

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

**Identificación morfológica, morfométrica y molecular de especies de
Helicotylenchus (Tylenchida: Hoplolaimidae) asociadas a seis
cultivos en Costa Rica**

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

Estudiante

Melissa Rodríguez Cubero

Tutor:

M. Sc. Walter Peraza Padilla

Asesores

PhD. Eduardo Salas Alvarado

Lic. Tatiana Zamora Araya

Campus Omar Dengo

Heredia, Costa Rica, 2020

**Identificación morfológica, morfométrica y molecular de especies de
Helicotylenchus (Tylenchida: Hoplolaimidae) asociadas a seis
cultivos en Costa Rica.**

Melissa Rodríguez Cubero

**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 Licenciatura en Ingeniería Agronómica**

Tribunal Examinador

PhD. Grace Wong Reyes
Decano (a) FCTM

Dr. Evelio Granados Carvajal
Director (a) Escuela de Ciencias Agrarias

M. Sc. Wálter Peraza Padilla
Director de Tesis

Dr. Eduardo Salas Alvarado
Asesor

Lic. Tatiana Zamora Araya
Asesora

Melissa Rodríguez Cubero
Sustentante

DEDICATORIA

Primeramente a la vida, por darme siempre oportunidades para crecer y aprender en cada proceso por el que he pasado en este camino de realización personal y profesional.

A mi mamá, por haberme inspirado a ser auténtica y a amar lo que hago, por ser la primera persona que confía en mí, por creer en mis capacidades y por siempre agarrarme de la mano para mostrarme apoyo y amor.

A mis hermanas y hermanos, por acompañarme en mi cotidianidad y por manifestar de múltiples maneras su cariño, respeto y apoyo.

A las amigas y los amigos que han permanecido a mi lado para sostenerme y darme aliento en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

Extiendo un sincero reconocimiento a cada una de las personas que contribuyeron en el proceso de realización y culminación de la presente tesis:

Gracias a mi tutor M.Sc. Wálter Peraza Padilla, por su permanente acompañamiento, su constante paciencia y su gran ayuda para que este trabajo fuera una realidad. Así mismo, manifiesto mi agradecimiento a mi asesor, el Dr. Eduardo Salas Alvarado y mi asesora, la Lic. Tatiana Zamora Araya por aportar su conocimiento y sus observaciones en esta investigación.

Un especial agradecimiento al Dr. Pablo Castillo Castillo, del Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Córdoba, España por brindar su ayuda en la identificación molecular de las especies de *Helicotylenchus*.

A la M.Sc. Irena Hilje Rodríguez, le agradezco la anuencia con la que atendió todas mis dudas y consultas, poniendo a disponibilidad sus conocimientos en biología molecular para poder entender mejor los análisis moleculares y filogenéticos presentes en este estudio.

Por último, agradezco al Laboratorio de Nematología de la Escuela de Ciencias Agrarias por proporcionar las instalaciones y equipo necesario que permitieron realizar los estudios morfológicos y morfométricos correspondientes.

RESUMEN

Los nematodos fitoparásitos son patógenos pero sus interacciones con otros agentes causantes de enfermedades dificultan medir su verdadero impacto en el rendimiento de los cultivos y su estimativo a gran escala. En este sentido, la correcta identificación de especies se vuelve una tarea importante para determinar a cuáles cultivos pueden estar asociadas y su potencial daño. El objetivo del presente estudio fue identificar especies del nematodo *Helicotylenchus* asociadas a los cultivos de piña en San Carlos, Alajuela; cítricos en Los Chiles, Alajuela; Uva en Santa Ana, San José; plátano en Talamanca, Limón; banano en Jicaral, Puntarenas y arroz en Paso Canoas, Puntarenas. Se realizaron estudios morfológicos, morfométricos y moleculares. Se llevaron a cabo un total de 3000 mediciones morfométricas, que facilitó la estadística descriptiva de cada población de nematodos. Se tomó un total de 2500 microfotografías de hembras y machos que permitieron discriminar entre las especies de *Helicotylenchus* asociadas a los cultivos muestreados. Por medio de la reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se amplificó el dominio D2-D3 de la región 28S del ADN ribosomal (ADNr) con los cebadores D2A (5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3') y D3B (5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3'). Asimismo, se amplificó la región ITS entre los genes ribosomales nucleares con los cebadores TW81 (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') y AB28 (5'-ACGAGCCGAGTGATCCACCG-3'). Los productos de PCR se purificaron previos a la secuenciación y cada secuencia, se comparó con otras reportadas para especies de *Helicotylenchus* depositadas en el GenBank®. Se calcularon los porcentajes de similitud y divergencia entre ellas. Para los análisis filogenéticos se utilizaron las secuencias de las regiones 28S e ITS del ADNr de las diferentes especies de *Helicotylenchus* reportadas en el GenBank®. Se establecieron relaciones filogenéticas entre las especies identificadas a partir de los tres marcadores moleculares utilizando el método de Inferencia Bayesiana (IB). La información molecular se comparó con la morfológica y morfométrica para obtener una correcta identificación de la especie encontrada en cada cultivo. La especie *Helicotylenchus dihystra*, se encontró asociada a plantaciones de piña, cítricos, plátano y uva. Por su parte, la especie *H. multincinctus* se identificó en asocio al cultivo de banano. En el caso del cultivo del arroz no fue posible identificar la especie asociada, por lo que será necesario utilizar molecularmente otras regiones conservadas del ADN que permitan suministrar más

información. Las secuencias obtenidas para *H. dihystera* presentaron un 99% de similitud con accesiones correspondientes a esta especie reportadas en los cultivos de morera y ñame en China y a *Camellia* sp. en Birmania. En cuanto a las secuencias de la especie *H. multinctus*, estas mostraron un 99% de similitud con accesiones correspondientes a esta especie, encontradas en el cultivo de *Musa paradisiaca* en China y cacao en Sudáfrica. En el caso de la población de *Helicotylenchus* presente en el cultivo de arroz, el análisis de la amplificación del dominio D2-D3 de la región 28S del ADN ribosomal (ADNr) mostró resultados porcentuales de similitud de 96% con accesiones correspondientes a la especie *H. caudatus*, por debajo de los necesarios para poder confirmar a cuál especie pertenecía. El árbol filogenético correspondiente al análisis de las secuencias de la región ITS mostró a *H. dihystera* agrupando con accesiones encontradas en Japón. Además, la secuencia de la especie *H. multinctus* agrupó con una accesión reportada en China. La correcta descripción de especies representa un método importante para la generación de información científica que permita llevar a cabo registros de plagas y hospederos, su localización y el impacto en el rendimiento de las plantaciones. De esta forma, se logra contar con suficiente información para ser utilizada en el desarrollo de programas cuarentenarios y estrategias de combate.

ABSTRACT

Phytoparasitic nematodes are pathogens, but their interactions with other disease-causing agents make it difficult to measure their true impact on crop yield and their estimation on a large scale. In this sense, the correct identification of species becomes an important task to determine which crops can be associated and their potential damage. The objective of the present study was to identify species of the *Helicotylenchus* nematode associated with pineapple crops in San Carlos, Alajuela; citrus in Los Chiles, Alajuela; Grape in Santa Ana, San José; plantain in Talamanca, Limón; banana in Jicaral, Puntarenas and rice in Paso Canoas, Puntarenas. Morphological, morphometric, and molecular studies were carried out. A total of 3,000 morphometric measurements were carried out, which facilitated the preparation of a descriptive statistical analysis in which the average, standard deviation, maximum and minimum data of each nematode population were obtained. In addition, a total of 2,500 microphotographs of females and males were taken, allowing discrimination between the *Helicotylenchus* species associated with the sampled crops. by PCR, the D2-D3 domain of the 28S region of ribosomal DNA (rDNA) was amplified with primers D2A (5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3') and D3B (5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3'). Likewise, the ITS region between the nuclear ribosomal genes was amplified with the primers TW81 (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') and AB28 (5'-ACGAGCCGAGTGATCCACCG-3'). The PCR products were purified prior to sequencing and each sequence was compared with others reported for *Helicotylenchus* species deposited in GenBank® and the percentages of similarity and divergence between them were calculated. For the phylogenetic analyzes, the sequences of the 28S and ITS regions of the rDNA of the different *Helicotylenchus* species reported in the GenBank® were used. Phylogenetic relationships between the identified species were established from the three molecular markers using the Bayesian Inference (IB) method. The molecular information was compared with the morphological and morphometric information to obtain a correct identification of the species found in each culture. The *Helicotylenchus dihystra* species was found associated with pineapple, citrus, banana, and grape plantations. For its part, the *H. multicinctus* species was identified in association with banana cultivation. In the case of rice cultivation, it was not possible to identify the associated species, which is why it will be

necessary to use molecularly other conserved regions of DNA to provide more information. The sequences obtained for *H. dihystera* showed 99% similarity with accessions corresponding to this species reported in the mulberry and yam crops in China and in *Camellia* sp. in Burma. Regarding the sequences of the *H. multicinctus* species, these showed 99% similarity with accessions corresponding to this species, found in the cultivation of *Musa paradisiaca* in China and cocoa in South Africa. In the case of the *Helicotylenchus* population present in the rice crop, the analysis of the D2-D3 domain amplification of the 28S region of ribosomal DNA (rDNA) showed percentage similarity results of 96% with accessions corresponding to species *H. caudatus*, below those necessary to confirm which species it belonged to. The phylogenetic tree corresponding to the analysis of the sequences of the ITS region showed *H. dihystera* grouping with accessions found in Japan. Furthermore, the sequence of the *H. multicinctus* species grouped with an accession reported in China. The correct description of species represents an important method for the generation of scientific information that allows carrying out records of pests and hosts, their location, and the impact on plantation performance. In this way, it is possible to have enough information to be used in the development of quarantine programs and combat strategies.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT	viii
ÍNDICE	x
LISTA DE TABLAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ANEXOS.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	4
I. Objetivo general.....	4
II. Objetivos específicos	4
MARCO TEÓRICO.....	5
I. Generalidades de los nematodos	5
II. Nematodos fitoparásitos	6
III. Familia Hoplolaimidae	7
IV. Género <i>Helicotylenchus</i>	7
V. Cultivos en estudio asociados con <i>Helicotylenchus</i>	9
Cultivo de piña (<i>Ananas comosus</i>)	9
Cultivo de banano (<i>Musa AAA</i>).....	11
Cultivo de plátano (<i>Musa</i> sp.).....	13
Cultivo de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	15
Cultivo de cítricos (<i>Citrus</i> sp.)	17
Cultivo de uva (<i>Vitis vinífera</i>)	19
VI. Análisis morfológico y morfométrico de especies de nematodos	21
VII. Análisis molecular de especies de nematodos.....	22
Técnica PCR.....	22
Secuenciación de ADN	24

Análisis filogenético	25
METODOLOGÍA	26
I. Recolecta de las muestras	26
II. Extracción y montaje de nematodos	27
III. Identificación morfológica y morfométrica	28
IV. Identificación molecular	29
Extracción de ADN, PCR y secuenciación	29
El análisis filogenético	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
I. Caracterización morfológica y morfométrica	31
<i>Helicotylenchus dihystra</i>	32
<i>Helicotylenchus multicinctus</i>	45
<i>Helicotylenchus sp.</i>	52
II. Caracterización molecular: análisis de secuencias y filogenia	55
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	60
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXOS	88

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Coordenadas geográficas y condiciones climáticas de cada una de las zonas de recolecta de muestras.	26
Tabla 2. Comparación de medidas morfométricas de hembras para la especie <i>H. dihystra</i> en estudio y las de la población original descrita por Cobb (1893).	38
Tabla 3. Comparación de medidas morfométricas de hembras para la especie <i>H. multicinctus</i> en estudio y las de la población original descrita por Cobb (1893).....	48
Tabla 4. Medidas morfométricas de hembras para la población de <i>Helicotylenchus</i> sp. en estudio.	53

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotomicrografías de la especie *H. dihystera* identificada en piña de Pital, San Carlos, Alajuela. 39
- Figura 2.** Fotomicrografías de la especie *H. dihystera* identificada en cítricos de La Virgen de los Chiles, Alajuela..... 40
- Figura 3.** Fotomicrografías de la especie *H. dihystera* identificada en uva de Pozos de Santa Ana, San José..... 41
- Figura 4.** Fotomicrografías de la especie *H. dihystera* identificada en plátano de Talamanca, Limón. 42
- Figura 5.** Fotomicrografías de la especie *H. multicinctus* identificada en banano en la Tigra de Jicaral, Puntarenas. 49
- Figura 6.** Fotomicrografías de *Helicotylenchus* sp. identificada en arroz en Paso Canoas, Puntarenas. 54
- Figura 7.** Regla concenso del 50% de un árbol de análisis de Inferencia Bayesiana generado a partir de la región D2-D3 del 28s rDNA del conjunto de datos de los genes de secuencias para las especies de *H. dihystera*; *H. multicinctus* y *Helicotylenchus* sp.....58
- Figura 8.** Regla concenso del 50% de un árbol de análisis de Inferencia Bayesiana (IB) generado a partir del conjunto de datos de secuencias ITS para las especies *Helicotylenchus dihystera* y *H. multicinctus*.....59

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Secuencias obtenidas a partir de la amplificación de los dominios D2-D3 de la región 28S del ARNr..... 88

Anexo 2. Secuencias obtenidas a partir de la amplificación de la región ITS1 del ARNr.
..... .91

INTRODUCCIÓN

El rendimiento de los cultivos tiene relación con la interferencia de diversos agentes, tanto bióticos como abióticos, los cuales interactúan con las plantas y además se relacionan con el ambiente. En la producción agrícola los cultivos pueden ser afectados y dañados por plagas, enfermedades y malezas. Las enfermedades en los cultivos provocan alteraciones en el funcionamiento fisiológico de las plantas, lo que afecta su desarrollo normal y reduce su rendimiento, alcanzando en algunos casos hasta la muerte de la planta. Entre los patógenos de mayor impacto a nivel mundial se encuentran los hongos, bacterias, virus, fitoplasmas y nematodos (Lastres, 2009).

En la producción agronómica existen factores que a menudo se combinan dando lugar a la disminución de los rendimientos agrícolas y es preciso cuantificar dichos factores limitantes, dentro de los cuales se destacan los nematodos fitoparásitos. Estos se encuentran ampliamente distribuidos en suelos naturales y cultivados en todo el mundo. (Peña y Páez, s.f). En términos generales, los nematodos causan pérdidas anuales de entre un 11% y un 14% en cultivos de importancia económica como leguminosas, granos, banano, yuca, coco, remolacha, caña de azúcar, papa, hortalizas y varios frutales. Las pérdidas en los cultivos como los mencionados anteriormente, representan unos \$80 billones al año. (Castaño, Guzmán y Villegas, 2011).

Los nematodos se encuentran siempre presentes y están asociados con el crecimiento de la planta y la producción del cultivo, lo que representa una limitación significativa para la agricultura de subsistencia, llegando a ser difíciles de controlar. Los nematodos fitopatógenos tienen gran relevancia por los daños que inducen en la planta, ya sea solos o en interacción con otros patógenos y los síntomas ocasionados a veces son similares a los que causan los hongos, las bacterias y los virus. Por lo anterior, es muy importante la identificación de géneros y especies de nematodos involucrados en las enfermedades de los cultivos agrícolas. Asimismo, es de gran trascendencia conocer su biología y las alternativas para su combate (Avena, Ceceña, González, Grimaldo y Durán, 2016). Hay muchos aspectos importantes en la biología de los nematodos, estos incluyen la correcta identificación y caracterización

taxonómica de la especie, la duración de su ciclo, número de generaciones por año, fecundidad, respuesta a factores de temperatura y humedad, rango de hospedantes y mecanismos de supervivencia y dispersión (Andrés, 2002).

La identificación de nematodos requiere, además, de un conocimiento de su morfología y del funcionamiento de cada una de sus estructuras (Rocha, 2018). La importancia de ciertas especies de nematodos y la combinación con otros problemas fitosanitarios, no es una tarea simple de combatir y se torna más difícil en climas tropicales que en climas templados (Peña y Páez, s.f). Tanto Torrado y Castaño (2009) como Avena, Ceceña, González, Grimaldo y Durán (2016), mencionan que, dentro de los géneros de nematodos más diseminados y de mayor importancia económica a nivel mundial, se encuentran *Meloidogyne* sp., *Globodera* sp., *Pratylenchus* sp., *Helicotylenchus* sp. y *Xiphinema* sp.

En Costa Rica no se cuenta con datos de pérdidas agrícolas, límites de tolerancia y umbrales económicos debido a los nematodos; sin embargo, su importancia como agentes patógenos se reconoce por la importación anual de nematicidas. Para el período 2000-2004, las importaciones superaron las 4000 toneladas y posteriormente esta cifra aumentó a 8317 toneladas para el período 2005-2009 (Ramírez, 2011; Bravo *et al.*, 2015). Estos productos químicos se utilizan para combatir los problemas asociados con dichos patógenos en banano, café, ornamentales, hortalizas y otros (Esquivel y Peraza, 2010).

En los cultivos de mayor importancia económica en Costa Rica, los géneros de nematodos más comunes son: *Helicotylenchus* sp., *Meloidogyne* sp. y *Pratylenchus* sp., los cuales se han encontrado asociados a los cultivos de café, arroz, piña, caña de azúcar, banano, plátano, cacao, papaya, maíz, frijol, papa, tomate, chile, cebolla, culantro, repollo, lechuga, apio, brócoli, coliflor, chayote, tacaco, camote, yuca, berenjena, limón, mango, mora, fresa y ornamentales. En el caso de la especie *Radopholus similis* se encuentra en cultivos de arroz, banano y plátano, siendo considerada plaga en estos dos últimos (Guzmán, Benavides, Hernández, Durán y Montero, 2013; Fernández y Quesada, 2013).

En lo que respecta al género *Helicotylenchus*, existen datos recopilados durante años por el laboratorio de Nematología de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional (ECA-UNA), en donde se han encontrado densidades poblacionales de *Helicotylenchus* que van desde 50 hasta 2500 entre juveniles y hembras en 10 g de raíz (Peraza, W. Comunicación personal. 12 de Febrero de 2018).

Existen diversos estudios realizados en Costa Rica sobre impacto, dinámica poblacional, combate y reconocimiento de nematodos en cultivos de interés económico como hortalizas, arroz, árboles frutales, plátano, papa, maíz, tabaco, caña de azúcar, banano, pejíbaye y café, los cuales demuestran que existe alta diversidad de nematodos y que pueden estar asociados a una amplia gama de cultivos (Wing-Ching, Salazar, Flores y Rojas, 2008).

Debido a la ocurrencia y densidades del nematodo espiral, la complejidad y dificultad que representa identificar los nematodos del género *Helicotylenchus* sp, aunado a la escasa identificación y descripción a nivel de especie en los distintos cultivos del país, es necesario la correcta identificación. Lograr caracterizar correctamente especies de este nematodo, ayudará a conocer aspectos como distribución, biología: ciclo biológico y patológico, síntomas primarios y secundarios, pérdidas, hospedantes, supervivencia, medios de diseminación y manejo, entre otros. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue realizar una caracterización morfológica, morfométrica y molecular de las especies de *Helicotylenchus* sp asociadas a seis cultivos en Costa Rica.

OBJETIVOS

I. Objetivo general

Identificar especies del nematodo *Helicotylenchus* sp. mediante criterios morfológicos, morfométricos y moleculares que puedan estar asociados a un cultivo de piña, plátano, banano, cítricos, arroz y uva en Costa Rica.

II. Objetivos específicos

1 Caracterizar morfológicamente y morfométricamente especies de *Helicotylenchus* de seis cultivos en Costa Rica, para determinar si un mismo nematodo puede estar asociado a más de un cultivo muestreado.

2 Identificar molecularmente cada una de las especies de *Helicotylenchus* asociadas a los cultivos muestreados, con el fin de conocer si hay especies aún no reportadas en nuestro país.

3 Establecer relaciones filogenéticas entre las especies de *Helicotylenchus* identificadas en los seis cultivos agrícolas a partir de dos marcadores moleculares (28S e ITS) utilizando el método de Inferencia Bayesiana (IB).

MARCO TEÓRICO

I. Generalidades de los nematodos

Los nematodos son el grupo de organismos no segmentados más grande de la tierra. Poseen simetría bilateral con sistemas fisiológicos similares a los animales superiores, son pequeños, con una longitud variable entre 0.2 y 10.00 mm y un ancho que va de los 0.01 a los 0.5 mm. Son de forma cilíndrica y delgada, excepto aquellos géneros en los cuales las hembras en su estado avanzado de desarrollo adoptan forma de “limón”, redonda y riñón (Frápoli, 2000). Son animales acuáticos muy delgados que viven en la película de agua que rodea las partículas de suelo. También se encuentran en el estiércol, basura orgánica y en sedimentos de estanques, ríos y océanos. Asimismo, se pueden encontrar algunos de estos microorganismos a profundidades aproximadas a los 500 metros (Esquivel, 2011).

Los nematodos existen en la naturaleza tanto en sus formas fitoparásitas, así como de vida libre (VL). Se conocen 26.646 especies clasificadas como: de vida libre (10.681); parásitos de invertebrados (3.501), de vertebrados (8.359) y de plantas (4.105). Los nematodos fitoparásitos son patógenos, pero sus interacciones con otros agentes causantes de enfermedades dificultan medir su verdadero impacto en el rendimiento de los cultivos y su estimativo a gran escala (Castaño *et al.*, 2011). Aquellos que por sus hábito alimenticio se clasifican como fitoparásitos, son biotrofos ya que se alimentan del citoplasma de las células de su planta hospedera, y secundariamente se convierten en agentes patógenos dependiendo de la población existente, susceptibilidad del cultivar y las condiciones existentes (principalmente la temperatura del suelo). Frecuentemente, se aprecian los síntomas típicos de los nematodos (amarillamiento, enanismo, poca fructificación, etc) en diversos cultivos agrícolas, donde ocasionan daños económicos importantes (Godoy, Yáñez, Gastélum, López y Almodóvar, 2014).

II. Nematodos fitoparásitos

Generalmente, los nematodos fitoparásitos son muy similares en su morfología; sin embargo, cada género y especie presenta características morfológicas muy específicas. La mayoría tiene cuerpo vermiforme (filamento con extremos más o menos agudos) en sus estados juveniles y adulto, aunque algunos géneros muestran dimorfismo sexual porque las hembras adquieren formas globosas, piriformes o reniformes (Godoy *et al.*, 2014).

Para su alimentación, los nematodos fitoparásitos utilizan el estilete, el cual ocasiona que se produzca una secreción de saliva (enzimas) hacia el interior de las células, con la finalidad de degradar los componentes celulares y poderlos extraer del protoplasma con una mayor facilidad y asimilación. En ciertas especies la rapidez de alimentación es apreciable, no obstante, existen algunas en las cuales es demasiado lenta pudiendo permanecer horas o días de manera activa. La forma de alimentación utilizada por estos microorganismos provoca que el tejido celular dañado derive en muerte o debilitamiento de manera severa de los puntos más importantes de crecimiento radicular, como yemas y puntas de las raíces. El hábito alimenticio de los nematodos ocasiona, a su vez, la formación de lesiones, degradación de tejido y producción de crecimiento anormal de las células, lo que origina agallas en varias partes de la planta en el caso de los nematodos del género *Meloidogyne* (González, 2013).

Los nematodos fitoparásitos están agrupados en tres órdenes principales: Aphelenchida, Dorylaimida y Tylenchida. De ellos, el orden Tylenchida es el que incluye la mayoría de nematodos fitoparásitos y el más importante económicamente. A nivel mundial los 10 géneros de nematodos fitoparásitos más importantes son *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Heterodera*, *Ditylenchus*, *Globodera*, *Tylenchulus*, *Xiphinema*, *Radopholus*, *Rotylenchulus* y *Helicotylenchus* (Rivera, 2007).

