior incremento abrupto de los precios en febrero-marzo del 2014, donde alcanzó precios superiores a los 200 centavos de dólar en USA por libra. Estas fluctuaciones se extendieron hasta diciembre de 2014, donde hubo una tendencia a la baja hasta por debajo de los 150 centavos de dólar USA por libra, para julio de 2015 (Figura 4).

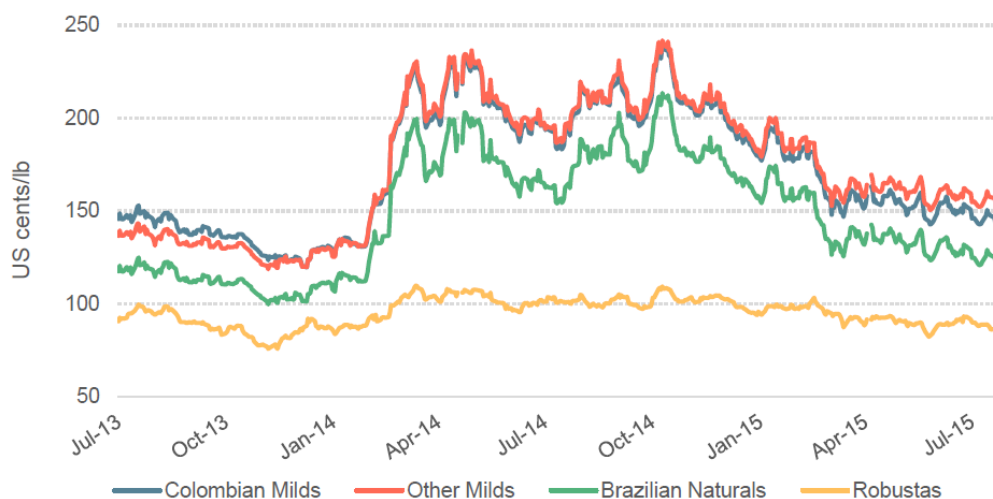


Figura 4. Precios indicativos diarios por grupos de café, según la OIC, para el periodo entre julio 2013 y julio 2015.

Fuente: tomado de ICO 2015.

Variedad Sarchimor

Este material cuenta con una mayor variabilidad genética natural que las variedades comerciales más comúnmente cultivadas (Quijano 2007).

Antecedentes de esta variedad

Esta línea de plantas híbridas Sarchimor, provienen del cruce entre el Villa Sarchí (CIFC H-361) y el híbrido Timor (CIFC 832/2). Esta línea logra mantener los genes de resistencia genética natural del híbrido Timor ante la roya del café e introduciendo las características genotípicas de la variedad Villa Sarchí, como lo son la buena productividad, la excelente calidad de bebida, entre otras (Quijano 2007; Ramírez 2017).

La progenie F₃ designada como T5296 de Sarchimor destacó como resultado de gran cantidad de trabajos de investigación, cruzamiento y selección de los mejores materiales genéticos. A partir de la población derivada de la planta CIFC H-361/4, homocigota, de porte bajo, con vigor vegetativo, de buena productividad los primeros años de producción. De esa progenie se han originado la mayoría de los Sarchimores liberados como variedades comerciales por los centros de investigación en café, por ejemplo el Parainema en Honduras, el Cuscatleco en El Salvador, el Limani en Puerto Rico, y las variedades Sarchimor que se cultivan en el país (Obatá, Tupí, entre otros) (Bettencourt y Fazuoli 2008; Ramírez 2017).

Debido a la gran cantidad de datos obtenidos en todas las investigaciones realizadas con los materiales genéticos y los diferentes cruces entre éstos, permiten manifestar con certeza que las poblaciones de Sarchimores constituyen un valioso y diversificado reservorio de genes de resistencia contra la roya del café. Así mismo, se cree que posiblemente también pueda tener resistencia contra otros agentes patogénicos como: *Colletotrichum kahawae* (CBD), *Fusarium oxysporum*, *Pseudomonas syringae* y contra los nematodos *M. exigua*, *M. incognita* y *M. arabicida* (Bettencourt y Fazuoli 2008).

Sarchimor T5296

Dentro de las características que presentan estas plantas está su buen potencial en la calidad de taza en altura, el rendimiento productivo es muy similar al del Caturra. La planta presenta un porte bajo, compacto, brotes verdes o bronce, se adapta muy bien en altitudes desde los 600 hasta los 1 200 m, la densidad de siembra es similar a la del Caturra 5 000/6 000 plantas por ha (World Coffee Research (WCR) 2016).

Por otra parte, presenta resistencia a la roya del café, a la antracnosis y a nematodos, especialmente a *M. exigua*. Los requerimientos nutricionales de las plantas de éste híbrido son altos y el tamaño del fruto es grande en promedio al Caturra (WCR 2016).

Estudios realizados por Bettencourt y Fazuoli (2008), acerca de herencia de la resistencia al nematodo *M. exigua*, demostraron que el híbrido de Timor (CIFC 832/2) posee un gen dominante Me, el cuál es responsable de la resistencia o tolerancia ante el ataque de éste nematodo. Estos resultados fueron confirmados posteriormente en la progenie Sarchimor T5296.

¿Qué son los nematodos fitoparásitos?

La palabra nematodo deriva del griego “*nema*”, la cual significa forma de un hilo. Los nematodos del suelo son pequeños invertebrados dependientes del agua y son un grupo muy diverso, considerándose entre los más diversos y abundantes del planeta. Se conocen unas 20 000 especies entre nematodos fitoparásitos y de vida libre. Representan los organismos pluricelulares que se encuentran en mayor cantidad en los agroecosistemas, pudiéndose encontrar hasta 30 millones de estos individuos por metro cuadrado. Es más común encontrar especies fitoparásitas en mayores porcentajes en los agroecosistemas que en los ecosistemas naturales, donde hay mayor equilibrio natural (Arauz 2011; Fátima *et al.* 2012).

Importancia

Algunos de estos nematodos (los de vida libre), cumplen una función como agentes de reciclaje de nutrientes y como reguladores y bioindicadores de fertilidad del suelo, siendo responsables del 10 al 15% de la respiración de la demás fauna del suelo. Además, algunos de estos microorganismos tienen la capacidad de ser agentes de control biológico de plagas, principalmente sobre estadios larvales de insectos o bien de otros nematodos fitoparásitos (Fátima *et al.* 2012, Lima 2018).

Los nematodos fitoparásitos son agentes responsables en parte de las pérdidas causadas en los sistemas radicales de las plantas (Fontana *et al.* 2013). Al penetrar en los tejidos de las plantas, ocasionan daños mecánicos, además extraen los nutrientes de la planta y uno de los daños más significativos es la introducción de sustancias tóxicas que son inyectadas por medio del estilete, a la planta (Lima 2018).

Las pérdidas anuales debido a nematodos parásitos en la producción agrícola mundial se estiman en un 11 y 14%. En términos absolutos, las pérdidas económicas anuales se calculan en unos 80 billones de dólares (Agrios 2005; Guzmán *et al.* 2012). Estas pérdidas económicas se deben a, las muertes de plantas, reducción de la producción, los costos de resiembra y los costos en el uso de nematicidas (Andrés 2003). Los problemas que ocasionan los nematodos al cultivo de café, en muchas ocasiones pasan desapercibidos debido a la desinformación o bien son atribuidos a la baja fertilidad de los suelos (Anzueto *et al.* 1991).

Características generales de los nematodos

Morfología

Los nematodos son animales vermiformes (forma de gusanos), que tienen cuerpo cilíndrico, simetría bilateral y son de tamaño microscópico de 0.25 a 5 mm de longitud por 15 a 50 μm en nematodos fitoparásitos, hasta 20 o más centímetros de largo por 0.5 cm de ancho en las especies que parasitan animales (Coyne *et al.* 2014). Cuentan con la mayoría de los sistemas fisiológicos al igual que los animales superiores, excepto los sistemas circulatorio y respiratorio (Galán y Ramírez 2011).

Anatomía

El cuerpo es transparente, cubierto por una cutícula incolora que a menudo presenta estrías. La cavidad corporal está compuesta por un pseudoceloma, cuentan con músculos pequeños que le permiten la movilidad, pero no tienen ni extremidades ni otros apéndices (Agrios 2005).

Todos los nematodos fitoparásitos cuentan con un estilete hueco que utilizan para penetrar las células de las plantas y extraer los fluidos celulares de los cuales se alimentan. El sistema digestivo consiste en un tubo hueco que va desde la boca, pasando por el esófago, el felesino, el recto y finalmente llega al ano (Talavera 2003). Generalmente son vermiformes durante los estados juveniles y adulto, únicamente en los endoparásitos sedentarios donde las hembras adultas tienen forma engrosada reniforme (forma de riñón), piriforme (forma de pera), hasta formas casi esféricas. (Crozzoli 2014; Arauz 2011).

Los sexos generalmente están separados (dimorfismo sexual) y las gónadas son alargadas. El aparato reproductor femenino está formado por uno o dos tubos que desembocan en un poro llamado vulva. Cada tubo contiene ovario, oviducto, espermateca y útero. Mientras tanto el aparato reproductor masculino consiste en un tubo con testículo, vesícula seminal, vaso deferente y espículas copulatorias, desemboca en la cloaca (Arauz 2011). La reproducción se realiza por medio de huevecillos y puede ser sexual, hermafrodita o partenogénica, ya que en muchas especies faltan los machos (Lima 2018; Agrios 2005).

Clasificación de los nematodos de acuerdo a sus hábitos alimenticios o formas de parasitismo

Los nematodos tienen hábitos alimenticios muy variables, no se alimentan de materia orgánica muerta, se pueden alimentar de organismos como bacterias, protozoarios, hongos o algas, otros son parásitos de insectos, animales o plantas y se encuentran los depredadores ya sea de otros nematodos o de microfauna del suelo en general (Esparrago y Novas 1997).

- **Ectoparásitos:** Permanecen fuera de la planta y penetran sólo con el estilete (que es por lo general, más largo que el resto de nematodos), son de mayor tamaño y se dividen en:

- *Ectoparásitos migratorios*: se alimentan en un sitio dentro de la raíz por un corto periodo. Ej: *Trichodorus* sp., *Tylenchorhynchus* sp., *Longidorus* sp., *Xiphinema* sp., entre otros (Galán y Ramírez 2011).
- *Ectoparásitos sedentarios*: se alimentan del mismo sitio toda la vida. Ej: algunos *Gracilacus* sp. y por varios días *Criconemella* sp. (Montes-Belmont 2000).
- **Ecto-endoparásitos**: pueden comportarse como ectoparásitos o bien penetrar de forma parcial o total la raíz. Ej: *Hoplolaimus* sp., *Helicotylenchus* sp. (Arauz 2011).
- **Endoparásitos**: estos nematodos penetran de forma total o parcial con su cuerpo en la planta:
 - *Endoparásitos migratorios*: cambian los sitios de alimentación constantemente, donde ocasionan gran destrucción de los tejidos. Ej: *Radopholus* sp., *Pratylenchus* sp. (Villain 2008).
 - *Endoparásitos sedentarios*: una vez que encuentran un lugar de alimentación permanecen ahí toda su vida en ese mismo sitio. Ej: *Meloidogyne* sp., *Heterodera* sp., *Globodera* sp., *Tylenchus* sp., *Rotylenchus* sp., entre otros (Coyne *et al.* 2014).

Nematodos en el cultivo de café

Los nematodos ocasionan considerables daños en la mayoría de las plantaciones de café de América Central. En esta región los nematodos que generan los mayores problemas fitosanitarios de importancia económica en éste cultivo, son los del género *Meloidogyne* sp. Dentro de éste género destacan principalmente las especies: i) *M. exigua* y ii) *M. incognita*. En las plantaciones de café en Costa Rica, se reportan las especies, *M. exigua*, *M. arabicida*, *M. javanica*, *M. incognita* y *M. enterolobii* (Rojas y Salazar 2013). Por otra parte el nematodo lesionador de la raíz (*Pratylenchus* sp.), cuya principal especie asociada al cafeto es *P. coffeae* (Jaehn 1990; Avelino *et al.* 2009; Figueroa y García 2010).

Los nematodos se alimentan de nutrientes que se encuentran en las raíces absorbentes de la planta de café, es por ello que son considerados parásitos de gran importancia económica en este cultivo. Estos fitoparásitos ocasionan pérdidas en el rendimiento del cultivo, además, no permiten que la planta logre desarrollarse y pueda dar su óptima producción (Souza 2008).

Control

El control de los nematodos es complejo y se necesita de integrar diferentes técnicas para lograr reducir las poblaciones a niveles que no afecten los sistemas radicales de las plantas (Fontana *et al.* 2013).

Los métodos más utilizados para el control de los nematodos son: el control químico y el uso de resistencia genética. No obstante, existen algunas otras técnicas como lo son el uso de nematicidas, la rotación de cultivos, la incorporación de materia orgánica, el uso de productos de origen biológico, la incorporación de inductores de resistencia a las plantas para su combate (Fontana *et al.* 2013; Talavera 2003).

Género: *Meloidogyne*

De acuerdo con la clasificación zoológica descrita por Siddiqi (2000), los nematodos pertenecientes al género *Meloidogyne*, se dividen de la siguiente manera:

Reino: Animalia

Phylum: Nematoda

Clase: Secernentea

Orden: Tylenchida

Familia: Meloidogynidae

Género: *Meloidogyne*

Los nematodos pertenecientes a éste género son conocidos como “noduladores de las raíces” y son endoparásitos obligados o sedentarios, muy adaptados a las raíces de la planta hospedera, ya que dentro de éstas cuentan con agua y nutrientes necesarios para la subsistencia, además de protección (Siddiqi 2000). Las pérdidas en la producción agrícola mundial por causa de los nematodos del género *Meloidogyne* son aproximadamente de 115 000 millones de dólares anuales (Armendáriz *et al.* 2015).

El género *Meloidogyne* ésta ampliamente distribuido por todo el mundo, prevalece tanto en países tropicales como subtropicales (Arauz 2011). Es el género de nematodos fitoparásitos de mayor importancia mundial, ya que ataca varias miles de especies de plantas. Debido a ésta amplia cantidad de hospedantes son uno de los principales factores limitantes en los campos de cultivo y muchas de ellas son importantes en café, caña de azúcar, banano, plátano, arroz, cereales, hortalizas y plantaciones frutales, entre otros cultivos. En cada uno de ellos ocasionan grandes pérdidas económicas debido a los daños al sistema radical, lo que se refleja en una reducción de las capacidades productivas y reproductivas de la planta (Siddiqi 2000; Luc *et al.* 1990).

Los nematodos endoparásitos (*Meloidogyne* spp.) representan una limitación importante para el desarrollo de la producción de café, siendo considerados como uno de los principales patógenos que causan bajos rendimientos en éste cultivo. Por otra parte, están ampliamente distribuidos en las zonas cafetaleras y sus abundantes poblaciones en los suelos (Anthony *et al.* 2003)

En el cultivo de café los nematodos pertenecientes a éste género se separaron en dos categorías: (i) los más comunes que ocasionan daños en éste cultivo y que se sabe que están asociadas principalmente en café: *M. exigua*, *M. incognita* y *M. coffeicola*; (ii) las especies menos difundidas y conocidas específicamente en café: *M. africana*, *M. decalineata*, *M. megadora*, *M. hapla*, *M. kikuyensis*, *M. arenaria*, *M. javanica*, entre otras especies (Luc *et al.* 1990).

Ciclo de vida de *Meloidogyne* spp.

Cuando hay plantas hospederas susceptibles, los nematodos dependen de otros factores para su supervivencia, como lo son: a) la temperatura, b) la humedad, c) la textura del suelo, d) el pH del suelo, e) presencia de exudados radicales, f) oxígeno del suelo, entre otros factores (Taylor y Sasser 1983).

El ciclo de los nematodos de éste género comprende cuatro estadios larvarios y un estado adulto (Figura 5). Éste ciclo se divide en dos fases: la primera es desde la salida de las larvas de los huevos, hasta su ingreso en las raíces de las plantas hospederas por lo que contempla los estadios J₁ y J₂, mientras tanto la segunda fase corresponde a la finalización del desarrollo del nematodo en el interior de los tejidos radicales, J₃, J₄ y adulto (Galán y Ramírez 2011).

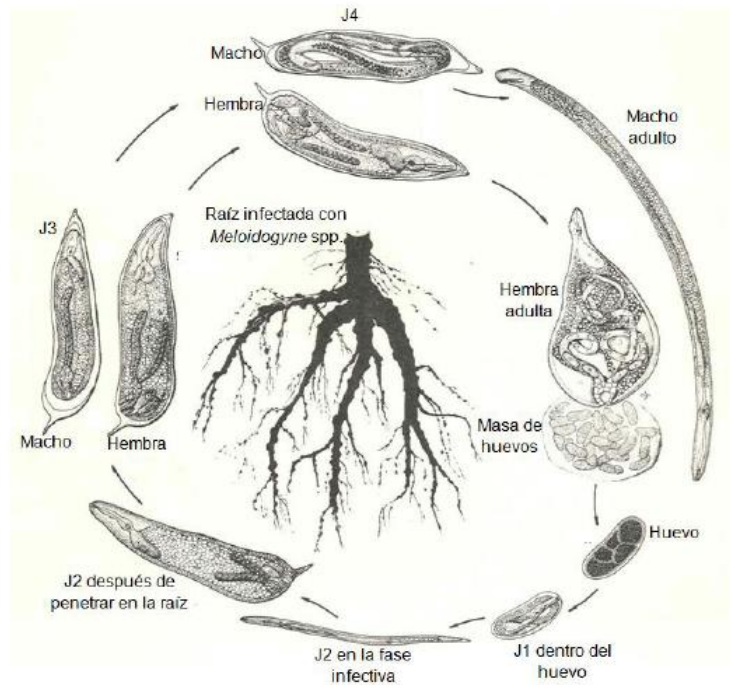


Figura 5. Ciclo de vida de los nematodos agalladores del género *Meloidogyne*.

Fuente: Tomado de Papp 1999.

Masa de huevos y huevo: es una masa gelatinosa glicoproteica, que mantiene los huevos juntos, protege de los cambios extremos del ambiente y de ser depredados. Ésta matriz puede contener alrededor de 1 000 huevos, algunas veces son depositados en la superficie y en otras ocasiones en el interior de las agallas. El desarrollo de los huevos inicia unas pocas horas luego de la ovoposición, los huevos se mantienen viables por periodos largos de tiempo, hasta que se presenten condiciones ideales (humedad y exudados radicales) para la eclosión. La primera muda se lleva a cabo dentro del huevo (Taylor y Sasser 1983; Perry *et al.* 2009).

J₁: el primer estadio se lleva a cabo dentro del huevo, se observa una larva, bien formada, con el estilete y enrollada dentro del huevo. Al final de éste estadio eclosionan y pasan al J₂ (Taylor y Sasser 1983; Siddiqi 2000).

J₂: en éste segundo estadio el cuál es el infectivo, ellos necesitan encontrar lo más rápido posible un hospedero, en ingresar en la raíz de éste. Se encuentran libres en el suelo en busca de raíces para penetrarlas y están en forma vermiforme (Perry *et al.* 2009).

J₃: en éste estadio las larvas ya se encuentran alimentándose en el interior de las raíces y continúan creciendo, entonces es aquí en dónde se inicia la formación de células gigantes alrededor de los puntos fijos de alimentación de los nematodos y se hacen visibles las agallas (Taylor y Sasser 1983). A partir del J₃ y el J₄ es que larvas mudan hasta adquirir una forma de “salchicha” como es conocido comúnmente y son llamadas formas aberrantes.

J₄: al final de éste estadio se inicia el desarrollo de los órganos sexuales principalmente en la hembra, la cual empieza a tomar forma más “esférica” y el macho forma “alargada de gusano” (Lima 2018; Siddiqi 2000).

Las hembras en los estadios larvarios J₃ y J₄, se da la muda final y ocurre la formación del útero y la vulva. Mientras tanto en los machos en éstos mismos estadios, el nematodo se engorda y su estilete no es tan visible, el bulbo medio se degenera y la gónada se alarga, finalmente se da una metamorfosis en la cual el cuerpo del macho se alarga (Armendáriz *et al.* 2015).

***Meloidogyne exigua* (Göeldi 1887)**

Ésta fue la primera especie de nematodos encontrada en el cultivo de café en Rio de Janeiro y fue reportada por Jobert en 1878, quien observó un problema en el cafeto debido a una severa enfermedad. Fue descrita por Emil August Goldi, en 1887 (Nemaplex 2015; Luc *et al.* 1990).

Distribución

Esta especie de nematodo fitoparásito es la que se reporta principalmente en plantaciones de café en las regiones de Centro y Sur América, pero también se ha encontrado en el sur de la India, en China y algunos países de Europa. Debido a su amplia distribución, provoca problemas fitosanitarios en el cultivo en todas las zonas cafetaleras, originando pérdidas económicas cada ciclo del cultivo (Rodríguez 2011; Elling 2013).

Importancia

En Latinoamérica el parasitismo que ocasionan los nematodos agalladores, principalmente *M. exigua*, se considera uno de los principales factores para reducir la productividad en cultivares de *Coffea arabica* (Campos y Villain 2005).

Uno de los principales problemas que hace más difícil su combate en campo, es que cuenta con gran cantidad de especies hospedantes alternas las cuales son arvenses muy comunes en los cafetales, como la *Bidens pilosa*, *Emilia fosbergii*, *Amaranthus deflexus*, *Euphorbia heterophylla*, entre otras. Además de que se han detectado ya tres razas, las dos primeras sí atacan café y la tercera ésta asociada al caucho y no afecta las plantas de café (Crozzoli 2014; Peraza y Orozco 2018).

En fincas cafetaleras en Rio de Janeiro se estima una reducción de productividad del 45%, debido al ataque del nematodo *M. exigua* (Barbosa *et al.* 2004). En Costa Rica, es la especie de nematodo más común asociada al cultivo de café, la cual puede ocasionar pérdidas económicas estimadas entre un 10 y un 20% (Anthony *et al.* 2003).