III. Familia Hoplolaimidae

La familia Hoplolaimidae comprende un gran número de géneros y especies de nematodos agrupados bajo las subfamilias Hoplolaiminae (*Hoplolaimus*, *Aerolaimus*, *Peltamigratus*, *Scutellonema* y *Rotylenchus*), Rotylenchoidinae (*Rotylenchoides* y *Helicotylenchus*), *Rotylenchulinae* (*Rotylenchulus*) y Hoplotylinae (*Hoplotylus* y *Acontylus*). Algunos de ellos se encuentran distribuidos a lo largo y ancho de cada uno de los continentes, mientras otros ocupan áreas más restringidas dentro de los mismos (Zerpa y Renaud, s.f).

Los hoplolaimidos son un grupo único de ectoparásitos radiculares migratorios semi-endoparásitos y endoparásitos verdaderos de plantas. El interés en los nematodos de esta familia se desarrolló debido al descubrimiento de la alta patogenicidad de una serie de especies pertenecientes a la misma, las cuales causan pudrición de raíces retardando notablemente el crecimiento de plantas de cultivos de importancia económica (Krall, 1990).

El nombre común de nematodo espiral se le atribuye con mayor frecuencia a los nematodos del género *Helicotylenchus*, pero en ocasiones se aplica también a otros géneros de la familia Hoplolaimidae incluyendo *Rotylenchus*, *Aerolaimus*, *Scutellonema* y *Peltamigratus*. Son llamados de esta manera debido a la tendencia de su cuerpo a enrollarse en una espiral cuando están en reposo o muertos. Los nematodos espiral del género *Helicotylenchus* se encuentran entre los fitoparásitos más omnipresentes en todo el mundo (Crow, 2013).

IV. Género *Helicotylenchus*

El género *Helicotylenchus* sp. es uno de los diez parásitos de plantas más importantes en el mundo. Este género, con alrededor de 250 especies, es el más abundante de la familia Hoplolaimidae. Debido a la postura helicoidal del cuerpo, a menudo es fácil identificar miembros del género; sin embargo, la separación de este a nivel de especie es muy difícil (Kashi & Karegar, 2014), debido en parte a que muchas especies comparten características diagnósticas muy similares y una variación intraespecífica muy alta (Subbotin *et al.*, 2015).

Biológicamente y dependiendo del hospedante, el hábito alimenticio de *Helicotylenchus* sp., se caracteriza por ser ectoparásito, semiendoparásito o endoparásito de raíces. Todos los estados pueden ser encontrados en el córtex de las raíces, pero la migración a través del tejido no ha sido registrada. Producto del parasitismo, en la epidermis de las raíces se forman lesiones pequeñas circulares de color café oscuras tornándose negras, las cuales pueden llegar a ser necróticas. La mayoría de especies son partenogenéticas aunque una de las más comunes y dañinas, *H. multicinctus*, es amfimíctica, es decir, requiere de ambos sexos para la reproducción (Guzmán, Pérez y Patiño, 2012).

Con respecto a *H. multicinctus* y *H. dihystra* representan las dos especies de fitonematodos más diseminadas y abundantes en el cultivo de musáceas (banano y plátano) en las áreas tropicales. Debido a su hábito alimenticio, estos nematodos dañan el sistema radical de las plantas, reduciendo la producción de musáceas entre 19% y 34% (Guzmán, 2011). Además, *H. dihystra* ha sido reportada en el cultivo de la piña, donde causa daño a las raíces y, cuando se encuentra en altas densidades poblacionales junto a otros géneros y especies de nematodos, afecta rendimientos y calidad de la piña (Hernández, s.f).

Las dos especies mencionadas anteriormente junto con *H. digonicus* y *H. pseudorobustus*, representan las especies más comúnmente reportadas en la literatura. En el caso de *H. pseudorobustus* está ampliamente distribuido tanto en regiones templadas como en regiones tropicales, parasita muchos cultivos y es un factor limitante en la supresión de crecimiento de los cultivos infectados por otros patógenos o afectados por desbalances hídricos o nutricionales (Subbotin *et al.*, 2015).

En Costa Rica, el género *Helicotylenchus* sp está presente en una amplia variedad de cultivos: aguacate, ajo, albahaca, apio, arroz, arveja, ayote, bambú, banano, brócoli, cacao, café, camote, caña de azúcar, cebolla, coliflor, culantro, chayote, chile, frijol, granadilla, guanábana, guayaba, lechuga, limón, maíz, mango, manzana de agua, mora, naranja, ñame, ñampí, papa, papaya, pepino, piña, repollo, sandía, tomate y zanahoria (Esquivel y Peraza, 2010; Fernández y Quesada, 2013).

La especie *H. stylocercus* fue encontrada durante un estudio en Costa Rica, en suelo alrededor de las raíces de banano en la localidad de Coto, Puntarenas y posteriormente descrita como nueva especie de la familia Hoplolaimidae (Siddiqi y Pinochet, 1979). Por otra parte, Salguero (2006), identificó mediante criterios taxonómicos a *H. multincinctus* en parcelas dedicadas al cultivo de banano en la vertiente Atlántica (Caribe) del país. No obstante, Wing-Ching y colaboradores en 2008 identificaron el género *Helicotylenchus* asociado a los pastos tropicales Kikuyo, Estrella, Tanner, Camerún, Decumbens, San Juan y Guinea en las localidades de Sucre y San Vicente en el cantón de San Carlos, Alajuela. A pesar de que este nematodo aparece con mucha regularidad en muestras de suelo de diferentes cultivos, a la fecha no se ha realizado en Costa Rica, algún estudio para identificar las especies presentes, mediante criterios morfológicos, morfométricos y moleculares.

V. Cultivos en estudio asociados con *Helicotylenchus*

Cultivo de piña (*Ananas comosus*)

La piña es la tercera fruta tropical más importante del mundo, después del banano y los cítricos. En Costa Rica se inició su siembra en las sabanas de Buenos Aires de Puntarenas en la década de 1950 (García y Rodríguez, 2011). El área sembrada de esta fruta era de 45 000 hectáreas en el año 2014, bajó a 40 000 en los siguientes dos años y en 2017 se recuperó a 44 500 hectáreas (Barquero, 2018). Para el año 2016, las exportaciones representaron un crecimiento de 2.2% del PIB Agrícola, con una producción total de 2.9 millones de toneladas anuales y una ganancia de \$930 millones anuales (CANAPEP, 2017). El país se ha posicionado en mercados internacionales como líder en producción de piña por sus certificados, tratados comerciales y el intenso desarrollo de infraestructura y sistemas productivos agroindustriales. Esta situación favorable no sólo permite el incremento de índices de producción y exportación, sino también la expansión territorial del cultivo (Obando, 2017).

Es uno de los cultivos de mayor versatilidad para nuestro país, en cuanto a su adaptación a los diferentes sistemas de cultivo, tanto del pequeño y mediano productor como

en las siembras intensivas en grandes extensiones (Villegas *et al.*, 2007). Su principal uso es como fruta fresca, pero también se puede industrializar, con lo cual se puede generar un mayor valor agregado (Barrientos y Porras, 2010).

La producción de esta fruta tropical se ha concentrado en los cantones de Buenos Aires de Puntarenas (donde se cultiva cerca del 80% de la fruta para exportación), Grecia, San Carlos, Sarapiquí y en menor medida en Limón. Geográficamente, el total de hectáreas dedicadas al cultivo de piña se divide entre la Zona Norte (51%), el Caribe (31%) y el Pacífico (18%) (Contreras, 2012). En la región Huetar Norte de nuestro país, se ubican la mayor cantidad de los pequeños y medianos productores de piña. La actividad de la piña se concentra en Pital (37%), seguido por Río Cuarto (18%), Guatuso (13%), Aguas Zarcas (8%) y marginalmente participan otras zonas de la región (Barrientos y Porras, 2010).

La piña tiene como origen a América del Sur, por su domesticación se cree que puede ser de una zona entre Brasil y Uruguay de donde se propagó a otros países del continente y posteriormente a Europa y Asia. Esta planta pertenece a la familia de las Bromeliáceas. Es de tipo herbáceo y perenne; cuenta con raíces que salen de la parte inferior de su tallo siendo muy superficiales ya que normalmente se desarrollan en su mayoría en los primeros 15 centímetros del horizonte de suelo (DANE-SIPSA, 2016). Llega a medir hasta un metro de altura, con un tallo rodeado de 30 a 40 hojas largas, gruesas y con espinas, la fruta se forma sobre un pedúnculo de unos 100 a 150 mm de longitud en el ápice del tallo. Sus flores son compuestas y junto con las brácteas adheridas a un eje central, se hacen carnosas y se unen para formar la fruta de piña, la cual madura cinco meses después de la floración (Retana, 2015).

Dentro de los factores ecológicos fundamentales para el desarrollo del cultivo destacan: altura máxima de 800 a 1200 m.s.n.m, temperatura entre los 26 y 30 grados centígrados, precipitaciones entre los 1500 y 2000 mm anuales, el suelo debe ser suelto, con excelente drenaje, con un contenido de bajo a medio de arcilla y un pH de 4 a 5.5 (Díaz, 2001). Se puede sembrar en suelos planos y ondulados menores al 25%, ya que de lo contrario

demandará una mayor preparación y adecuación del terreno con curvas de nivel para el manejo del cultivo (DANE, 2016).

En cuanto a plagas y enfermedades, la susceptibilidad del cultivo al daño causado varía de acuerdo con su estado de desarrollo. A su vez, la incidencia de las plagas y enfermedades está en función de los factores ambientales y de la condición del cultivo. Las enfermedades más recurrentes son: pudrición del cogollo (*Phytophthora parasitica*), pudrición del fruto (*Phytophthora cinnamomi*), fusariosis (*Fusarium* sp.), pudrición acuosa (*Thielaviopsis paradoxa*), hoja de tamal (*Erwinia carotovora*), pudrición bacteriana del fruto (*Erwinia carotovora*) (Rodríguez, 2011).

Así mismo, dentro de las plagas más comunes en el cultivo de piña en Costa Rica se encuentran: cochinilla (*Dysmicoccus brevipes*), tecla o barrenador del fruto (*Strymon basilides*), gusano soldado (*Elaphria nucicolora*), picudo (*Metamasius dimidiatipennis*) (Vargas, 2011) y nematodos del orden Tylenchida: *Meloidogyne*, *Rotylenchulus*, *Criconemoides*, *Pratylenchus* y *Helicotylenchus*. De este último grupo, *H. dihystra* representa la especie más reportada a nivel mundial, relacionada a este cultivo (Hernández, s.f).

Cultivo de banano (*Musa AAA*)

El banano es una planta procedente del sudeste asiático que se cultiva desde hace 10000 años y cuyas primeras huellas se encontraron en Papúa Nueva Guinea en el siglo VII a. C (INFOCOMM, 2016). Es uno de los cultivos de mayor importancia a nivel mundial, al ser sustento económico y alimenticio de millones de personas en más de 120 países, principalmente en América Latina y el Caribe (ALC). La producción se encuentra en manos de pequeños y medianos productores, con manejo en la mayoría de los casos de manera tradicional, quienes destinan el 87% de la producción al consumo local y el 13% al comercio internacional (Delgado, 2013).

Actualmente Costa Rica es uno de los principales productores de banano en el mundo gracias a una productividad promedio de 2 989 cajas por hectárea (54,2 toneladas métricas),

una de las más altas del mundo. Además, el área de siembra de 42 857 hectáreas, le permite alcanzar una producción total de cerca de 128 millones de cajas y percibir anualmente \$1 043 millones. Esto le da al banano un posicionamiento privilegiado en el ámbito agrícola nacional y lo identifica como un motor de desarrollo económico y social en su área de influencia. Para el año 2017, las exportaciones bananeras representaron un 2.2% del producto interno bruto (PIB) y aportaron el 9,6% de los ingresos del país por concepto de venta al exterior, siendo la Unión Europea (50,7%) y los Estados Unidos (39,6%) los principales mercados del banano (CORBANA, 2018; Barquero, 2017).

El banano es una planta herbácea gigante, perenne, perteneciente al grupo de las monocotiledóneas y a la familia de las musáceas (INFOCOMM, 2016). Llega a medir de 3 a 7 metros de altura, su tallo está formado por peciolos de hojas curvadas y comprimidas, las cuales, al emerger por la parte superior del tallo, se van desarrollando hasta alcanzar dos o más metros de largo. Su sistema radicular está formado por un rizoma central de cuya base se forman numerosas raíces cortas y cilíndricas, estos rizomas desarrollan yemas de las cuales se forman hijos (García, 2018). La yema floral es corta y cónica, este cambio en el punto de crecimiento marca el comienzo del desarrollo del tallo verdadero, el cual se convertirá en tallo aéreo y crecerá por el centro del pseudotallo. Por último, el fruto se desarrolla en los ovarios de las flores pistiladas por el aumento del volumen de las tres celdas del ovario opuestas a eje central (Gómez, 2008).

Con respecto a los requerimientos del cultivo, las zonas comprendidas entre los 0 y los 300 msnm son las más aptas, no obstante, el banano se adapta a alturas que alcanzan hasta los 2200 msnm, con velocidad de viento no mayor a 20 km/hora, el rango de temperatura óptima oscila de los 25 a los 30°C (Torres, 2012). Asimismo, necesita de una pluviosidad de 120-150 mm mensual o 44 mm semanales (Gómez, 2008), humedad relativa del 70% y un rango de luminosidad de 6 a 8 horas luz diarias (Acevedo, 2016).

Los suelos aptos para el desarrollo del cultivo son aquellos con topografía de tipo plana con facilidad para la implementación de infraestructura, textura franco-arcillosa, franco-arenosa, franco arcillo limoso y franco limoso, con una salinidad no superior a 1dS/m

(García, 2018). El cultivo tolera suelos ligeramente ácidos y alcalinos con un pH comprendido entre los 5.5 y 7.2, sin embargo, suelos de reacción neutra con pH de 6.5 a 7 resultan los más adecuados para la siembra y explotación de banano (Vegas, 2013).

Las principales enfermedades presentes en el cultivo de banano son el Moko (*Ralstonia solanacearum* E.F), el Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* schlecht, *Fusarium*. sp. cubense [e.f. Smith]), la Pudrición acuosa del pseudotallo o bacteriosis (*Dickeya chrysanthemi*) y la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet var. *difformis*) (DANE, 2016). Dentro de los insectos plaga más importantes se encuentran el gusano cabrito del banano (*Opsiphanes* sp), cabrito negro (*Caligo* sp), gusano cogollero (*Spodoptera* sp), abeja trigona (*Trigona* sp), Trips, picudo negro (*Cosmopolites sordidus*) y picudo rayado (*Metamasius hemipterus*) (REPCar, 2009).

Después del nematodo barrenador *R. similis*, el nematodo espiral *H. multicinctus* es el fitonematodo más diseminado y abundante en los cultivos de banano en las áreas tropicales, donde las condiciones agroecológicas son óptimas para el cultivo de musáceas. No obstante, a menudo es considerado como el principal nematodo parásito de estos cultivos donde la temperatura es inferior a 15.6 °C y precipitación menor a 120 mm mensuales, las cuales no son condiciones óptimas para *R. similis* (Guzmán, 2011).

Cultivo de plátano (*Musa* sp.)

El plátano es un cultivo de mucha importancia en el trópico americano y en otras zonas tropicales del mundo. Su origen es el sureste asiático donde se extendió posteriormente a la India y África. En 1516, los europeos lo introdujeron en América y las Antillas. En la actualidad es un cultivo de amplia distribución por su adaptación, tanto en los trópicos como subtrópicos donde las mayores plantaciones comerciales se encuentran en los trópicos húmedos (Rodríguez y Guerrero, 2002).

En Costa Rica su consumo es parte de la dieta y de la cultura culinaria de todos los costarricenses, siendo importante como un cultivo de seguridad alimentaria. Sin embargo, el

consumo por habitante es el más bajo de América tropical, gran parte de la producción se destina a las exportaciones. La región Caribe es la principal productora de plátano con un área cercana a 6500 hectáreas. Se considera que para la agroindustria se destina el 35% de la producción nacional, la cual se estima en unas 80000 toneladas métricas (MAG, 2007). Desde los años 70 y 80, Costa Rica ha participado en la exportación de plátano al mercado de Estados Unidos, principalmente. Aunque en sus inicios no fue consistente, en las últimas décadas las exportaciones se han incrementado, incluyendo el mercado europeo (Rojas *et al.*, 2007).

El plátano es una planta herbácea perenne que luego de la fructificación sus partes aéreas mueren y son reemplazadas por los nuevos retoños que crecen desde la base donde puede llegar a alcanzar hasta los 8 metros de altura (Solís, 2007). Presenta un pseudotallo constituido a partir de las vainas foliares (generalmente de gran tamaño, a veces parcialmente leñosas), su tallo es rizomatoso, es decir, subterráneo y desprovistos de hojas, el cual en su parte superior presenta hojas cuyas vainas están dispuestas en espiral fuertemente apretadas unas a otras, constituyendo el falso tronco. Sus hojas son grandes, simples, enteras, con vainas y normalmente con pecíolo, las flores son hermafroditas o unisexuales, con brácteas, con perianto cigomorfo, diferenciado a menudo en cáliz y corola, las inflorescencias son en espiga o panícula y los frutos son abayados o capsulares (Molina, 2016).

Morfológicamente, el desarrollo de una planta de plátano comprende tres fases. En la fase I que corresponde a la vegetativa ocurre la formación de raíces principales y secundarias, la mayor parte de las raíces salen de la parte superior del cormo y las raíces superiores pueden alcanzar hasta 4 metros de altura. En la floración, el tallo floral se eleva del cormo a través del pseudotallo y es visible hasta el momento de la aparición de la inflorescencia. Por último, en la fase de fructificación, se diferencian las flores masculinas y se disminuye gradualmente la formación de hojas (Rodríguez y Guerrero, 2002).

Entre los requerimientos del cultivo se encuentran la altitud la cual debe ser entre los 0 a 400 msnm para que sea apta, un promedio diario anual de 4 a 6 horas de brillo solar, una humedad relativa de 70 a 80% (Rojas *et al.*, 2007). Asimismo, requiere una temperatura

óptima entre los 20 y los 30°C, necesidad de agua entre 1800 y 2500 mm distribuidos en todo el año (o bien, 150-180 mm mensuales), vientos con velocidad no mayor a 20 km/hora. Finalmente, necesita suelos con profundidad mayor o igual a 1.2 metros, sin problemas internos de drenaje, de textura franco-arenosa muy fina, franco limoso o franco arcillo limoso y un pH de 5.5 a 7.0 (Guerrero, 2010).

Las principales enfermedades que afectan al cultivo de plátano son la pudrición acuosa del pseudotallo o bacteriosis (*Dickeya chrysanthemi*), el mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* schlecht, *Fusarium*. sp. cubense [e.f. Smith]) y la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet var. *difformis*). Dentro de las plagas que atacan al cultivo de plátano se encuentran el picudo negro (*Cosmopolites sordidus*) y el picudo rayado (*Metamasius hemipterus*) (Alarcón y Jiménez, 2012). Las especies de nematodos *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria*, *Criconema* sp, *Radopholus similis* y *H. multincinctus* están involucradas en la afectación del sistema radical en plantas de plátano (Lara, Núñez, López y Carrión, 2015).

Cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.)

El arroz es uno de los cultivos más antiguos y ha formado parte de la alimentación del ser humano durante más de 10000 años. Ocupa después del trigo, el segundo lugar a nivel mundial en superficie cosechada, pero si se considera su importancia como cultivo alimenticio, proporciona más calorías por hectárea que cualquier otro cultivo de cereales (González, 2015). Para muchos pueblos del mundo representa más del 50% del total de calorías diarias ingeridas y en esas regiones el consumo llega a ser hasta de 273 Kg por habitante por año (Pinciroli, Ponzio y Salsamendi, 2015).

En el siglo XX la evolución del cultivo de arroz en Costa Rica tuvo diferentes etapas que marcaron en forma significativa su proceso de desarrollo paralelamente a las actividades del país, tales como su política y economía. Cabe mencionar dentro de dichas actividades, aquellas que impulsaron los programas de mejoramiento con el fin de lograr variedades con mayor resistencia a plagas y enfermedades (Guzmán, 2006).

En nuestro país, las regiones Chorotega y Brunca poseen la mayor cobertura de hectáreas sembradas con 35% y 24% respectivamente, situación contraria al Pacífico Central con un 11% y la Huetar Atlántica con tan solo 2% de la producción total. La producción de este grano básico se genera mayoritariamente por micro/pequeños productores (79%), seguido por medianos productores con un 16% y los grandes con un 5%. El método secano es el más empleado ya que 78% de los productores lo utilizan, mientras que el método de riego representa el 22% restante (Sánchez y Vega, 2017). La producción nacional de arroz se estima en unas 157 930 toneladas métricas, de las cuales se exportan 8 560 toneladas a países como Guatemala, El Salvador y Nicaragua, generando una ganancia de \$2 372 455 millones al año (CONARROZ, 2018).

El arroz es una planta perteneciente a la familia de las poáceas, monoica, anual, de crecimiento rápido y con gran reproductividad, adaptada a una diversidad de condiciones de suelo y clima con excelentes resultados en cultivo de inundación (INTA, 2011). El sistema radical del arroz es de naturaleza fibrosa y comprende dos tipos de raíz: seminal y adventicia. El tallo es, en sus inicios, una estructura muy corta y subterránea donde se encuentran bien diferenciados los nudos, a partir de los cuales se originan los hijos primarios, los cuales dan origen a los vástagos secundarios y terciarios. Las hojas se disponen en forma alterna a lo largo del tallo: la hoja más alta, por debajo de la panícula, recibe el nombre de hoja bandera o panicular, en el cuello de la hoja se encuentra la lígula y las aurículas (INIA, 2004). Las flores poseen color verde, dispuestas en espiguillas (unidades de la inflorescencia) y cuyo conjunto constituye una panícula, estas a su vez, corresponden a prolongaciones de los tallos a partir del último nudo; el grano de arroz es el ovario fecundado y maduro (Moquete, 2010).

Los requerimientos edafoclimáticos del cultivo de arroz incluyen: alturas desde el nivel del mar hasta los 2500 msnm, suelos con pH de 6.6 (Quito, 2017), Adicionalmente, Cárdenas (2017) menciona que esta planta necesita alrededor de 5% de materia orgánica, con excelente capacidad de intercambio catiónico, una capa arable de 25 centímetros de profundidad. Además, requiere de buen drenaje, temperatura entre 20 a 30 °C, radiación solar de 300 calorías diarias por centímetro cuadrado, cantidad de agua entre 800 y 1240 mm durante todo el ciclo.

Dentro de las plagas que afectan al cultivo de arroz se encuentran los jobotos (*Phyllophaga* sp.), los abejones negros (*Eutheola bidentata*), el grillo topo (*Neocurtilla hexadactyla*), los insectos del tallo: taladrador menor del arroz (*Elasmopalpus lignosellus*), el barrenador de la caña (*Diatraea* sp), la novia del arroz (*Rupella albinella*) y los insectos del follaje: pulguillas del arroz (*Epitrix cucumis*), el gusano cogollero (*Spodoptera* sp.), el gusano medidor o langosta (*Mocis latipes*), los chapulines (*Conocephalus* sp., *Neoconocephalus* sp.) y los chinches (*Oebalus insularis*) (Tinoco y Acuña, 2009).

Las principales enfermedades asociadas al cultivo son la *Pyricularia grisea*, el virus de la hoja blanca, el añublo de la vaina del arroz (*Rhizoctonia solani* Kühn), el Manchado del grano de arroz (por interacción compleja entre distintos patógenos: *Helminthosporium oryzae*, *Curvularia lunata*, *Alternaria* sp., *Pseudomonas* sp. y *Xanthomonas* sp., *Cercospora* sp., *R. solani* y *Fusarium*). Asimismo, los géneros de nematodos *Hirschmanniella*, *Xiphinema*, *Longidorus*, *Trichodorus*, *Aphelenchus*, *Aphelenchoides*, *Pratylenchus* y *Helicotylenchus*, se reportan en el país como los principales nematodos asociados al cultivo de arroz (López, Salazar y Azofeifa, 1987; Araya, 2008).

Cultivo de cítricos (*Citrus* sp.)

El origen del género *Citrus* se sitúa en el sureste de Asia y el centro de China, Filipinas y el archipiélago Indo Malayo hasta Nueva Guinea. Las primeras variedades e híbridos de cítricos fueron el resultado de un largo proceso de identificación, colecta y reproducción de plantas silvestres. El mayor productor a nivel mundial es Brasil con 22.6% de la producción, seguido de Estados Unidos con un 15.6%, China, México, España e India en conjunto representan el 64.17% del total de la producción a nivel mundial (EARTH, 2004).

Los cítricos fueron traídos a Costa Rica por los españoles desde la colonia, se consideran contemporáneos al café, ya que se utilizaron como sombra para este cultivo y se aprovechaban como frutal para autoconsumo. Los primeros cítricos sembrados fueron las naranjas, los limones ácidos y dulces, las mandarinas y hasta hace algunos años, las toronjas y los híbridos tangelos y tangores. La naranja ha sido el frutal que se ha desarrollado con una

mayor área sembrada, muy por encima del resto de cítricos (Calderón y Jiménez, 2008). En el país existen alrededor de 27 000 hectáreas de naranja sembradas y 5 000 hectáreas de otros cítricos. La Zona Norte y La Cruz de Guanacaste representan el 75% del área sembrada; las regiones Central Sur, Central Occidental y Central Oriental se reparten el restante 25% del área de cítricos. El 90% de la producción se destina como fruta para procesamiento industrial y el 10% restante se comercializa como fruta fresca en los mercados tradicionales (Jiménez, 2012).

Los cítricos pertenecen a la familia Rutaceae y se encuentran agrupados en la subfamilia Aurantioideae. Los géneros más importantes son *Citrus*, *Poncirus* y *Fortunela*. Las especies del género *Citrus* son las más importantes desde el punto de vista agronómico y representa casi la totalidad de los cítricos cultivados (Orduz y Mateus, 2012). Morfológicamente, las especies de este género tienen raíces principales que sujetan sólidamente al árbol, desarrollándose a una profundidad de 2 a 3 metros. Las hojas pueden tener varias formas pero mayormente son elípticas con margen generalmente entero, las flores se presentan aisladas o agrupadas en racimos de 5 pétalos en forma de copa que pueden ser terminales o desarrollarse en las axilas de las hojas. El fruto de los cítricos es un hesperidio de tamaño y color variable con la especie y la variedad, su forma puede ser oval, piriforme o esférica (Doria, 2014).

Generalmente tienen alta adaptabilidad a diversas condiciones climáticas, lo que favorece su cultivo en un gran número de países, aunque las regiones productoras por excelencia han sido localizadas en el continente americano (Espinal, Martínez y Peña, 2005). Los cítricos se desarrollan en alturas de los 800 a los 2 000 msnm, en suelos de naturaleza franca con buen drenaje y al menos 1,5 metros de profundidad, con un pH óptimo entre 5.5 y 7.0. La temperatura óptima para este cultivo va de los 23 a los 30 °C; requiere además de 1 200 a 1800mm de precipitación anual y una humedad relativa de 75 a 85% (Cleves, Orduz y Fonseca, 2012; INATEC, 2018).

Las plagas más comunes que afectan a los cítricos son los áfidos (*Aphis citricola*, *Aphis gossypii*), los chinches, las escamas (*Lepidosaphes beckii*, *Planococcus citri*), los

piojos y polillas, los trips y ácaros, el minador de las hojas (*Phyllocnistis citrella*), la mosca blanca, la mosca de la fruta (*Anastrepha* sp.), la mosca del mediterráneo (*Ceratitis capitata*) y el picudo de los cítricos (*Compsus* sp.) (León, 2012; CATIE, 2009). Por otra parte, la gomosis (*Phytophthora citrophthora*, *P. parasítica* y *P. palmivora*), la antracnosis (*Colletotrichum gloesporioides*) y la tristeza (*Citrus tristeza virus*, CTV), representan las tres principales enfermedades que afectan al cultivo (Calderón y Jiménez, 2008).

El nematodo plaga de los cítricos (*Tylenchulus semipenetrans*) es el más importante en este cultivo, al ser el causante de la enfermedad conocida como “muerte lenta”. No obstante, los cítricos son atacados además por las especies *Radopholus citrophilus*, *Belonolaimus longicaudatus* y los géneros *Pratylenchus*, *Hemicycliophora*, *Meloidogyne*, *Paratrichodorus*, *Hoplolaimus*, *Xiphinema* y *Helicotylenchus* (Castro, Timmer, Leguizamón, Müller y Corrales, 2000). De este último género, se registran asociadas al cultivo de cítricos las especies *H. crenacauda*, *H. dihystra*, *H. erithrinae* y *H. multicinctus* (Crozzoli, Lamberti, Greco y Rivas, 1998).

Cultivo de uva (*Vitis vinífera*)

El origen de la uva se localiza en Europa, por su importancia económica, cultural y religiosa, este cultivo es uno de los más antiguos del mundo. Derivado de su consumo diversificado, la uva se caracteriza por su alto valor económico y actualmente la producción mundial de uva ocupa 74 276 583 toneladas métricas, de las cuales el 71% es utilizado para la elaboración de vino, 27% para consumo fresco y 2% es procesado como frutos secos (Borja, García, Reyes y Arellano, 2015; Valero, 2017).

El cultivo de la vid en América tiene en la actualidad una superficie de 987 400 hectáreas que corresponden al 12, 64% de la producción mundial. En este continente se produce una viticultura muy diversa: desde la clásica y tradicional de clima mediterráneo en países como Canadá, Estados Unidos, México, Ecuador, Perú, Bolivia, Paraguay, Brasil, Uruguay, Chile y Argentina, hasta la de tipo tropical en Guatemala, Honduras, Costa Rica, República Dominicana, Haití, Colombia y Venezuela (Hidalgo e Hidalgo, 2011). En Costa

Rica existen plantaciones en el Valle Central y proyectos tanto experimentales como demostrativos, desarrollados por el Instituto Nacional de Aprendizaje y la Estación Experimental Fabio Baudrit de la Universidad de Costa Rica (Monge, 2015).

En las vides se pueden distinguir una parte enterrada, formada por un sistema denso de raíces, de crecimiento rápido y una parte aérea donde se distinguen tallo, ramas, hojas, frutos y zarcillos, flores e inflorescencias (Cutipa, 2013). Las hojas tienen cinco grandes nervaduras, forma cordiforme, orbiculadas, truncadas y reniformes. El tallo es siempre ondulado y retorcido, está recubierto de corteza vieja y puede alcanzar dimensiones considerables (Núñez, 2012). Las flores de la vid se agrupan en inflorescencias en racimo, son muy pequeñas, verdes y hermafroditas en la mayoría de los casos. El origen de los zarcillos es el mismo que el de las inflorescencias, pudiéndosele considerar una inflorescencia estéril y con frecuencia tienen varios botones florales (Rubio, 2011). El fruto se encuentra agrupado en racimos y se trata de una baya en forma esférica o ligeramente alargada que presenta un peso y tamaño variable, sin olor específico. Cada fruto posee de dos a cuatro semillas, con una cáscara constituida por una fina cutícula recubierta de una capa cerosa (Franco y Cruz, 2012).

La uva es un frutal de climas templados, pero puede desarrollarse todo el año en climas tropicales (Gandarilla, Rivas y Fernández, 2014). Con respecto al suelo, para el cultivo de la vid se requiere que la topografía del terreno sea plana, con una profundidad del suelo superior a 70cm y no presentar impermeabilidad en el fondo del terreno y debe tener buen drenaje, con pH neutro. Otros de los requerimientos del cultivo incluyen temperaturas de aproximadamente 25 °C con una mínima de 10 °C y una máxima de 35 °C y luminosidad de 1 200 a 1 800 horas distribuidas durante el año, precipitaciones de 350 a 600 mm (Martínez, 2017; Valero, 2017).

Las principales plagas presentes en el cultivo de la vid son la ericnosis o verruga (*Eriophyes vitis*), el gorgojo barrenador de ramas (*Neoterius fairmairei*), el gorgojo barrenador (*Neoterius* sp.), el taladrador de la vid (*Nicaprata scabra*), el gusano cornudo (*Euphorma vitis*) y la araña roja (*Panonychus citri*). Por otra parte, los patógenos más

comunes en el cultivo de uva son Oídium (*Uncinula nicator*), Agalla de la corona (*Agrobacterium tumefaciens*), cercospora (*Cercospora vitis*), Podedumbre gris (*Botrytis cinérea*), mildiu (*Plasmophora vitifoliae*), Antracnosis (*Gloesporium ampelophagum*) y los virus hoja enrollada (*Grape leafroll virus*) y hoja abanico (*Grape fanleaf virus*) (Huallanca, 2012).

Entre las especies de nematodos presentes en el cultivo de la vid se encuentran *Scutellonema brachyurum*, *Rotylenchus reniformis*, *Pratylenchus elaschitus*, *Criconemoides morgensis*, *Xiphinema floridae* y *H. dihystra* (Gandarilla, Rivas y Fernández, 2014; Jima, 2018).

VI. Análisis morfológico y morfométrico de especies de nematodos

Un estudio cualitativo y cuantitativo de caracteres que definen a un organismo se denomina caracterización, que puede ser realizado por la identificación de caracteres morfológicos, fisiológicos, de comportamiento y genéticos. Este tipo de investigaciones posibilita un reconocimiento de los organismos aislados más adaptados a una localidad específica y facilita un entendimiento de las relaciones patógeno-hospedero a través de informaciones relacionadas a la variación de la estructura poblacional (Sosa, Tirano y Arantes, 1998).

Los parámetros utilizados para la caracterización de especies de nematodos se conocen como Fórmulas De Man o Índices DeMan, de los cuales son más relevantes: número de especímenes en los cuales están basadas las medidas, longitud total del cuerpo, porcentaje de la posición de la vulva al extremo anterior, diámetro mayor del cuerpo, distancia de la base de las glándulas esofágicas al extremo anterior del cuerpo, longitud del estilete, largo de la cola, diámetro del cuerpo a nivel del ano, distancia del fasmidio al ano en relación a la longitud de la cola (Universidad de California, s.f).

La determinación morfológica y morfométrica de nematodos fitopatógenos en los laboratorios de diagnóstico, resulta complicada dado el amplio rango de especies existentes.

En los últimos años, se han desarrollado técnicas moleculares (sobre todo para la identificación de las especies más importantes) que facilitan enormemente el diagnóstico, por lo que se están implementando para su uso ordinario. Antes de caracterizar un determinado nematodo mediante un marcador molecular apropiado es necesario extraer su ADN, por eso se considera este paso como el más crítico a la hora de aplicar técnicas moleculares (Mansilla *et al.*, 2004). Las herramientas de biología molecular se utilizan con mayor frecuencia para la separación de especies y patotipos de nematodos. Algunas de estas herramientas incluyen la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) con imprimadores específicos (Vejl, Skupinova, Sedlák y Domkárová, 2002).

VII. Análisis molecular de especies de nematodos

Técnica PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es la técnica más comúnmente empleada en biología molecular para la amplificación de ADN, en la cual se lleva a cabo una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN (Berrecil *et al.*, 2015). El procedimiento consiste en realizar ciclos repetitivos de desnaturalización del ADN molde, el alineamiento de dos oligonucleótidos con las secuencias complementarias al ADN de interés y la extensión mediante la acción de una ADN polimerasa (Arredondo, 1993).

El elemento principal en la PCR es el ADN, cuya naturaleza química ofrece ventajas para su manipulación. En la reacción, el templado son las cadenas de ADN que se separan y funcionan como molde para que la enzima sintetice las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco de interés. Por su parte, la ADN polimerasa se encarga de la catálisis de la reacción, sintetizando las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia blanco. Para que la enzima funcione con alta especificidad y la reacción transcurra exitosamente, también se necesita de elementos denominados primers, dNTPs, Mg⁺, buffer y H₂O. (Tamay de Dios, Ibarra y Velasquillo, 2013).

La reacción consta por lo general, de una treintena de ciclos repetitivos conformado cada uno de varios pasos. El primer paso consiste en la ruptura de los puentes de hidrógeno del ADN para desnaturalizarlo, incubándolo a una temperatura de 94°C por un período aproximado de un minuto; en este paso se exponen las bases nitrogenadas del ADN blanco (Rodríguez y Barrera, 2004). La temperatura puede variar significativamente ya que va a depender de la temperatura de recocido de los imprimadores que se estén utilizando. Por último, se utiliza una temperatura de extensión (72°C) en la cual la ADN polimerasa va a producir bandas complementarias a partir de los imprimadores hasta que la polimerización sea interrumpida cuando empieza el segundo ciclo con 94°C (Klug, Cummings & Spencer, 1999).

En el segundo paso se van a generar cuatro bandas simples de ADN de las cuales cada una de ellas se van a unir los imprimadores y al incrementar la temperatura a 72°C, la ADN polimerasa nuevamente comenzará a polimerizar nucleótidos. Dos de las cuatro bandas serán idénticas a las obtenidas en el primer paso por lo que finalizarán la polimerización cuando se inicie un nuevo ciclo, las otras dos bandas lo harán justo donde el imprimador está unido. Los ciclos siguientes generarán cuatro bandas nuevas: dos cortas y dos largas (Klug, Cummings & Spencer, 1999).

La principal ventaja de la técnica de PCR radica en que permite generar millones de copias de la región de interés a partir de una o muy pocas copias del ADN molde. Es una técnica muy robusta debido en gran medida a la gran capacidad de los oligonucleótidos de unirse firme y específicamente a sus secuencias complementarias de ADN discriminado entre centenares de millares de sitios (Serrato, Flores, Aportela y Sierra, s.f).

El desarrollo de esta técnica permite estudiar y manipular mejor al ADN, facilitando el establecimiento de protocolos experimentales en biología molecular. El progreso de esta técnica ha sido muy notable y ha ido en paralelo con los nuevos retos para estudiar y comprender mejor el rol de los genes, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Por ello, difundir los fundamentos de la PCR es un primer paso para conocer una de varias

herramientas tecnológicas con las que se cuenta para el estudio de los ácidos nucleicos (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Secuenciación de ADN

En la doble hélice de ADN, cada una de las cadenas es un polímero integrado por miles o incluso millones de nucleótidos. Cada nucleótido está formado por un azúcar (desoxirribosa), una base nitrogenada que puede ser adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G) y un grupo fosfato (Márquez, Serrato y Cerritos, 2011). Las cuatro bases químicas que forman se unen siempre con la misma pareja para formar “pares de bases”. Por lo tanto, la adenina siempre forma pareja con la timina y la citosina con la guanina. Este emparejamiento es la base para el mecanismo mediante el cual las moléculas de ADN se copian cuando las células se dividen (National Human Genome Research Institute, 2019).

El orden que tienen estos nucleótidos es lo que se denomina secuencia. La secuenciación hace referencia a las técnicas y métodos empleados para determinar dicha secuencia. Conocer el orden de los nucleótidos es una herramienta con una infinidad de aplicaciones porque la diferencia fundamental entre todas las moléculas de ADN que forman el material genético de los seres vivos es precisamente la secuencia de las cuatro bases nitrogenadas (Márquez, Serrato y Cerritos, 2011).

La estrategia básica de la secuenciación de ácidos nucleicos incluye la degradación específica y el fraccionamiento de los polinucleótidos de interés a fragmentos suficientemente pequeños que posteriormente son secuenciados. Por último, involucra el ordenamiento de los fragmentos a través de la repetición de los pasos anteriores, usando un procedimiento de degradación que produce una serie de fragmentos de polinucleótidos que traslapan el punto de corte en la primera serie (Necochea y Canul, 2004).

Análisis filogenético

El fenotipo es la manifestación externa de un genotipo y está condicionada por el efecto del ambiente. Así, las determinaciones fenotípicas requieren de ensayos relativamente complicados para descontar el efecto de este y su interacción con el genotipo. Con el genotipado, y dada la posibilidad que proporciona los marcadores moleculares de comparar un gran número de caracteres homólogos independientes del ambiente, se ha facilitado en gran medida la realización de estudios filogenéticos tanto para delimitar la integridad de las especies y confirmar su estatus taxonómico, como para testar hipótesis evolutivas (López, 2016).

La inferencia filogenética a partir de secuencias de ADN es una forma de establecer las relaciones evolutivas entre organismos. La finalidad del análisis filogenético es producir hipótesis “comprobables” de las relaciones genealógicas entre grupos monofiléticos de organismos. Está basado principalmente en la “descendencia común”, es decir, la genealogía estricta (López y Pérez, 1999). En general, el proceso de análisis filogenético comprende cuatro pasos básicos que normalmente se ejecutan en el siguiente orden: 1) alineación de secuencias, 2) determinación del modelo evolutivo, 3) inferencia del árbol filogenético y 4) evaluación de la robustez de los diferentes grupos (Carranza, 2002).

El árbol filogenético (dendrograma) consta de ramas y nodos que conectan dichas ramas entre sí según su relación ancestro-descendiente. Las ramas terminales corresponden a las secuencias actuales (observadas) y las ramas internas representan sus ancestros hipotéticos. Su longitud refleja la cantidad de cambio acumulado. La rama más interna, el ancestro común, representa la raíz del árbol y es esencial para dotar de un sentido histórico al mismo. Los métodos de reconstrucción filogenética a partir de secuencias producen árboles sin raíz. La forma más recomendable de enraizar un árbol es incluyendo una secuencia externa al grupo de interés que lo dote de polaridad. La elección del grupo externo requiere de información adicional, como la deriva de estudios morfológicos o taxonómicos (Abascal, Irisarri y Zardoya, 2014).

METODOLOGÍA

I. Recolecta de las muestras

Se recolectaron muestras de suelo de la rizosfera de seis cultivos agrícolas distribuidos en la Región Huetar Norte, Región Huetar Atlántica, Región Central, Región Pacífico Central y Región Brunca. Durante la ejecución de la tesis se realizaron varias giras de campo en parcelas dedicadas a la producción de piña, plátano, banano, arroz, cítricos y uva. En la Tabla 1, se detallan los sitios de recolecta así como algunas características de importancia con respecto a latitud, longitud, altitud, temperatura y precipitación.

Tabla 1. Coordenadas geográficas y condiciones climáticas de cada una de las zonas de recolecta de muestras.

Cultivo	Localización	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)	Temperatura (Máx/Mín) °C	Precipitación (mm) anuales
Uva	Pozos, Santa Ana, San José	9°57'27"N	84°11'27"E	863	29/19°C	139
Piña	Pital, San Carlos, Alajuela	10°27'11"N	84°16'40"E	158	25/18°C	341
Cítricos	La Virgen, Los Chiles, Alajuela	10°23'55"N	84°20'19"E	310	32/22°C	149
Banano	La Tigra, Jicaral, Puntarenas	9°58'12"N	85°07'34"E	17	33/22°C	119
Arroz	Paso Canoas, Puntarenas	8°32'10"N	82°50'42"E	130	33/23°C	355
Plátano	Talamanca, Limón	9°39'09"N	82°45'08"E	36	31/22°C	249

Fuente: Boletín “Resúmenes climatológicos”, IMN (2016).

Entre 15 y 20 submuestras fueron recolectadas dependiendo del tamaño y las condiciones de la parcela hasta obtener aproximadamente una muestra de 1-2 kg de suelo. Las submuestras se tomaron con barreno mediante un muestreo sistemático en zig zag entre los 30 cm a 50 cm de profundidad. Posteriormente, las muestras fueron llevadas en una

hielera al laboratorio de Nematología de la UNA, para evitar cambios bruscos de temperatura y para su posterior procesamiento.

II. Extracción y montaje de nematodos

Las muestras de suelo y raíces se procesaron mediante el método de tamizado y centrifugación en solución azucarada (Caveness & Jensen, 1955). Se tomó una submuestra de 100 gramos de suelo la cual se colocó en una cubeta y se lavó directamente a presión bajo un chorro de agua. La suspensión resultante se dejó reposar por 30 segundos y posteriormente, se decantó sobre un juego de tamices de 100 y 400 micras respectivamente. La operación se repitió una vez más con el suelo remanente en la cubeta. El suelo retenido en la criba de 400 micras, fue transferido a un tubo de centrífuga de 50 mL con ayuda de una pizeta y se centrifugó durante 3 minutos a 3000 r.p.m. Se decantó cuidadosamente el sobrenadante y se agregó una solución de azúcar (484 g/L) el cual se agitó vigorosamente. Posteriormente, se volvió a centrifugar durante 30 segundos más.

El sobrenadante se hizo pasar por una criba de 500 micras y se lavó con suficiente agua para eliminar el exceso de azúcar adherida a los nematodos y así evitar la plasmolización, es decir, que el nematodo perdiera sustancias de su contenido al medio y se arrugara. Los nematodos recuperados fueron transferidos a un plato de conteo o siracusa para su observación y conteo. Posteriormente, los nematodos se fijaron en formaldehído al 4% a 70°C y se infiltraron con glicerina anhidra utilizando el método modificado rápido de Seinhorst (Seinhorst 1959; Seinhorst, 1962). A continuación, los nematodos se montaron en láminas permanentes de Cobb mediante la técnica de anillo de parafina (s'Jacob & van Bezooijen 1984) para su observación y preservación. Todas las láminas elaboradas, se depositaron en la colección de nematodos del Laboratorio de Nematología de la Escuela de Ciencias Agrarias de la UNA.

III. Identificación morfológica y morfométrica

La observación de hembras y machos se realizó en un microscopio Nikon eclipse 80i y los datos morfométricos se mostraron en μm con un micrómetro ocular a 40x y 100x de magnificación.

En el caso de las hembras, se tomaron en cuenta los siguientes criterios: Longitud total del nematodo, anchura máxima del cuerpo, longitud de la faringe, longitud del estilete, longitud del cono, longitud de la cola, anchura y altura de la región labial, longitud del poro excretor, diámetro del cuerpo anal, número de anillos en la cola, posición del fasmidio, ancho del cordón lateral, entre otros. Con respecto a los machos, se tomaron en cuenta los siguientes criterios: Longitud total del nematodo, anchura máxima del cuerpo, longitud de la faringe, longitud del estilete, longitud del cono, longitud de la cola, anchura y altura de la región labial, longitud del poro excretor, ancho del cordón lateral, longitud de la espícula y longitud del gubernáculo. Además de las medidas se calcularon los siguientes ratios de deMan: a: longitud del cuerpo/anchura del cuerpo, b: longitud del cuerpo/ longitud del esófago, c: longitud del cuerpo/ longitud de la cola, c': longitud del cuerpo/ anchura del cuerpo a la altura del ano, V%: distancia extremo anterior a la vulva /longitud del cuerpo.

De los datos obtenidos de las mediciones anteriores se realizó un análisis estadístico descriptivo en el que se obtuvo el promedio, desviación estándar, datos máximos y mínimos de cada población de nematodos perteneciente a cada sitio muestreado. La combinación entre los diferentes métodos (taxonómicos y moleculares) permitió la correcta identificación de cada una de las especies y permitió agrupar o separar las especies de *Helicotylenchus* según el cultivo y región de procedencia.

IV. Identificación molecular

Extracción de ADN, PCR y secuenciación

Se utilizaron alrededor de 10 individuos de *Helicotylenhus* de cada cultivo muestreado, los cuales fueron colocados en un contador para nematodos y observados bajo un microscopio invertido (Olympus® CK30-F100). Cada nematodo fue transferido con una microaguja a un tubo de microcentrifuga de 0,2 ml con 47 µl de M Tris-HCL pH. 8.0 (2.0 M) y 3 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Se colocó cada tubo en un baño ultrasónico (Branson 2510 ultrasónico, Branson Ultrasonidos) con agua destilada y se incubó durante 10 minutos a 60 °C. Seguidamente, se incubó durante 30 minutos a 60 °C en un termociclador y después se mezcló en un agitador tipo vórtex. Posteriormente, se incubó a -20°C durante 15 minutos, a 90°C durante 10 minutos y se agitó en el vórtex. Se incubó 15 minutos a -20°C y por última vez a 90°C durante 10 minutos. Finalmente, se centrifugó cada tubo (correspondiente a la población de cada uno de los cultivos en estudio) por 2 minutos a 2000 rpm y se procedió a tomar 45 µl de la suspensión de ADN resultante de cada tubo, el cual se transfirió a un nuevo tubo de microcentrifuga para ser almacenado a -20°C (Solano, Beacham, Thomas, Steinberger & Hanson, 2013).