Sintomatología de las plantas hospederas

Los síntomas primarios son nudosidades pequeñas, redondeadas, ubicadas generalmente en las raíces laterales, las cuales pueden alcanzar hasta 5 mm de diámetro y son del mismo color de la raíz, ápices radicales atrofiados, sistema radical poco desarrollado. Las masas de huevos se encuentran generalmente dentro de las agallas (Baeza 1979; Galán y Ramírez 2011).

Dentro de los principales síntomas secundarios se encuentran: reducción en la altura y desarrollo de las plantas, decaimiento general, clorosis, caída temprana de hojas, síntomas de deficiencia de N y Zn, y bajos rendimientos. En la raíz se logran observar pequeñas agallas redondeadas y disminución de las raíces laterales (Ferreira y Crozzoli 1995; Salgado *et al.* 2008).

Duración del ciclo de vida de *M. exigua* en café variedad Caturra

Según lo indican (Leguizamón s.f. y Taylor y Sasser 1983) la duración del ciclo de vida de este nematodo se estima que tiene una duración de 32 a 42 días, con condiciones de idóneas de humedad, textura del suelo y temperaturas de 25 a 30°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del ensayo

El ensayo se realizó en la Hacienda Alsacia, ubicada en Dulce Nombre de San Isidro de Alajuela ($10^{\circ} 5'49.11''N$ y $84^{\circ}11'59.90''O$) con una altitud de la finca que va desde los 1 400 m hasta los 1 600 m aproximadamente (Figura 6).

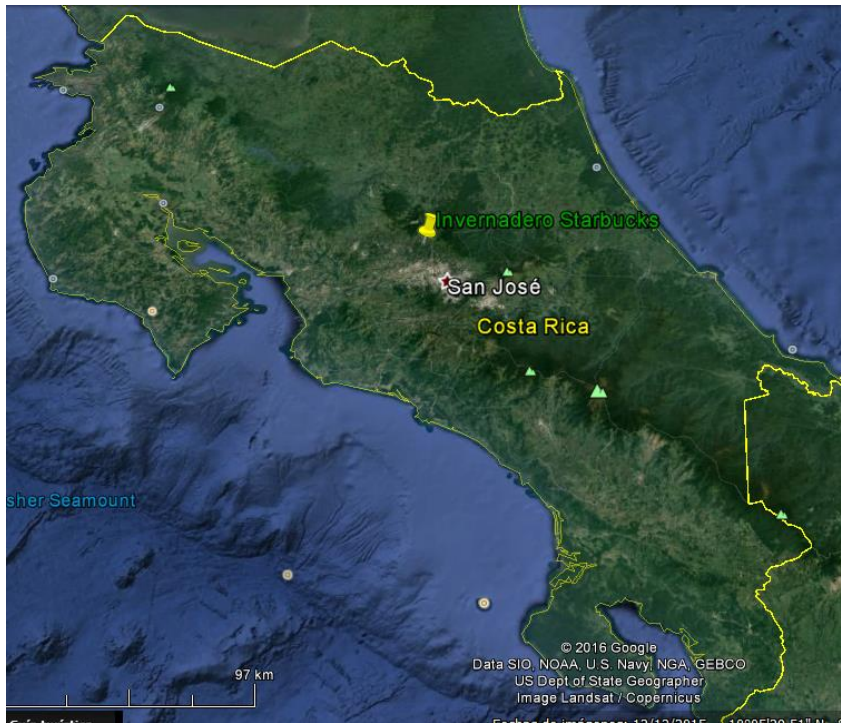


Figura 6. Ubicación del invernadero en donde se encontraban las plantas del almácigo de café, durante todo el periodo de la investigación.

Fuente: Google Earth 2016.

El ensayo se realizó en el invernadero de la Hacienda Alsacia entre diciembre de 2015 a octubre 2016. Durante ese periodo, se elaboró el semillero, las mediciones de campo y se recolectaron las plantas para su procesamiento en el laboratorio de Nematología de la Universidad Nacional.

Condiciones meteorológicas

La precipitación total registrada en el 2016 cerca de la zona de estudio, fue de 2 907 mm, con un promedio de 242 mm de lluvia por mes. Febrero fue el mes con menor cantidad de lluvia 11.8 mm caídos en sólo un día, mientras tanto, octubre fue el mes con mayor cantidad 524 mm. Setiembre y octubre fueron los meses con más días de lluvia con un total de 25 (Cuadro 7).

Cuadro 7. Condiciones meteorológicas cercanas al área de estudio. Estación Meteorológica Itiquis, altitud: 1 080 m. Datos 2016.

	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Set	Oct	Nov	Dic	Prom	Total
Lluvia en (mm)	12.6	11.8	29.3	116.9	392.8	399.9	261.5	358.9	481	524.1	246	72.6	242.3	2907.4
Prom. de días con lluvia	1	1	2	8	21	22	19	21	25	25	16	6	14	167

Fuente: Elaboración propia, datos tomados de Calderón 2017.

Tipo de sustrato

Para la mezcla del sustrato, se utilizó suelo procedente de la Finca Experimental Santa Lucía en Barva de Heredia y arena gris, de río proveniente, de Atenas. Para la realización del sustrato se mezcló el suelo y la arena de río en una proporción final de 1:1 (v/v suelo y arena de río). Finalmente, esta mezcla se utilizó para llenar los tubetes utilizados en el ensayo.

El suelo se esterilizó en una autoclave a 121°C por 20 minutos en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional. La esterilización del suelo permitió evitar la presencia de otros nematodos tanto fitoparásitos como de vida libre en el ensayo. Además, con la esterilización del suelo se evitó la presencia de algunos hongos o bacterias que pudieran estar presentes en el suelo. La arena no se esterilizó ya que está no contenía nematodos fitoparásitos.

Material vegetal utilizado en el ensayo

Se utilizaron cinco líneas de café derivadas del “Sarchimor T5296”: la SI (San Isidro) 27, 31, 32, 34, 35 y una de la variedad Caturra (CT) utilizada como testigo debido a sus conocidas características de susceptibilidad a los nematodos.

Estas líneas San Isidro, derivadas del “Sarchimor T5296” corresponden a una 6^{ta.} generación de este material genético proveniente de Brasil, el cual llegó al CATIE en la 3^{era.} generación, en la década de los 80's (Figura 7).

Selección de las líneas San Isidro, a partir del Sarchimor T5296

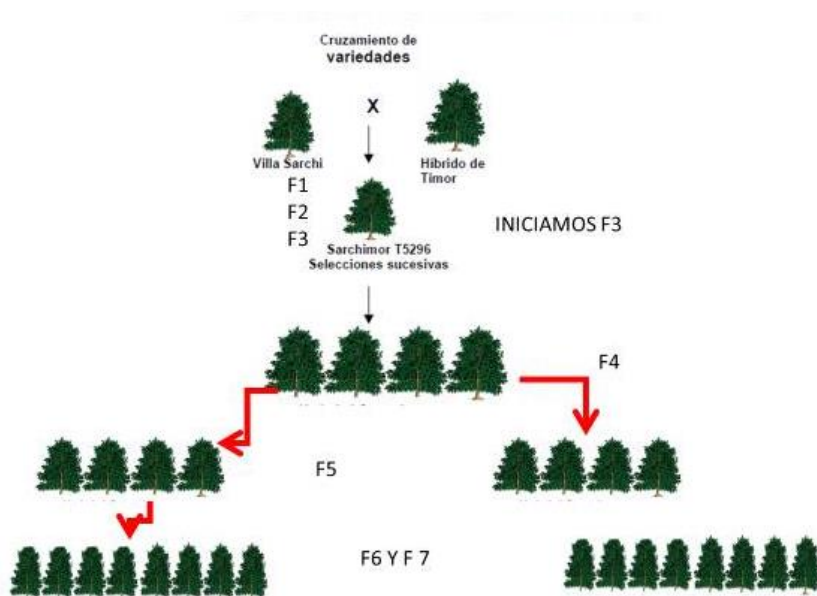


Figura 7. Diagrama de la selección de las líneas San Isidro utilizado en el ensayo, desde el inicio de la formación del híbrido hasta la generación seis que fue la empleada en esta investigación.

Fuente: Rodríguez 2017.

Siembra de las semillas y obtención de plantas de almácigo de café

Se utilizaron semillas de las cinco líneas San Isidro (SI) obtenidas de los lotes de Coopevictoria RL. Cada semilla se cosechó y se secó debidamente para su posterior siembra. En el caso de las semillas de la variedad Caturra (CT), fueron suministradas por el CICAFFÉ y se realizó el mismo procedimiento de cosecha y secado que las semillas anteriores.

El semillero se realizó directamente con la siembra de dos semillas por cada tubete de polietileno (de 5 cm de diámetro por 18 cm largo). Cada tubete contenía aproximadamente 350 g de sustrato. Los tubetes se colocaron en una “cama” de malla desde la siembra de las semillas, hasta el final del ensayo. La fase experimental del semillero se realizó de diciembre 2015 hasta febrero 2016. Los tubetes se dejaron en dicha cama, para permitir el crecimiento de las plantas a lo largo del periodo del ensayo. A mediados del mes de junio, se procedió con la inoculación de los nematodos.

Las plantas se conservaron en el invernadero de la Hacienda Alsacia propiedad de la Compañía Starbucks con riego a capacidad de campo, dos veces al día (8:00 am y 4:00 pm). Se utilizaron dos micro aspersores, con una duración de una hora al inicio y posteriormente se aumentó este tiempo de riego a dos horas, cada periodo.

Se aplicó de manera manual, cinco gramos del fertilizante de liberación lenta (Osmocote), de formulación (14 N -14 P₂O₅ -14 K₂O) por tubete. La incorporación del fertilizante, se realizó con la presencia del primer par de hojas verdaderas (aproximadamente a los 30 días después de la germinación) y se realizó una segunda aplicación trascurridos los cuatro meses de haber realizado la primera fertilización. También se realizaron aplicaciones foliares de 500 ml de Bayfolán Forte al mes el cual aporta los siguientes macro (N, P₂O₅ y K₂O) y microelementos (S, B, Co, Zn, Cu, Mo, Ca, Mn, Fe, Mg) (30 ml/10 l de agua).

Es importante mencionar que se aumentó la distancia entre los tubetes (plantas) con el objetivo de favorecer la aireación y disminuir la aparición de enfermedades. En algunas ocasiones, se observó la ocurrencia de algunas enfermedades fungosas como es el caso de Antracnosis (*Colletotrichum* sp.) la cual se combatió del almácigo, con la aplicación de Amistar 50WG (i.a Azoxystrobin) y Fytosan (i.a Sulfato de Cobre) como protector.

Material para la inoculación (obtención del inóculo)

La población inicial de *M. exigua* se obtuvo de un lote del CICAFAE el cual históricamente ha presentado problemas con estos nematodos. Se tomaron muestras de raíces de plantas de café agalladas, para así obtener el inóculo. Los huevos de *M. exigua* fueron extraídos según el método

de Barker (1985), en el cual las raíces recolectadas del campo, se lavaron cuidadosamente con agua del tubo de cañería para retirar las partículas de suelo adheridas. Luego las raíces se desinfectaron mediante el uso de hipoclorito de sodio. Se colocaron entre 20 a 50 g de raíz previamente lavada en un beaker con NaOCL al 0.5% y se agitaron durante tres minutos. La solución se pasó a través de un tamiz de 0.001 pulgadas (25 UM), para retener los huevos que finalmente, se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de cloro y lograr la desinfección superficial.

Adicionalmente, para la extracción de los huevos y juveniles de *M. exigua* se utilizó la metodología de centrifugación-flotación, en solución azucarada, descrita por Jenkins (1964). Este procedimiento consistió en tomar las raíces recolectadas en campo y lavarlas con agua. Se usó solo aquel material con síntomas de agallamiento por *Meloidogyne*, para asegurar una población alta de este nematodo, en la inoculación en los tubetes. Las raíces se cortaron en trozos pequeños (1-2 cm) y se colocaron en una licuadora con 300 ml de agua para ser maceradas durante 30 segundos. El material licuado se pasó por un juego de tamices de 100 y 400 micras. El material retenido en la criba de 400 micras se colectó y se colocó en un tubo de 50 ml en la centrífuga por 3 minutos a 3 000 r.p.m. Posteriormente, se decantó el agua sobrenadante y se le agregó solución azucarada de gravedad específica 1.18. Luego, se agitó vigorosamente y se colocó nuevamente en la centrífuga por tres minutos a 3 000 r.p.m. Finalmente, el sobrenadante contenido con la solución azucarada se vertió en un tamiz de 500 micras, se lavó con un flujo de agua ascendente para lavar el exceso de azúcar. Una vez completada esta fase, la solución fue colectada en una caja de conteo y se procedió a realizar la observación y determinar la densidad poblacional de *M. exigua* al microscopio.

Reproducción de *M. exigua* en un hospedante alternativo

Con el fin de multiplicar la cantidad de nematodos y huevos de esta especie, se utilizaron plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*), como hospedero alternativo. Se colocaron 15 macetas de plástico de 4 l de capacidad con cuatro plantas cada una, para tener 60 plantas en total. Tanto el suelo utilizado en el almácigo como para las macetas con tomate se esterilizaron en autoclave a 121°C por 20 minutos. Cada maceta con cuatro plantas de tomate fueron inoculados con aproximadamente 1 000 juveniles de *M. exigua*. A los 55 días después del trasplante se tomaron las raíces de tomate infectadas y se realizó la extracción de nematodos, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente de acuerdo con la metodología de Jenkins (1964). Es importante mencionar,

que la reproducción de juveniles en hospedante alterno, permitió tener siempre J₂ vivos para realizar las pruebas moleculares correspondientes.

Inoculación del material

A los cuatro meses después de la germinación del almácigo de café (cuando las plantas tenían en promedio cinco pares de hojas verdaderas), se realizó la inoculación de nematodos, la cual consistió en una “suspensión madre” de 450 ml de agua destilada con aproximadamente 190 000 entre juveniles y huevos de *M. exigua* que fueron distribuidos en todas las plantas del ensayo.

La inoculación de cada una de las unidades experimentales (tubetes, con dos plantas cada uno), para el tratamiento “inoculado” (Cuadro 8), se realizó de la siguiente manera: a) se procedió a realizar un pequeño hueco de aproximadamente 2 cm. de profundidad en el sustrato en medio de las dos plantas, b) posteriormente, con la ayuda de una micro pipeta, se tomó 5 ml de la “suspensión madre” con aproximadamente 2 000 entre huevos y juveniles c) finalmente se depositaron en el orificio previamente realizado. Para el tratamiento “sin inocular” (Cuadro 8), se realizó el mismo procedimiento solo que se colocó agua destilada libre de nematodos.

Cuadro 8. Tratamientos utilizados en el ensayo

Inoculado	Sin Inocular
SI27	SI27
SI31	SI31
SI32	SI32
SI34	SI34
SI35	SI35
CT (testigo)	CT (testigo)

SI: corresponde a las líneas San Isidro y el número es un código de identificación de cada línea, mientras tanto, la CT corresponde a la variedad testigo Caturra.

Fuente: Elaboración propia

Variables evaluadas:

Variables de crecimiento

Las variables de crecimiento se midieron en tres momentos, 2 días antes de realizar la inoculación, a los 60 días después de la inoculación y a los 120 días después de la inoculación y finalización del ensayo de campo.

Altura de la planta

La medición de la altura de las plantas se realizó utilizando una regla dos días antes de realizada la inoculación, a los dos meses después de la inoculación y al finalizar el periodo del ensayo de campo (a los cuatro meses después de la inoculación). Esta medición se realizó colocando la regla desde el nivel del sustrato hasta el meristemo apical de la planta y tomando el dato de los centímetros (cm) que se observaban en ese punto del meristemo apical.

Grosor del tallo

La medición del grosor del tallo de la planta se realizó mediante el uso del “pie de rey o vernier”, y la unidad fue en milímetros (mm). Esta medición se realizó dos días antes de realizada la inoculación, a los dos meses después de la inoculación y al finalizar el periodo del ensayo de campo (a los cuatro meses). Para medir el grosor del tallo se colocó el “pie de rey” en el tallo al nivel del sustrato y el instrumento digital indicaba la medida del tallo de cada planta.

Número de hojas por planta

Se contó el número de hojas por planta exceptuando las hojas cotiledonales y tomado en cuenta únicamente, las hojas completamente expandidas. Al igual que en las mediciones anteriores, se realizó en las mismas fechas.

Índice de Agallamiento Radical (IAR)

La medición para esta variable se realizó a los cuatro meses después de la inoculación, es decir, luego de haber realizado las últimas mediciones de las variables de crecimiento que coincidieron con la culminación del ensayo. Se colectaron los tubetes y se cortaron las plantas en la zona del tallo a la altura de la superficie del tubete. Cada tubete junto con el tallo cortado, se colocó en una bolsa debidamente rotulada y sellada para ser trasladado al laboratorio de Nematología de Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional.

Posteriormente, se tomó cada tubete y se lavó con agua para eliminar el sustrato adherido a las raíces y así determinar el Índice de Agallamiento Radical (IAR) con base en el estado de cada sistema radical. Esto se realizó a cada una de las 15 plantas (unidades experimentales) por línea para el tratamiento inoculado. Para determinar el IAR, se utilizó el Diagrama de Infección Radical causado por *Meloidogyne* spp. según Taylor y Sasser (1983) (anexo 1). Esta figura, categoriza la severidad del agallamiento o infección del sistema radical de la planta en seis grupos. El grupo “G-0” corresponde a un sistema radical libre de agallas, el “G-1” a un porcentaje de severidad que va de 1 a 10%, el “G-2” de 11 a 25%, “G-3” de 26 a 50%, “G-4” de 51 a 75% y finalmente el “G-5” de 76 al 100%. Además, del diagrama de Taylor y Sasser (1983), se utilizó también el Cuadro 9, según el tipo de reacción del genotipo planteado por Sañudo *et al.* 2003.

Cuadro 9. Escala para el Índice de Agallamiento Radical (ÍAR)

Grados de afección	% de afección	Reacción del genotipo
0	0%	Inmune (I)
1	1-10%	Resistente (R)
2	11-25%	Moderadamente Resistente (MR)
3	26-50%	Moderadamente Susceptible (MS)
4	51-75%	Susceptible (S)
5	76-100%	Altamente Susceptible (AS)

Fuente: tomado de Sañudo *et al.* 2003.

Análisis del peso fresco de las raíces

Se tomaron las raíces de cada unidad experimental (tubete), previamente lavadas, se cortaron en trozos de aproximadamente 1 cm, se colocaron en un beaker previamente pesado. Luego se determinó del peso fresco de cada unidad experimental en todas las líneas para el tratamiento inoculado. Este se realizó en una balanza “college” B502 de 500 g.

Análisis de la población final de nematodos en raíces

Se procesó el sistema radical de las 15 plantas por línea para el tratamiento inoculado y se realizó el mismo procedimiento que se utilizó para la obtención del inóculo. Posteriormente se tomaron cada una de las muestras para las cinco líneas San Isidro (SI) y la Caturra (CT) y se contabilizó la población final de *M. exigua* para cada uno de los tratamientos. Se utilizó un microscopio invertido OLYMPUS CKX41 a una magnificación de 20X.

Análisis de la población final de nematodos en sustrato

Se homogenizó el sustrato y se tomó una submuestra de 100 g para cada uno de los tubetes y se procesó por medio del método de tamizado y centrifugación-flotación en solución azucarada. Posteriormente, se procedió a realizar el conteo de las mismas, en un microscopio invertido OLYMPUS CKX41 a una magnificación de 20X.

Análisis del Factor de Reproducción

Éste índice que se utilizó para relacionar la población inicial de nematodos (P_i) con la población final de los mismos (P_f) ($FR = P_f/P_i$) (Oostenbrink 1966) en cada uno de los tratamientos “inoculados” (San Isidro y Caturra). Si el $FR < 1$, la planta es considerada como hospedero resistente y si el $FR > 1$, la planta es considerada un hospedero susceptible al nematodo

Análisis físico del sustrato

La determinación de las propiedades físicas del suelo, se realizó mediante el método del hidrómetro Bouyoucos, el cual consistió en tomar 50 g de suelo seco, se le agregó 10 ml de agente dispersante, se colocó en la batidora por 10 min, posteriormente el contenido se vertió en un cilindro de vidrio, se introdujo el hidrómetro y se aforó hasta la marca del cilindro. Luego se extrajo el Bouyoucos, se mezcló con fuerza el contenido dentro del cilindro, y de nuevo se introdujo el hidrómetro para realizar las lecturas correspondientes, la primera se realizó 40 segundos después de haber introducido el hidrómetro y la segunda 2 horas después. En ambas lecturas se tomó la temperatura a la que se encontraba el líquido al interior del cilindro (Henríquez y Cabalceta, 2012).

Este análisis se realizó en el INISEFOR (Instituto de Investigaciones y Servicios Forestales), de la Universidad Nacional en Barva, Heredia.

Identificación de la especie de *Meloidogyne*

La identificación de la especie se realizó mediante el montaje de diseños perineales de hembras ovígeras y las mediciones morfométricas de estadios juveniles (J₂). Dichas mediciones, se realizaron en el laboratorio de Nematología de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional. Además, se realizó la identificación de la especie mediante el uso de las técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y RFLP. Estos análisis se llevaron a cabo en el laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional.

Identificación morfológica y morfométrica de juveniles (J₂) de *Meloidogyne*

Se realizaron cortes de la región ano-genital de hembras ovígeras, de acuerdo con el método descrito por Hartman y Sasser (1985). Las raíces recolectadas en la plantación de café del CICAFFÉ, de la variedad Catuaí, se lavaron y se tomaron algunas agallas las cuales fueron colocadas en una caja Petri para luego ser observadas en un estereoscopio a 45X. Con la ayuda de agujas de disección, se abrió el tejido para extraer las hembras de *Meloidogyne* de su interior. Un total de diez hembras, fueron colocadas en una gota de ácido láctico al 45% y posteriormente cada hembra

fue cortada a la mitad para remover el contenido del cuerpo. Luego, la parte posterior de la cutícula de cada hembra, donde se encuentra el diseño perineal, se colocó en un portaobjetos con un cubreobjetos y se observó en un microscopio a 100X (Peraza *et al.* 2014). Posteriormente, se comparó la morfología de los diseños perineales con descripciones e ilustraciones de varios autores (Esser *et al.* 1976; López y Dickson 1977; Taylor y Sasser 1983; Whitehead 1968) y se tomaron fotografías en un microscopio Nikon eclipse 80i con una cámara digital integrada a 100X.