Por medio de la PCR se amplificó el dominio D2-D3 de la región 28S del ADN ribosomal (ADNr) con los cebadores D2A (5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3') y D3B (5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3') (Castillo *et al.*, 2003; He *et al.*, 2005; Palomares-Rius *et al.*, 2008). Además, se amplificó la región ITS entre los genes ribosomales nucleares con los cebadores TW81 (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') y AB28 (5'-ACGAGCCGAGTGATCCACCG-3') (Subbotin *et al.*, 2015).

Los productos de PCR se purificaron previos a la secuenciación con el kit ExoSAP-IT (Affmetrix, productos USB) y la cuantificación del ADN se realizó por medio de un espectrofotómetro Nanodrop (Nanodrop Technologies, Wilmington, USA). La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador multicapilar de ADN (analizador genético Modelo 3130XL; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando el BigDye

Terminator Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystems®). Las secuencias se editaron y se alinearon con el programa BioEdit v. 7.2.5 (Hall, 1999) y se ensamblaron con el programa seqmanPRO v.9.0. Cada secuencia se comparó con otras secuencias reportadas para especies de *Helicotylenchus* depositadas en el GenBank® y se calcularon los porcentajes de similitud y divergencia entre ellas. Cada secuencia obtenida en este estudio se incorporó a la base de datos del GenBank®.

El análisis filogenético

Para los análisis filogenéticos se utilizaron las secuencias de las regiones 28S e ITS del ADNr de las diferentes especies de *Helicotylenchus* reportadas en el GenBank. Los taxones y grupos externos que se utilizaron para analizar las secuencias de los segmentos de expansión D2-D3 de la región 28S del ADNr fueron los mismos que utilizaron Subbotin *et al.* (2008) y Palomares-Ruis *et al.* (2014). En el caso de la región ITS, se utilizó la especie *Nacobbus aberrans* como grupo externo para esta filogenia. Se hicieron alineamientos múltiples con las secuencias de los diferentes genes con el programa MAFFT v.7.205 con parámetros ya establecidos (Kato y Standley, 2013). Los análisis filogenéticos se realizaron basados en el criterio de Inferencia Bayesiana (IB) (Schwarz, 1978) por medio del programa MrBayes v.3.1.2 (Huelsenbeck y Ronquist, 2003). Se obtuvo el mejor modelo de sustitución de nucleótidos (modelo de evolución de ADN) para generar los árboles con el programa jModelTest v.2.1.7 (Darriba *et al.*, 2012). Por último, se utilizó el programa Tree View v. 2017 (Page 1996) con 1000 reemplazos para generar los árboles filogenéticos según los modelos de sustitución con mayor probabilidad para cada alineamiento.

Con los resultados moleculares, se establecieron relaciones filogenéticas entre las especies identificadas a partir de los dos marcadores moleculares utilizando los métodos de Inferencia Bayesiana (IB). Se espera que los árboles filogenéticos generados muestren nodos con bajo o bien, alto soporte y formación de clados entre las especies identificadas lo que a su vez determinará si existe una relación o no cercana entre las especies en estudio. Finalmente, la información molecular se comparó con la morfológica y morfométrica para obtener una correcta identificación de cada especie encontrada en cada cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El uso de distintas técnicas de identificación (morfológicas, morfométricas y moleculares), permitió conocer y caracterizar, las principales especies de *Helicotylenchus* asociadas a seis cultivos agrícolas de Costa Rica. La especie *Helicotylenchus dihystra*, se encontró en una finca dedicada a la producción de uva en la localidad de Pozos de Santa Ana, en la provincia de San José. Asimismo, esta especie se identificó asociada al cultivo de piña en una plantación localizada en Pital de San Carlos y al cultivo de cítricos en una finca orgánica ubicada en La Virgen de Los Chiles, ambas localidades pertenecientes a la provincia de Alajuela. Además, esta especie se encontró asociada a una plantación de plátano ubicada en Talamanca, provincia de Limón. La especie *H. multicinctus*, se encontró en una parcela dedicada al cultivo de banano localizada en La Tigra de Jicaral, provincia de Puntarenas. Finalmente, mediante las técnicas empleadas se logró identificar únicamente a nivel de género a *Helicotylenchus* sp. asociada a una plantación de arroz ubicada en Paso Canoas en la provincia de Puntarenas.

I. Caracterización morfológica y morfométrica.

En cuanto al análisis morfométrico, se tomaron 20 hembras en cada uno de los cultivos y de 10 machos en aquellos cultivos donde se presentaron especímenes de este género. A partir de dichas muestras, se tomaron las respectivas mediciones basadas en los parámetros mencionados anteriormente en la metodología. Se realizó un total de 2760 mediciones de acuerdo con los parámetros a tomar en cuenta para las hembras y un total de 400 mediciones en el caso de los machos, para un total de 3160 mediciones. Con los datos obtenidos se obtuvo el promedio, desviación estándar y mínimos y máximos de cada uno de los criterios de estudio, lo que facilitó la elaboración de un análisis estadístico de carácter descriptivo.

Los datos para cada uno de los parámetros de medición obtenidos en esta investigación coincidieron con las medidas para especies de *Helicotylenchus* reportadas por otras investigaciones. No obstante, se observó que algunas de las mediciones de cada una de

las poblaciones en estudio presentaron variaciones, dando como resultado datos mayores o menores con respecto a los valores morfométricos descritos y establecidos para la especie. De acuerdo con Peraza *et al* (2013) es común encontrar variabilidad o superposición de medidas en los parámetros morfométricos dentro de una misma especie y estas diferencias están ligadas a factores ambientales que influyen directamente con el desarrollo de individuos de una misma población. Asimismo, Castillo (2014) menciona que la morfometría puede llegar a ser muy diferente dentro de ejemplares de una misma población debido a la variación intraespecífica.

Las especies identificadas en cada uno de los cultivos muestreados, así como los datos obtenidos a partir de las mediciones llevadas a cabo en hembras y machos de cada población, se muestran a continuación.

Helicotylenchus dihystra

(Cobb, 1893)

Cultivo: Piña

Medidas: Tabla 2

Descripción: Figura 1

Hembra

Longitud del cuerpo varió de 501 a 727,8 μm , ancho máximo del cuerpo de 20,5 a 24,6 μm . Medidas del labio de 3,3 a 3,9 μm de altura y 5,9 a 7,2 μm de diámetro. El estilete presentó una longitud de 21,7 a 23,7 μm , el cono con una longitud de 9,4 a 11,5 μm y un DGO de 12,1 a 17,8 μm . La longitud del poro excretor fue de 87,2 a 129,2 μm , la longitud de la faringe de 128,4 a 157,2 μm y un MB de 43,5 a 58,4 μm . Campo lateral con 4 líneas y un ancho de 4,3 a 5,9 μm . Porcentaje de vulva de 61,9 a 66,7% con respecto a la longitud del cuerpo. Diámetro del cuerpo anal mostró una longitud de 10,9 a 14,5 μm . Altura de la cola

de 10,1 a 15,7 μm , la posición del fasmidio de 5,2 a 8,1 μm con respecto a la cola. Longitud de la proyección ventral de 3,1 a 5,8 μm y de 8 a 11 anulaciones desde la abertura anal hasta la cola.

Macho

En este estudio no se encontraron especímenes.

Helicotylenchus dihystra

(Cobb, 1893)

Cultivo: Cítricos

Medidas: Tabla 2

Descripción: Figura 2

Hembra

Longitud del cuerpo varió de 589,4 a 817,6 μm , con ancho máximo del cuerpo de 20,3 a 26,6 μm . Medidas del labio de 3,3 a 3,9 μm de altura y 6,3 a 6,9 μm de diámetro. El estilete presentó una longitud de 22,5 a 24 μm , el cono con una longitud de 11 a 12,5 μm y un DGO de 11,6 a 15,1 μm . Longitud del poro excretor de 100,7 a 124,9 μm , la longitud de la faringe fue de 130,8 a 164,1 μm y un MB de 43 a 58,5 μm . Campo lateral con 4 líneas y un ancho de 4,3 a 5,6 μm . Porcentaje de vulva de 61,4 a 66,2% con respecto a la longitud total del cuerpo. Diámetro del cuerpo anal mostró una longitud de 11,8 a 16,6 μm . La cola mostró una altura de 12,3 a 17,7 μm , fasmidio posicionado de 4 a 5,6 μm con respecto a la cola. Longitud de la proyección ventral de 4,3 a 5,6 μm y de 9 a 10 anulaciones desde la abertura anal hasta la cola.

Macho

No se encontraron especímenes en el presente estudio.

Helicotylenchus dihystra

(Cobb, 1893)

Cultivo: Uva

Medidas: Tabla 2

Descripción: Figura 3

Hembra

Longitud del cuerpo de 515,6 a 722,9 μm , ancho máximo del cuerpo de 20,2 a 25,5 μm . Labio con altura de 3,2 a 3,9 μm y 6,1 a 7 μm de diámetro. Longitud del estilete de 21,2 a 24,9 μm , el cono con una longitud de 10,5 a 11,8 μm y un DGO de 11,2 a 16,9 μm . El poro excretor mostró una longitud de 90,1 a 126,6 μm , faringe de 133,6 a 167,7 de longitud μm y un MB de 48,3 a 56 μm . Campo lateral con 4 líneas y un ancho de 4,4 a 5,7 μm . Porcentaje de vulva de 59,1 a 65,8% con respecto a la longitud del cuerpo. Diámetro del cuerpo anal de 12,2 a 16,3 μm . Altura de la cola de 12,6 a 18,8 μm , posición del fasmidio de 4 a 5,5 μm con respecto a la cola. Longitud de la proyección ventral de 2,1 a 3,7 μm y de 8 a 11 anulaciones desde la abertura anal hasta la cola.

Macho

No se encontraron machos.

Helicotylenchus dihystra

(Cobb, 1893)

Cultivo: Plátano

Medidas: Tabla 2

Descripción: Figura 4

Hembra

Longitud del cuerpo de 451,8 a 675,2 μm , ancho máximo del cuerpo de 18,3 a 23,7 μm . Labio con altura de 3,1 a 3,9 μm y 5,9 a 6,8 μm de diámetro. Longitud del estilete de 20,2 a 23,7 μm , el cono con una longitud de 9,4 a 11,7 μm y un DGO de 9,2 a 13 μm . El poro excretor mostró una longitud de 81,6 a 118,6 μm , faringe de 122,5 a 159,7 de longitud μm y un MB de 39,6 a 55,3 μm . Campo lateral con 4 líneas y un ancho de 4,4 a 5,6 μm . Porcentaje de vulva de 61,4 a 69% con respecto a la longitud del cuerpo. Diámetro del cuerpo anal de 10,4 a 15 μm . Altura de la cola de 11 a 17,9 μm , posición del fasmidio de 3,6 a 5,2 μm con respecto a la cola. Longitud de la proyección ventral de 2,2 a 3,5 μm y de 9 a 12 anulaciones desde la abertura anal hasta la cola.

Macho

Longitud del cuerpo varió de 402 a 655,3 μm , ancho máximo del cuerpo de 16,1 a 19,5 μm . Labio con altura de 3,4 a 4 μm y 5,3 a 6,3 μm de diámetro. Longitud del estilete de 15,4 a 17,8 μm , el cono con una longitud de 8,3 a 10,3 y un DGO de 9,7 a 14,6 μm . El poro excretor mostró una longitud de 76 a 95,9 μm , faringe de 116,7 a 152,1 de longitud μm y un MB de 47,1 a 66 μm . Campo lateral con 4 líneas y un ancho de 3,9 a 4,7 μm . Altura de la cola de 14,6 a 18,6 μm . Con espícula de 16,8 a 19,9 μm y gubernáculo de 4,5 a 5,8 μm .

Diagnóstico

Cuerpo en forma de espiral muy variable, desde abierta a muy cerrada; en algunas ocasiones, cuerpo casi recto en la parte anterior. Región cefálica hemisférica, conformada por 4-5 anillos. Presencia de 4 líneas longitudinales que se fusionan formando una V o Y en la cola; campos laterales areolados en la región faríngea. Protuberancias basales del estilete proyectadas ligeramente hacia la parte anterior. Espermatecas diferenciadas y sin espermatozoides. Fasmidios ubicados 10-12 anillos antes del ano. Cola curvada dorsalmente con una ligera proyección ventral, no bien definida (Crozzoli, 2014).

Tipo de hospedante y localidad

La especie *H. dihystra* se encontró en suelos en el cultivo de piña, ubicado en Pital de San Carlos, Alajuela, cítricos en la localidad de La Virgen de Los Chiles, Alajuela, en el cultivo de uva en la zona de Pozos de Santa Ana, San José y plátano en la localidad de Talamanca, Limón.

Otros hospedantes y localidades

Esta especie se considera cosmopolita (Crozzoli, 2002) y fue descrita originalmente en Australia donde se encontró asociada a la caña de azúcar (Stirling, Halpin & Bell, 2011; Crozzoli, 2014). No obstante, ha sido reportada en los cultivos de melocotón, pera, manzana, tabaco (Escuer y Palomo, 1991; Espárrago y Navas, 1995), cítricos (Valcarce, 2015) y Olivo (Nico, 2002) en España. En Egipto se encuentra en asocio con los cultivos de anona, remolacha, repollo, naranja agria, toronja, malanga, algodón, mango, olivo, almendro, caña de azúcar, tomate, berenjena y uva (Ibrahim, Mokbel & Handoo, 2010). En Estados Unidos se encuentra asociada a banano (Brooks, 2004), frijol, ornamentales (Vargas & Rodríguez, 2001) y pastos (Subbotin *et al.*, 2011; Cassida *et al.*, 2005). Se ha reportado, además, en el cultivo de maracuyá en Nueva Zelanda (Knight, 2001), en uva y maíz en Eslovenia (Urek, Širca & Karssen, 2003), plátano en Nigeria (Coyne *et al.*, 2005), guayaba en Sudáfrica (Berry, Dana, Spaul & Cadet, 2009), en India en frijol, marañón (Sharma & Bhatia, 2002;

Bhattacharya, Dasgupta & Mukherjee, 2012) y banano (Jonathan, Raguchander, Zareena & Sundaramoorthy, 2009).

En Venezuela se encontró asociada a piña, mango (Gandarilla, Rivas y Fernández, 2014), frutales, ciruela, tamarindo (Castellano, Lugo, Casassa, Pérez y Núñez, 2014), guayaba, ají, café, cebolla, maíz, mandarina, melón, hortalizas, chile, tomate, pimienta, yuca (Castellano *et al.*, 2012; Lugo, Crozzoli, Perichi, Medina y Castellano, 2007; Lugo, Crozzoli, Greco, Perichi y Fernández, 2010), uva (Jiménez, Jiménez, Crozzoli y Casanova, 2012), banano, caña de azúcar y papa (Crozzoli, 2014; Jiménez, Crozzoli y Greco, 2007). En Brasil ha sido reportada en los cultivos de piña (Hernández, s.f), caña de azúcar (Orsini *et al.*, 2010; De Moura, 2005), banano (Lima *et al.*, 2013), ñame (De Moura, Santana & Rubens, 2005), marañón (Gandarilla, Rivas y Fernández, 2014). Asimismo, se reporta en maracuyá y pitahaya en Colombia (Ortiz, Guzmán y Ocampo, 2012; Guzmán, 2011) y en frijol, frambuesa y soya en Chile (SAG, 2005). En Cuba, se encuentra asociada al cultivo de hortalizas: pepino, tomate y chile (Fernández *et al.*, 2015), plátano (Almarales, Martín y Leresma, 2014), caña de azúcar (Peña *et al.*, 2018), palma (Li-Hung, Gandarilla y Reyes, 2011), coco, fresa, guayaba (Gandarilla, Rivas y Fernández, 2014) y ornamentales (Gandarilla y Fernández, 2002). En Guatemala se reporta asociada al cultivo de cebolla (Morales, 2017).

Tabla 2. Comparación de medidas morfométricas de hembras para la especie *Helicotylenchus dihystra* en estudio y las de la población original descrita por Cobb (1893). Localidades: Pital de San Carlos, La Virgen de Los Chiles, Pozos de Santa Ana y Talamanca. Región Huetar Norte, Región Central y Región Huetar Atlántica, Costa Rica. 2018.

Hospedero	Piña (<i>Ananas comosus</i>) Hembras (µm)	Cítricos (<i>Citrus</i> sp.) Hembras (µm)	Uva (<i>Vitis vinifera</i>) Hembras (µm)
N°	20	20	20
L	633,6±56,1 (501,0-727,8)	671,9±64,0 (589,4-817,6)	607,6±63,1 (515,6-722,9)
a	28,1±2,5 (22,6-34,5)	30,0±1,6 (28,1-34,5)	26,4±2,2 (22,2-30,9)
b	12,6±1,8 (9,8-16,3)	12,7±1,1 (10,9-15,6)	11,7±1,2 (9,6-14,1)
b'	4,3±0,3 (22,6-34,5)	4,5±0,3 (3,9-5,0)	4,1±0,3(3,4-4,5)
c	50,0±4,6 (39,7-56,4)	49,2±2,6 (42,9-52,9)	42,1±4,0 (34,7-50,0)
c'	0,9±0,1 (0,8-1,1)	1,0±0,1 (0,8-1,1)	1,0±0,1 (0,8-1,2)
V	64,0±1,4 (61,9-66,7)	63,3±1,3 (61,4-66,2)	63,2±1,8 (59,1-65,8)
Altura labio	3,6±0,2 (3,3-3,9)	3,6±0,2 (3,3-3,9)	3,6±0,2 (3,2-3,9)
Diámetro labio	6,7±0,3 (5,9-7,2)	6,5±0,2 (6,3-6,9)	6,6±0,2 (6,1-7,0)
Longitud estilete	22,8±0,5 (21,7-23,7)	23,2±0,4 (22,5-24,0)	22,8±1,0 (21,2-24,9)
Longitud cono	10,5±0,6 (9,4-11,5)	11,7±0,4 (11,0-12,5)	11,1±0,4 (10,5-11,8)
DGO	15,4±1,3 (12,1-17,8)	13,0±0,8 (11,6-15,1)	13,7±1,7 (11,2-16,9)
Longitud poro excretor	109,2±9,6 (87,2-129,2)	111,3±6,8 (100,7-124,9)	105,7±9,4 (90,1-126,6)
Longitud faringe	146,7±8,4 (128,4-157,2)	150,7±8,3 (130,8-164,1)	147,8±9,5 (133,6-167,7)
MB	50,6±4,4 (43,5-58,4)	53,2±3,7 (43,0-58,5)	52,2±2,4 (48,3-56,0)
Diámetro máx. cuerpo	22,6±1,2 (20,5-24,6)	22,4±1,8 (20,3-26,6)	23,1±1,7 (20,2-25,5)
Ancho campo lateral	5,1±0,5 (4,3-5,9)	5,2±0,3 (4,3-5,6)	5,2±0,4 (4,4-5,7)
Altura cola	13,8±1,4 (10,1-15,7)	14,4±1,4 (12,3-17,7)	15,2±1,9 (12,6-18,8)
Diámetro cuerpo anal	12,7±1,0 (10,9-14,5)	13,7±1,3 (11,8-16,6)	14,5±1,0 (12,2-16,3)
Longitud proyección ventral	4,5±0,8 (3,1-5,8)	3,0±0,3 (4,3-5,6)	3,1±0,5 (2,1-3,7)
N° anulaciones cola	9,7±0,9 (8,0-11,0)	9,3± 0,5 (9,0-10,0)	9,3±1,2 (8,0-11,0)
Posición fasmidio	6,5±0,9 (5,2-8,1)	4,8±0,5 (4,0-5,6)	4,9±0,4 (4,0-5,5)
Espícula	---	---	---
Gubernáculo	---	---	---

L: Longitud total del cuerpo. **A:** L/diámetro máx. cuerpo. **B:** L/MB. **b':** L/Longitud de la faringe. **C:** L/Diámetro del cuerpo anal. **c':** Diámetro del cuerpo anal/Altura de la cola. **V:** Porcentaje de vulva. **Diámetro del labio:** ancho del labio. **Longitud del estilete:** Desde la base de los nódulos hasta la parte anterior del estilete. **Longitud del cono:** Longitud desde la base del cono (en el estilete) hasta el labio. **DGO:** Longitud de la base de los nódulos hasta el orificio de la glándula dorsal. **Longitud del poro excretor:** Longitud desde la apertura del poro excretor hasta la cabeza. **Longitud de la faringe:** Desde el final de la faringe hasta la cabeza. **MB:** Longitud desde el bulbo medio hasta la cabeza. **Diámetro máximo del cuerpo:** Ancho total del cuerpo. **Ancho campo lateral:** Ancho de las líneas transversales. **Altura de la cola:** Desde la apertura del ano hasta el final de la cola. **Diámetro del cuerpo anal:** A partir de la apertura de la cola. **Longitud proyección ventral:** Longitud desde la cola hasta el final de la proyección de la cola. **Número de anulaciones de la cola:** Número de anulaciones desde la apertura del ano hasta el final de la cola. **Posición del fasmidio:** Longitud desde el fasmidio hasta el final de la cola.

*Medidas estimadas a partir de la Figura 9 de la descripción original para la población tipo, Cobb 1893; Sher 1961

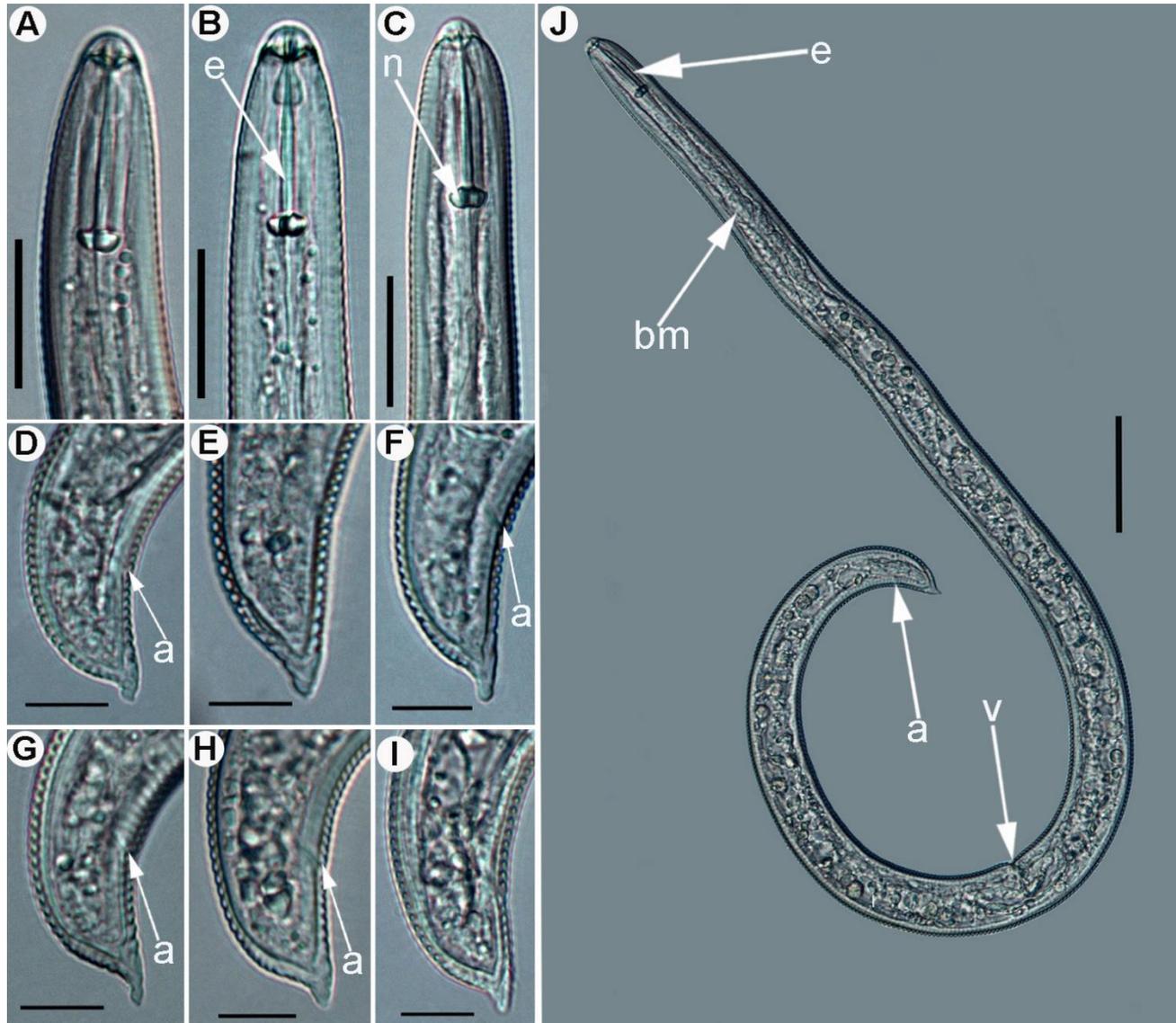


Figura 1. Fotomicrografías de la especie *H. dihystra* identificada en piña de Pital, San Carlos, Alajuela. A, B, C. Región anterior de hembras mostrando el estilete (e) y los nódulos (n). D, E, F, G, H I. Región posterior de hembras mostrando el ano (a). J. Hembra completa mostrando el estilete (e), el bulbo medio (bm), la vulva (v) y el ano (a). Escalas A, B, C, D, E, F, G, H, I: 20 μ m. J: 50 μ m.