Las medidas morfométricas de los diez juveniles J₂ de *Meloidogyne* se realizaron tomando en cuenta: la longitud del cuerpo, diámetro del ancho máximo del cuerpo, diámetro del cuerpo a nivel del ano, longitud del estilete, ancho de la región labial, longitud de la base de los nódulos hasta el orificio de la glándula dorsal, distancia desde la base del estilete hasta el poro excretor, longitud del esófago, longitud de la cola y longitud de la porción hialina de la cola. Tanto las mediciones como las fotografías se realizaron en un microscopio Nikon, modelo ECLIPSE 80 i y una cámara Nikon DS-Fi1-L2.

Con los datos que se obtenidos de las mediciones morfométricas, se realizó un análisis estadístico descriptivo, en el cual se obtuvo: el promedio, la desviación estándar y los valores máximos y mínimos.

Identificación de la especie mediante análisis moleculares

Extracción de ADN

Para la extracción del ADN se siguió la metodología de Solano *et al.* (2013) con algunas modificaciones. Para ello se tomaron juveniles (J₂), estados aberrantes y machos aislados, los cuales se colocaron individualmente en tubos de PCR de 0.2 ml con 47 µl de Tris-HCL (0.2M) a pH 8.0. Posteriormente se agregaron 3 µl de proteinasa K (20 mg/ml) a cada tubo, para completar un volumen final de 50 µl. Se colocaron los tubos en un baño ultrasónico por 10 minutos a 60 °C. Luego se procedió con otra incubación en calor durante 30 minutos a 60 °C en un termociclador “2720” (Applied Biosystems™) y seguidamente se agitaron en un vórtex. Una vez terminado este proceso, se colocaron las muestras en un congelador a -20 °C por 15 minutos. Pasado este tiempo en el congelador, las muestras se incubaron de nuevo por 10 minutos a 90 °C y se agitaron en el

vórtex por segunda ocasión. Se repitió el procedimiento en el congelador a -20 °C y en el termociclador por 10 minutos a 90 °C. Finalmente, los tubos que contenían los nematodos se centrifugaron por 2 min a 2 000 rpm y se tomaron 45 ul de la suspensión de ADN cada uno de ellos y se transfirió a un nuevo tubo. Los nuevos tubos con el ADN de cada individuo, se almacenaron a -20 °C para posteriores análisis.

Reacción de la Cadena de Polimerasa (PCR)

Mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se amplificó una región entre la subunidad II de la citocromo oxidasa (COII) y el gen 16S del ADN ribosomal mitocondrial (ADNmt). Se utilizaron los imprimadores C2F3 (5'-GGTCAATGTTTCAGAAATTTGTGG-3') y 1108 (5'-TACCTTTGACCAATCACGCT-3') (Power y Harris 1993).

Se realizaron reacciones de PCR de 50 µl, que contenían la siguiente mezcla de reacción: DreamTaq™ Master Mix (Thermo Scientific™) a una concentración 1X, 15 µl de agua ultra pura, cada imprimador, (*forward* y *reverse*), a 0.4 mM cada uno y 6 µl del ADN en solución (Solano *et al.* 2015). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador 2720 (Applied Biosystems™). Las condiciones del perfil térmico utilizadas fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos a 94 °C por 10 segundos, 52 °C por 30 segundos, 68 °C por 2 minutos y una extensión final de 72 °C durante 2 minutos (Jeyaprakash *et al.* 2006).

Posteriormente, se analizaron los productos de PCR, en geles de agarosa al 1%, teñidos con GelRed™ (Biotium Inc.) 1X. El gel se corrió en una cámara de electroforesis Thermo Scientific™ durante 90 minutos a 90 V a un amperaje constante de 250-300 mA. Luego de la electroforesis, se evaluó el gel en un transiluminador de luz ultravioleta (Solano *et al.* 2015; Zamora *et al.* 2015).

Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP)

Con los productos resultantes del PCR, se procedió a realizar un análisis de RFLP. Para ello, se cortaron los productos con la enzima de restricción *DraI* de Thermo Scientific™, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se tomó 1 µl de la enzima, 1.5 µl de buffer específico para la enzima,

7.5 µl de agua ultra pura y 5 µl del producto de PCR, y se incubó en un termociclador a 37 °C por 3 horas. Después de este procedimiento, se tomaron los fragmentos del PCR sin cortar y los del RFLP y se separaron por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 2%, preparado con TBE 1X, durante 90 minutos a 90 V. Finalmente, se evaluó el gel con las bandas en el transiluminador de luz ultravioleta (Zamora et al. 2015).

Secuenciación de la especie *M. exigua*

Se tomaron 30 µl de los productos de PCR obtenidos a partir de muestras de juveniles (J₂), formas aberrantes (J₃ y J₄) y machos, se enviaron a purificar y secuenciar a la compañía MacroGen Inc en Corea del Sur. Las secuencias se editaron y se ensamblaron con el programa BioEdit versión 7.2.5 (Hall 1999) y se analizaron con el programa BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool disponible en: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para comparar las secuencias analizadas con las depositadas en GenBank® del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y analizar el porcentaje de similitud entre secuencias. Se analizó y comparó el porcentaje de similitud entre las secuencias previamente editadas de la población de *Meloidogyne* en estudio, versus las depositadas en el GenBank® del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Posterior a los análisis de secuenciación, para confirmar la identidad de las muestras secuenciadas, se hicieron reacciones de PCR, con el set de imprimadores tipo SCAR, ex-D15-F (5'-CATCCGTGCTGTAGCTGCGAG-3) y ex-D15-R (5'-CTCCGTGGGAAGAAAGACTG-3), diseñados por Randig *et al.* (2002), los cuales son específicos para *M. exigua*.

Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con 15 repeticiones por línea para cada tratamiento (Figura 8). Cada repetición fue una unidad experimental, la cual consistió de un tubete de polietileno con dos plantas cada uno, los tratamientos fueron “Inoculación y “Sin Inoculación”.

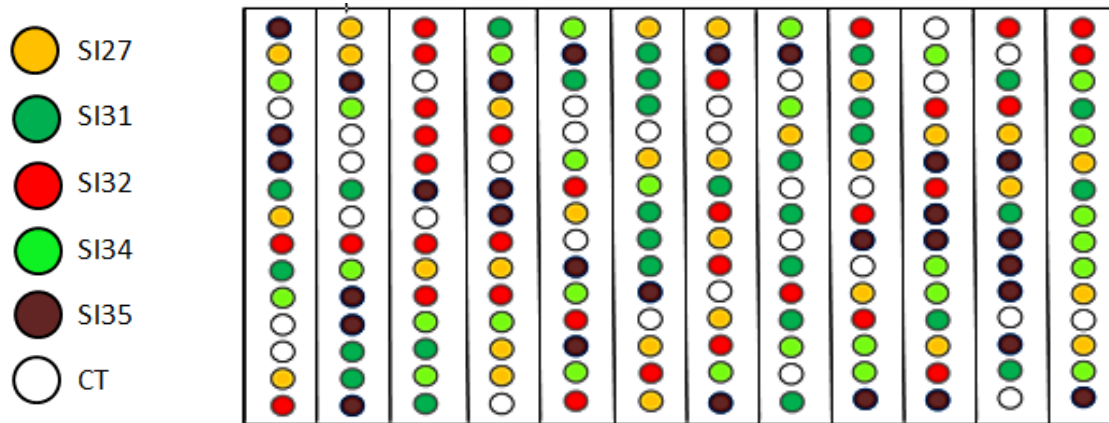


Figura 8. Diagrama del diseño experimental utilizado y ubicación de las unidades experimentales (tubetes con plantas) durante el periodo del ensayo.

Fuente: Elaboración propia.

Análisis estadístico

Para evaluar el efecto de *M. exigua* sobre el crecimiento de las plantas (altura, diámetro del tallo, número de hojas), el peso fresco de las raíces y el porcentaje de severidad de agallamiento por *Meloidogyne*, se realizó un análisis de varianza de los datos a la cosecha (fecha tres), a los 120 días de la inoculación, según la estructura factorial de tratamientos (líneas de café e inoculación de nematodos), mediante el procedimiento del Modelo General Lineal (GLM) de SAS® 9.4. Además, para evaluar las diferencias entre niveles de los factores se realizó la prueba de Waller-Duncan. También se utilizó el procedimiento GenMod de SAS® 9.4 para determinar diferencias entre tratamientos en cuanto a los datos de los conteos de huevos y juveniles de *Meloidogyne* (poblaciones finales) en raíz y sustrato.

Para el Factor de Reproducción (FR), nuevamente se realizó un análisis de varianza, mediante el procedimiento del Modelo General Lineal (GLM) de SAS® 9.4 y nuevamente se realizó la prueba de Waller-Duncan, para evaluar diferencias entre niveles.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VARIABLES DE CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS DE ALMÁCIGO DE CAFÉ

De acuerdo al análisis de varianza para las variables de crecimiento (altura, diámetro y número de hojas) “0” días (cuatro meses y medio a partir de la germinación de la semilla), a los 60 y 120 días después de la inoculación, mostraron diferencias significativas ($P < 0.0296$) entre las líneas de café San Isidro (SI) y Caturra (CT) (testigo), tanto en las plantas del tratamiento inoculado como en las del tratamiento no inoculado con nematodos (Cuadro 10).

Cuadro 10. Análisis de las variables de crecimiento (altura, diámetro y número de hojas) al final del ensayo (120 días después de la Inoculación $n=30$). San Isidro de Alajuela, 2016.

Líneas de Café	Variables de Crecimiento					
	Altura (cm)		Diámetro (mm)		Número de Hojas	
	Inoculado	Sin Inocular	Inoculado	Sin Inocular	Inoculado	Sin Inocular
SI 35	12.50 ^{A (NS)}	13.58 ^A	2.60 ^{A (NS)}	2.60 ^A	9.27 ^{AB (NS)}	9.53 ^{AB}
SI 31	13.20 ^{A (NS)}	13.77 ^A	2.59 ^{A (NS)}	2.55 ^A	9.10 ^{ABC (*)}	10.20 ^A
SI 32	12.45 ^{A (NS)}	12.19 ^B	2.56 ^{A (NS)}	2.46 ^{AB}	9.43 ^{A (NS)}	9.57 ^{AB}
SI 27	12.08 ^{A (NS)}	11.23 ^{BC}	2.59 ^{A (NS)}	2.49 ^{AB}	8.70 ^{ABC (NS)}	8.90 ^B
SI 34	9.31 ^{B (*)}	12.34 ^B	2.30 ^{B (NS)}	2.39 ^B	8.21 ^{BC (*)}	10.46 ^A
CT	7.27 ^{C (*)}	10.84 ^C	1.97 ^{C (*)}	2.21 ^C	8.00 ^{C (*)}	9.70 ^{AB}
Probabilidad	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0296	0.0190
Error Estándar	0.5350	0.4336	0.0658	0.0567	0.3648	0.3257

Letras iguales en cada columna indican que no hay diferencias entre variedades según la prueba Waller-Duncan (razón $k=100$). (*) y (NS) indican, en el primer caso (*), que si hubo diferencias estadísticamente significativas y (NS-no significativo) que no hubo diferencias entre los tratamientos inoculados para cada línea (SI).

Fuente: Elaboración propia

Altura de la planta

La altura de las plantas, es una variable muy importante a medir en ensayos donde se inocula algún nematodo endoparásito como el caso de *Meloidogyne*. Generalmente, se logra observar en periodos cortos de tiempo (como en el caso de los cuatro meses que se mantuvo el almácigo bajo la presión del inoculo), si hubo un efecto sobre esta variable (altura) en las plantas inoculadas versus las plantas sin inocular. De acuerdo con los resultados de esta investigación, las variedades San Isidro (SI), se diferenciaron al presentar **alturas de planta** entre 12.08 cm (SI27) y 12.50 cm (SI35) para

el tratamiento inoculado y 11.23 cm (SI27) y 13.77 cm (SI31) para el tratamiento sin inocular. En el caso de la variedad Caturra (CT), es una planta de porte, lo cual se comprobó en este estudio, ya que presentó significativamente la menor altura de planta tanto en el tratamiento inoculado como en el sin inocular (7.27 cm y 10.84 cm) respectivamente. Se tomó la decisión de incluir la variedad Caturra (CT) como testigo en el experimento, por su conocida susceptibilidad a nematodos (World Coffee Research 2016). Al comparar la variedad Caturra (CT), se observaron reducciones de 32.9%, 10.9% y 17.5% respectivamente, en el tratamiento inoculado versus el no inoculado para las variables altura, diámetro del tallo y número de hojas. El número de hojas del Caturra (CT) fue significativamente menor que algunos Sarchimor cuando hubo presencia de nematodos en el sustrato; sin embargo, cuando el suelo estuvo libre de ellos, el Caturra (CT) no se diferenció significativamente de los Sarchimor (Cuadro 10).

Para la variable **altura de la planta**, en el tratamiento inoculado con nematodos, no se determinaron diferencias significativas entre las líneas SI35 (12.5 cm), SI31 (13.20 cm), SI32 (12.45 cm) y SI27 (12.08 cm), es decir, no hubo efecto por la inoculación de nematodos sobre esta variable ($P > 0.1410$), para estas líneas (Cuadro 10), (Figura 9); sin embargo, la SI34 si se diferenció de las demás líneas San Isidro (SI) inoculadas, al presentar la menor altura dentro de la variedades (SI) (9.31 cm). Así mismo, la variedad Caturra (CT) (7.27 cm) utilizada como testigo, presentó diferencias significativas con respecto a todas las líneas (SI) y particularmente con la SI34 en donde las plantas inoculadas con *M. exigua* crecieron menos respecto a las no inoculadas.

Al realizar el análisis de varianza se observó una diferencia significativa ($P < 0.0001$) de la línea SI34 inoculada (9.31 cm) versus la SI34 no inoculada (12.34 cm) que porcentualmente correspondió a una disminución del 24.5% en el tratamiento inoculado para la variable altura. La SI34 inoculada fue la más afectada con una reducción en el crecimiento de 32.9% con respecto a las SI34 no inoculadas. Como era de esperar, la Caturra (CT) testigo ($P < 0.0001$) por su alta susceptibilidad a nematodos se notó fuertemente afectada por la inoculación. En esta variedad, se observó una gran cantidad de “agallas” o “nódulos” (Figura 10) y menor volumen de raíces absorbentes, así como mayor cantidad de nematodos. Esta condición favorece que el sistema radical tenga menos absorción de nutrientes y agua.

El parasitismo provocado por los nematodos en los sistemas radicales de las plantas de café, dificulta la absorción y translocación del agua y los nutrientes que se encuentran en solución disponibles Salgado *et al.* (2008). Adicionalmente, Cepeda-Siller (1996) y Caillaud *et al.* (2008), mencionan que los nematodos agalladores provocan atrofia en el funcionamiento de los reguladores de crecimiento entre las raíces y la parte aérea de las plantas, ocasionan trastornos en la respiración celular, alteraciones del ciclo celular, afectan la síntesis de ADN y generan modificaciones con respecto a la síntesis de fitohormonas. Todas estas alteraciones se manifiestan debido a la formación de células gigantes (agallas) que generan la reducción del crecimiento y desarrollo de las plantas tal y como se observó en la SI27, SI34 y Caturra (CT) (Figura 10). En investigaciones realizadas por Di Vito y colaboradores (2000), encontraron en plantas de café inoculadas con *M. exigua* en edades de cuatro y diez meses, una reducción en el crecimiento de 34 y 45% respectivamente, a diferencia de plantas sin presencia de nematodos que tuvieron un crecimiento esperado.

En esta investigación, se utilizó una cantidad de 2 000 entre juveniles y huevos por tubete, es decir, 7.4 J₂+huevos/cm³, lo cual se consideró suficientemente alta para lograr observar qué comportamiento presentaban las plantas de cada línea en cuanto a las variables de crecimiento medidas. Por ejemplo, en estudios realizados por Ferreira y Crozzoli (1995), encontraron una reducción del crecimiento de las plantas en la etapa de almácigo a partir de poblaciones iniciales de 16 huevos/cm³ de suelo. Así mismo, Rojas y Salazar (2013), determinaron en una investigación realizada con *M. exigua*, en Costa Rica, que con poblaciones iniciales superiores a 32 huevos/cm³ de sustrato de dicho nematodo, generó una reducción de alrededor del 20% en la altura y el diámetro del tallo en plantas de café. En el caso de este estudio, la reducción en crecimiento en altura con la incorporación de 7.4 J₂+huevos/cm³ fue de 24.5% y 32.9% para los materiales SI34 y Caturra (testigo), respectivamente, que fueron los dos tratamientos más afectados del ensayo. Con respecto a la reducción grosor de tallo, este no fue tan representativo, con 4% y 10.9% en la SI34 y Caturra respectivamente.

Las líneas SI35, SI31 y SI32 inoculadas con nematodos, tuvieron mejor comportamiento con las variables medidas, debido a la menor afectación observada durante la evaluación del ensayo. En el caso de la SI35 y la SI31 se consideran plantas resistentes (R), en tanto la SI32, se comportó como planta moderadamente resistentes (MR) a *M. exigua*. Plantas dentro de estos dos rangos de

resistencia, no serán afectados su desarrollo y crecimiento normal. Según Gelpud *et al.* (2011), el crecimiento de la raíz y la parte aérea de la planta continuarán su normal desarrollo y no serán afectados negativamente cuando presentan genotipos resistentes o moderadamente resistentes. Por su parte, Sañudo y Betancourth (2005), mencionan que los materiales vegetales con capacidad de resistencia o resistencia moderada, permiten un adecuado funcionamiento fisiológico de los procesos de absorción y adsorción de nutrientes esenciales y agua, sin que se afecte el crecimiento de las mismas.

Diámetro del tallo

En el tratamiento inoculado con nematodos, se presentó un comportamiento igual al de la variable altura, donde las líneas SI35, SI31, SI32 y SI27, no difirieron entre sí; sin embargo, sí se observó una diferencia ($P < 0.05$) de la SI34 y del mismo Caturra CT (testigo). En el tratamiento sin inoculación con nematodos, las líneas SI35 (2.60 mm), SI31 (2.55 mm), SI32 (2.46 mm), SI27 (2.49 mm), no presentaron diferencias significativas entre sí y fueron la líneas con los diámetros más altos. En el caso de la SI32, SI27 y SI34 no presentaron diferencias significativas. Con respecto al Caturra (CT), se encontraron diferencias significativas entre las SI35 y SI31 (las de mayor diámetro) y las SI32, SI27 y S34 respectivamente. En general, la Caturra (CT) fue la que tuvo el diámetro más pequeño y la que difirió con el resto de líneas en el ensayo.

Ninguna línea (SI) presentó efecto por la inoculación de nematodos ($P > 0.2237$); no obstante, el menor diámetro lo presentó la SI34 con 2.3 mm versus la SI35 con 2.6 mm (Figura 9). En el caso de la variedad Caturra (CT) sí se observó un efecto del tratamiento, con una diferencia significativa ($P < 0.0003$) para esta variable de las plantas inoculadas con respecto a las sin inocular. Esta diferencia significativa corresponde a una reducción del crecimiento de un 10.9%, con la inoculación de 740 J_2 +huevos/100 cm^3 de sustrato. Según Niño *et al.* 2008, en ensayos realizados, observaron una reducción del 21.5% grosor del tallo en plantas de Uchuva inoculadas con 500 J_2 /100 cm^3 de sustrato de *M. hapla* en comparación con el tratamiento testigo sin inocular, que fue el que presentó el mayor grosor del tallo.

Número de hojas

En la variable **número de hojas** para el tratamiento inoculado, la SI32 fue la que tuvo el valor más alto ($P < 0.05$), difiriendo con respecto a la SI34. Dicha diferencia fue de 12.9% menos de hojas para la SI34. Además, se observó que hubo una diferencia significativa entre la SI32 con respecto a la CT (testigo), con reducción en cantidad de hojas para esta última de 15%. Las plantas del tratamiento sin inoculación de nematodos de las líneas SI34 y SI31 tuvieron la mayor cantidad de hojas (más de 10), difiriendo significativamente ($P < 0.05$), solo de la SI27 que tuvo menos de nueve hojas por planta, con reducciones en cantidad de hojas de la SI27 versus SI34 de (14.9%) y SI27 versus SI31 (12.7%).

Adicionalmente, se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para las líneas SI31 ($P < 0.0288$), SI34 ($P < 0.0001$) y Caturra (CT) ($P < 0.0012$). Esta disminución representó un 11% en la SI31 ($P = 0.0288$), un 21.5% en la SI34 ($P = 0.0001$) y un 17.5% para la Caturra (CT). En las otras líneas SI35 (9.27 hojas), SI32 (9.43 hojas) y SI27 (8.70 hojas) no hubo efecto en la adición de nematodos para esta variable ($P > 0.5888$) (Figura 9).

La reducción en la cantidad de hojas, que se presentó para la variedad Caturra CT (testigo) del tratamiento “inoculado” con respecto al tratamiento “sin inocular”, fue similar al que se observó en la línea SI34. Tanto la Caturra (CT) y SI34, fueron los tratamientos más susceptibles con pérdidas en la cantidad de hojas por presencia de nematodos. La defoliación en la etapa de vivero es un síntoma que se presenta muy frecuentemente cuando los suelos utilizados para elaborar los almácigos, presentan altas poblaciones de nematodos fitoparásitos que posteriormente parasitarán las plántulas (Araya 1994; Hussey y Williamson 1998). Asimismo, estos autores mencionan que tanto los viveros como plantaciones de café con poblaciones elevadas de *Meloidogyne*, pueden manifestar clorosis, raquitismo, enanismo y defoliación, entre otros.