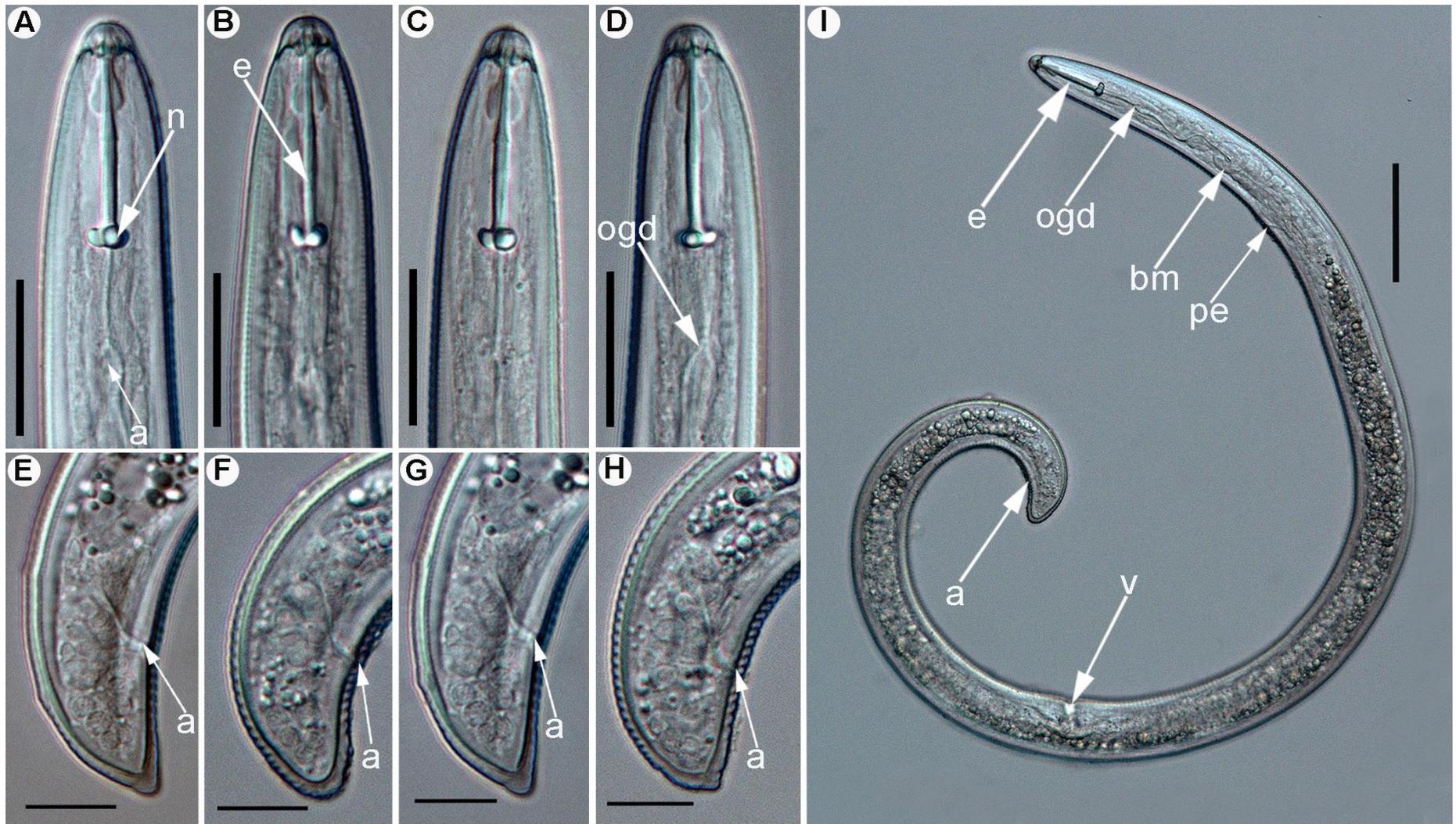


Figura 2. Fotomicrografías de la especie *H. dihystra* identificada en cítricos de La Virgen de los Chiles, Alajuela. A, B, C y D. Región anterior de hembras mostrando nódulos (n), el estilete (e) y el orificio de la glándula dorsal (ogd). E, F, G, H. Región posterior de hembras mostrando el ano (a). I. Hembra completa mostrando el estilete (e), el orificio de la glándula dorsal (ogd), el bulbo medio (bm), el poro excretor (pe), la vulva (v) y el ano (a). Escalas A, B, C, D, E, F, G: 20 μ m. I: 50 μ m.

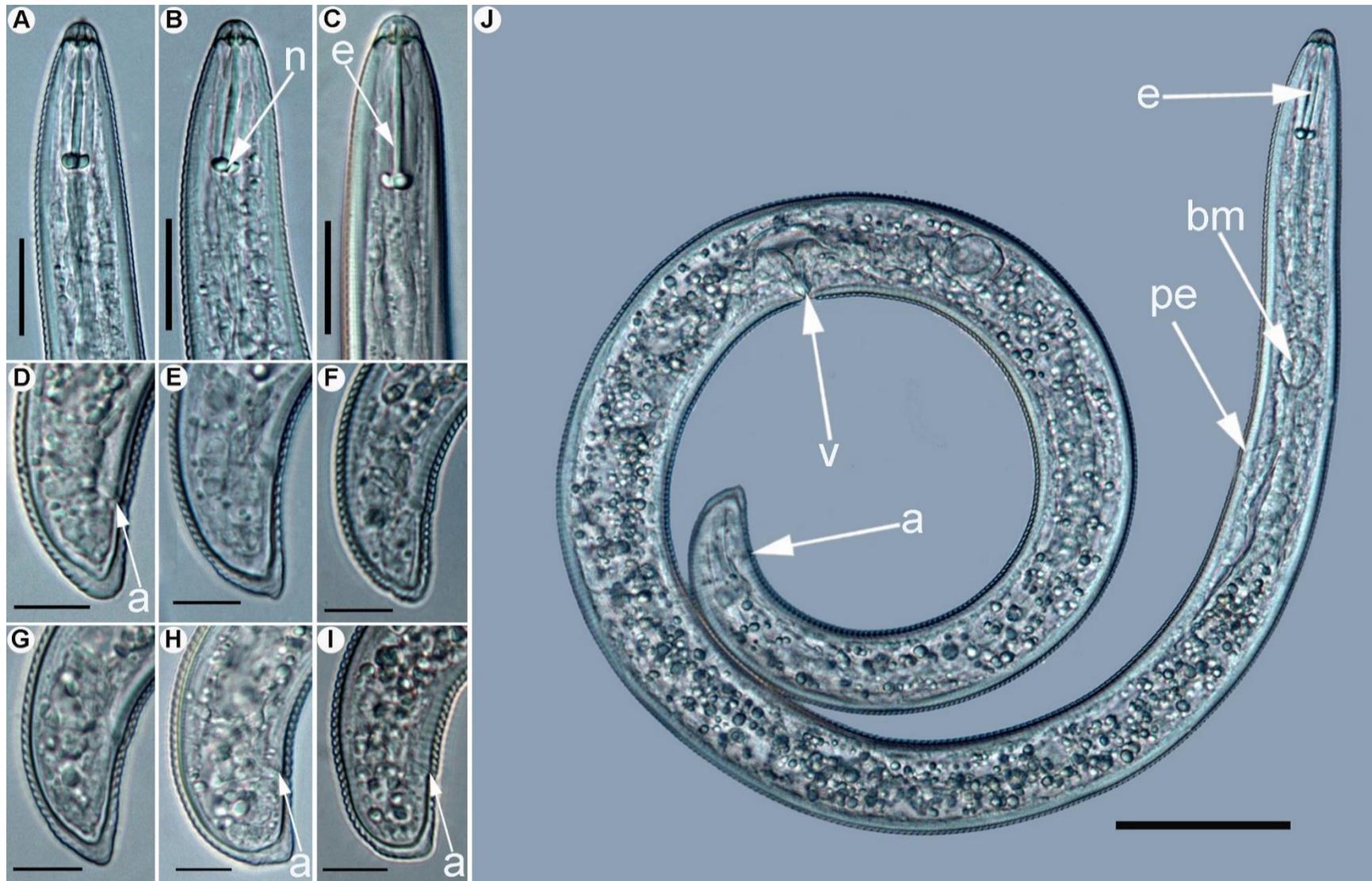


Figura 3. Fotomicrografías de la especie *H. dihystra* identificada en uva de Pozos de Santa Ana, San José. A, B, C. Región anterior de hembras mostrando los nódulos (n) y el estilete (e). D, E, F, G, H, I. Región posterior de hembras mostrando el ano (a). J. Hembra completa mostrando el estilete (e), el bulbo medio (bm), el poro excretor (pe), la vulva (v) y el ano (a). Escalas A, B, C, D, E, F, G, H, I: 20 μ m. J: 50 μ m).

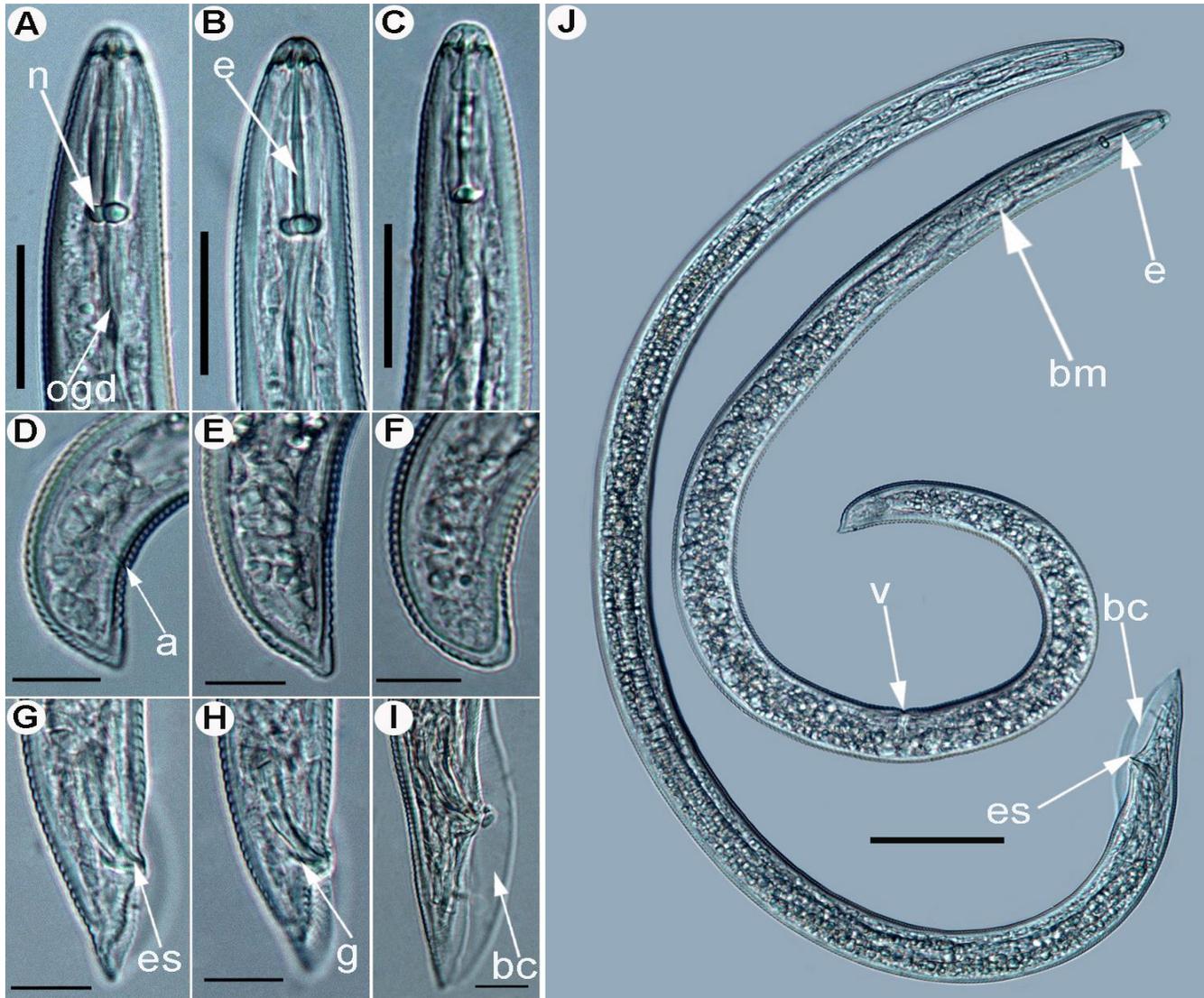


Figura 4. Fotomicrografías de la especie *H. dihystra* identificada en plátano de Talamanca, Limón. A, B, C. Región anterior de hembras mostrando los nódulos (n), el orificio de la glándula dorsal (ogd) y el estilete (e), y D, E, F. Región posterior de hembras mostrando el ano (a). G, H I. Región posterior de machos mostrando la espícula (es), el gubernáculo (g) y la bursa copulatória (bc). J. Hembra y macho completo. Hembra mostrando el estilete (e), el bulbo medio (bm) y la vulva (v). Macho mostrando la espícula (es) y la bursa copulatória (bc). Escalas A, B, C, D, E, F, G, H, I: 20 µm. J: 50 µm).

Los resultados obtenidos a partir del análisis morfométrico de las poblaciones en estudio para la especie *H. dihystra* asociada a los cultivos de piña en Pital de San Carlos, cítricos en Los Chiles, uva en Santa Ana y plátano en Paso Canoas, permitieron realizar una comparación descriptiva entre las medidas morfométricas obtenidas en la presente investigación y las descritas por Cobb (1893) para la población tipo, Fortuner (1984) y los estudios realizados por Crozzoli (2014) en Venezuela.

Las medidas morfométricas obtenidas en el presente estudio presentaron similitud y/o concordancia con las descritas originalmente por Cobb (1893) para las hembras de *H. dihystra*. En el caso de la longitud del nematodo presentó un rango de 610,0-860,0 μm , porcentaje de vulva entre 60,0-66,0%, longitud del estilete de 24,5 a 27,5 μm , diámetro del labio 6,32 μm , medida de DGO de aproximadamente 14,21 μm , cono con 9,7 μm de longitud, poro excretor con 126,66 μm de largo, longitud de faringe de 143,33 μm , ancho del campo lateral (líneas transversales) de 5,29 μm , altura cola (12,94 μm), diámetro del cuerpo anal 11,76 μm , de 6 a 12 anulaciones en la cola, longitud de la proyección ventral de 4,71 μm y posición del fasmidio de 5,88 μm . Asimismo, también coincidieron las medidas de los radios a, b', c y c', exceptuando el radio b, el cual presentó una medida por encima de los 5,1 a 6,4 μm de la población tipo, esto último también se presentó en la medida de la altura del labio, la cual fue mayor a los 2,37 μm .

Las medidas correspondientes a los machos de *H. dihystra* de la población en estudio, presentaron valores similares (o aproximados) a los descritos en la población tipo: longitud del nematodo de 590 a 650 μm , longitud del estilete de 22 a 27 μm , espícula de 20-23 μm y gubernáculo de 7-8 μm , el cual es evidentemente mayor en la población tipo. Los radios a (25-32 μm), b' (4,2-4,9 μm) y c (31-33 μm) también presentaron concordancia. Cabe destacar que, según Muller, Gooch, Siddiqi & Hunt (1977), los machos en esta especie son extremadamente raros de encontrar y no son esenciales para la reproducción.

Fortuner (1984) menciona que *H. dihystra* (junto a *H. pseudorobustus*) es una de las especies que mejor representa al género *Helicotylenchus*, debido a que sus medidas morfométricas se encuentran dentro del rango promedio establecido, en comparación con

otras especies del mismo género. En otras palabras, *H. dihystra* es considerada la especie tipo del género *Helicotylenchus*.

Este nematodo se considera ectoparásito (semiendoparásito); no obstante, puede comportarse como endoparásito migratorio, completando su ciclo en la raíz (Carvajal, 2009). Es una de las especies más comunes en cultivos en el mundo, generalmente lesiona la superficie de las raíces y dependiendo de la succulencia de las mismas, puede penetrar completamente en el tejido cortical. Sin embargo, solo se ha comprobado su patogenicidad en el cultivo de caña de azúcar (causa deformaciones radicales y retraso en el crecimiento de la planta). En el cultivo de olivo induce lesiones necróticas en la parte externa de la zona cortical y en guayaba, reduce la altura de la planta y el tamaño de las hojas (Lugo, Crozzoli, Perichi, Medina y Castellano, 2007; Crozzoli, 2014).

En cuanto a los cultivos en estudio, *H. dihystra* puede influir en los rendimientos y la calidad de la piña cuando se encuentra en altas densidades junto a otros géneros y especies como *P. brachyurus*, *M. incognita* y *R. reniformes*. Afecta el sistema radical de la planta, destruye los pelos radicales y las raíces secundarias, lo que conduce a la formación de un sistema radical pobremente desarrollado con poco anclaje y poca capacidad de absorción de agua y nutrientes. Todo esto se traduce a un deterioro general de la planta, manifestándose en una marcada reducción de la tasa de crecimiento, poca emergencia de hijos y disminución del tamaño y peso del fruto (Vera, Maicelo, Guevara y Oliva, 2017). Esta especie ocasiona un deterioro progresivo de la raíz de plátano, lo que provoca pérdida de vigor, reducción de la longevidad y disminución del rendimiento de la planta (Guzmán, 2011; Chandra, Balamohan, Poormina, Velalazan & Seenivasan, 2014). En los cultivos de uva y de cítricos no existen estudios relacionados con la posible patogenicidad de *H. dihystra* (Jiménez, Jiménez, Crozzoli y Casanova, 2012).

Helicotylenchus multicinctus

(Cobb, 1893)

Cultivo: Banano

Medidas: Tabla 3

Descripción: Figura 5

Hembra

Longitud del cuerpo varió de 342 a 495,2 μm , ancho máximo del cuerpo de 15,4 a 19,5 μm . Medidas del labio de 3,0 a 3,9 μm de altura y 5,7 a 6,6 μm de diámetro. El estilete presentó una longitud de 19,1 a 22,2 μm , el cono con una longitud de 8,1 a 13,8 μm y un DGO de 7,1 a 9,0 μm . La longitud del poro excretor fue de 56,9 a 89,3 μm , la longitud de la faringe de 101,1 a 125,4 μm y un MB de 40,2 a 52,2 μm . Campo lateral con 4 líneas y un ancho de 3,9 a 4,4 μm . Porcentaje de vulva de 64,1 a 70,3% con respecto a la longitud del cuerpo. Diámetro del cuerpo anal mostró una longitud de 9,3 a 13,5 μm . Altura de la cola de 8,6 a 12,8 μm , la posición del fasmidio de 3,7 a 4,9 μm con respecto a la cola. Longitud de la proyección ventral de 1,4 a 2,7 μm y de 9 a 11 anulaciones desde la abertura anal hasta la cola.

Macho

En el caso de esta especie, si se encontraron machos y la longitud del cuerpo varió de 466, a 459,6 μm , ancho máximo del cuerpo de 14,3 a 16,2 μm . Labio con altura de 2,1 a 3 μm y 5,2 a 6,3 μm de diámetro. Longitud del estilete de 17,2 a 19,1 μm , el cono con una longitud de 8,4 a 9,9 μm y un DGO de 6,5 a 7,9 μm . El poro excretor mostró una longitud de 58,5 a 88,1 μm , faringe de 100,0 a 115,3 de longitud μm y un MB de 40,3 a 52 μm . Campo lateral con 4 líneas y un ancho de 3,9 a 4,4 μm . Altura de la cola de 11 a 15,1 μm . Con espícula de 16,1 a 18 μm y gubernáculo de 3,2 a 3,9 μm .

Diagnóstico

Cuerpo arqueado con forma de C, anulaciones distintivas en la mitad del cuerpo, campos laterales no areolados con 4 incisuras, región labial hemisférica y ligeramente compensada, marco cefálico fuertemente esclerotizado. Tubo guía del estilete prominente y bulboso, estilete con nódulos basales prominentes (Siddiqi, 1973), poro excretor en la base de la región faríngea. Espermateca con espermatozoides. Fasmidios ubicados de 2-3 anillos antes del ano, cola con terminación hemisférica de 6 a 13 anillos de largo. Macho similar a la hembra, con testículo sencillo extendido, espermatozoides pequeños y redondos, bursa caudal corta y con bordes dentados (Crozzoli, 2014).

Tipo de hospedante y localidad

La especie *H. multincinctus* fue identificada en asocio con el cultivo de banano, en la localidad de La Tigra de Jicaral, provincia de Puntarenas, Costa Rica.

Otros hospedantes y localidades

H. multincinctus es la segunda especie más difundida en el cultivo de las musáceas, actualmente está diseminada en todas las regiones tropicales y subtropicales de los cinco continentes (Crozzoli, 2014). Se ha encontrado asociada a dicho cultivo en Venezuela (Crozzoli, 2002; Castellano *et al.*, 2012; Martínez, Delgado, Rodríguez, Hernández y Del Valle, 2008), Ecuador (Delgado, 2013), Brasil (Tomazini, Ferraz & Monteiro, 2008; Neves, Diaz & Barbosa, 2009; Lima *et al.*, 2013;), Perú (Holguín, 2018), Bolivia (De Waele, Stoffelen y Krestemont, 2006), Colombia (Guzmán y Castaño, 2004; Castillo, Araya y Patiño, 2010), México (Lara, Núñez, López y Carrión, 2015), Cuba (Fierro, Draguiche y Ramírez, 2006; Almarales, Martín y Leresma, 2014), Estados Unidos (Brooks, 2004; Wang & Hooks, 2009), Egipto (Lima *et al.*, 2013), Sudáfrica (Daneel *et al.*, 2015), Nigeria (Van Dessel, Coyne, Dubois, De Waele & Franco, 2011; Coyne, Omowumi, Rotifa & Afolami, 2013) Uganda (Kashaija, McIntyre, Ssali & Kizito, 2004; Elsen *et al.*, 2004; Talwana, Speijer, Gold, Sweennen & De Waele, 2006), Ghana (Brentu *et al.*, 2004; Brentu, Amoatey

& Oppong, 2013), Rwanda (Gaidashova, Van Asten, De Waele & Delvaux, 2009), República Democrática del Congo (Kamira, Hauser, Van Asten, Coyne & Talwana, 2013), Martinica (Chabrier, Hubervic & Quénehervé, 2002; Chabrier, Hubervic, Jules & Quénehervé, 2005), India (Krishnamoorthy, Kumar, Poornima & Soorianathasundaram, 2005; Shanti & Rajendran, 2006), Turquía (Karakas, 2007) y Grecia (Tzortzakakis, Cantalapiedra, Castillo, Palomares & Archidona, 2017).