Figura 9. Plantas de café en los tubetes a los 120 días después de la inoculación. Plantas de la izquierda de cada fotografía corresponden al tratamiento inoculado y en el tubete de la izquierda la planta sin inocular con los nematodos *Meloidogyne exigua*. La A. son las plantas de la línea SI35, la B. son las plantas SI31, la C. son de la línea SI32, las plantas de la D. son de la SI27, las de la E. son las plantas de la SI34 y la F. son las plantas de la variedad Caturra (testigo).

Fuente: Elaboración propia.

Índice de Agallamiento Radical (ÍAR)

El IAR se clasificó en cinco grupos, dependiendo del porcentaje de agallamiento (%A) observado en el sistema radical de cada una de las plantas de las líneas San Isidro (SI) y Caturra (CT). Para el caso de la línea SI35, el 93% (14 de 15 plantas) presentaron sistemas radicales dentro del G-1, es decir, plantas con porcentajes de agallamiento (%A) radical poco o casi nulo. Estas plantas se clasificaron dentro de la categoría de planta resistente (R), con raíces prácticamente libres de agallas o nódulos (Figura 10-A). En la línea SI31, el 73% (11 de 15 plantas) presentaron sistemas radicales dentro del G-1 (entre 1-10% de agallamiento) con (%A) radical bajos, 2 plantas (13%) dentro del G-2 con (%A) del 11-25%, y las 2 restantes plantas (13%), dentro del “G-3”, con (%A) que va entre 26 al 50% (Cuadro 11).

En el sistema radical de las plantas de la línea SI32, el 80% (12 de 15 plantas) se ubicaron dentro del G-1, con severidad menor al 10% de agallamiento y tan solo tres plantas dentro del G-3 (Cuadro 11) (Figura 10-C). El comportamiento que presentó la línea SI27 fue muy variado, el 33% (5 de 15 plantas) se ubicaron dentro del G-1, el 20% (tres plantas) correspondieron a los grupos G-2 y G-3 respectivamente. Posteriormente, el 13% (dos plantas) se ubicaron dentro de los grupos G-4 con (%A) del 57-75% y G-5 con (%A) del 76 al 100% (Cuadro 11).

Finalmente, la línea SI34 tuvo un comportamiento muy similar al Caturra (CT), donde se encontraron una mayor cantidad de plantas con (%A) que van del 26 al 100%. En el caso de la SI34, el 7% (una planta) se halló dentro del G-1 y G-2 respectivamente. Un total de tres plantas (20%) se ubicaron dentro del G-3, cuatro plantas (26%) dentro de G4 y seis plantas (40%) dentro del G-5 (Figura 10-E). Con respecto a la Caturra (CT), no se encontró ninguna planta en el G-1. Así mismo, el 7% (una planta) se ubicó en el G-2, tres plantas (20%) dentro del G-3, cinco plantas (33%) dentro del G-4 y seis plantas (40%) dentro del G-5 (Cuadro 11).

Cuadro 11. Contingencias para Índice de Agallamiento Radical (ÍAR) para las líneas San Isidro (SI) y Caturra (CT). San Isidro de Alajuela, 2016.

IAR	Porcentaje (%)									
	G-1 (1-10)		G-2 (11-25)		G-3 (26-50)		G-4 (51-75)		G-5 (76-100)	
Línea	*A n=15	R (%)	A n=15	R (%)	A n=15	R (%)	A n=15	R (%)	A n=15	R (%)
SI35	14	93	0	0	1	7	0	0	0	0
SI31	11	73	2	13	2	13	0	0	0	0
SI32	12	80	0	0	3	20	0	0	0	0
SI27	5	33	3	20	3	20	2	13	2	13
SI34	1	7	1	7	3	20	4	26	6	40
CT	0	0	1	7	3	20	5	33	6	40

*A: Absoluta, R: Relativa.

Fuente: Elaboración propia.

De acuerdo con Taylor y Sasser (1983), existe una correlación entre la formación de agallas por nematodos noduladores del género *Meloidogyne* y la disminución del crecimiento de la parte aérea de la planta. En el ensayo, se observó que la SI34 y la Caturra (CT), fueron las líneas que presentaron mayor incidencia y severidad de agalladas, por lo tanto, también presentaron el menor crecimiento por la adición de la población de *M. exigua* durante el experimento.

La formación de agallas en los sistemas radicales debido a la presencia de *Meloidogyne*, genera que las raíces de las plantas sufran de alteraciones celulares con formación de células gigantes, que afectan las funciones primordiales como la absorción de agua y nutrientes. Este estado de la planta a su vez, repercute de forma negativa en el funcionamiento adecuado tal y como se observó en la SI34 y Caturra (CT), con reducciones significativas en el crecimiento al ser susceptibles al nematodo *Meloidogyne*. Taylor y Sasser (1983); Kirkpatrick *et al.* (1991), confirmaron en sus investigaciones que, las plantas hospederas de nematodos fitoparásitos endoparásitos como es el caso de *Meloidogyne*, sufren cambios morfológicos debido a la formación de agallas o nodulaciones. Las agallas provocan en el sistema radicular la ruptura los elementos vasculares y la deformación de las raíces, lo que interrumpe el flujo normal del agua y nutrientes. Además, inducen a la planta a varias patologías entre ellas, la falta de crecimiento, aparición de deficiencias nutricionales, heterogeneidad de plantas en el campo y marchitez en los días calurosos.

Para que un fitonematodo exprese su potencial patogénico y pueda finalizar su ciclo de vida con normalidad, necesita que condiciones de temperatura, humedad relativa y la textura del suelo (preferiblemente arenoso) sean idóneas, para permitir el desplazamiento entre los espacios porosos. Adicionalmente, también hay que tomar en cuenta, el tipo de hospedero, la capacidad de daño que puede ocasionar al sistema radical y su posible formación de agallas, que finalmente, afectarán las funciones de las raíces.

De acuerdo con Cepeda-Siller (1996); Sharma *et al.* (2006), la versatilidad sobre la capacidad de tolerancia que tienen algunas plantas a nematodos, está generalmente influenciada por las condiciones de temperatura, humedad, textura de suelo y principalmente por el tipo de hospedero. En esta investigación, se homogenizó el tipo de sustrato para todas las líneas así como las condiciones climáticas; sin embargo, se presentaron diferencias significativas en cuanto al ÍAR, lo que obedece principalmente al genotipo de cada planta y a su capacidad de reprimir, retardar o evitar el efecto de *M. exigua*.

Las cinco líneas San Isidro (SI) utilizadas son del mismo patrón, derivadas del “Sarchimor T5296”, tres de ellas (SI35, SI31 y SI32) presentaron un comportamiento de resistente (R) a moderadamente resistente (MR), la línea SI27 mostró un comportamiento moderadamente susceptible (MS) y finalmente la SI34, se comportó como material susceptible (S). Sobre este tema, Davis y May (2003) concluyeron que, el grado de tolerancia de los cultivares con índices de agallamiento y niveles de resistencia similares no siempre se comportan igual de una línea a otra, ya que habrán algunas líneas susceptibles derivadas de un mismo patrón genético. Ejemplo de ello es la condición de moderadamente susceptible de la SI27 y susceptible de la SI34, en donde el sistema radical de esta última, fue el que presentó el mayor agallamiento de las líneas estudiadas (Figura 10).

El comportamiento de resistencia que presentaron las líneas SI35, SI31 y SI32, se debió quizás a una respuesta de defensa con la activación de los genes o mecanismos que confieren la capacidad de resistencia ante nematodos fitoparásitos, no así las líneas SI27 y SI34 respectivamente. Camacho (1991); Sandoval y Lomas (2007) indican que si hay ausencia en la expresión de los mecanismos de respuesta en defensa de las raíces, estos determinan en gran medida que haya abundantes sitios de alimentación para el nematodo. Adicionalmente, estos autores mencionan que, esta circunstancia favorece un elevado número y tamaño de agallas, que se manifiesta en una infección radical elevada. En caso contrario, si se da la activación y

respuesta de estos mecanismos de defensa por parte de la planta, ocasionan una alteración sobre las condiciones de supervivencia y desarrollo del nematodo en su estado parasítico. Esta situación impide al nematodo completar su ciclo de reproductivo con la disminución de los sitios de alimentación, la escasa formación de agallas y finalmente, una baja escala de infección radical.

Porcentaje de severidad

El porcentaje de severidad, reflejó qué tan agallado se encontró el sistema radical en cada una de las líneas San Isidro (SI). En el caso de la línea SI35 (la menos agallada) fue de un 5.3% con un comportamiento de reacción del genotipo como resistente (R) a nematodos (Cuadro 12). Al observar el sistema radical de la línea SI35, se encontró únicamente unas pocas agallas o nodulaciones en las plantas inoculadas (Figura 10-A).

Mismo comportamiento Resistente (R), para la línea SI31, que presentó en promedio un 10.5% de afectación, por lo que se encuentra dentro del rango de resistente. En lo que respecta a la línea SI32, mostró un porcentaje de agallamiento de 11.2%, por lo que se categorizó como moderadamente resistentes (MR) a nematodos. De acuerdo con la prueba de Waller-Duncan, la SI35, SI31 y SI32 no mostraron diferencias significativas ente sí ($P>0.05$) siendo la SI35 la mejor.

La línea SI27 mostró un porcentaje de severidad de 31.6% lo que indicó que es una planta moderadamente susceptible (MS) (Cuadro 12) (Figura 10-D). Finalmente, las líneas SI34 y Caturra (CT), presentaron un porcentaje de severidad de 59.9% y 66.4% respectivamente. Ambas líneas, la SI34 y Caturra (CT) no presentaron diferencias significativas entre sí ($P>0.05$) y se agruparon de acuerdo con la reacción de genotipo, como plantas susceptibles (S) al nematodo *M. exigua* (Cuadro 12). Tanto la línea SI34 y Caturra (CT), mostraron un alto porcentaje de agallamiento radical (Figura 10 E-F).

Cuadro 12. Porcentajes de severidad por cada línea para el Índices de Agallamiento Radical (ÍAR), mediante el uso de la escala planteada por Sañudo *et al.* (2003). San Isidro de Alajuela, 2016.

Líneas	IAR	Reacción del genotipo
SI35	5.3 ^C	Resistente (R)
SI31	10.5 ^C	Resistente (R)
SI32	11.2 ^C	Moderadamente resistente (MR)
SI27	31.6 ^B	Moderadamente susceptible (MS)
SI34	59.9 ^A	Susceptible (S)
CT	66.4 ^A	Susceptible (S)
Probabilidad	<0.0001	

Letras iguales en cada columna indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre líneas según la prueba Waller-Duncan (razón k=100).

Fuente: Elaboración propia

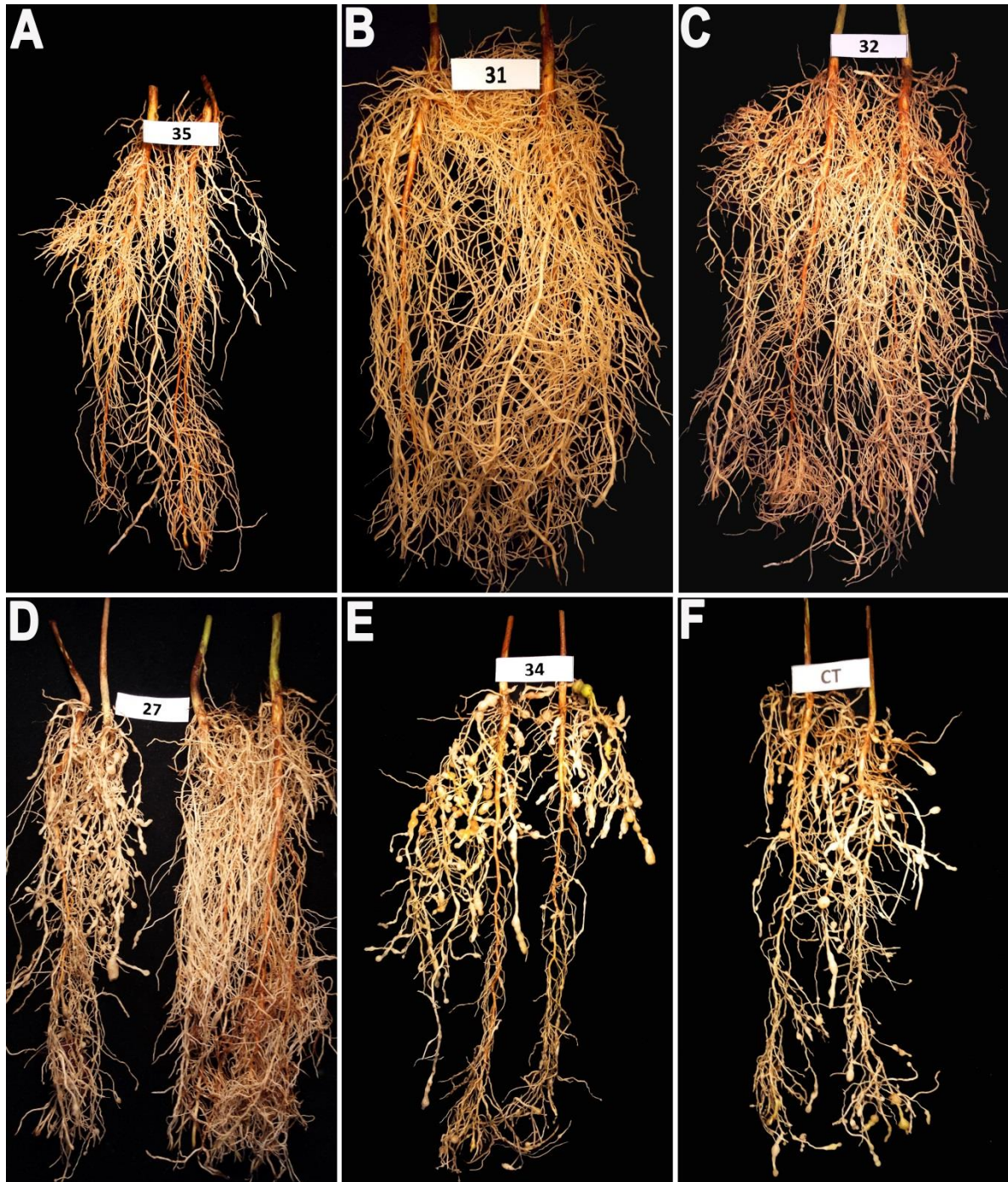


Figura 10. Sistemas radicales de plantas de café de las líneas San Isidro (SI) y Caturra (CT), a los 120 días después de la inoculación con *M. exigua*. A. SI35, B. SI31, C. SI32, D. SI27. E. SI34, F. Caturra (CT)-testigo. San Isidro de Alajuela. 2016.

Fuente: elaboración propia.

Variable peso fresco del sistema radical

El peso fresco del sistema radical presentó diferencias significativas entre las líneas San Isidro (SI) y la Caturra (CT) (Testigo). Los pesos más altos se observaron en las líneas SI27 y SI32 con 6.1 y 5.8 g respectivamente (Cuadro 13). De acuerdo con Waller-Duncan, no se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) entre ambas líneas (SI27 y SI32). En el caso de las líneas SI31 y SI34 mostraron pesos de 5.0 y 4.9 g, sin mostrar diferencias significativas entre ellas, ni con las líneas SI27 y SI32 ($P>0.05$) (Cuadro 13). La línea SI35 presentó un peso de 4.4 g mostrando una diferencia significativa ($P<0.05$) con las líneas SI32 y SI27, no así ($P>0.05$) con la SI31 y SI34. Finalmente, la Caturra (CT), tuvo un peso de 2.6 g, el cual fue el más bajo de todos y difirió con todas las San Isidro (SI) (Cuadro 13).

Cuadro 13. Pesos frescos (g) de los sistemas radicales de cada línea San Isidro (SI) y Caturra (CT). San Isidro de Alajuela, 2016.

Líneas	Peso raíz (g)
SI35	4.4 ^B
SI31	5.0 ^{AB}
SI32	5.8 ^A
SI27	6.1 ^A
SI34	4.9 ^{AB}
CT	2.6 ^C
Probabilidad	<0.0001

Letras iguales en cada columna indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre líneas según la prueba Waller-Duncan (razón $k=100$).

Fuente: Elaboración propia

La variable peso radical fresco, es un poco engañosa, ya que no precisamente una planta por registrar el mayor peso del sistema radical es la mejor adaptada al ataque de nematodos, sino que por el contrario, pesos radicales altos en muchas ocasiones, indican una mayor cantidad de agallas (por su volumen y peso). Es importante señalar que al momento de finalizar el ensayo, ningún sistema radical del total de las plantas utilizadas en el ensayo, presentaban podrición, condición que hubiera hecho que se registraran menores pesos radicales en aquellas líneas que resultaron ser susceptibles como la SI34 y Caturra (CT).

La línea SI35 que resultó ser resistente (R), fue la que registró menor peso radical y la línea SI27 moderadamente susceptible (MS) tuvo el mayor peso radical. Estos resultados concuerdan con estudios realizados por Rojas y Salazar (2013), donde indican que el peso fresco de los

sistemas radicales tiende a ser mayor para aquellas plantas que cuentan con las mayores densidades de nematodos en sus raíces. Además menciona que, el agallamiento radical puede estar relacionado con el comportamiento de mayor peso de las raíces. Datos similares fueron confirmados por Barker y Olthof (1976), en donde encontraron que la producción de nódulos en las raíces como respuesta al ataque por *Meloidogyne*, generó mayores pesos de las raíces que resultaron ser infectadas por nematodos.

Las líneas poco afectadas por los nematodos inoculados (SI35, SI31 y SI32) presentaron gran cantidad de raicillas secundarias que son principalmente absorbentes de agua y nutrientes (Figura 10-A, B y C). En cambio, en las líneas (SI27 y SI34) que mostraron gran cantidad de agallas, tenían pocas raíces secundarias (Figura 10-E y F). Estos resultados muestran similitud con los de Leguizamón (1997), al indicar que los nematodos fitoparásitos principalmente los del género *Meloidogyne*, tienden a ocasionar reducciones en la producción de raíces secundarias y absorbentes, que son las más importantes en las plantas.

Respecto de los sistemas radicales en etapa de almácigo, en las líneas susceptibles a la infección por nematodos, se producen daños irreversibles en periodos cortos de tiempo (tres o cuatro meses). Adicionalmente, la línea SI35 a diferencia de las demás San Isidro (SI) y la variedad Caturra (CT), no tuvo la necesidad fisiológica de destinar muchos recursos a la producción de raíces, aunque el suministro de nutrientes fue el adecuado, sino que por el contrario, quizás apuntó más en destinar esos recursos a la producción de biomasa aérea.

Sobre este mismo tema, Gelpud *et al.* 2011 demostraron que, genotipos considerados susceptibles (S) y altamente susceptibles (AS), tuvieron menores pesos frescos de raíz, que aquellos genotipos resistentes (R) o moderadamente resistentes (MR), con relación al porcentaje de agallamiento (%A). Complementariamente, Taylor y Sasser (1983) y El-Sherif *et al.* (2007) señalan que las raíces infestadas con *Meloidogyne* spp. son de menor tamaño que las raíces sanas, existe menos presencia de raíces laterales y pelos radicales, lo que ocasiona una reducción del peso radical. No obstante, en esta investigación se observó que la línea SI35 a pesar de ser tener el mejor comportamiento en todas las variables tanto morfológicas como con respecto al agallamiento y conteo de nematodos, presentó el menor peso radical con 4.4 g. Este comportamiento se podría atribuir quizás a que las plantas de este tratamiento, utilizaron eficientemente los recursos de nutrición de la planta y no tuvieron la necesidad fisiológica de destinar una cantidad considerable de energía en la producción de raíces sino más bien en la

producción de follaje. De acuerdo con Brouwer (1962); Boot y Mensink (1990), concluyeron que, cuando una planta recibe un suministro importante de nutrientes los cuales pueden estar totalmente disponibles para ella, la cantidad de biomasa destinada a raíces es menor; sin embargo, si recibe pocos nutrientes, hay una importante biomasa reservada para el sistema radical.

Análisis del conteo de nematodos

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0004$) en la cantidad de juveniles tanto en raíz, como en sustrato para los tratamientos inoculados con *M. exigua*. En el caso del conteo de huevos, se presentaron diferencias significativas ($P < 0.0001$) con respecto a los huevos extraídos de raíz, en cambio, para los huevos extraídos del sustrato no se presentó una diferencia significativa ($P > 0.2798$).

Las líneas SI31, SI35 y SI32, presentaron los promedios de conteo más bajos de huevos y juveniles en raíz y sustrato. Por ejemplo, en la SI31 se contabilizaron en promedio en raíz 147.7 juveniles y 697.5 huevos, mientras que en sustrato, 3.20 juveniles y 2.47 huevos. En la SI35, se observaron un total de 167.8 juveniles y 608.5 huevos en raíz y 1.07 juveniles y 2.53 huevos en sustrato. En la SI32 se determinaron en promedio 271.9 juveniles y 1 162.1 huevos en raíz, entre tanto en el sustrato se encontraron 1.27 juveniles y 2.47 huevos.

En los materiales SI31, SI35 y SI32, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre sí ($P > 0.05$); sin embargo, sí se encontraron diferencias ($P < 0.05$) con las líneas SI27 y SI34 (Cuadro 14). En el caso de la SI32 no hubo diferencias significativas con respecto al Caturra (CT) testigo; no obstante, en la SI32 se contabilizaron en raíz 54% y 33% menos juveniles y huevos respectivamente en comparación con el testigo.

La SI35 fue la que toleró mejor la inoculación de *M. exigua* y al compararla con el Caturra (CT) testigo, presentó un 72% y 65% menos de juveniles y huevos respectivamente, por lo que sí hubo una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$), entre ésta y el testigo. La línea SI31 presentó valores muy cercanos a la mejor línea (SI35) con respecto a los conteos de juveniles y huevos en raíz; por lo tanto, no se encontraron diferencias significativas entre sí, no así con el tratamiento Caturra (CT) testigo, con 75% menos juveniles y 60% menos huevos en la SI31, en donde sí se presentó diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

Las líneas SI27 y SI34 fueron las que presentaron en promedio, el mayor número de nematodos y huevos tanto en raíz como en sustrato y no presentaron diferencias entre sí (Cuadro 14). No obstante, la líneas SI27 no difirió de la Caturra (CT) testigo, pero si se observó una diferencia significativa ($P < 0.05$) con las líneas SI35, SI31 y SI32. La línea SI27 y SI34 tuvieron 58% y 143% más juveniles y 79% y 149% más huevos en promedio que la Caturra (CT) testigo.

La SI34 (tratamiento que tuvo mayor cantidad de huevos y nematodos) sí presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) en raíz para juveniles, con respecto a la Caturra (CT) al contabilizar 844 juveniles de más. Con relación al promedio del conteo de huevos en raíz, la diferencia no fue estadísticamente significativa ($P > 0.05$) con la Caturra (CT), aun así presentó 2 602 huevos de más que el testigo (CT) (Cuadro 14).

Cuadro 14. Promedio del conteo de huevos y juveniles en raíz y sustrato para cada una de las líneas San Isidro (SI) y Caturra (CT) (Testigo). San Isidro de Alajuela, 2016.

Líneas	Raíz		Sustrato	
	Juveniles	Huevos	Juveniles	Huevos
SI35	167.8 ^A	608.5 ^A	1.07 ^A	2.53
SI31	147.7 ^A	697.5 ^A	3.20 ^B	2.47
SI32	271.9 ^{AB}	1162.1 ^{AB}	1.27 ^A	2.47
SI27	934.9 ^{CD}	3112.1 ^C	3.67 ^B	4.40
SI34	1436.3 ^D	4343.2 ^C	5.27 ^B	3.47
CT	592.3 ^{BC}	1740.8 ^{BC}	2.80 ^B	2.27
Probabilidad	<0.0001	<0.0001	0.0004	0.2798
Error Estándar	0.3209	0.2757	0.2521	0.2496

Letras iguales en cada columna indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre líneas según la prueba Waller-Duncan (razón $k=100$).

Fuente: Elaboración propia

Según la categorización de Sañudo *et al.* (2003), las líneas SI35 y SI31 resultaron ser resistentes, mientras tanto, la línea SI32 se categorizó como moderadamente resistente, de acuerdo con la clasificación del ÍAR. Con relación a los conteos de nematodos, las líneas (SI35, SI31 y SI32), permitieron poca reproducción y multiplicación de *M. exigua*, ubicándose dentro de la escala de resistentes (R), con menores tasas de reproducción en comparación con el Caturra (CT) testigo, que fue susceptible, según el criterio de clasificación de Oostembrink (1966). Estos resultados concuerdan con los publicados por Cook y Evans (1987), quienes mencionan que una planta resistente (R) es aquella en la que un nematodo se reproduce en porcentajes muy bajos, mientras tanto, una planta susceptible (S) permite la reproducción relativamente alta. Estos dos términos, son el resultado del efecto que ejerce la planta sobre la capacidad

reproductiva de los nematodos fitoparásitos. Por lo tanto, dentro de la terminología propuesta por Cook y Evans (1987) y la clasificación de Oostenbrink, las líneas SI35, SI31 y SI32 son líneas resistentes (R), mientras tanto las SI27 y SI34, son líneas susceptibles (S) (Cuadro 15).

Según García (2012), el daño que se puede observar en raíz es proporcional a la cantidad de nematodos encontrados, es decir, es de esperar que un sistema radical que presente una destrucción general y gran cantidad de agallas, presenten mayores densidades poblacionales de nematodos de los géneros *Helicotylenchus* y *Meloidogyne* en estadio infectivo (J₂), este último nematodo, evaluado en este ensayo.

Entre más alto fue el porcentaje de infección de la variable ÍAR encontrado para cada material vegetal, mayor fue la severidad de afectación de agallas en los sistemas radicales y esto se correlaciona con las poblaciones de nematodos contabilizadas en raíz. En este sentido y de acuerdo con los resultados obtenidos, las líneas SI27 y SI34, más la Caturra (CT) testigo, fueron las más afectadas por los nematodos inoculados, con ÍAR generalmente mayores al 25% de afectación y en categorías de “moderadamente susceptible (MS)” y “susceptible (S)” respectivamente. En el caso de los conteos de juveniles estos fueron superiores a 500 individuos en ambas líneas (SI27 y SI34), en menos de 10 g de raíz.

Como lo indican Taylor y Sasser (1983), cuando una planta hospedera presenta una categoría de resistente a moderadamente resistente, las agallas provocadas por el ingreso de J₂ tienden a ser más reducidas que en plantas susceptibles; por consiguiente, se da la formación de una pequeña proporción de células gigantes que finalmente, determinarán la cantidad de estadios infectivos que logren su desarrollo hasta la fase adulta. Sobre este mismo tema, Sharma *et al.* (2006), concuerdan en que las líneas con capacidad de resistencia (R) y moderadamente resistentes (MR) son aún más valiosas, si tienen la posibilidad de reducir la reproducción del nematodo en forma positiva en suelo o en el sustrato donde se encuentre. De acuerdo a lo que se observó en el ensayo con las SI35, SI31 y SI32, estos tratamientos resultaron ser resistentes (R) y moderadamente resistentes (MR), por lo tanto, no hubo afinidad de las plantas de las líneas San Isidro (SI) con el nematodo *M. exigua* que se inoculó en el ensayo. Los conteos de nematodos y huevos en los sistemas radicales al final del estudio, fueron menores en estas líneas (SI35, SI31 y SI32), debido quizás al factor de menor tasa de penetración y multiplicación, aunado a su capacidad de tolerancia.

La densidad poblacional de nematodos encontrada en raíz en las líneas que mostraron susceptibilidad (SI27 y SI34), fue de 934, en 6.1 g y 1 436 en 4.9 g respectivamente. Ambas líneas fueron clasificadas de acuerdo con Oostenbrink, como moderadamente susceptible (MS) (SI27) y susceptible (S) (SI34). De acuerdo con lo que se observó en el ensayo, ambas líneas presentaron altas tasas de reproducción y un exitoso desarrollo de los nematodos inoculados. Según Taylor y Sasser (1983), aunque las plantas hospederas presenten diferentes grados de susceptibilidad ante un nematodo fitoparásito (en este caso *Meloidogyne*), se debe prestar mucha atención a aquellas líneas que tengan categorías de susceptibilidad alta y moderada. Estas líneas favorecen la penetración y reproducción del nematodo, con densidades poblacionales de huevos y juveniles elevadas.

Por otra parte, existe la posibilidad de que la planta ante la presencia de algún fitonematodo en el sistema radical, active las señales de reconocimiento del agente patógeno. De acuerdo con Sharma *et al.* (2006), entre más crece el nivel de resistencia de una planta, más aumenta el nivel de tolerancia de ésta al patógeno (en este caso a los nematodos). La relación directa que presenta una planta entre la resistencia y tolerancia, se considera equivalente al daño que causa la densidad poblacional de los nematodos en el suelo o el sustrato del cultivo. Por lo tanto, las plantas de las líneas SI35, SI31 y SI32 (resistentes según la clasificación de Oostenbrink para factor de reproducción), probablemente realizaron un reconocimiento ante la presencia de los nematodos inoculados. Caso contrario sucedió con las plantas de las líneas SI27 y SI34, las cuales no presentaron ese comportamiento de resistencia y tolerancia ante el ataque de *M. exigua* a sus sistemas radicales.

En esta investigación se calcularon las variables del ÍAR y la población final de nematodos tanto de juveniles como huevos (Cuadro 15). En el caso del ÍAR brinda un panorama general de la capacidad de tolerancia o susceptibilidad que tienen las plantas de una línea ante el ataque del nematodo agallador, como *M. exigua*. En el caso del conteo de huevos y juveniles en cada una de las plantas y sustrato, se realizó con el fin de hacer la investigación más detallada, para determinar la capacidad de reproducción de los nematodos en cada una de las líneas utilizadas en el ensayo. Ambas mediciones (ÍAR y los conteos de juveniles y huevos), son las más adecuadas en este tipo de ensayos. Según Sharma *et al.* (2006), aunque dos líneas tengan un comportamiento muy similar con respecto al ÍAR, la población de nematodos que se encuentra en cada una de éstas líneas, puede ser variable. Así mismo, el conteo de las poblaciones es una

variable más detallada y la cantidad de nematodos presentes en los sistemas radicales, está más ligada con la supresión del crecimiento tanto en las raíces como en la parte aérea de las plantas.

Factor de Reproducción (FR)

Según el análisis de Waller-Duncan, para la variable factor de reproducción, se presentaron diferencias significativas ($P < 0.0010$), entre las líneas San Isidro (SI). En el caso de las líneas San Isidro (SI) y Caturra (CT) testigo, no se presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en cuanto al Índice de Agallamiento Radical (ÍAR). Las líneas SI35, SI31 y SI32 (resistentes), difirieron significativamente ($P < 0.05$) de la SI34 (susceptible), pero sin diferir ($P > 0.05$) ni de la SI27, ni del mismo Caturra (testigo) (Cuadro 15).

Cuadro 15. Factor de reproducción del nematodo *Meloidogyne exigua*, en el tratamiento “inoculado” a las plantas de café en etapa de almácigo, San Isidro de Alajuela.

Líneas	Factor de Reproducción	Clasificación según Oostenbrink	
		Factor de Reproducción	Respuesta de los Genotipos
SI35	0.39 ^A	FR < 1	Resistentes
SI31	0.42 ^A		
SI32	0.72 ^A		
SI27	2.02 ^{AB}	FR ≥ 1	Susceptibles
SI34	2.89 ^B		
CT	1.17 ^{AB}		
Probabilidad	<.0010		

Letras iguales en cada columna indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre líneas según la prueba Waller-Duncan (razón $k=100$).

Fuente: Elaboración propia

Según este Factor de Reproducción (FR) propuesto por Oostenbrink, nuevamente las líneas que presentaron mejor comportamiento y en este caso de resistencia ante la inoculación de *M. exigua*, fueron las líneas SI35 (0.39), SI31 (0.42) y la SI32 (0.72). Estas líneas tuvieron un FR menor a 1, lo cual indica que los nematodos no tuvieron la capacidad de ingresar o reproducirse en las raíces (Cuadro 15). Mientras tanto, las líneas SI27 (2.02) y SI34 (2.89) presentaron FR superiores a 2, lo que demuestra que son líneas susceptibles a la inoculación de *M. exigua*. Finalmente el Caturra (CT) testigo, utilizado así por su susceptibilidad a nematodos, se comportó como esperaba y al final del ensayo presentó un FR de 1.17, lo que lo hace vulnerable al ataque de nematodos endoparásitos migratorios como *Meloidogyne*.

Análisis morfológicos y morfométricos para la identificación de la población de *M. exigua*.

Para la correcta identificación de la población de nematodos del género *Meloidogyne* utilizada en el ensayo, se recurrió al análisis morfológico (diseños perineales) y morfométrico. En lo que respecta a los diseños perineales, se estudiaron y analizaron al menos diez cortes perineales de hembras ovígeras. Los patrones perineales se caracterizaron por presentar en su mayoría, una forma redondeado a oval, con un arco dorsal claramente bajo, estriado y liso (Figura 11). Así mismo, fue posible observar estrías ampliamente espaciadas y gruesas. Es importante mencionar que, algunos de los diseños perineales mostraron algunas variaciones intraespecíficas que son comunes para una misma especie.

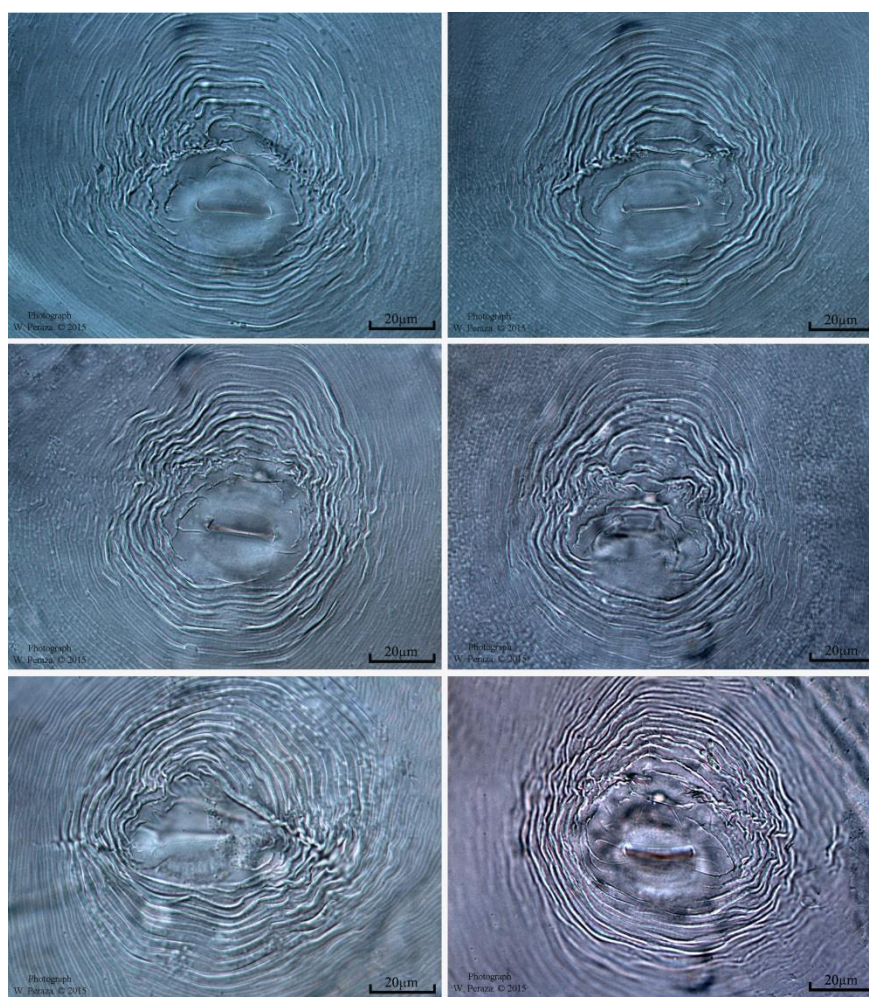


Figura 11. Diseños perineales de hembras de *M. exigua* extraídas de agallas de raíces de café. CICAFFÉ, San Pedro de Barva, Heredia. 2016.

Fuente: elaboración propia

Identificar especies de *Meloidogyne* únicamente mediante diseños perineales es complejo, debido a que hay muchas variaciones intraespecíficas (Xu *et al.* 2004). Además, los diseños perineales pueden tornarse similares entre algunas especies de éste amplio género (Brito *et al.*

2004), lo que podría inducir a error en la identificación, es por eso que es necesario el uso de más técnicas de identificación.

El análisis morfométrico de diez juveniles (J₂) junto con las descripciones y comparaciones de Lordello y Zamith 1958 y Whitehead 1968, permitieron la correcta identificación de *M. exigua* (Cuadro 16 y Figura 12). El valor promedio de la longitud del cuerpo para los diez juveniles medidos, fue de 357.4 μm , encontrándose dentro del rango de la descripción original para la especie *M. exigua* (333.5-358 μm).

En cuanto a los valores de la longitud de la cola (Lc) (44.8 μm) y la longitud del esófago (Le) (80.7 μm) descritos por Whitehead 1968 y Lordello y Zamith 1958, fueron similares a los encontrados en este estudio para la especie *M. exigua*, cola (Lc) (44 μm) y la longitud del esófago (Le) (80.3 μm) respectivamente. Por otra parte, el valor promedio de la longitud del estilete (E) de la población en estudio fue (11.9 μm) versus (9.9 μm) a partir de la figura de Lordello y Zamith 1958, lo que hace que la población utilizada de San Pedro de Barva, tenga un estilete más largo (Cuadro 16). Es importante mencionar que aunque se encuentren valores promedios diferentes, como fue el caso de la longitud del estilete (E), o la distancia desde la base del estilete hasta el poro excretor (o), todas ellas, se encuentran dentro del rango que se reporta para la especie.

Cuadro 16. Medidas morfométricas de juveniles (J₂) de una población de *M. exigua* proveniente de plantas de café de la finca del CICAFFÉ. San Pedro de Barva, Heredia, 2016.

Hospedero	Café (<i>Coffea arabica</i>)	Lordello y Zamith 1958
	San Pedro de Barva, Heredia	
	Juveniles J ₂ (μm)	
Medidas y relaciones (μm)	<i>M. exigua</i>	n=10
L	357.4±17.84 (329.5-380.4) ^a	345.7 (333.5-358)
MBW	14.4±0.82 (13.2-15.3)	14.5 (13.7-15.3)
ABW	9.2±0.62 (8.1-10.4)	8.4 (7.7-9.2)
E	11.9±0.64 (11.2-13.1)	9.9 (8.6-11.4)**
LRW	4.7±0.12 (4.5-5.0)	4.4*
DGO	3.6±0.31 (3.3-4.1)	3.2 (2.5-4.1)**
o	61.5±3.29 (56.9-66.2)	45*
Le	80.7±6.11 (73.2-91.2)	80.3 (78-82.6)
Lc	44.8±1.59 (42.4-46.8)	44 (39-50)**
Porción hialina	12.2±1.11 (10.3-13.6)	11.1*
a	24.8±1.31 (21.5-26.0)	24.1 (22.2-26)
b	4.5±0.48 (3.8-5.1)	4.3 (4.2-4.4)
c	8.0±0.47 (7.4-8.9)	7.5 (7.3-7.8)
c'	4.9±0.30 (4.5-5.3)	5.1 (4.3-6)**

^a Promedio \pm desviación estándar (rango).

n= número de especímenes medidos.

* Medidas tomadas a partir de las figuras de Lordello y Zamith 1958.

** Medidas tomadas de Whitehead 1968.

L: longitud del cuerpo. **MBW:** diámetro del ancho máximo del cuerpo. **ABW:** diámetro del cuerpo a nivel del ano. **E:** longitud del estilete. **LRW:** ancho de la región labial. **DGO:** longitud de la base de los nódulos hasta el orificio de la glándula dorsal. **o:** distancia desde la base del estilete hasta el poro excretor. **Le:** Longitud del esófago. **Lc:** Longitud de la cola. **a:** (L/MBW). **b:** (L/Le). **c:** (L/Lc). **c':** (Lc/ABW).

Fuente: Elaboración propia

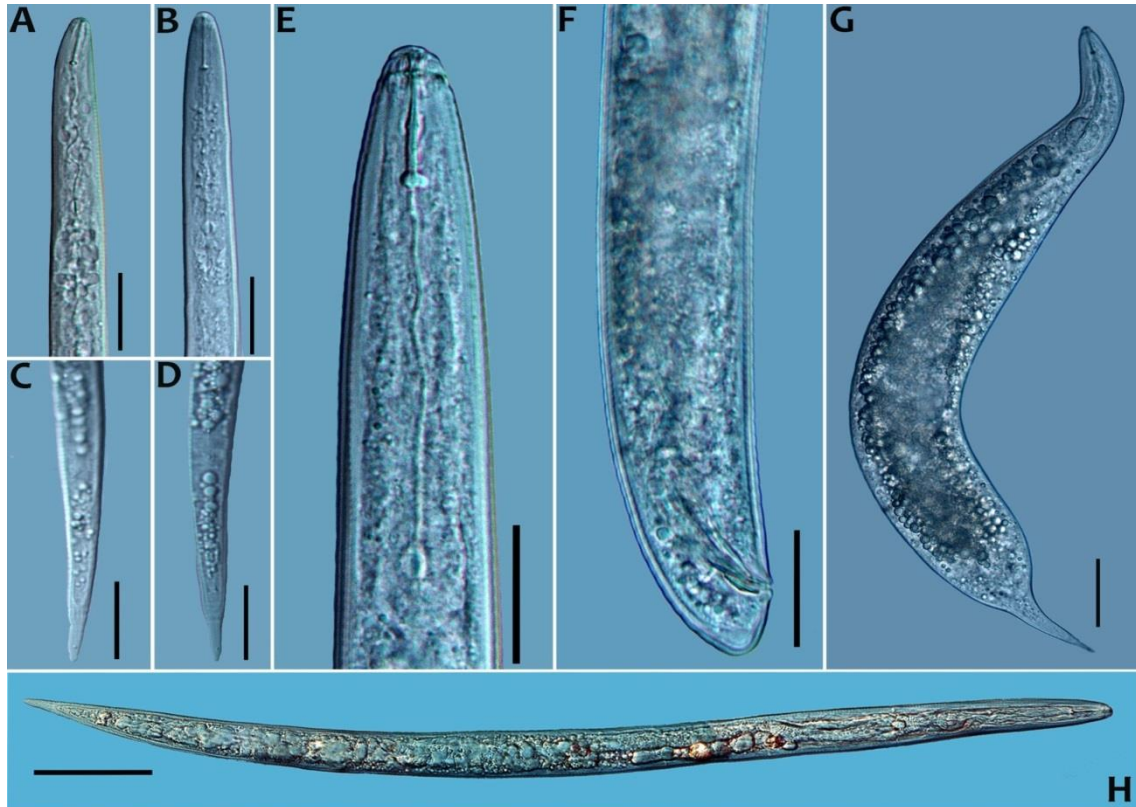


Figura 12. Fotomicrografías de la población de *M. exigua* identificada en una plantación de café. A y B. Región anterior de juveniles o J₂. C y D. Región posterior de J₂. E y F. Región anterior y posterior de un macho. G. Forma aberrante (J₃). H. Juvenil completo de *M. exigua*. San Pedro de Barva, Heredia, 2016. Escala: A-F= 20 μ m, G y H= 30 μ m.

Fuente: elaboración propia.