También, se ha reportado asociada a los cultivos de avena y frijol en Estados Unidos (Vargas & Rodríguez, 2001), cítricos en España, uva en Eslovenia y Grecia (Urek, Sirca & Karssen, 2003; Tzortzakakis, Cantalapiedra, Castillo, Palomares & Archidona, 2017), cítricos, mango, guayaba y uva en Egipto (Lima *et al.*, 2013; Gandarilla Rivas y Fernández, 2014). En Venezuela se encuentra en plátano, guanábana, tamarindo y yuca (Castellano *et al.*, 2012; Crozzoli y Perichi, 2007). En Cuba se reporta en caña de azúcar (Almarales, Martín y Leresma, 2014; Peña *et al.*, 2015), coco, guayaba (Gandarilla, Rivas y Fernández, 2014), frijol (Hernández, Rodríguez y Holgado, 2018) y palma (Li-Hung, Gandarilla y Reyes, 2011).

Tabla 3. Comparación de medidas morfométricas de hembras para la especie *H. multicinctus* en estudio y las de la población original descrita por Cobb (1893). Localidad: La Tigra de Jicaral, Puntarenas. Región Pacífico Central, Costa Rica. 2018.

Hospedero	Banano (<i>Musa</i> sp)		Cobb 1893	
	Hembras (µm)	Machos (µm)	Hembras (µm)	Machos (µm)
Nº	20	10	3	2
L	432,8±44,7 (342,0-495,2)	419,3±314,4 (466,5-459,6)	470-530	470
a	24,0±2,1 (19,6-27,3)	27,1±2,0 (24,4-30,4)	24-30	29-30
b	9,4±1,2 (6,9-11,5)	9,4±1,1 (8,1-11,0)	4,7-5,4	5,2
b'	3,9±0,5 (3,0-4,8)	3,9±0,3 (3,6-4,6)	3,4-4,1	3,9
c	40,9±3,8 (33,0-47,3)	31,9±3,3 (27,9-37,4)	35-46	28-31
c'	1,0±0,1 (0,8-1,3)	---	0,8-1	---
V	68,1±2,1 (64,1-70,3)	---	65-69	---
Altura labio	3,4±0,3 (3,0-3,9)	2,7±0,3 (2,1-3,0)	*3,75	*3,28
Diámetro labio	6,3±0,3 (5,7-6,6)	5,7±0,4 (5,2-6,3)	*7,5	*6,09
Longitud estilete	20,7±1,0 (19,1-22,2)	18,1±0,6 (17,2-19,1)	22-24	22
Longitud cono	10,5±1,1 (8,1-13,8)	9,2±0,4 (8,4-9,9)	*11,25	*11,25
DGO	8,0±0,6 (7,1-9,0)	7,2±0,4 (6,5-7,9)	*9,37	*7,96
Longitud poro excretor	73,7±9,6 (56,9-89,3)	68,7±8,8 (58,5-88,1)	*87,14	*80,62
Longitud faringe	111,0±8,0 (101,1-125,4)	107,1±5,6 (100,0-115,3)	*121,42	*113,43
MB	46,3±0,3 (40,2-52,2)	44,7±3,8 (40,3-52,0)	*50	*46,87
Ancho máx. cuerpo	18,0±0,9 (15,4-19,5)	15,5±0,6 (14,3-16,2)	*20	*15,93
Ancho campo lateral	4,5±0,3 (4,0-5,1)	4,1±0,1 (3,9-4,4)	*3,75	*3,75
Altura cola	10,6±1,4 (8,6-12,8)	13,2±1,5 (11,0-15,1)	*10,78	*13,12
Diámetro cuerpo anal	10,7±1,0 (9,3-13,5)	---	*10,31	---
Longitud proyección ventral	1,8±0,4 (1,4-2,7)	---	*2,81	---
Nº anulaciones cola	9,7±0,7 (9,0-11,0)	---	*10-12	---
Posición fasmidio	4,5±0,4 (3,7-4,9)	---	*4,21	---
Espícula	---	16,6±0,6 (16,1-18,0)	---	17-18
Gubernáculo	---	3,7±0,2 (3,2-3,9)	---	5-6

L: Longitud total del cuerpo. **a:** L/diámetro máx. cuerpo. **b:** L/MB. **b':** L/Longitud de la faringe. **c:** L/Diámetro del cuerpo anal. **c':** Diámetro del cuerpo anal/Altura de la cola. **V:** Porcentaje de vulva. **Diámetro del labio:** ancho del labio. **Longitud del estilete:** Desde la base de los nódulos hasta la parte anterior del estilete. **Longitud del cono:** Longitud desde la base del cono (en el estilete) hasta el labio. **DGO:** Longitud de la base de los nódulos hasta el orificio de la glándula dorsal. **Longitud del poro excretor:** Longitud desde la apertura del poro excretor hasta la cabeza. **Longitud de la faringe:** Desde el final de la faringe hasta la cabeza. **MB:** Longitud desde el bulbo medio hasta la cabeza. **Diámetro máximo del cuerpo:** Ancho total del cuerpo. **Ancho campo lateral:** Ancho de las líneas transversales. **Altura de la cola:** Desde la apertura del ano hasta el final de la cola. **Diámetro del cuerpo anal:** A partir de la apertura de la cola. **Longitud proyección ventral:** Longitud desde la cola hasta el final de la proyección de la cola. **Número de anulaciones de la cola:** Número de anulaciones desde la apertura del ano hasta el final de la cola. **Posición del fasmidio:** Longitud desde el fasmidio hasta el final de la cola.

*Medidas estimadas a partir de la Figura 9 de la descripción original para la población tipo, Cobb 1893.

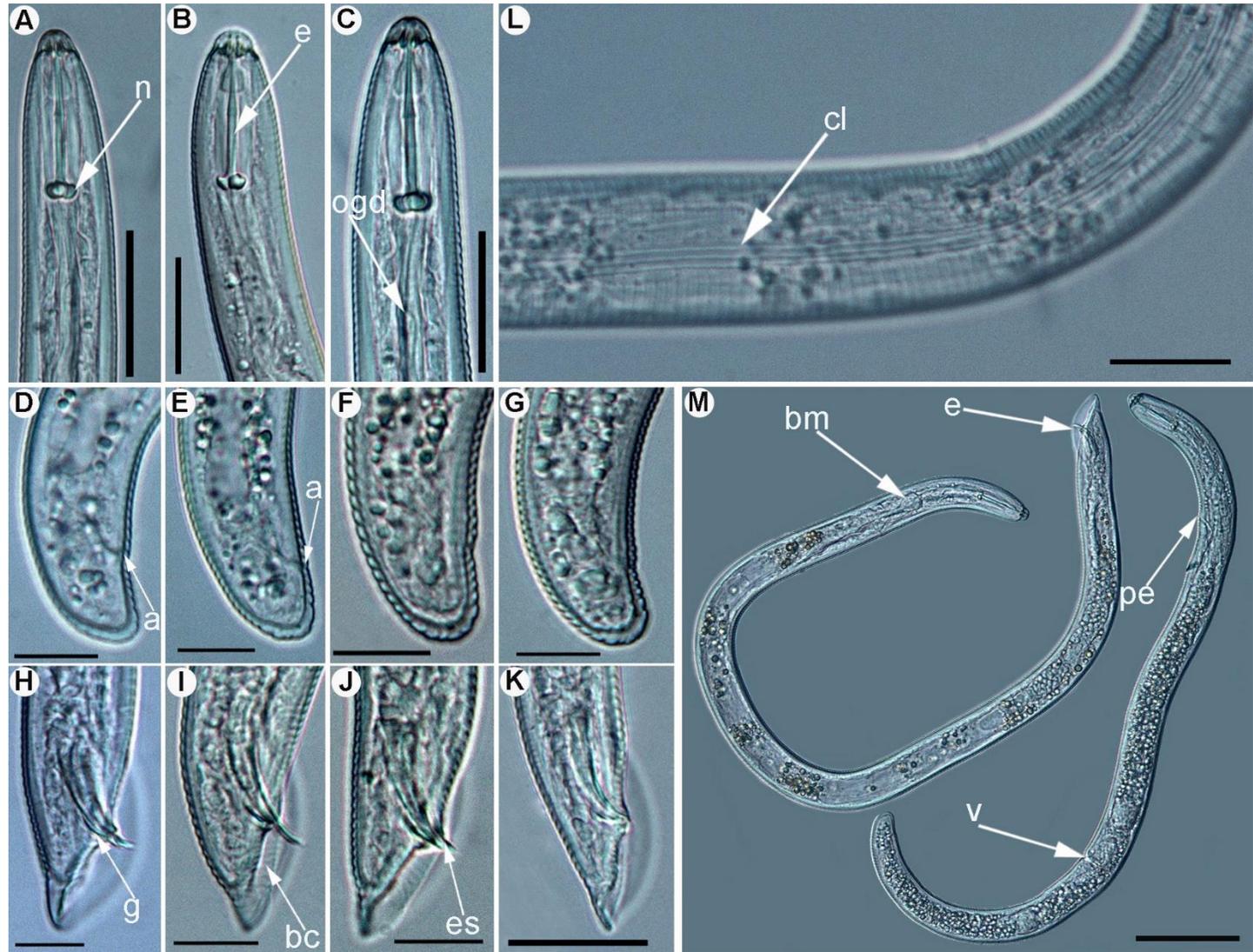


Figura 5. Fotomicrografías de la especie *H. multicinctus* identificada en banano en la Tigra de Jicaral, Puntarenas. A, B, C. Región anterior de hembras mostrando los nódulos (n), el estilete (e) y el orificio de la glándula dorsal (ogd). D, E, F y G. Región posterior de hembras mostrando el ano (a). H I, J y K. Región posterior de machos mostrando el gubernáculo (g), la bursa copulatória (bc) y la espícula (es). L. Campo lateral (cl) con cuatro líneas. J. Hembra y macho completo. El macho mostrando la espícula (es) y el bulbo medio (bm). La hembra mostrando el poro excretor (pe) y la vulva (v). Escalas A, B, C, D, E, F, G,

Los resultados obtenidos a partir del análisis morfométrico de las poblaciones en estudio para la especie *H. multincinctus* asociada al cultivo de banano en Jicaral, permitieron realizar una comparación descriptiva entre las medidas morfométricas obtenidas en la presente investigación y las descritas por Cobb (1893) y Sher (1966) para la población tipo, Fortuner (1991) y los estudios realizados por Crozzoli (2014) en Venezuela.

Las medidas morfométricas obtenidas en el presente estudio, presentaron similitud con las descritas originalmente por Cobb (1893) para las hembras de *H. multincinctus*: longitud del nematodo en un rango de 470,0-530,0 μm , porcentaje de vulva entre 65-69%, longitud del estilete de 22 a 24 μm , 3,75 μm para la altura del labio, diámetro del labio 7,5 μm , longitud del cono de 11,25 μm , medida de DGO de aproximadamente 9,37 μm , poro excretor con 87,14 μm de largo, longitud de faringe de 121,42 μm , ancho del campo lateral (líneas transversales) de 3,75 μm , altura de la cola 10,78 μm , diámetro del cuerpo anal 10,31 μm , de 10 a 12 anulaciones en la cola, longitud de la proyección ventral de 2,81 μm y posición del fasmidio de 4,21 μm . coincidieron, además, las medidas de los radios a, b', c y c', exceptuando el radio b, el cual posee una medida notablemente menor en la población tipo.

Así mismo, las medidas correspondientes a los machos de *H. multincinctus* de la población en estudio, presentaron valores similares (o aproximados) a los descritos en la población tipo: longitud del nematodo de 470 μm , longitud del estilete de 22 μm , 3,75 μm para la altura del labio, diámetro del labio 7,5 μm , cono de 11,25 μm de longitud, medida de DGO de aproximadamente 7,96 μm , poro excretor con 80,62 μm de largo, longitud de faringe de 113,43 μm , ancho del campo lateral (líneas transversales) de 3,75 μm , altura de la cola 13,12 μm , espícula de 17-18 μm y gubernáculo de 5-6 μm , el cual es evidentemente mayor en la población tipo. Los radios a, b' y c también presentaron concordancia.

H. multincinctus representa un grupo de especies con cuerpo en forma de C, cola conoide/redondeada y vulva más posterior que lo habitual en el género *Helicotylenchus* (Fortuner, 1991). Se encuentra en las regiones donde se cultiva banano. En áreas tropicales donde *R. similis* (nematodo barrenador) está presente, esta especie es de importancia secundaria, sin embargo, *H. multincinctus* podría superar numéricamente a *R. similis* en

localidades donde estas dos especies coexisten (Holgúin, 2018). Es considerado un nematodo endoparásito capaz de alimentarse y completar su ciclo biológico en la región cortical de las raíces ocasionando la destrucción de células al inyectar secreciones digestivas que remueven el contenido celular (Delgado, 2013, Crozzoli, 2014).

El efecto del ataque de *H. multincinctus* en banano ocasiona lesiones superficiales rojizas en la epidermis y corteza. En infestaciones graves, las lesiones coalescen causando extensas necrosis en la parte superficial de la corteza. *H. multincinctus* también afecta al rizoma, lesionándolo superficialmente y pudiéndose diseminar a través de él (Crozzoli, 2014). En la parte aérea, causa reducción en el crecimiento de la planta, alargando el ciclo vegetativo y reduciendo la vida productiva de la plantación después de 3 años. Los componentes de las pérdidas incluyen menor peso del racimo, reflejado en reducido tamaño de los frutos, madurez retardada y pérdidas en el mercado. El volcamiento de las plantas puede también ocurrir con altas infestaciones del nematodo (Guzmán, 2011)

Helicotylenchus sp.

Cultivo: Arroz

Medidas: Tabla 4

Descripción: Figura 6

Hembra

Longitud del cuerpo de 503,5 a 681,1 μm , ancho máximo del cuerpo de 19,6 a 26,7 μm . Medidas del labio de 3,2 a 3,7 μm de altura y 6,1 a 6,7 μm de diámetro. El estilete presentó una longitud de 20,1 a 21,7 μm , el cono con una longitud de 9,2 a 10,4 μm y un DGO de 9,1 a 11,9 μm . La longitud del poro excretor fue de 81,4 a 102,8 μm , la longitud de la faringe de 129,0 a 149,0 μm y un MB de 46,7 a 56,6 μm . Campo lateral con 4 líneas y un ancho de 4,6 a 5,9 μm . Porcentaje de vulva de 59,6 a 63,7% con respecto a la longitud del cuerpo. Diámetro del cuerpo anal mostró una longitud de 11,3 a 16,5 μm . Altura de la cola de 12,6 a 17,7 μm , la posición del fasmidio de 3,9 a 5,8 μm con respecto a la cola. Longitud de la proyección ventral de 2,9 a 4,0 μm y de 9 a 13 anulaciones desde la abertura anal hasta la cola.

Macho

No se encontraron especímenes en el presente estudio.

Tabla 4. Medidas morfométricas de hembras para la población de *Helicotylenchus* sp. en estudio. Localidad: Paso Canoas, Puntarenas. Región Brunca, Costa Rica. 2018.

Hospedero	Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.) Hembras (µm)
N°	20
L	584,1±51,1 (503,5-681,1)
a	25,7±1,0 (23,9-27,5)
b	11,5±0,9 (10,1-13,1)
b'	4,2±0,3 (3,7-4,8)
c	43,6±3,5 (35,4-49,3)
c'	0,9±0,1 (0,8-1,2)
V	61,8±1,2 (59,6-63,7)
Altura labio	3,4±0,1 (3,2-3,7)
Diámetro labio	6,4±0,2 (6,1-6,7)
Longitud estilete	21,0±0,5 (20,1-21,7)
Longitud cono	9,7±0,3(9,2-10,4)
DGO	10,7±0,7 (9,1-11,9)
Longitud poro excretor	91,8±4,9 (81,4-102,8)
Longitud faringe	138,0±5,0 (129,0-149,0)
MB	51,0±2,8 (46,7-56,6)
Ancho máx. cuerpo	22,7±2,0 (19,6-26,7)
Ancho campo lateral	5,2±0,4 (4,6-5,9)
Altura cola	14,8±1,4 (12,6-17,7)
Diámetro cuerpo anal	13,4±1,3 (11,3-16,5)
Longitud clavija ventral	3,5±0,3 (2,9-4,0)
N° anulaciones cola	10,5±1,0 (9,0-13,0)
Posición fasmidio	4,7±0,6 (3,9-5,8)

L: Longitud total del cuerpo. **a:** L/diámetro máx. cuerpo. **b:** L/MB. **b':** L/Longitud de la faringe. **c:** L/Diámetro del cuerpo anal. **c':** Diámetro del cuerpo anal/Altura de la cola. **V:** Porcentaje de vulva. **Diámetro del labio:** ancho del labio. **Longitud del estilete:** Desde la base de los nódulos hasta la parte anterior del estilete. **Longitud del cono:** Longitud desde la base del cono (en el estilete) hasta el labio. **DGO:** Longitud de la base de los nódulos hasta el orificio de la glándula dorsal. **Longitud del poro excretor:** Longitud desde la apertura del poro excretor hasta la cabeza. **Longitud de la faringe:** Desde el final de la faringe hasta la cabeza. **MB:** Longitud desde el bulbo medio hasta la cabeza. **Diámetro máximo del cuerpo:** Ancho total del cuerpo. **Ancho campo lateral:** Ancho de las líneas transversales. **Altura de la cola:** Desde la apertura del ano hasta el final de la cola. **Diámetro del cuerpo anal:** A partir de la apertura de la cola. **Longitud proyección ventral:** Longitud desde la cola hasta el final de la proyección de la cola. **Número de anulaciones de la cola:** Número de anulaciones desde la apertura del ano hasta el final de la cola. **Posición del fasmidio:** Longitud desde el fasmidio hasta el final de la cola.

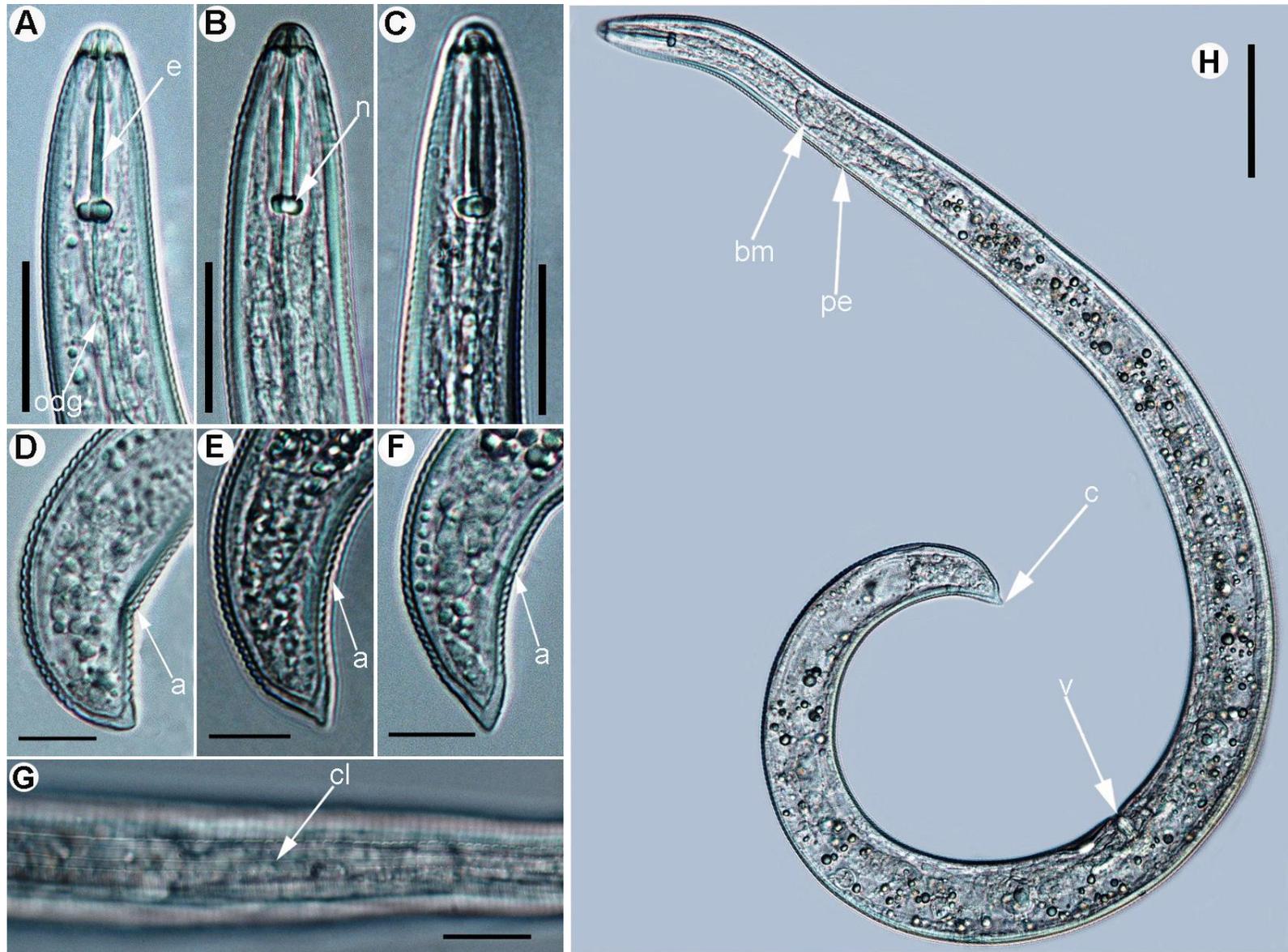


Figura 6. Fotomicrografías de *Helicotylenchus* sp. identificada en arroz en Paso Canoas, Puntarenas. A, B y C. Región anterior de hembras mostrando el estilete (e) y los nódulos (n) . D, E y F. Región posterior de hembras mostrando el ano (a). G. Hembra mostrando el campo lateral (cl). H. Hembra completa mostrando el bulbo medio (bm), el poro excretor (pe), la vulva (v) y la cola (c). Escalas A, B, C, D, E, F, G, H, I: 20 μ m. J: 50 μ m).

Mediante los resultados obtenidos a partir del análisis morfológico y morfométrico de la población de *Helicotylenchus* sp. en estudio asociada al cultivo de arroz, se logró establecer similitudes con las medidas y descripciones morfológicas obtenidas por Crozzoli (2014), Subbotin *et al* (2015), Okki *et al* (2020) y Uzma, Nasira, Firoza & Shahina (2015) para las especies *H. dihystra*, *H. pseudorobustus* y *H. caudatus*: longitud del nematodo de 560 a 704 μm , porcentaje de vulva entre 58% y 69%, longitud del estilete de 19 a 27 μm , poro excretor entre 81 y 135 μm , presencia de 4 líneas longitudinales, cola curvada dorsalmente con proyección ventral que varía de bien definida a no definida y número de anulaciones entre 7 y 13. Cabe mencionar que Sancho y Salazar (1985) elaboraron un trabajo de reconocimiento de especies de nematodos fitoparásitos asociados al cultivo de arroz en suelos del sureste de Costa Rica, en el cual identificaron, únicamente a nivel de género, a *Helicotylenchus* sp. como el nemátodo más común en dichos suelos.

II. Caracterización molecular: análisis de secuencias y filogenia.

El análisis de las secuencias de las regiones 28S e ITS del ADNr obtenidas en el presente estudio, permitió establecer concordancia con las especies de *Helicotylenchus* depositadas en el GenBank® por otros investigadores.

Se identificó la especie *H. dihystra* asociada al cultivo de plátano (AS77) en Talamanca, Limón; piña (AS59) en San Carlos, Alajuela; cítricos (AS61) en Los Chiles, Alajuela; uva (AS60) en Santa Ana, San José. Esta especie presentó un 99% de similitud con las accesiones KX822142 y MH142614 correspondientes a *H. dihystra* encontradas en China y reportadas en el cultivo de morera y ñame respectivamente, (Zhang, 2017; Hou, 2018). Adicionalmente, presentó un 99% de similitud para la misma especie (MN445995) encontrada en Birmania y asociada al cultivo de *Camellia* sp. (Du, Zhou, Liu & Deng, 2019).

Por su parte, se identificó a *H. multicinctus* asociada al cultivo de banano (AS62) en Jicaral. Puntarenas. Dicha especie mostró un 99% de similitud con las accesiones KF443214

y MN056344 correspondientes a esta especie y que fueron reportadas en el cultivo de *Musa paradisiaca* en China por Xiao, Zhang & Liu, (2013) y cacao en Sudáfrica por Daramola (2019), respectivamente.

Las relaciones filogenéticas entre las especies de *Helicotylenchus*, obtenidas a partir de los análisis de las regiones 28S e ITS y basadas en el criterio de Inferencia Bayesiana (IB) se muestran en las figuras 7 y 8. Se encontraron agrupamientos similares en la tipología de ambas regiones.

En el caso del dendrograma generado para las secuencias de la región 28S (figura 7), se mostró a *H. dihystra* correspondiente a los cultivos de piña (AS67), cítricos (AS69), uva (AS60) y plátano (AS77) que agrupó con la accesión HM014245 asociada a *Schefflera* sp. en Ft. Lauderdale, Florida, Estados Unidos; a la accesión HM014246 asociada al cultivo de Bromelias en Goulds, Florida, Estados Unidos; a la accesión HM014247 correspondiente al cultivo de *Ficus benjamina* en St. Pierce, Florida, Estados Unidos (Subbotin *et al.*, 2011). Finalmente, a la accesión KM506835 (cultivo no indicado) y que se localizó en Texas, Estados Unidos (Subbotin *et al.*, 2015).

En el caso de la especie *H. multicinctus* correspondiente al cultivo de banano (AS62), agrupó con las accesiones KM603531, HM014292, DQ328745 asociadas respectivamente al cultivo de *Colocasia* sp. en Vietnam (Skantar, Handuo, Akinbade, Mojtahedi & Guerra, 2015- datos sin publicar), al cultivo de *Ficus benjamina* en St. Pierce, Florida, Estados Unidos (Subbotin *et al.*, 2015) y al cultivo de *Musa* sp. en Sudán (Subbotin *et al.*, 2007).

El árbol filogenético correspondiente al análisis de las secuencias de la región ITS1 (Figura 8) mostró a *H. dihystra* correspondiente a los cultivos de piña (AS67), cítricos (AS69) y plátano (DD72 y DD73) del presente estudio, agrupando con las accesiones LC030373 y LC030374 encontradas en suelo (cultivo no indicado) en la Prefectura de Ibaraki, Japón (Kushida & Kondo, 2015). Por su parte, la especie *H. multicinctus* (AS70 y AS79) identificada en el cultivo de banano, agrupó con la accesión KF443216 (cultivo no indicado) y reportada en China por Xiao, Zhang & Liu, (2013).

Con respecto a la población de *Helicotylenchus* presente en el cultivo de arroz (AS57 y AS76), el análisis de la amplificación del dominio D2-D3 de la región 28S del ADN ribosomal (ADNr) mostró resultados porcentuales de similitud por debajo de los porcentajes necesarios (entre 98% y 100%) para poder confirmar a cuál especie pertenecía. De acuerdo con los datos depositados en el GenBank®, las secuencias obtenidas a partir de la amplificación de dicha región coincidieron en un 96% con las accesiones MN764333, MN764335 y MN764337 correspondientes a la especie *H. caudatus* asociada a *Poa pratensis* en Corea (Okki *et al*, 2020). Dicho porcentaje de similitud no permite indicar con certeza si en efecto, la especie mencionada está asociada al cultivo del arroz.

Asimismo, es importante mencionar que en la elaboración del dendrograma, dicha población de *Helicotylenchus* asociada al cultivo de arroz de esta investigación, se asoció en un clado con la accesión KM506847 (*Helicotylenchus* sp. V2) (cultivo no indicado) y que fue reportada en Corea del Sur (Subbotin *et al*, 2015).

Por otra parte, en cuanto a la amplificación de la región ITS para el cultivo de arroz, no hubo resultado alguno debido a que se obtuvo una cantidad de nucleótidos insuficiente para lograr una correcta identificación. No obstante, dicha región resulta ser muy conservada entre diferentes especies del género, por lo que se hace difícil lograr una correcta identificación de las mismas. Asimismo para la población en estudio asociada al cultivo de uva, no se obtuvieron resultados en el análisis de esta región.

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

28S
***Helicotylenchus* sp.**

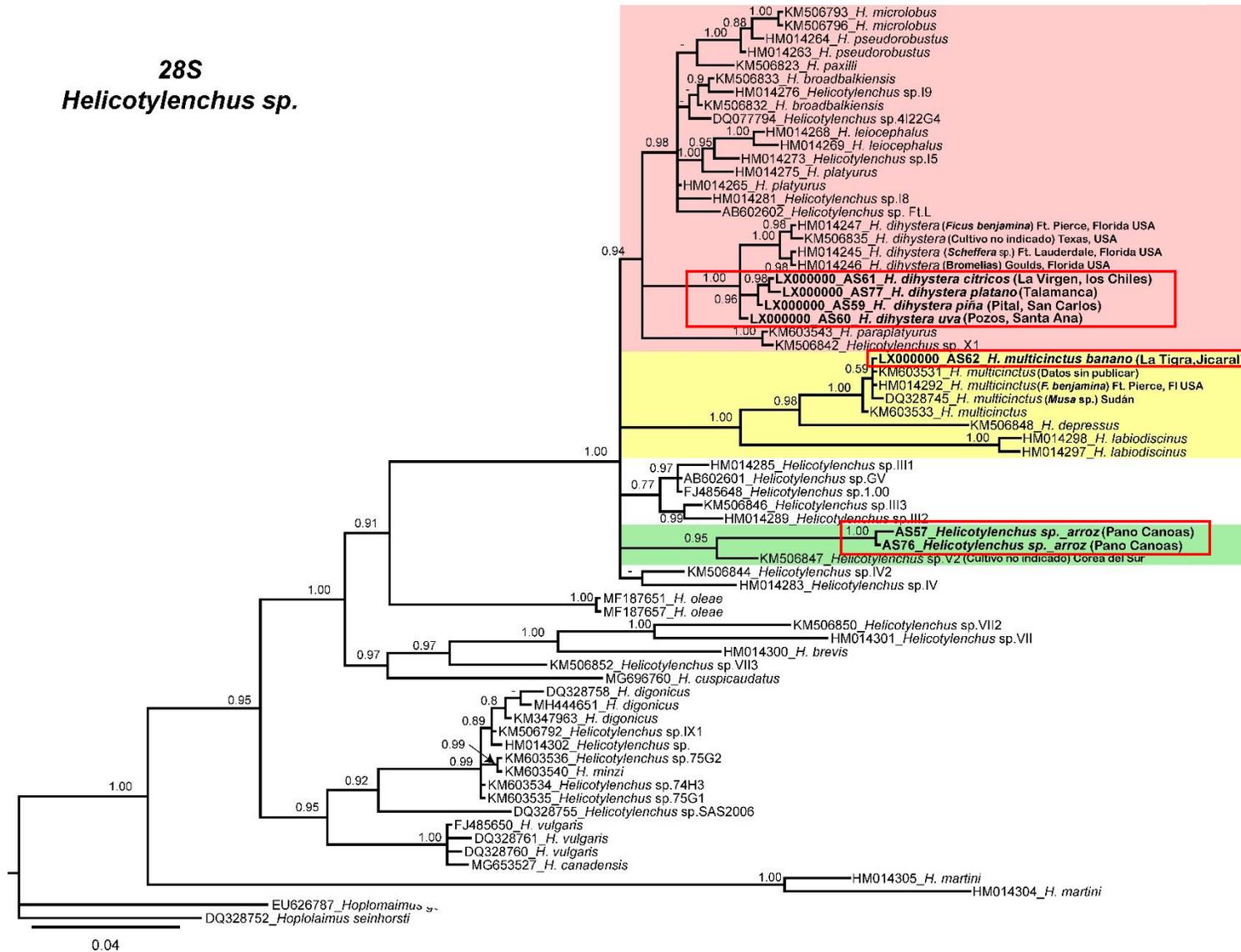


Figura 7. Regla concenso del 50% de un árbol de análisis de Inferencia Bayesiana generado a partir de la región D2-D3 del 28s rDNA del conjunto de datos de los genes de secuencias para las especies de *H. dihystra*; *H. multincinctus* y *Helicotylenchus* sp. Códigos generados para identificación con el cultivo Cítricos (AS61), Plátano (AS77), Piña (AS59), uva (AS60), Banano (AS62) y Arroz (AS57, 58 AS76).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las técnicas morfológicas (fotografías), taxonómicas, de PCR, secuenciación y análisis filogenético, permitieron establecer una correcta tipología y caracterización de cada una de las poblaciones de nematodos presentes en esta investigación. El empleo de análisis morfológicos, morfométricos y moleculares, facilitaron la correcta identificación de las especies de *Helicotylenchus* asociadas a los cultivos incluidos en este estudio.

Se identificó la especie *Helicotylenchus dihystra* en los cultivos de piña en Pital de San Carlos, Alajuela, cítricos en Los Chiles, Alajuela, uva en Santa Ana, San José y plátano en Talamanca, Limón. La especie *Helicotylenchus multicinctus* fue encontrada en el cultivo de banano en La Tigra de Jicaral, Puntarenas.

Las secuencias del dominio D2-D3 de la región 28S presentaron mayor similitud con accesiones pertenecientes a la especie *H. caudatus*. Por tanto, se recomienda realizar de nuevo análisis filogenéticos donde se incluyan las secuencias de esta especie y las secuencias correspondientes a la población asociada al cultivo de arroz, con el fin de conocer la forma en que se agruparían estas secuencias.

La ITS resulta ser una región muy conservada y compartida entre especies dentro del género *Helicotylenchus*, lo cual representó una dificultad para obtener resultados en los cultivos de uva y arroz. Debido a esto, será necesario en futuras investigaciones realizar análisis moleculares que permitan generar cebadores específicos para cada una de las especies que comparten dicha región, los cuales permitan obtener porcentajes de precisión entre 98% y 100% para lograr una acertada identificación de especies. Como alternativa, es preciso amplificar y secuenciar otras regiones del genoma que resulten mejores para diferenciar entre especies. Por lo anterior, se recomienda secuenciar además, la región 18S del ADN.

En el presente estudio se incluyeron seis cultivos distribuidos en las regiones Huetar Norte y Huetar Atlántico, Brunca, Pacífico Central y Central. Para futuras investigaciones,

se recomienda incluir a la región Chorotega, así como incluir más de un cultivo por región, con el objetivo de conocer si existen diferentes especies de *Helicotylenchus* asociadas a distintos cultivos en una misma región, lo que permitiría tener un registro más amplio de hospederos.

La correcta descripción de especies representa un método importante para la generación de información científica que permita llevar a cabo registros de plagas y hospederos, su localización, grado de afectación en los cultivos y el impacto en el rendimiento de las plantaciones. De esta forma, se logra contar con suficiente información para ser utilizada tanto en la detección de organismos patógenos, la elaboración de diagnósticos oportunos y las consiguientes estrategias de combate como en el desarrollo de programas cuarentenarios.

A partir de la información originada en el presente trabajo, se puede fijar un antecedente para futuras investigaciones orientadas a la indagación de plagas de nematodos, en las cuales se establezca un estudio del comportamiento de la relación patógeno-hospedante y las condiciones ambientales en las que se desarrollan. Esto con la finalidad de buscar hospederos tolerantes o resistentes a dicho patógeno, para así evitar la infección y la disminución en el rendimiento de los cultivos.

Con la colaboración del Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Córdoba y el Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología de la Universidad de Jaén de España se logró cumplir con los objetivos planteados en este estudio. De ahí la importancia de los convenios de cooperación con instituciones internacionales, las cuales en este caso, permitieron ampliar los conocimientos en la identificación de nematodos fitoparásitos. Esto refleja la importancia de estrechar alianzas científicas tanto a nivel nacional como internacional para seguir en la búsqueda de nuevos proyectos de investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, P. (2016). *Implementación de un sistema piloto de producción de banano variedad Gross Michel (Musa acuminata AAA) como alternativa técnica en la vereda Monte Verde, en Andes, Antioquía* (trabajo final de grado). Universidad La Salle, El Yopal, Colombia.
- Alarcón, J., y Jiménez, Y. (2012). *Manejo fitosanitario del cultivo de plátano*. Recuperado de: <http://cep.unep.org/repcar/proyectos-demostrativos/colombia-1/publicaciones-colombia/plagas-defintiva.pdf>
- Almarales, M., Martín, C., y Leresma, R. (2014). Prospección de nematodos en las zonas agrícolas de la provincia de Cienfuegos. *Revista Agroecosistemas*, 2(2), 337-348.
- Andrés, M. (2002). Estrategias en el control y manejo de nematodos fitoparásitos. *Ciencia y Medio Ambiente*. Recuperado de: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/128310/1/Estrategias%20en%20el%20control%20de%20nematodos%20fitoparasitarios%20en%20la%20zona%20agr%C3%A9cola%20de%20Cienfuegos.pdf>
- Araya, E. (2008). *Identificación, cuantificación y caracterización de densidades poblacionales de nematodos asociados al cultivo de arroz (Oryza sativa) en la Región Huetar Norte (cantones de Los Chiles y San Carlos) de Costa Rica* (trabajo final de grado). Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Costa Rica.
- Arredondo, P. (1993). La Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR: Un impacto reciente en la Biología Molecular. *Boletín de Educación Bioquímica*, 12(1), 3-14.
- Avena, B., Ceceña, C., González, D., Grimaldo, O., Durán, D. (2016). *Conducta poblacional de fitonematodos en cultivos agrícolas en el valle de Mexicali, Baja California*. Baja California, México: OmniaScience

- Barquero, M. (27 de Diciembre de 2017). Exportación Bananera cerrará este año con récord en ventas. *La Nación*. Recuperado de: <https://www.nacion.com/economia/agro/exportacion-bananera-cerrara-este-ano-con-record/DOPHP2UFKFAZXLC4KV66UWDT34/story/>
- Barquero, M. (3 de Abril de 2018). Ventas de piña subieron 19% en cuatro años en medio de polémicas. *La Nación*. Recuperado de: <https://www.nacion.com/economia/agro/ventas-de-pina-subieron-19-en-cuatro-anos-en/TX6GZAJ7WRBRDFE6Y3KDLUZ62U/story/>
- Barrientos, O., y Porras, S. (2010). *Cadena productiva de piña*. Recuperado de: <http://www.infoagro.go.cr/MarcoInstitucional/Documents/Politica-Pi%C3%B1a.pdf>
- Berry, S., Dana, P., Spaul, V., & Cadet, P. (2009). Effect of intercropping on nematodes in two small-scale sugarcane farming systems in South Africa. *Nematropica*, 39(1), 11-33.
- Berrecil, D., Torres, E., Moreno, G., Aguilar, A., Arenas, R., y Hernández, R. (2015). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus aplicaciones en dermatología. *Demartología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 13(3), 214-219.
- Bhattacharya, C., Dasgupta, M., & Mukherjee, B. (2012). Biodiversity of plant parasitic nematodes of cashew plantations in Tripura, India. *Nematologia mediterránea*, 40: 163-168.
- Borja, M., García, J., Reyes, L., y Arellano, S. (2015). Rentabilidad de los sistemas de producción de uva (*Vitis vinífera*) para mesa e industria en Aguascalientes, México. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 13(1), 151-168.

- Bravo, V., Berrocal, S., Ramírez, F., de la Cruz, E., Canto, N., Tatis, A., Mejía, W., y Rodríguez, T. (2015). Importación de plaguicidas y peligros en salud en América Central durante el período 200-2009. *Uniciencia*, 29(2), 84-106.
- Brentu, F., Speijer, P., Green, K., Hemeng, B., De Waele, D., & Coyne, D. (2004). Microplot evaluation of the yield reduction potential of *Pratylenchus coffeae*, *Helicotylenchus multicinctus* and *Meloidogyne javanica* on plantain cv. Apantu-pa (*Musa* spp., AAB-group) in Ghana. *Nematology*, 6(3), 455-462.
- Brentu, F., Amoatey, C., & Oppong, E. (2013). Weed hosts of the root-lesion nematode *Pratylenchus speijeri* in replanting sites cleared from nematode-infested plantain v. Apantu-Pa (*Musa* spp., AAB-group) fields in Ghana. *Nematropica*, 43(1), 91-96.
- Brooks, F. (2004). Plant-parasitic nematodes of banana in American Samoa. *Nematropica*, 34(1), 65-72.
- Calderón, M., y Jiménez, A. (2008). *Análisis de la complementariedad temporal de los frutales con potencial industrial utilizados como sombra en el cultivo de café en los cantones de Acosta y cacao en el cantón de Talamanca* (tesis de grado). Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- CANAPEP. (2017) *¿Por qué la producción de piña en Costa Rica es un sector esencial para la economía?* Recuperado de: <https://canapep.com/produccion-pina-costa-rica-sector-economia/>
- Cárdenas, L. (2017). *Principales insectos plaga que atacan el cultivo de arroz (Oryza sativa) en la zona de Arenillas provincia de El Oro*. Recuperado de: http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/10520/1/DE00001_EXAMEN_COMPLEXIVO.pdf

- Carranza, S. (2002). Los métodos moleculares en el estudio de la sistemática y filogenia de los Anfibios y Reptiles ibéricos. En Pleguezuelos, J., Márquez, R., y Lizana, M (Ed.), *Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España* (pp. 551-579). Madrid, España: Tetrazeta.
- Carvajal, E. (2009). *Comparación de la dinámica poblacional de nematodos en el cultivo de piña (Ananas comosus) (L) Merr. Híbrido MD-2 bajo técnicas de producción convencional y orgánica* (tesis de grado). Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Costa Rica.
- Cassida, K., Kirkpatrick, T., Robbins, R., Muir, J., Venuto, B., & Hussey, M. (2005). Plant-parasitic nematodes associated with switchgrass (*Panicum Virgatum* L.) grown for biofuel in the south-central United States. *Nematropica*, 35(1), 1-10.
- Castaño, J., Guzmán, O., y Villegas, B. (2011). Principales nemátodos fitoparásitos y síntomas ocasionados en cultivos de importancia agrícola. *Revista Agronomía*, 20 (1), 38-50.
- Castellano, G., Casassa, A., Ramírez, R., Pérez, E., Burgos, M., y Crozzoli, R. (2012). Nematodos fitoparásitos asociados a frutales estratégicos en el municipio Baralt del estado Zulia, Venezuela. *Agronomía Venezolana*, 25(1), 2-6.
- Castellano, G., Lugo, Z., Casassa, A., Pérez, E., y Núñez, K. (2014). Nematodos fitoparásitos asociados a frutales potenciales, en tres sectores del municipio Mara, estado Zulia, Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 1: 414-422.
- Castillo, P., Vovlas, N., Subbotin, S., y Troccoli, A. (2003). A new root-knot nematode, *Meloidogyne baetica* n. sp. (Nematoda: Heteroderidae), parasitizing wild olive in Southern Spain. *Phytopathology*, 93: 1093-1102.

- Castillo, J., Araya, M., y Patiño, L. (2010). Respuesta a la aplicación de nematicida en banano en la zona de Urabá, Colombia. *Agronomía Mesoamericana*, 21(2), 307-317.
- Castro, B., Timmer, L., Leguizamón, J., Müller, G., y Corrales, J. (2000). *Enfermedades de los cítricos en Colombia*. Bogotá, Colombia: PRODUMEDIOS.
- CATIE. (2009). *Manejo Agronómico de Frutales (Mango, Aguacate, Cítricos y Papaya)*. Recuperado de: <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A7575e/A7575e.pdf>
- Caveness, F., & Jensen, H. (1955). Modification of centrifugal flotation technique for the isolation and concentration of nematodes and their eggs and plant tissue. *Proceedings helminthological society Washington*, 22(2), 87-89.
- Chabrier, C., Hubervic, J., & Quénéhervé, P. (2002). Evaluation of fosthiazate (Nemathorin® 10G) for the control of nematodes in banana fields in Martinique. *Nematropica*, 32(2), 137-147.
- Chabrier, C., Hubervic, J., Jules, R., & Quénéhervé, P. (2005). Evaluation de l'efficacité de deux formulations d'oxamil contre les nématodes et le charançon des bananiers a la Martinique. *Nematropica*, 35(1), 11-21.
- Chandra, S; Balamohan, T; Poormina, K; Velalazan, R; & Seenivasan, N. (2014). Breeding and evaluation of *Musa* hybrids to the spiral nematode, *Helicotylenchus multicinctus*. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 74(1), 1-8.
- CONARROZ. (2018). Informe estadístico 2017-2018. Recuperado de: http://www.conarroz.com/userfile/file/INFORME_ANUAL_ESTADISTICO_PERIODO_2017_2018.pdf

- Contreras, M. (2012). *Efecto de la inversión extranjera directa (IED) de la agrocadena de la piña sobre el desarrollo sostenible del cantón de Buenos Aires de Puntarenas* (tesis de grado). Universidad Nacional de Costa Rica, Heredia, Costa Rica.
- CORBANA. (2018). *Estadísticas*. Recuperado de: <https://www.corbana.co.cr/banano-de-costa-rica/#estadistica>.
- Coyne, D., Rotimi, O., Speijer, P., De Schutter, B., Dubois, T., Auwerkerken, A., Tenkouano, A., & De Waele, D. (2005). Effects of nematode infection and mulching on the yield of plantain (*Musa* spp., AAB-group) ratoon crops and plantation longevity in southeastern Nigeria. *Nematology*, 7(4), 531-541.
- Coyne, D., Omowumi, A., Rotifa, I., & Afolami, S. (2013). Pathogenicity and damage potential of five species of plant-parasitic nematodes on plantain (*Musa* spp., AAB genome) cv. Agbagba. *Nematology*, 15: 589-599.
- Cleves, J., Orduz, J., y Fonseca, J. (2012). Aportes de la investigación en cítricos al manejo agroecológico del cultivo en el piedemonte del departamento del Meta, Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 3(2), 85-97.
- Crozzoli, R., Lamberti, F., Greco, N., y Rivas, D. (1998). Nematodos fitoparasíticos asociados con los cítricos en Venezuela. *Nematología mediterránea*, 26(1998), 32-58.
- Crozzoli, R. (2002). Especies de nematodos fitoparasíticos en Venezuela. *Interciencia*, 27(7), 354-364.
- Crozzoli, R. (2014). *La nematología agrícola en Venezuela*. Maracay, Venezuela: Ediciones de la Facultad de Agronomía.