Con facilidad, se puede incurrir en errores al diagnosticar una especie únicamente con el uso de un criterio, además, si en ese género existen muchas especies, la equivocación tiende a aumentar. Sobre este tema, Castillo (2014) menciona que la identificación a nivel de especies es muy dificultosa debido a una serie de factores entre los cuales está, la existencia y al número de especies desconocidas, el creciente número de especies descritas, a la morfometría que es muy variable y por último, a la variación intraespecífica. Todos estos factores dificultan definir los límites interespecíficos. Así mismo, Solano *et al.* (2015), menciona que en Costa Rica, la

identificación de nematodos del género *Meloidogyne* y otros fitonematodos de importancia agrícola, se realiza usualmente a nivel de género debido a la complejidad morfológica, a la alta inversión de tiempo y al escaso equipo humano capacitado.

Identificación de *M. exigua* mediante análisis moleculares

A pesar de que la mayoría de los diseños perineales y las medidas obtenidas de la población de *M. exigua* concuerdan con las descritas en la literatura, se recurrió a realizar una descripción polifásica, es decir, una correcta identificación que incluyó no solo aspectos morfológicos y taxonómicos sino que también moleculares. Tal y como lo mencionan Esbenshade y Triantaphyllou (1990); Carneiro y Cofcewicz (2008), utilizar únicamente criterios morfológicos y la observación de diseños perineales, dificultarían identificar con exactitud especies de *Meloidogyne*. En este sentido, las técnicas bioquímicas de laboratorio para la caracterización de especies de nematodos agalladores, son una herramienta exitosa utilizada hoy en día que permite junto con otras pruebas, identificar con certeza cualquier especie de nematodo. Por lo anterior, se realizó un análisis molecular el cual incluyó la extracción del ADN, PCR, FRLP y secuenciación que se describen a continuación.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación (PCR) con los imprimadores C₂F₃ y 1108 generó productos de 500-600 pb, para todas las muestras analizadas (Figura 13), lo que concuerda con otros estudios de *M. exigua* (Powers y Harris 1993, Flores 2008, Humphreys et al. 2014).

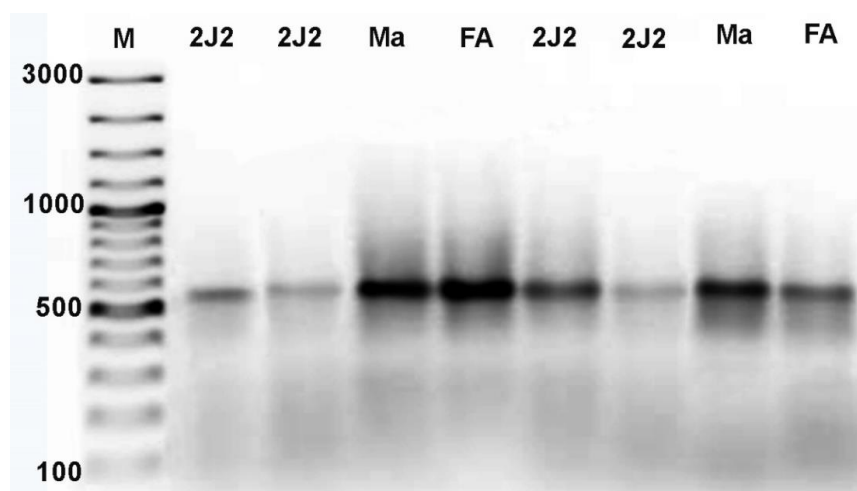


Figura 13. Resultado de electroforesis en gel de agarosa al 1%, de los productos de la amplificación (PCR) de la región mitocondrial COII/16S con los imprimadores C₂F₃/1108 (Powers y Harris 1993). M: marcador de peso molecular GeneRuler de 100 pb. Carriles dos,

tres, seis y siete: dos juveniles (2J₂) de *M. exigua*; carriles cuatro y ocho: machos (Ma); carriles cinco y nueve: formas aberrantes (FA). CICA FÉ, San Pedro Barva, Heredia, Costa Rica. 2017.
Fuente: elaboración propia

Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP)

Los análisis RFLP dieron como resultado dieron como resultado dos fragmentos, uno de 160 y otro de 420 pb aproximadamente (Figura 4). Se utilizó únicamente la enzima de restricción *DraI*, ya que es la que reconoce el sitio de corte en la secuencia de *M. exigua* obtenida (Powers *et al.* 2005).

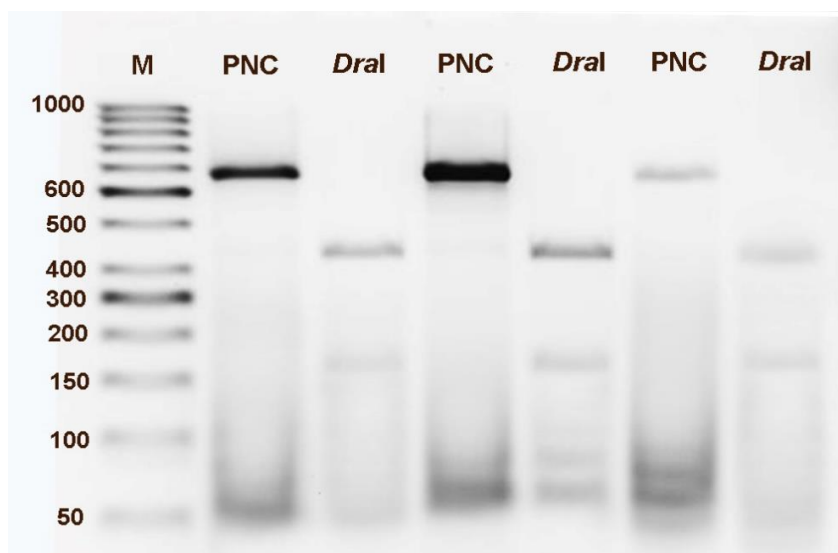


Figura 14. Resultado de electroforesis en gel de agarosa al 2%, con los patrones RFLP generados con la enzima de restricción *DraI*. M: marcador GeneRuler de peso molecular 50 pb; carriles dos, cuatro y seis: Producto de PCR sin cortar con la enzima (PNC); Carriles tres, cinco y siete fragmentos generados con la enzima *DraI*.

Fuente: elaboración propia

Secuenciación de *M. exigua*

El análisis de las secuencias de ADN de las muestras de nematodos provenientes de la plantación de café de San Pedro de Barva (CICA FÉ), Heredia, mostraron 100% similitud con la secuencia de las accesiones KF993640.1 y HQ709105.1, ambas pertenecientes a poblaciones de *M. exigua* reportadas y depositadas en el GenBank por Humphreys *et al.* (2014) en Costa Rica y Herrera *et al.* (2011) en Nicaragua respectivamente (Figura 15).

Tanto la accesión KF993640.1, HQ709105.1 y de este estudio, se compararon a su vez con la accesión JN241938.1, que corresponde a *Meloidogyne minor*, asociada a un césped de Holanda y reportada por McClure *et al.* (2012) y con la KY020413.1, que corresponde a una población

de *M. graminicola* procedente de una muestra de soya de China, reportada por Long *et al.* (2017). Se utilizaron todas estas secuencias para realizar un alineamiento múltiple de secuencias de la región entre el gen de la subunidad II de la citocromo oxidasa (COII) y el 16S del ADNmt ribosomal (Figura 4) para comparar y ver diferencias y similitudes en la secuencia.

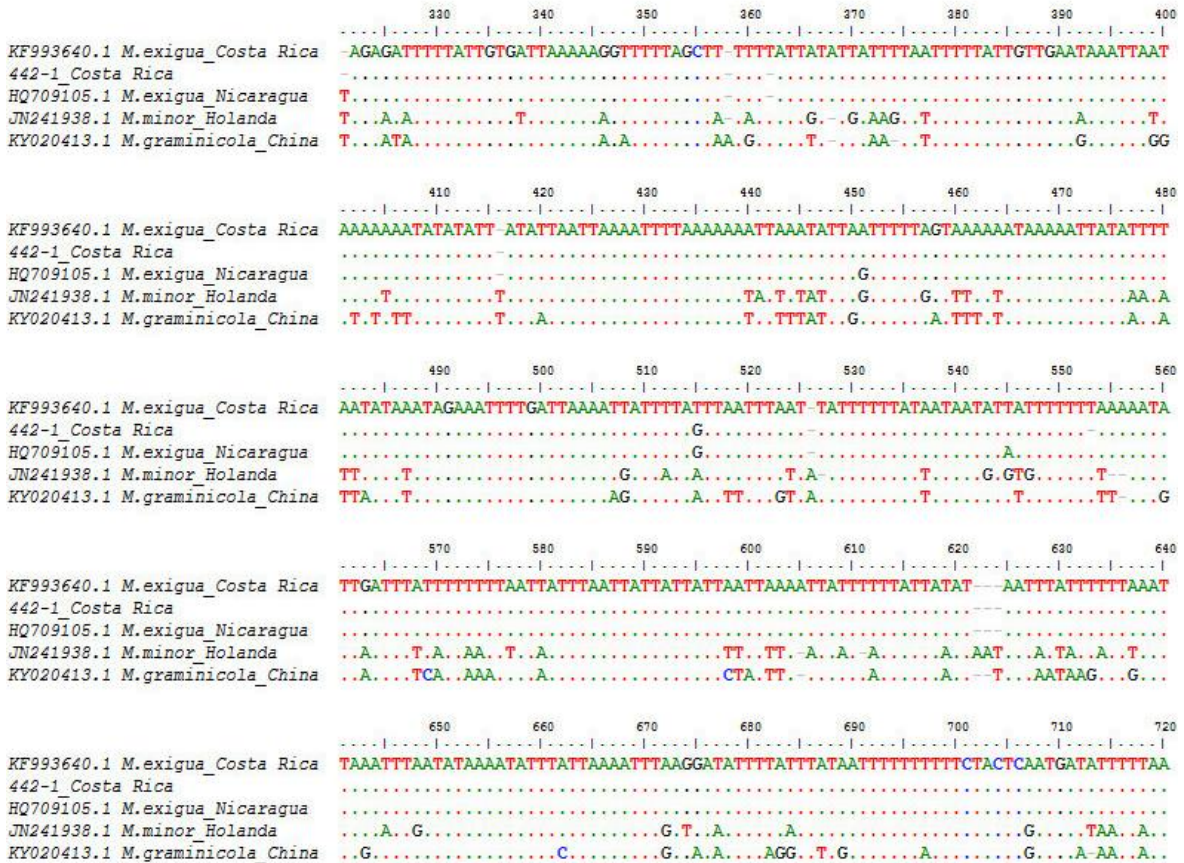


Figura 15. Alineamiento múltiple de secuencias parciales de la región entre el gen de la subunidad II de la citocromo oxidasa (COII) y el 16S del ADNmt ribosomal de varias especies de *Meloidogyne*. Sólo se muestran los nucleótidos polimórficos; (.) indica un nucleótido idéntico, (-) indica un gap o espacio en la secuencia.

Fuente: elaboración propia

Como lo indica Powers y Harris (1993), hacer el diagnóstico de PCR y posteriormente realizar los análisis de RFLP, utilizando principalmente el ADN mitocondrial con los fragmentos entre los genes COII y 16S ADNr, es una herramienta útil para la identificación de especies y en este caso lo fueron, para la identificar la especie de *M. exigua* asociada al cultivo del café, en el CICAFFÉ.

Análisis de PCR para reconfirmar la especie

Asimismo, para reconfirmar la identificación de la especie, se tomaron cinco muestras que incluían juveniles (J₂), machos (Ma) y formas aberrantes (estadios J₃ y J₄) de *Meloidogyne* y se utilizaron los imprimadores ex-D15-F y ex-D15-R que son especie-específicos. Los fragmentos generados con estos imprimadores fueron de aproximadamente 600 pb (Figura 16). De acuerdo con los resultados obtenidos y a la característica de los imprimadores, se comprobó nuevamente que la población de nematodos procedente del CICAFAÉ era *M. exigua*.

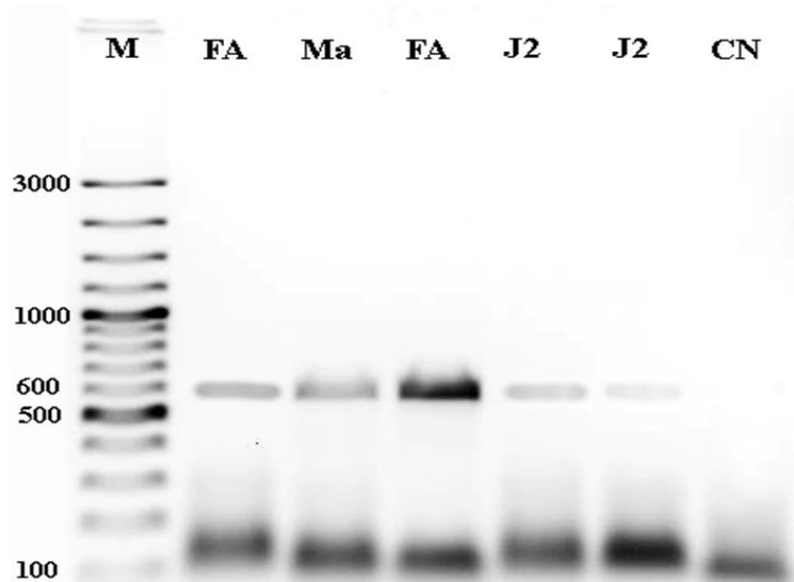


Figura 16. Resultado de electroforesis en gel de agarosa al 1%, de los productos de la amplificación (PCR) de la región mitocondrial COII/16S con los imprimadores ex-D15-F y ex-D15-R (Randig *et al.* 2002). M: marcador de peso molecular GeneRuler de 100 pb. Carriles dos y cuatro: Formas aberrantes (FA), carril tres: macho (Ma), carriles cinco y seis: dos juveniles (2J₂), carril siete: control negativo (CN) agua. CICAFAÉ, Costa Rica, 2017.

Fuente: elaboración propia.

Ambos resultados de PCR, concuerdan con estudios realizados por Randig *et al.* (2002), donde utilizaron los imprimadores tipo SCAR (ex-D15-F y ex-D15-R) y obtuvieron una banda específica para *M. exigua* de 562 pb. La ventaja de utilizar imprimadores específicos diseñados para una sola especie, es que permite la identificación de una muestra blanco sin recurrir a la secuenciación. Sin embargo, en el caso de nematodos, se recomienda la secuenciación para una correcta identificación de la especie.

Análisis físico del sustrato

Para la mezcla del sustrato del ensayo, se utilizó un suelo del orden Andisol, cuya característica es ser de derivados de cenizas volcánicas. Este suelo se recolectó de la Finca Experimental Santa Lucía en Barva, Heredia. Además, se utilizó arena gris de río, proveniente de Atenas, Alajuela. Al realizar el análisis de partículas según su tamaño, el suelo presentó una textura “franco arenoso” con contenidos de arena del 53.6%, lo cual es un contenido bastante alto de arenas en el suelo. Posteriormente, se realizó un análisis físico al sustrato (Anexo 6), cuyo resultado fue 87.4% de arenas, con lo que el sustrato utilizado se ubicó en la clase textural “arena”.

Como lo indican Buyer *et al.* (2002); Cavigelli *et al.* (2005); Windham y Barker (1986), la característica física del suelo “textura”, es muy estable, es un factor que afecta significativamente la diversidad, distribución y los niveles poblacionales de microorganismos (nematodos) en el suelo. En el caso de este ensayo, se utilizó un sustrato clasificado como arenoso, lo que favoreció las condiciones de hábitat para los fitonematodos inoculados en los tubetes. Además, facilitó la movilidad de *M. exigua* durante el momento de la inoculación así como para que posteriormente cumpliera su ciclo de vida y se reprodujera en el sistema radical de la planta. Suelos con contenidos altos de arena, crean un ambiente ideal para que los nematodos puedan movilizarse, obtener alimento e ingresar a la raíz del hospedero para posteriormente reproducirse y desarrollarse (Windham y Barker 1986; Robinson *et al.* 1987).

De acuerdo con Salazar y Guzmán (2013), suelos de tipo franco-arenoso, favorecen el desarrollo de los nematodos, encontrándose los promedios más altos de individuos tanto en suelo como en raíz en lotes que cuentan con este tipo de textura. En el caso de lotes con suelos de textura franco-arcillosas, al tener altas cantidades de arcilla reducen la porosidad y esto afecta la movilidad de los nematodos en el suelo. Vergel y colaboradores (2000), concuerdan en que la condición física del suelo (textura franco-arenosa) favorece una mayor población del género *Meloidogyne*, lo que aumenta la incidencia y severidad del daño en el cultivo del café.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- La inoculación de *M. exigua* en el ensayo realizado con plantas de café en tubetes en etapa de almácigo, afectó el crecimiento en altura de las plantas, principalmente a la línea SI34 y la Caturra CT (Testigo). En el caso del diámetro del tallo, no se mostró una afectación estadísticamente significativa para aquellas plantas inoculadas versus las plantas sin inocular. Respecto del número de hojas, se presentaron diferencias significativas en las líneas SI31, SI34 y Caturra, del tratamiento inoculado con nematodos en comparación con el sin inocular.
- De las cinco líneas San Isidro (SI) probadas en el ensayo, la SI35, SI31 y SI32 se comportaron como líneas resistentes (R) tanto para el factor de reproducción (FR) según la clasificación de Oostenbrink así como también para el índice de agallamiento radical (ÍAR). Según la clasificación propuesta por Sañudo y compañía, la SI35 se comportó como resistente (R) mientras que la SI31 y SI32 como moderadamente resistentes (MR).
- De tomar una decisión por cuál línea SI utilizar en posibles ensayos en campo, sería la SI35. Esta línea tuvo un mejor comportamiento en la mayoría de las variables evaluadas en el ensayo, tanto en las de crecimiento como en las de resistencia para el factor de reproducción (FR) y para el índice de agallamiento radical (ÍAR).
- Las líneas SI34 y SI27 se comportaron como líneas susceptibles (S) con respecto al factor de reproducción, lo cual indica con seguridad que, sus sistemas radicales se verán afectados cuando existan las condiciones adecuadas y un patógeno virulento, propiciando así el ambiente apropiado para las condiciones del triángulo de la enfermedad.
- El peso radical fresco no es un buen indicativo del comportamiento de los nematodos sobre los sistemas radicales. Se comprobó que la línea SI35 fue la mejor en la mayoría de las variables evaluadas; sin embargo, presentó el menor peso radical comparado con las demás líneas utilizadas en el ensayo.
- Mediante la integración de varias técnicas, que incluyeron criterios de identificación taxonómico, morfológico y molecular, se logró identificar correctamente la especie *M. exigua*. Este nematodo es el de mayor distribución y el que causa más problemas en el cultivo de café en Costa Rica.

- Es fundamental realizar ensayos de investigación, para evaluar materiales vegetales promisorios con capacidad de resistencia o tolerancia genética a los nematodos en sistemas de mejoramiento de cultivos. Este tipo de estudios permiten conocer con exactitud, cuáles líneas podrán posteriormente, ser llevadas a campo y observar su comportamiento.
- Las investigaciones en etapa de vivero permiten tener buenos resultados en periodos de tiempo más cortos, por lo que la inversión en recursos para la investigación es menor, tanto en dinero como en tiempos.
- Los almácigos de café se deben elaborar con suelos o sustratos desinfectados. De esta manera, se pueden obtener plantas más sanas, vigorosas, con mayor y mejor crecimiento, más área foliar y mejores sistemas radicales capaces de dar soporte y buena absorción de agua-nutrientes.
- La textura arenosa del sustrato fue la idónea para favorecer el hábitat de *M. exigua*, ya que presentó una alta cantidad de espacios porosos lo que facilitó la movilidad de los nematodos en búsqueda del alimento. Así mismo, se lograron evidenciar altas tasas de reproducción en el tratamiento Caturra CT (Testigo) y en las líneas SI27 y SI34.

LITERATURA CITADA

- Agrios, GN. 2005. Fitopatología. (2da ed.). México, Limusa. 856 p.
- Andrés, M. 2003. Nematodos parásitos de plantas en suelos agrícolas. Sanidad Vegetal. (149):33-42.
- Anthony, F; Topart, P; Astorga, C; Anzueto, F; Bertrand, B. 2003. La Resistencia Genética de *Coffea* spp. a *Meloidogyne paranaensis*: identificación y utilización para la caficultura latinoamericana. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. 67(1):5-12.
- Anzueto, F; Eskes, AB.; Sarah, JL; Decazy, B. 1991. Recherche de la resistance a *Meloidogyne* spp dans une collection de *Coffea arabica* (en línea). In: Colloque Scientifique International sur le Café Consultado: 21 de set. 2015. Disponible en <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=FR19960041637>
- Arauz, LF. 2011. FITOPATOLOGÍA: un enfoque agroecológico. 2ed. San José, Costa Rica, Editorial UCR. 519p.
- Araya, M. 1994. Sintomatología en ataques de nematodos en café. Noticiero del café, Costa Rica. 9 (87): 3-4.
- Arcila, J. 2011. Sistemas de producción de Café en Colombia: Crecimiento y desarrollo de la planta de Café. Arcilla, J; Farfan, V; Moreno, B; Salazar, L; Hincapie, G (Eds). Manizales, Colombia, Cenicafe. 295 p.
- Armendáriz, I; Quiña, D; Ríos, M; Landázuri, P. 2015. Nematodos: Fitopatógenos y sus Estrategias de Control. Ecuador, Comisión editorial de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. 90 p.
- Avelino, J; Bouvret, M; Salazar, L; Cilas, Ch. 2009. Relationships between ago-ecological factors and population densities of *Meloidogyne exigua* and *Pratylenchus coffeae* sensu lato in coffee roots, in Costa Rica. Applied Soil Ecology. 43:95-105.
- Baeza, CA. 1979. Síntomas Debidos a Nematodos de las Especies de *Meloidogyne* en Café (en línea). Avances técnicos Cencicafé: Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. No. 90. Consultado 05 oct. 2015. Disponible en http://www.cenicafe.org/es/index.php/nuestras_publicaciones/avances_tecnicos/avance_tecnico_0090

- Barbosa, DH; Viera, HD; Souza, RM; Viana, AP; Silva, CP. 2004. Field Estimates of Coffee Yield Losses and Damage Threshold by *Meloidogyne exigua*. *Nematologia Brasileira*, 28(1): 49-54.
- Barker, KR. 1985. An advanced treatise on *Meloidogyne*. International *Meloidogyne* project. North Caroline State, United States 2: 127-134.
- Barker, KR. y Olthof, TH. 1976. Relationships between nematode population densities and crop responses. *Annual Review of Phytopathology* 14: 327-353.
- Bertrand, B; Aguilar, G; Bompard, E; Rafinon, A; Anthony, F; 1997. Comportement agronomique et resistance aux principaux depredateurs des lignes de Sarchimor et Catimor ua Costa Rica. *Plantations Reserch Developpement* 4:312-321.
- Bettencourt, AJ y Fazuoli, LC. 2008. Melhoramento Genético de Coffea arabica L.: Transferencia de Genes de Resistencia a *Hemileia vastatrix* do Híbrido de Timor para a cultivar Villa Sarchí de Coffea arabica (en línea). Documentos IAC, Campinas, Brasil. n° 84. 20 p. Consultado 19 de jul. 2017. Disponible en http://www.iac.sp.gov.br/publicacoes/publicacoes_online/pdf/doc84.pdf
- Boot, GA. y Mensink. M. 1990. Size of Morphology of root systems of perennial grasses from contrasting habitats as affected by Nitrogen supply. *Plant and Soil* 129(2): 291-299.
- Brito, J; Powers, T; Mullin, P; Inserra, R; Dickson, D. 2004. Morphological and molecular characterization of *Meloidogyne mayaguensis* isolates from Florida. *Journal of Nematology* 36 (3):232-240.
- Brouwer R. 1962. Nutritive Influences on the distribution of dry matter on the plant. *Journal Agriculture Sciencie*. 10(5): 399-408.
- Buyer, JS; Roberts, DP; Russek-Cohen, E. 2002. Soil and plant effects on microbial community structure. *Canadian Journal of Microbiology* 48(11): 955-964.
- Café de Colombia. 2010. El árbol y el entorno (en línea). Colombia. Consultado 17 de sep. 2015. Disponible en http://www.cafedecolombia.com/particulares/es/sobre_el_cafe/el_cafe/el_arbol_y_el_entorno

- Café de Costa Rica. 2011. Dimensión Económica y Social (en línea). Heredia, Costa Rica. Consultado 24 de sep. 2015. Disponible en http://www.cafedecostarica.com/esp/ModeloSostenible_Economico.html
- Caillaud, MC; Dubreuil, G; Quentin, M; Perfus-Barbeoch, L; Lecomte, P; de Almeida Engler, J; Abd, P; Rosso, MN; Favery, B. 2008. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *Journal of Plant Physiology* 165(1): 104-113.
- Calderón, G. 2013. Nematodos y los síntomas en Café: Recomendaciones sobre la técnica de muestreo en el cultivo del café para una estrategia de control enfocada en el manejo integrado (en línea). Guatemala, CedCICAFÉ-Anacafé. *Revista el Cafetal*. Consultado 21 de nov. 2015. Disponible en https://www.anacafe.org/glifos/index.php?title=Caficultura_ControlNematodos
- Calderón, K. 24 de oct. 2017. Información sobre la precipitación de la Estación climática Tegucigalpa, Itiquis (correo electrónico). San José, Costa Rica, IMN.
- Camacho, RV. 1991. Reacción de tres selecciones de batata a diferentes niveles poblacionales del nematodo *Meloidogyne incognita*. Tesis de grado. Maracay, Ecuador, Universidad Central de Ecuador. 46 p.
- Campos, VP; Villain, L. 2005. Nematode parasites of *Coffee* and *Cocoa*. Luc, M; Sikora, RA; Bridge, J (Eds.) *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Wallingford UK. CAB International. 529-579 pp.
- Canet, G; García, A. (Eds.) 2010. PROMECAFE: 30 años de experiencia. PROMECAFE/IICA. Guatemala. 88 p.
- Cárdenas, IS. 2007. Caracterización morfológica y agronómica de la colección núcleo de café, (*Coffea arabica* L.) del CATIE. (Magister Scientiae). Turrialba, Costa Rica, CATIE. 103 p.
- Carneiro, RM y Cofcewicz, ET. 2008. The taxonomy of Coffee –Parasitic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. In Souza, RM (Ed.) *Plant–Parasitic Nematodes of coffee*. Dordrecht, Springer. 87-122 p.
- Castillo, JH. 2014. Identificación de Especies del Género *Meloidogyne* spp. Presentes en el Municipio de Patzicía, Chimaltenango. Tesis de grado. Guatemala de la Asunción, Guatemala. Universidad Rafael Landívar. 73 p.

- Cavigelli, MA; Lengnick, LL; Buyer, JS; Fravel, D; Handoo, Z; McCarty, G; Millner, P; Sikora, L; Wright, S; Vinyard, B; Rabenhorts, M. 2005. Landscape level variation on soil resources and microbial properties in a no-till corn field. *Applied Soil Ecology* 29(2): 99-123.
- CEDRSSA (Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria, México). 2014. Producción y Mercado de Café en el Mundo y en México (en línea). México. 18 p. Consultado 02 de jun. 2017. Disponible en <http://www.cedrssa.gob.mx>
- Cepeda-Siller M. (Ed.). 1996. Nematología agrícola. México D.F, TRILLAS, 290 p.
- Coffee IQ. 2017. Infografía: Mayores consumidores de Café en el mundo (Per Cápita). Consultado 07 de jun. 2017. Disponible en <http://www.coffeeiq.co/inforgrafia-mayores-consumidores-de-cafe-en-el-mundo-per-capita/>
- Cook, R. y Evans, K. 1987. Resistance and Tolerance. *In*: Brown, RH; y Kerry, BR. (Eds.). Principles and Practices of Nematode Control in Crops. Marrickville, Australia, Academic Press. 179-231 p.
- Coyne, DL; Nicol, JM; Claudius-Cole, B. 2014. Practical plant nematology: a field and laboratory guide. (2ed). Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Cotonou, Benin. 82 p.
- Cros, J; Combes, MC; Trouslot, P; Anthony, F; Hamon, S; Charrier, A; Lashermes, P. 1998. Phylogenetic Analysis of Chloroplast DNA Variation in *Coffea* L. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 9 (1):109-117.
- Crozzoli, R. 2014. La Nematología Agrícola en Venezuela. Maracay, Venezuela, Ediciones de la Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. 447p.
- Cruz, L. 2013. Identificación del Nematodo Agallador de la Raíz del Cafeto en la Región Centro de Veracruz. Tesis Licenciatura. Veracruz, México, Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Agrícolas. 49 p.
- DaMatta, F y Rodríguez, N. 2007. Producción sostenible de cafetales en sistemas agroforestales del Neotrópico: una visión agronómica y ecofisiológica. *Agronomía Colombiana* 25(1):113-123.

- Davis, RF y May, OL. 2003. Relationships Between Tolerance and Resistance to *Meloidogyne incognita* in Cotton. *Journal of Nematology* 35(4): 411-416.
- Di Vito, M; Crozzoli, R; Vovlas N. 2000. Pathogenecity of *Meloidogyne exigua* ao Coffee (*Coffea arabica* L.) in post. *Nematropica* 30(1):55-61.
- Durán, J. 2012. Diagnóstico, dinámica poblacional, caracterización bioquímica y molecular de nematodos noduladores (*Meloidogyne* spp.) en cultivos tropicales de Costa Rica. San Carlos, Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica Vicerrectoría de Investigación y Extensión. 38 p.
- Elling, AA. 2013. Major Emerging Problems with Minor *Meloidogyne* Species. (en línea). *Phytopathology* 103(11):1092-1102. Consultado 07 oct. 2015. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PHYTO-01-13-0019-RVW>
- Esbenshade, PR y Triantaphyllou, AC. 1990. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 22(1):10- 15.
- Espárrago, G y Novas, A. 1997. Nematodos Fitoparásitos. (en línea). Madrid, España, 5 p. Consultado 20 ago. 2015. Disponible en http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Agri%2FAgri_1997_774_71_75.pdf
- Esser, RP; Perry, VG; Taylor, AL. 1976. A diagnostic compendium of the genus *Meloidogyne* (Nematoda: Heteroderidae). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 43(2):138-150
- European Coffee Federation (ECF). 2016. Coffee Market Overview February 2016 (en línea). Brussels, Bélgica. 5 p. Consultado 07 abr. 2017. Disponible en <https://www.ecf-coffee.org/publications/european-coffee-report>
- Fátima, MS; Moreira, E; Huising, EJ; Bignell, DE. (eds.). 2012. Manual de Biología de Suelos Tropicales: Muestreo y caracterización de la biodiversidad bajo suelo. Instituto Nacional de Ecología, México. 337 p.
- Ferreira, I y Crozzoli, R. 1995. Efectos del nematodo agallador *Meloidogyne exigua* sobre el crecimiento de plantas de café en vivero. *Nematología Mediterránea*. 23:325-328.

- Figuroa, P y García, J. 2010. Fluctuación de poblaciones de nematodos en el cultivo del café (en línea, sitio web). Consultado 03 de sep. 2015. Disponible en https://www.anacafe.org/glifos/index.php?title=Fluctuacion_de_nematodos_cultivo
- Fontana, L; Adelaiye, RM; Rastelli, AL; Miles, KM; Ciamporcerro, E; Longo, VD; Nguyen, H; Vessella, R; Pili R. 2013. Dietary protein restriction inhibits tumor growth in human xenograft models. *Oncotarget* 4:2451–2461.
- Galán, E. y Ramírez, J. 2011. Evaluación de los extractos de hojas de *Azadirachta indica* (NIM) para el control de *Meloidogyne* sp. (Nematodos Fitoparásitos) de *Coffea arabica* (Café). Tesis Licenciatura. San Salvador, El Salvador, Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia. 110 p.
- García, J. 2012. Densidad y diversidad de nematodos en sistemas agroforestales de café en asocio con bananos y sombra de leguminosas en Jinoteca, Nicaragua. Tesis de Maestría. Turrialba, Costa Rica, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). 76 p.
- Gelpud, C; Mora, E; Salazar, C. 2011. Susceptibilidad de genotipos de *Solanum* spp. al nematodo causante del nudo radical *Meloidogyne* spp. (chitwood). *Acta Agronómica* 60(1): 1-14.
- Google Earth, 2016. Mapa de Costa Rica (en línea). Esc. United States. Consultado 08 de Dic. 2016. Disponible en <https://www.google.com/earth/>
- Guzmán, OA; Castaño, J; Villegas, B. 2012. Principales Nematodos Fitoparásitos y Síntomas Ocasionados en Cultivos de Importancia Económica. *Agronomía* 20 (1):38-50.
- Hall, T. 1999. Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT/2000/XP. *Nucleic Acids Research*. No 41:95-98 Consultado 03 set. 2017. Disponible en <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
- Hartman, K y Sasser, J. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal patterns morphology. Barker, KR; Carter, CC; Sasser, JN (eds.). *An advanced treatise on Meloidogyne*. Vol. 1. Biology and control. Raleigh, USA, Department of Plant Pathology, North Carolina State University Graphics. 69-77 p.

- Henríquez, C. y Cabalceta, G. 2012. Guía práctica para el estudio introductorio de los suelos con un enfoque agrícola. 2da ed. Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo, San José, Costa Rica. UCR/CIA-ACCS. 60 p.
- Humphreys, D; Flores, L; Gómez, M; Salazar, L; Gómez, L; Elling, A. 2014. *Meloidogyne lopezi* n. sp. (Nematoda Meloidogynidae) a new root-knot nematode associated with coffee (*Coffea arabica* L.) in Costa Rica, its diagnosis and phylogenetic relationship with other coffee-parasitising *Meloidogyne* species. *Nematology* 16:643-661.
- Hussey, R.S y Williamson V.M. (1998). Physiological and Molecular Aspects of Nematode Parasitism. In Barker K., Pederson G. y Windham G. (Eds.), *Plant and Nematode Interactions*. Estados Unidos de América, Agronomy Monograph, 87-108 p.
- ICAFE (Instituto del Café de Costa Rica). 2015. ICAFE: Estructura del Sector (en línea, sitio web). Consultado 24 de sep. 2015. Disponible en <http://www.icafe.cr/nuestro-cafe/estructura-del-sector/>
- ICAFE (Instituto del Café de Costa Rica). s.f. ICAFE: Historia del café en Costa Rica (en línea, sitio web). Consultado 21 de ago. 2015. Disponible en http://www.icafe.go.cr/nuestro_cafe/historia.html
- ICAFE (Instituto del Café de Costa Rica). 2012. Informe Sobre la Actividad Cafetalera de Costa Rica. San José, Costa Rica, ICAFE. 99 p. N.º XLI.
- ICO (International Coffee Organization, Inglaterra). 2015. ICO: Historical Data on the Global Coffee Trade (en línea). Londres, Inglaterra. Consultado 21 de ago. 2015. Disponible en http://www.ico.org/new_historical.asp
- ICO (International Coffee Organization, Inglaterra). 2017. ICO: Trade Statistics Tables (en línea). Londres, Inglaterra. Consultado 15 jun. 2017. Disponible en http://www.ico.org/trade_statistics.asp
- ICO (International Coffee Organization, Inglaterra). s.f. ICO: Aspectos Botánicos (en línea, sitio web). Consultado 17 de sep. 2015. Disponible en http://www.ico.org/es/botanical_c.asp
- INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censo). 2015. VI Censo Nacional Agropecuario: Características de las Fincas y de las Personas Productoras. 1 ed. San José, Costa Rica. 178 p.

- Jaehn, A. 1990. Informe: Asesoría Sobre Nematodos de Café en el Área de Centroamérica. Turrialba, Costa Rica, IICA-PROMECAFE. 23 p.
- Jenkins, WR. 1964. A rapid centrifugation-flotation technique for separating nematodes from soil. *In* This Week's Citation Classic (XLI, 1980, New Brunswick, Estados Unidos de América) New Jersey, Estados Unidos de América, Plant Disease Report. 48:692.
- Jeyaprakash, A; Tigano, M; Brito, J; Carneiro, R; Dickson. D. 2006. Differentiation of *Meloidogyne floridensis* from *M. arenaria* using high-fidelity PCR amplified mitochondrial AT-rich sequences. *Nematropica* 36:1-12.
- Kirkpatrick, TL; Oosterhuis, DM; Wullschleger, SD 1991. Interaction of *Meloidogyne incognita* and Water Stress in Two Cotton Cultivars. *Journal of Nematology* 23: 462-467.
- Leguizamón J. 1997. Efecto de *Meloidogyne* spp. en plantaciones establecidas de café variedad Caturra. *In*: Informe anual de actividades 1996-1997: Disciplina de Fitopatología. Chinchiná, Colombia, Centro Nacional de Investigaciones de Café, (CENCICAFÉ).
- Leguizamón J. s.f. Los Nematodos del Cafeto en Colombia y su Control. Colombia, Centro Nacional de Investigaciones de Café, CENCICAFÉ. 8 p. Consultado 15 de jun. 2017. Disponible en <http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/713/13/13%20Nematodos%20cafeto%20y%20control.pdf>
- Leon, J. 2000. Botánica de los cultivos tropicales. 3 ed. San José, Costa Rica, IICA. 552 p.
- Lima, I. (Ed). 2018. Nematodos Parásitos de Plantas. Puno, Perú, G y S IMPRESORES Jr. Huancané. 576 p.
- Long, HB; Sun, YF; Feng,TZ; Pei,YL; Peng,DL. 2017. First Report of *Meloidogyne graminicola* on Soybean (*Glycine max*) in China. *Plant Disease* 101(8):1554.
- López, R y Dickson, D. 1977. Morfometría y respuesta de hospedantes diferenciales a tres poblaciones de *Meloidogyne incognita* y una de *Meloidogyne javanica*. *Agronomía Costarricense* 1(2):119-127.
- Lordello, LG. y Zamith, AP. 1958. On the Morphology of the Coffee Root-Knot Nematode, *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1887. *Helminthological Society* 25(2): 133-137.

- Luc, M; Sikora, RA; Bridge, J (eds.). 1990. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Wallingford, Inglaterra, CAB International. 629 p.
- MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería, Costa Rica). 2007. Plan Estratégico de la Agrocadena Productiva de Café (en línea). San José, Costa Rica, MAG. 103 p. Consultado 03 oct. 2015. Disponible en www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00041.pdf
- McClure, MA; Nischwitz, C; Skantar, AM; Schmitt, ME; Subbotin, SA. 2012. Root-Knot Nematodes in Golf Course Greens of the Western United States. *Plant Disease* 96 (5): 635-647
- Monroig, M. 2015. Situación Mundial del Café (en línea). s.l. s.e. 35 p. Consultado 04 abr. 2017. Disponible en http://academic.uprm.edu/mmonroig/HTMLobj1673/Situaci_n_Mundial_del_Caf__2015.pdf
- Montes-Belmont, R. 2000. Nematología vegetal en México, Investigación documental. Segunda edición. México: Sociedad Mexicana de Fitopatología. 98 p.
- Mora, N. 2008. Agrocadena de Café. San José, Costa Rica, Ministerio de Agricultura y Ganadería. 49 p.
- Morera, N y Flores, R. 1987. Especies de Café y Cruces con Resistencia al Ataque del Nematodo de Agallas. *Noticiero del Café*, Instituto del Café (ICAFE). San José, Costa Rica; 19 mar.:2-3 p.
- NEMAPLEX. 2015. *Meloidogyne exigua* (en línea). California, Estados Unidos de América, Universidad de California, Davis. Consultado 21 abr. 2016. Disponible en <http://nemaplex.ucdavis.edu/Taxadata/G076s6.aspx>
- Niño, N; Arbeláez, G; Navarro, R. 2008. Efecto de diferentes densidades poblacionales de *Meloidogyne hapla* sobre uchuva (*Physalis peruviana* L.) in greenhouse. *Agronomía Colombiana* 26(1): 58-67.
- Oficina del café. 1979. Historia del origen y fecha de siembra primeros cafetos en el país. San José, Costa Rica, Oficina del café. 18 p. Consultado 31 de ago. 2015. Disponible en <http://www.icafe.cr/nuestro-cafe/historia/>

- Onzima, JR; Coulibaly, N; Montagnon, C. 2002. The role of the African Coffee Research Network in developing sustainable coffee production and quality (en línea). Montpellier Cedex, Francia, CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement), ed. Recherche et caféiculture. 75-83 p. Consultado 05 abr. 2017. Disponible en www.cirad.fr/en/content/download/3722/29687/.../art-reca.pdf
- Oostenbrink, M. 1966. Major Characteristics of the relation between nematodes and plants. *Mendelingen Landbouwhogeschool Wageningen* 66(4):1-46.
- Papp, CS. 1999. The root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) (en línea). California, Estados Unidos de América, Universidad de California, Davis. Consultado 21 abr. 2016. Disponible en <http://nemaplex.ucdavis.edu/Taxadata/G076s6.aspx>
- Peraza, W; Orozco, M; Esquivel, A. 2014. Evaluación in vitro de hongos nematófagos en zonas arroceras de Costa Rica contra el nematodo agallador *Meloidogyne javanica*. *Agronomía Costarricense* 38(2):19-32.
- Peraza, W y Orozco, M. 2018. Evaluación de arvenses como hospedantes alternos de nematodos fitoparásitos en cafetales de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana* 29(1): 1-14.
- Perry, RN; Moens, M; Starr, JL. (eds). 2009. Root-knot nematodes. Wallingford, Inglaterra, CABI Publishing. 487 p.
- Powers, T y Harris, T. 1993. A polymerase chain reaction method of identification five major *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 25(1):1-6.
- Powers, T; Mullin, P; Harris, T; Sutton, L; Higgins, R. 2005. Incorporating molecular identification of *Meloidogyne* spp. into a large-scale regional nematode survey. *Journal of Nematology* 37(2): 226-235.
- Quijano, JM. 2007. Variedad Cuscatleco. Santa Tecla, El Salvador, PROCAFE. 5 p. Consultado 15 Oct. 2015. Disponible en www.gensa.com.sv/pdf/Cafe_Cuscatleco.pdf
- Ramírez, J. Características de los Principales Grupos de Variedades de Porte Bajo con Resistencia a la Roya del Cafeto (en línea). Comunicaciones técnicas de Café. Número 74. Consultado 05 de may. 2017. Disponible en <http://www.ramirezcaficulturadesdecostarica.com/ct-74>

- Randig, O; Bongiovanni, M; Carneiro, R; Castagnone-Sereno, P. 2002. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR marker specific for the coffee damaging species. *Genome* 45:862-870.
- Robinson, AF; Heald, CM; Flanagan, SL; Thames, WH; Amador, J. 1987. Geographical distributions of *Rotylenchulus reniformis*, *Meloidogyne incognita* and *Tylenchulus semipenestrans* in the lower Rio Grande Valley as Related to Soil Texture and Land Use. *The Journal of Nematology* 1: 20-25.
- Rodríguez Da Silva, L. 2011. Efeito Do Extracto de Capeba *Pothomorphe umbellata* (L.) MIQ. Na Mobilidade de Juvenis de Segundo Estádio de *Meloidogyne exigua*. Tesis Grado. Muzambinho, Brasil, Instituto Federal De Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Muzambinho. 37 p.
- Rodríguez, CM. 21 Jul. 2017. Información sobre selección de las líneas San Isidro a partir del Sarchimor T5296. (Correo electrónico). Alajuela, Costa Rica. Starbucks.
- Rojas, M. 2010. Nemátodos del café (en línea) Revista Informativa I. ICAFE. 8-11 p. Consultado 07 de ago. 2015. Disponible en http://www.icafe.cr/wp-content/uploads/revista_informativa/Revista-I-Sem-10.pdf
- Rojas, M y Salazar, L. 2013. Densidad crítica de *Meloidogyne exigua* en plantas de almácigo de café variedad Caturra. *Agronomía Costarricense*. 37(2):115-123.
- Román, J y Acosta, N. 1984. Nematodos Diagnóstico y Combate. Mayagüez, Puerto Rico, Universidad de Puerto Rico, Servicio de Extensión Agrícola. 29 p.
- Salazar, W y Guzmán, T. 2013. Nematodos Fitoparásitos Asociados al Tomate en la Zona Occidental de Nicaragua. *Agronomía Mesoamericana* 24(1):27-36.
- Salgado, M; Oliveira, L; Silva, R; Campos, V. 2008. Aspectos importantes dos fitonematóides do cafeeiro. *Informe Agropecuária* 29(247):42-50.
- Salgado, S y Rezende, JC. 2010. Manejo de Fitonematóides em Cafeeiro. In Reis, PR; Cunha, RL. (eds.). *Café Arábica: do plantio a colheita*. Minas Gerais, Brasil, Lavras: Empresa de Pesquisa Agropecuaria de Minas Gerais (EPAMIG SM). 757-804 p.
- Sandoval, AM y Lomas, LJ. 2007. Incidencia, Severidad, Rango de Hospederos y Especie de Nematodo del Rosario de la Raíz (*Nacobus* sp.) en el Cultivo de Tomate de Mesa

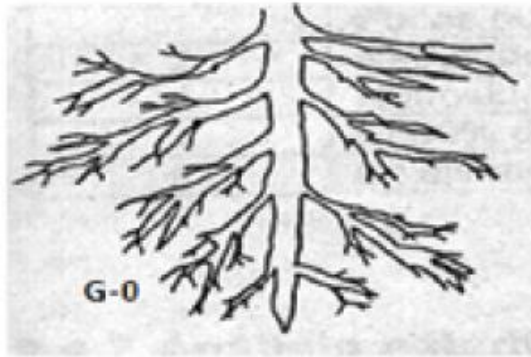
- (*Lycopersicon esculentum*) en el Valle del Chota y Pimampiro. Tesis Bachiller. Ibarra, Ecuador, Universidad Técnica del Norte, Escuela de Ingeniería Agropecuaria. 124 p.
- Sañudo, B. y Betancourth, C. 2005. Fundamentos de Fitomejoramiento. Pasto, Colombia, Editorial Universitaria, Universidad de Nariño. 150 p.
- Sañudo, B; Betancourth, C; y Salazar, C. 2003. Principios de Nematología Agrícola. Pasto, Colombia, Editorial Universitaria, Universidad de Nariño. 65 p.
- SAS (SAS Institute Inc, Estados Unidos de América) 2014. User's Guide. Cary, Carolina del Norte, Estados Unidos de América. Versión, 9,4.
- El-sherif, G.; Efaei, R.; Nagar, E.; Salem, M. 2007. The role of eggs inoculum level of *Meloidogyne* sp., on their reproduction and host reaction. African Journal of Agricultural Research 2(4):159-163.
- Sharma, A.; Haseeb, A.; Abuzar, S. 2006. Screening of field pea (*Pisum sativum*) selections for their reactions to root knot nematode (*Meloidogyne incognita*). Journal of Zhejiang University SCIENCE B 7(3): 209-214.
- Siddiqi, MR. 2000. TYLENCHIDA: Parasites of Plants and Insects (2nd ed.). Oxon, Inglaterra, CABI Publishing. 833 p.
- Herrera, L; Bryngelsson, T; Monzón, A; Geleta, M. 2011. Identification of root-knot based on perineal pattern, SCAR markers and nuclear ribosomal DNA sequences. Nematología Mediterránea 39(2): 101-110.
- Solano, F; Beacham, J; Thomas, S; Steinberger, Y; Hanson, S. 2013. Assessment of soil nematode biodiversity in preserved soil samples. nematodes. In Congreso de la Sociedad Americana de Fitopatólogos. (2013APS Annual, Austin, Texas). Austin, Texas. The American Phytopathological Society, APS●MSA Joint Meeting.
- 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.
- Souza, RM. (ed). 2008. Plant-Parasitic Nematodes of Coffee. Brazil, Springer. 340 p.

- Talavera. RM. 2003. Manual De Nematología Agrícola: Introducción al análisis y al control nematológico para agricultores y técnicos de agrupaciones de defensa vegetal. Brasil, Instituto de formación agraria y pesquera. 23 p. Consultado 03 de jul. 2017. Disponible en: <http://www.caib.es/sites/M65/publicacions-722/archivopub.do?ctrl=CNTSP722ZI4569&id=4569>
- Taylor, A y Sasser, J. 1983. Biología, identificación y control de los nematodos del nudo de la raíz: (Especies de *Meloidogyne*). Raleigh, North Carolina, Estados Unidos de América, North Carolina State University Graphics. 111 p.
- Verdejo-Lucas, S. 2009. Especies del género *Meloidogyne*, Manejo Integrado de nematodos. In Conclusiones de un Seminario de Dupont en Almería, (2009, Almería, España). Almería, España, Horticultura, Sanidad Vegetal 213:10-12 p.
- Vergel, D; Leguizamón, J; Cortina, H; Torres, H. 2000. Reconocimiento y Frecuencia de *Meloidogyne* spp. en una localidad de la zona cafetalera central de Colombia. CENICAFÉ, 51(4): 285-295.
- Villain, L. 2008. Economic importance, epidemiology and management of *Pratylenchus* sp. in coffee plantations. In Souza RM. (ed.). Plant-parasitic nematodes of coffee. Berlín, Alemania, Springer. 65-84 p.
- Windham, GL y Barker, KR. 1986. Effects of soil type on the damage potential of *Meloidogyne incognita* on soybean. Journal of Nematology 18(3): 331-338.
- Whitehead, A. 1968. Taxonomy of *Meloidogyne* (Nematodea: Heteroderidae) with descriptions of four new species. The Transactions of the Zoological Society of London 31(3):263-401
- World Coffee Research (WCR). 2016. Las Variedades de Café de Mesoamérica y El Caribe (en línea). 40p. Consultado 25 de ago. 2016. Disponible en https://worldcoffeeresearch.org/documents/26/Variedades_de_Cafe_de_Mesoamerica_y_el_Caribe_20160609.pdf.
- Xu, J; Lui, P; Meng, Q; Long, H. 2004. Characterization of *Meloidogyne* species from China using isoenzyme, phenotypes and amplified mitochondrial DNA restriction fragments length polymorphism. European Journal of Plant Pathology 110:309-315.

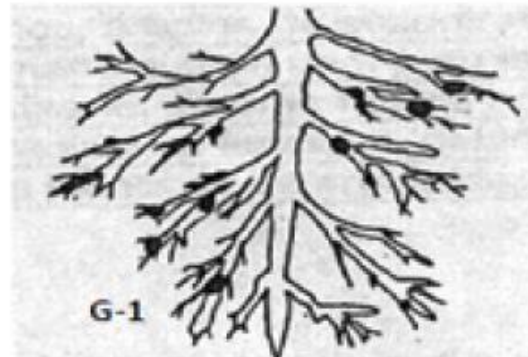
Zamora, T; Peraza, W; Molina, R; Esquivel, A. 2015. Identificación Morfológica, morfométrica y molecular de cuatro especies de *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae) de Costa Rica. (Tesis de Licenciatura). Heredia, Costa Rica, Universidad Nacional de Costa Rica. 99 p.

ANEXOS

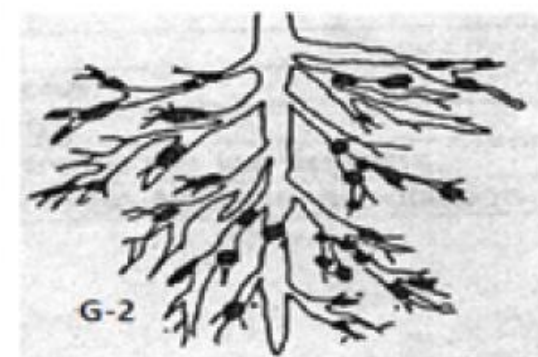
Anexo 1. Diagrama de la infección radical causada por *Meloidogyne* spp.



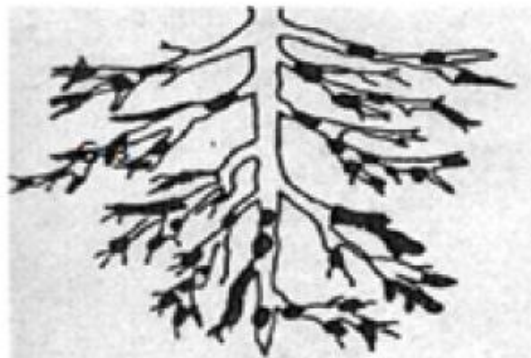
0%



1-10%



11-25%



26-50%



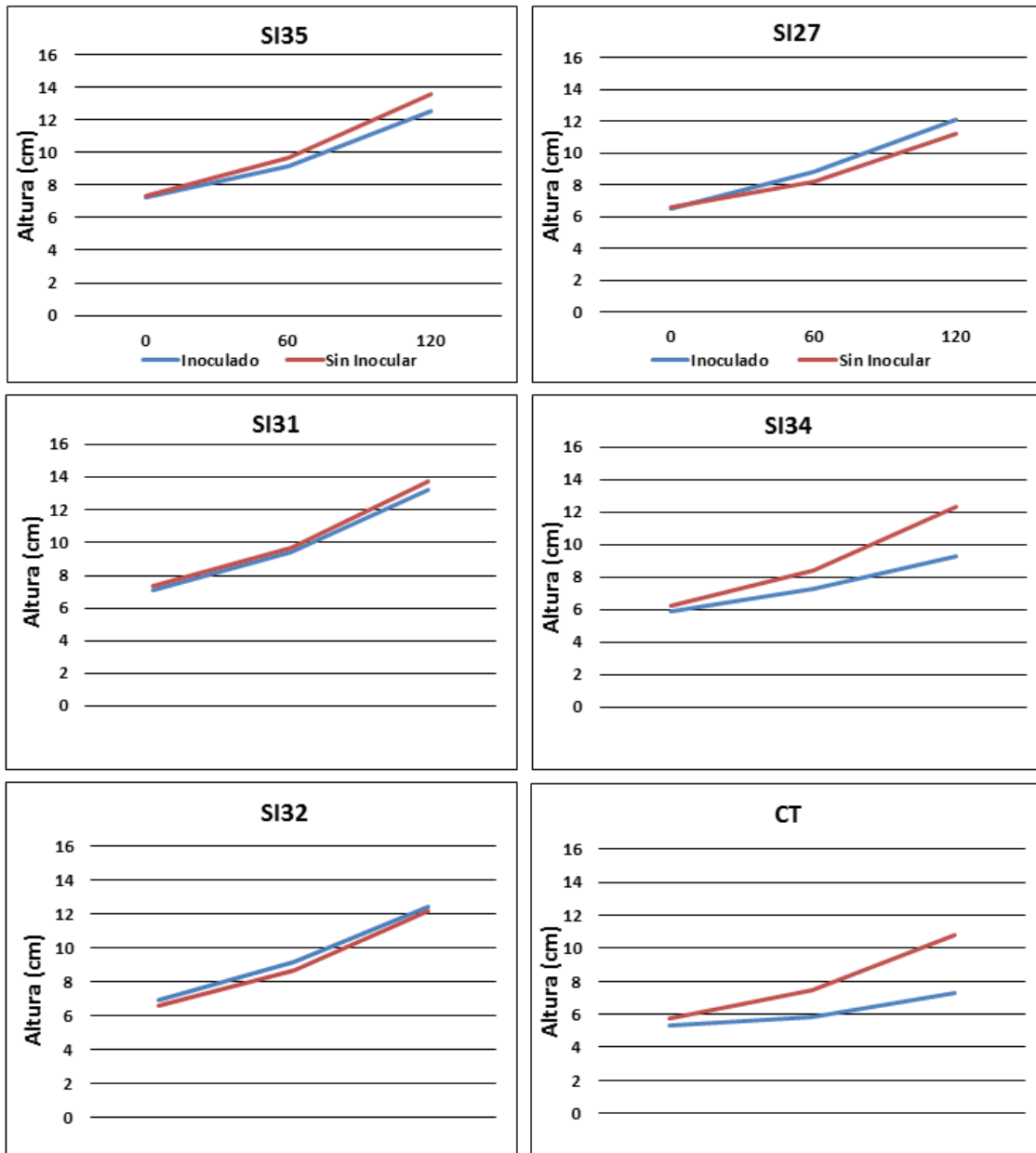
51-75%



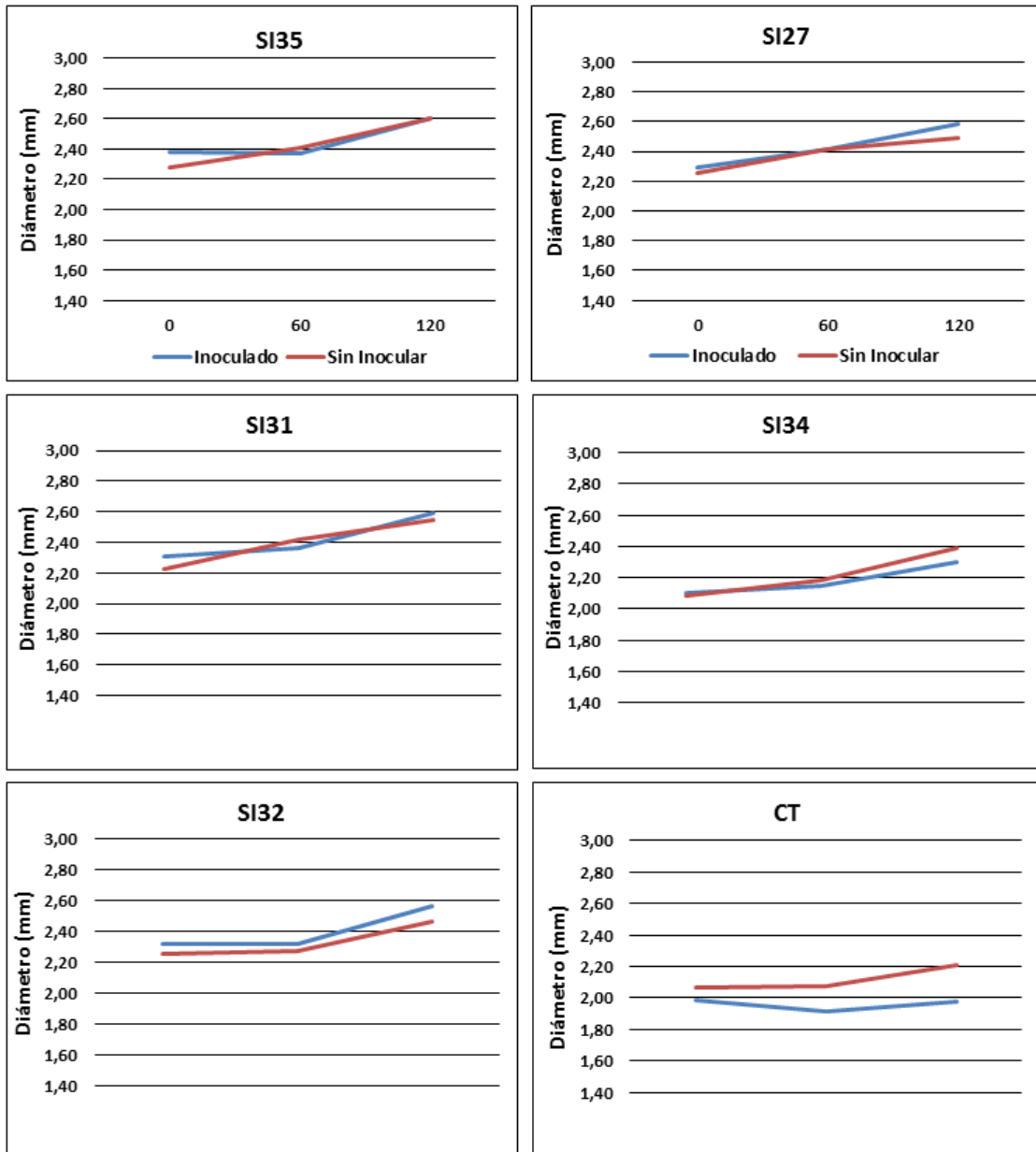
76-100%

Fuente: Taylor y Saseer, 1983.

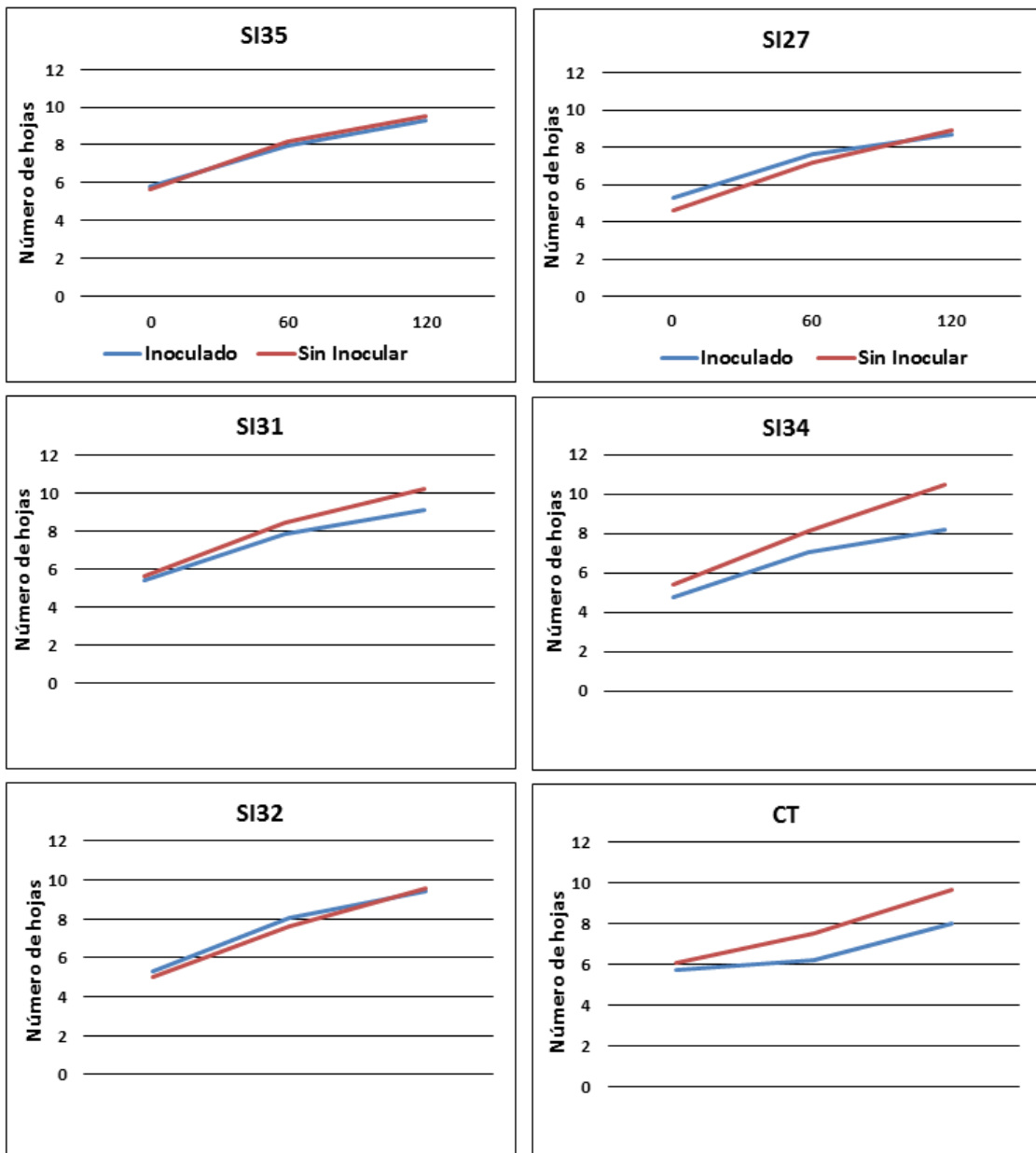
Anexo 2. Análisis de la variable altura de planta en las tres fechas 0, 60 y 120 días de la inoculación con *Meloidogyne exigua*, para cada línea San Isidro y la variedad Caturra.



Anexo 3. Análisis de la variable diámetro del tallo en las tres fechas 0, 60 y 120 días de la inoculación con *Meloidogyne exigua*, para cada línea San Isidro y la variedad Caturra.



Anexo 4. Análisis de la variable número de hojas en las tres fechas 0, 60 y 120 días de la inoculación con *M. exigua* para cada línea San Isidro y la variedad Caturra.



Anexo 5. Variables de Crecimiento a los 120 días después de la Inoculación n=30.

Variedades de Café	Nematodos								
	Inoculado	Sin Inocular	Prob.	Inoculado	Sin Inocular	Prob.	Inoculado	Sin Inocular	Prob.
	Altura (cm)			Diámetro (mm)			Número de Hojas		
SI 35	12.50 ^A	13.58 ^A	0.1797	2.60 ^A	2.60 ^A	0.9912	9.27 ^{AB}	9.53 ^{AB}	0.5888
SI 31	13.20 ^A	13.77 ^A	0.4606	2.59 ^A	2.55 ^A	0.6319	9.10 ^{ABC}	10.20 ^A	0.0288
SI 32	12.45 ^A	12.19 ^B	0.7541	2.56 ^A	2.46 ^{AB}	0.2775	9.43 ^A	9.57 ^{AB}	0.7834
SI 27	12.08 ^A	11.23 ^{BC}	0.1410	2.59 ^A	2.49 ^{AB}	0.2237	8.70 ^{ABC}	8.90 ^B	0.6437
SI 34	9.31 ^B	12.34 ^B	<0.0001	2.30 ^B	2.39 ^B	0.4189	8.21 ^{BC}	10.46 ^A	0.0001
CT	7.27 ^C	10.84 ^C	<0.0001	1.97 ^C	2.21 ^C	0.0003	8.00 ^C	9.70 ^{AB}	0.0012
Probabilidad	<0.0001	<0.0001		<0.0001	<0.0001		0.0296	0.0190	
Error Estándar	0.5350	0.4336		0.0658	0.0567		0.3648	0.3257	

Anexo 6. Cuadro del análisis físico del sustrato.

Características Físicas del sustrato	Porcentaje de partículas
Arena	87.4%
Limo	6%
Arcilla	6.6%