- De Moura, R., Santana, I., & Rubens, G. (2005). Fitonematóides Associados do Inhame da Costa em Seis Municípios Produtores da Zona da Mata do Estado de Pernambuco, Brasil. *Nematologia Brasileira*, 29(2), 299-302.
- De Waele, D., Stoffelen, R., y Kestemont, J. (2006). Efecto de las especies de plantas asociadas sobre los nematodos del banano. *InfoMusa*, 15(1-2), 1-6.
- Delgado, A. (2013). *Determinación del nivel crítico del nematodo Helicotylenchus multicinctus en plantas de banano (Musa AAA) y plátano (Musa AAB), establecidas en invernadero y área comercial* (tesis de grado). Universidad Técnica de Babahoyo, Babahoyo, Ecuador.
- Díaz, C. (2001). Perfil de la actividad piñera en Costa Rica. *Tecnología En Marcha*, 13(3), 27-42.
- Doria, V. (2014). *Producción de cítricos*. Recuperado de: <https://www.formaciontecnicabolivia.org/webdocs/publicaciones/2015/citricosweb.pdf>
- Du, Y., Zhou, J., Liu, B., & Deng, Z. (2019). *Investigation of plant parasitic nematodes in southesatern countries*. Recuperado de: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MN445995.1?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=2&RID=6JPZGC3G016](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MN445995.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=2&RID=6JPZGC3G016)
- EARTH. (2004). *Perfil de producto Naranja*. Recuperado de: <http://usi.earth.ac.cr/glas/sp/50000142.pdf>
- Elsen, A., Goossens, B., Belpaire, B., Neyens, A., Speijer, P., & De Waele, D. (2004). Recolonization by nematodes of hot water treated cooking banana planting material in Uganda. *Nematology*, 6(2), 215-221.

- Escuer, M., y Palomo, A. (1991). Nematodos asociados a melocotoneros, perales y manzanos en el Bajo Cinca (Aragón). *Orsis*, 6: 75-81.
- Espárrago, G., y Navas, A. (1995). Nematofauna fitoparásita asociada a cultivos hortícolas y tabaco en regadíos de Extremadura. *Boletín Sanidad Vegetal. Plagas*, 21: 303-317.
- Espinal, C., Martínez, H., y Peña, Y. (2005). *La cadena de cítricos en Colombia*. Recuperado de: <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/handle/11348/6323>
- Esquivel, A., y Peraza, W. (2010). *Nematodos fitoparásitos asociados a cultivos agrícolas de Costa Rica*. Heredia, Costa Rica. Recuperado de: <https://es.scribd.com/document/195399234/Manual-Cultivos-Final>
- Esquivel, A. (2013). *Morfología de los nematodos*. Recuperado de: <http://plpnemweb.ucdavis.edu/nemaplex/Courseinfo/Curso%20en%20Español/ManualIdentif%202013.pdf>
- Fernández, O., y Quesada, A. (2013). *Nematodos asociados a los cultivos de Costa Rica*. Recuperado de: http://sfe.go.cr/LabDiagnostico/Nematodos_asociados_a_los%20Cultivos_de_Costa_Rica.pdf
- Fernández, E., Casanueva, K., Gandarilla, H., Márquez, M., Despaigne, F., Almandoz, J., y García, M. (2015). Nematodos en cultivos protegidos de hortalizas y su manejo en tres localidades de La Habana. *Fitosanidad*, 19(1), 13-22.
- Fierro, A., Graguiche, J., y Ramírez, T. (2006). Evaluación de nuevos híbridos y selecciones de bananos (*Musa* spp.) frente a nematodos fitopatógenos. *Centro Agrícola*, 33(1), 27-32.

- Fortuner, R. (1984). Morphometrical variability in *Helicotylenchus* Steiner, 1945. 6: Value of characters used for specific identification. *Revue Nématology*, 7(3), 245-264.
- Fortuner, R. (1991). *The Hoplolaiminae*. Recuperado de: http://genisys.prd.fr/Fortuner_1991b.pdf
- Frápoli, E. (2000). *Nematodos Fitoparásitos*. Málaga, España: A.G Novograf.
- Franco, O., y Cruz, J. (2012). *La vid silvestre en México*. México DF, México: Altres Costa-Amic Editores.
- Gaidashova, S., Van Asten, P., De Waele, D., & Delvaux, B. (2009). Relationship between soil properties, crop management, plant growth and vigour, nematode occurrence and root damage in East African Highland banana-cropping systems: a case study in Rwanda. *Nematology*, 11(6), 883-894.
- Gandarilla, H., y Fernández, E. (2002). Registro actualizado de fitonematodos en plantas ornamentales de Cuba. *Fitosanidad*, 6(3), 9-27.
- Gandarilla, H., Rivas, O., y Fernández, E. (2014). Fitonematodos asociados a los cultivos de frutos tropicales. *Fitosanidad*, 18(3), 187-197.
- García, A., y Rodríguez, M. (2011). *Manual de Buenas Prácticas Agrícolas para la producción de piña en Costa Rica*. Recuperado de: <http://cep.unep.org/repcar/proyectos-demostrativos/costa-rica-1/publicaciones-banacol/Manual%20BPA%20Banacol.pdf>
- García, L. (2018). *Análisis del proceso de desmane en el cultivo de banano, Banasa, Coatepeque, Quetzaltenango*. Recuperado de: <http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesiseortiz/2018/06/14/Garcia-Luis.pdf>

- Godoy, T., Yáñez, M., Gastélum, R., López, M., y Almodóvar, T. (2014). *Nematodos Fitoparásitos y su importancia en la agricultura*. Recuperado de: http://sistemanodalsinaloa.gob.mx/archivoscomprobatorios/_14_resumeneventoscientificos/597.pdf.
- Gómez, A. (2008). *Manual de manejo de las diferentes etapas de producción de banano de exportación*. Recuperado de: <http://www.gipag.org/archivos/banano.pdf>
- González, R. (2015). *Evaluación agroproductiva de cuatro cultivares de arroz (Oryza sativa L.) en el Sur del Jíbaro* (tesis de grado). Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Santa Clara, Cuba.
- González, U. (2013). *Diversidad de nematodos fitoparásitos asociados al cultivo de maíz en el municipio de Guasave, Sinaloa* (tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional. Sinaloa, México.
- Guerrero, M. (2010). *Guía técnica del cultivo del plátano*. Recuperado de: <http://www.centa.gob.sv/docs/guias/frutales/GUIA%20CULTIVO%20PLATANO%202011.pdf>
- Guzmán, D. (2006). *Manejo agronómico del cultivo de arroz (Oryza sativa L.) sembrado bajo riego en finca Ranchos del Horizonte; Cañas, Guanacaste, Costa Rica*. Recuperado de: <https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/2837/Manejoagronomico%20delcultivo%20dearroz%20Oryza%20sativa%20L.%20sembrado%20bajorigo%20en%20finca%20RanchosHorizonte%20Caas%20Guanacaste%20CostaRica..pdf>
- Guzmán, O., y Castaño, J. (2004). Reconocimiento de nematodos fitopatógenos en plátanos Dominico Hartón (*Musa* AAB Simmonds), África FHIA-20 y FHIA-21 en la granja Montelindo, Municipio de Palestina (Caldas), Colombia. *Revista Academia Colombiana de Ciencias*, 107(28), 297-302.

- Guzmán, O. (2011). Importancia de los nematodos espiral, *Helicotylenchus multicinctus* (COBB) Golden y *H. dihystra* (COBB) Sher, en banano y plátano. *Agronomía*, 19 (2), 19-32.
- Guzmán, O., Pérez, L., y Patiño, A. (2012). Reconocimiento de nematodos fitoparásitos en Pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus* HAW). *Boletín Científico*, 16 (2), 149-161.
- He, Y., Subbotin, S., Rubtsova, T., Lamberti, F., Brown, D., & Moens, M. (2005). A molecular phylogenetic approach to Longidoridae (Nematoda: Dorylaimida). Rusia. *Nematology*, 7(1), 111-124.
- Guzmán, T., Benavides, I., Hernández, S., Durán, J., y Montero, W. (2013). Principales géneros de nematodos fitoparásitos asociados a plátano y piña en las regiones Huetar Norte y Huetar Atlántica de Costa Rica. *Tecnología en Marcha*, 27(1), 86-92
- Hernández, D., Rodríguez, M., y Holgado, R. (2018). Nematodos parásitos que afectan *Phaseolus vulgaris* L.- en Latinoamérica y Cuba: especies, daños y tácticas evaluadas para su manejo. *Revista de Protección Vegetal*, 33(3), 1-17.
- Hernández, R. (s.f). *Los nematodos parásitos de la piña. Opciones para su manejo*. Recuperado de: <http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/5007/cuf0122s.pdf>
- Hidalgo, L., y Hidalgo, J. (2011). *Tratado de viticultura I*. Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa.
- Holguín, A. (2018). *Nematodos parásitos asociados al cultivo de banano (Musa spp.) en el distrito de La Matanza, Valle del Alto Piura* (tesis de grado). Universidad Nacional de Piura, Piura, Perú.

- Hou, X. (2018). *Direct submission*. Recuperado de: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MH142614.1?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=3&RID=6JPZGC3G016](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MH142614.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=3&RID=6JPZGC3G016)
- Huallanca, D. (2012). *Asistencia técnica dirigida en instalación y mantenimiento en el cultivo de la vid*. Recuperado de: <https://www.agrobanco.com.pe/data/uploads/ctecnica/040-a-vid.pdf>
- Ibrahim, I., Mokbel, A., & Handoo, Z. (2010). Current status of phytoparasitic nematodes and their host plants in Egypt. *Nematropica*, 40(2), 239-262.
- INATEC. (2018). *Cultivo de Frutales*. Recuperado de: https://www.tecnacional.edu.ni/media/Cultivos_de_frutales.compressed.pdf
- INFOCOMM. (Julio de 2016). *Banano*. En M. Kituyi (Presidencia). 14° período de sesiones de la Conferencia de las Naciones Unidas sobre Comercio y Desarrollo (UNCTAD). Conferencia llevada a cabo en Nairobi, Kenia.
- INIA. (2004). *El cultivo del Arroz en Venezuela*. Recuperado de: http://sian.inia.gob.ve/pdfpnp/Cultivo_arroz.pdf
- INTA. (2011). *Guía Tecnología del Cultivo de Arroz*. Recuperado de: <http://www.inta.gob.ni/biblioteca/images/pdf/guias/Guia%20Tecnica%20de%20ARRROZ%202012.pdf>
- Jima, J. (2018). *Prospección e identificación de nematodos fitoparásitos de uva (Vitis vinífera) en zonas productoras del cultivo en Ecuador* (trabajo final de grado). Universidad Central de Ecuador, Quito, Ecuador.
- Jiménez, J. (2012). *Cadena Agroalimentaria de Cítricos*. Recuperado de: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/E70-11054.pdf>

- Jiménez, N., Crozzoli, R., y Greco, N. (2007). Nematodos fitoparásitos asociados con el cultivo de la papa en el estado Lara, Venezuela. *Fitopatología Venezolana*, 20(2), 34-40.
- Jiménez, N., Jiménez, R., Crozzoli, R., y Casanova, M (2012). Nematodos fitoparásitos asociados con la vid en el estado Lara, Venezuela. *Fitopatología Venezolana*, 25(1), 7-9.
- Jonathan, E., Raguchander, T., Zareena, M., & Sundaramoorthy, S. (2009). Field evaluation of talc based bioformulations of biocontrol agents for the management of *Radopholus similis* and *Helicotylenchus dihystra* in Banana. *Nematologia mediterránea*, 37: 139-144.
- Kamira, M., Hauser, S., Van Asten, P., Coyne, D., & Talwana, H. (2013). Plant parasitic nematodes associated with banana and plantain in Eastern and western Democratic Republic of Congo. *Nematropica*, 43(1), 216-225.
- Karakas, M. (2007). Life cycle and mating behavior of *Helicotylenchus multicinctus* (Nematoda: Hoplolaimidae) on excised *Musa cavendishii* roots.
- Kashaija, I., McIntyre, B., Ssali, H., & Kizito, F. (2004). Spatial distribution of roots, neamtode populations and root necrosis in Highland banana in Uganda. *Nematology*, 6(1), 7-12.
- Kashi, L., & Karegar, A. (2014). Description of *Helicotylenchus persiaensis* sp. n (Nematoda: Hoplolaimidae) from Iran. *Zootaxa*, 3785(4), 575-588.
- Klug, W., Cummings, M., y Spencer, C. (1999). Análisis genómico. En Mensua, J., y Bueno, D. (Ed.). *Conceptos de Genética*. (529-674). Madrid, España: Prentice Hall.

- Knight, K. (2001). Plant parasitic nematode associated with six subtropical crops in New Zeland. *New Zeland Journal of Crop and Horticultural Science*, 29: 267-275.
- Krall, E. (1990). *Root Parasitic Nematodes*. New Delhi, India: Oxonian Press.
- Krishnamoorthy, V., Kumar, N., Poornima, K., & Soorianathasundaram, K. (2005). Response of diploid banana hybrids and their parents to *Helicotylenchus multicinctus*. *Nematologia mediterranea*, 33: 35-40.
- Kushida, A., & Kondo, N. (2015). A simple method for the detection and discrimination of *Pratylenchus* and *Meloidogyne* species in nematode communities. *Nematological Research*, 45(2015), 101-114.
- Lara, S., Núñez, A., López, D., y Carrión, G. (2015). Nematodos fitoparásitos asociados a raíces de plátano (*Musa acuminata* AA) en el centro de Veracruz, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34(1), 116-130.
- Lastres, L. (2009). *Patógenos que atacan los cultivos. Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano*. Recuperado de: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1354/2/02.pdf>.
- León, G. (2012). *Insectos de los cítricos*. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/266558590_Insectos_de_los_citricos
- Li-Hung, M., Gandarilla, H., y Reyes, L. (2011). Fitonematodos asociados a las aráceas en las antiguas provincias habaneras. *Fitosanidad*, 15(1), 11-15.
- Lima, R., Silva, M., Da Cunha, J., Lopes, E., Gomes, P., Simões, K.,...Gomes, J. (2013). Frequencies and population densities of the major phytonematodes associated with banana in the state of Alagoas, Brazil. *Nematropica*, 43(2), 186-193.

- López, R., Salazar, L., y Azofeifa, J. (1987). Nematodos asociados al arroz (*Oryza sativa* L.) en Costa Rica V. Frecuencia y densidades poblacionales en las principales zonas productoras. *Agronomía Costarricense* 11(2). 215-220.
- López, E., y Pérez, G. (1999). Métodos de análisis en la reconstrucción filogenética. *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa*, 26(1999), 45-56.
- López, U. (2016). Las técnicas de secuenciación masiva en el estudio de la diversidad biológica. *Munibe Ciencias naturales*, 64(2016), 7-31.
- Lugo, Z., Crozzoli, R., Perichi, G., Medina, R., y Castellano, G. (2007). Nematodos fitoparásitos asociados a plantas cultivadas y silvestres en el municipio Miranda del estado Falcón, Venezuela. *Fitopatología Venezolana*, 20(1), 15-20.
- Lugo, Z., Crozzoli, R., Greco, N., Perichi, G., y Fernández, A. (2010). Nematodos fitoparásitos asociados a hortalizas en el estado Falcón, Venezuela. *Fitopatología Venezolana*, 23(1), 16-21.
- MAG. (2007). *Plan Estratégico de la Cadena Productiva de Plátano*. Recuperado de: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/E70-4278.pdf>
- Mansilla, J., Abelleira, A., Pintos, C., Aguín, O., Pérez, R., Loureiro, B., y Montenegro, M. (2004). *Método de extracción de ADN en nematodos para su aplicación en el diagnóstico por técnicas moleculares*. Recuperado de: <http://www.efa-dip.org/comun/publicaciones/comunicaciones/2004/nematodosPCR.pdf>
- Márquez, L., Serrato, A., y Cerritos, R. (2011). *Secuenciación de fragmentos de ADN*. Recuperado de: <http://www.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/secuenciación.pdf>.
- Martínez, J. (2017). *Influencia del tipo de suelo en el estado nutricional de la vid, el desarrollo vegetativo, la producción, la composición de la uva y de los vinos de la*

- variedad Tempranillo Tinto (Vitis vinífera L.) en el ámbito de la D.O.Ca. Rioja* (tesis doctoral). Universidad de La Rioja, Logroño, España.
- Molina, G. (2016). *Implementación de un cultivo de plátano Hartón (Musa paradisiaca) en altas densidades como sistema de producción sostenible en el municipio de Cúcuta Norte de Santander* (trabajo final de grado). Universidad La Salle, El Yopal, Colombia
- Monge, C. (10 de Setiembre de 2015). Uvas dulces y exquisitas, en el patio de la casa. *Prensa Pérez Zeledón*. Recuperado de: <http://www.perezzeledon.net/uvas-dulces-y-exquisitas-en-el-patio-de-la-casa/>
- Moquete, C. (2010). *Guía técnica. El cultivo de arroz*. Recuperado de: <http://www.cedaf.org.do/publicaciones/guias/download/arroz.pdf>
- Morales, A. (2017). *Prospección de nematodos fitoparásitos de cebolla y su relación con Fusarium oxysporum f. sp cepae en el Valle de Asunción Mita, Jutiapa* (tesis de grado). Universidad Rafael Landívar, Jutiapa, Guatemala.
- National Human Genome Research Institute. (2019). *Secuenciación del ADN*. Recuperado de: <https://www.genome.gov/es/about-genomics/fact-sheets/Secuenciacion-del-ADN>
- Necochea, R., y Canual, J. (2004). *Secuenciación de los Ácidos nucleicos*. Recuperado de: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/secuenciacion_acidos_nucleicos.pdf
- Neves, W., Dias, M., & Barbosa, J. (2009). Flutuação Populacional de Nematoides em Bananais de Minas Gerais e Bahia (Anos 2003 a 2008). *Nematologia Brasileira*, 33(4), 281-285.

- Nico, A. (2002). *Incidencia y patogenicidad de nematodos fitopatógenos en plantones de olivo (Olea europea L.) en viveros en Andalucía, y estrategias para su control* (tesis doctoral). Universidad de Córdoba, Córdoba, España.
- Núñez, A. (2012). *Producción de uva de mesa* (trabajo final de grado). Universidad Autónoma Agraria, Coahuila, México.
- Obando, A. (2017). El Estado detrás de la piña: el desarrollo de los monocultivos de exportación en la Región Huetar Norte de Costa Rica. En F. Sáenz (Presidencia), 9° *Congreso Latinoamericano de Ciencia Política*. Congreso llevado a cabo en Montevideo, Uruguay.
- Okki, A., Na, H., Kim, Y., Kim Y., Han, G., & Lee, D. (2020). Characterization of a new spiral nematode, *Helicotylenchus asiaticus* n. sp., and three known species from Korea; with comments on validity of *Helicotylenchus microlobus* Perry in Perry, Darling % Thorne, 1959. *European Journal of Plant Pathology*, 157(2020), 565-581.
- Orduz, J., y Mateus, D. (2012). Generalidades de los cítricos y recomendaciones agronómicas para su cultivo en Colombia. En Garcés, L (Ed.), *Cítricos: Cultivo, poscosecha e industrialización* (pp. 49-88). Itagüí, Colombia: Artes y Letras S.A.S.
- Orsini, I., Homechin, M., Bueno, J., Sumida, C., Bagio, T., & Santiago, D. (2010). Fluctuação Populacional de Nematoides em Duas Épocas de Avaliação em Solos Cultivados com Cana-de- açúcar sob Diferentes Manejos. *Nematologia Brasileira*, 34(3), 159-163.
- Ortiz, R., Guzmán, O., y Ocampo, J. (2012). Identificación de nematodos fitoparásitos en el Banco de Germoplasma de maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) en Colombia. *Acta Agrinómica*, 61(4), 295-304.

- Palomares-Rius, J., Subbotin, S.A., Landa, B.B., Vovlas, N., y Castillo, P. (2008). Description and molecular characterization of *Paralongidorus litoralis* and *P. paramaximus* Heyns, 1965 (Nematoda: Longidoridae) from Spain. *Nematology* 10: 87-101.
- Peña, M., Olivares, N., Rodríguez, M., Peña, L., Cobas, A., Cervera, G., y Barquié, O. (2018). Nematodos fitoparásitos asociados al cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en la provincia Guantánamo, Cuba. *Cultivos Tropicales*, 39(1), 7-14.
- Peña, R; y Páez, E. (sin fecha). *Nemátodos Fitopatógenos*. Recuperado de: <http://virtual.uptc.edu.co/ova/fito/archivo/NEMATODOS.pdf>
- Peraza, W. (2018). Género *Helicotylenchus*. Entrevista. Heredia, Costa Rica.
- Pincioli, M., Ponzio, N., y Salsamendi, M. (2015). *El arroz alimento de millones*. Recuperado de: <https://libros.unlp.edu.ar/index.php/unlp/catalog/view/410/377/1287-1>
- Quito, C. (2017). *Manejo orgánico del cultivo de arroz en ladera en el cantón Macará provincia de Loja* (tesis de pregrado). Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador
- Ramírez, F. (2011). *Importación de plaguicidas en Costa Rica: Período 2007-2009*. Recuperado de: http://cep.unep.org/repcar/informacion-de-paises/costa-rica/Impoortaciones_07-09_REPCar.pdf
- REPCar. (2009). *Identificación y manejo integrado de plagas en banano y plátano Magdalena y Urabá Colombia*. Recuperado de: <http://cep.unep.org/repcar/proyectos-demostrativos/colombia-1/publicaciones-colombia/plagas-defintiva.pdf>

- Retana, J. (2015). *Manual Agronómico Cultivo de la Piña*. Recuperado de: <http://www.competitividad.org.do/wp-content/uploads/2016/05/Manual-Agron%C3%B3mico-Cultivo-de-la-Pi%C3%B1a.pdf>
- Rivera, G. (2007). *Conceptos introductorios a la Fitopatología*. San José, Costa Rica: EUNED.
- Rocha, L. (2018). *Identificación de nematodos fitoparásitos asociados al cultivo de Rosa (Rosa sp), en el sector Lasso provincia de Cotopaxi*. Recuperado de: <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/28377/1/Tesis-198%20%20Ingenier%C3%ADa%20Agron%C3%B3mica%20-CD%20579.pdf>
- Rodríguez, I., y Barrera, H. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*, 7(3), 323-335.
- Rodríguez, M., y Guerrero, M. (2002). *Guía técnica cultivo de plátano*. Recuperado de: <http://www.centa.gob.sv/docs/guias/frutales/Platano.pdf>
- Rodríguez, M. (2011). *Guía de identificación y manejo integrado de plagas y enfermedades en piña*. Recuperado de: <http://cep.unep.org/repcar/proyectos-demostrativos/costa-rica-1/publicaciones-banacol/guia%20identificacion5.pdf>
- Rojas, P., Araya, J., Álvarez, S., Fuentes, G., Velásquez, M., y Fallas, M. (2007). *Caracterización y plan de acción para el desarrollo de la agrocadena del cultivo de plátano en la Región Huetar Atlántica*. Recuperado de: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/E70-10317.pdf>
- Rubio, J. (2011). *Botánica, Organografía y Ciclo anual de la Vid*. Recuperado de: <http://repositorio.ual.es/bitstream/handle/10835/574/A8.%20BOTANICA%2C%20ORGANOGRAFIA%20Y%20CICLO%20ANUAL%20VID.pdf>

- SAG. (2005). *Actualización de información fitosanitaria nacional*. Recuperado de:
<https://www2.sag.gob.cl/agricola/vigilancia/noabril05.pdf>
- Salguero, B. (2006). *Caracterización de nematodos de vida libre como bioindicadores de calidad y salud de suelos bananeros en Costa Rica* (tesis de Maestría). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica.
- Sánchez, Y., y Vega., M. (2017). Situación del mercado del arroz en Costa Rica: una mirada a la realidad. *ABRA*, 56(38), 1-22.
- Sancho, C., y Salazar, L. (1985). Nematodos fitoparásitos del arroz (*Oriza sativa* L.) en el sureste de Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 11(2), 161-163.
- Seinhorst, J. (1959). A rapid method for the transfer of nematodes from fixative anhydrous glycerin. *Nematologica* 4: 67-69.
- Seinhorst, J. (1962). On the killing, fixation, and transferring to glycerin of nematodes. *Nematologica* 8: 29-32.
- Serrato, A., Flores, L., Aportela, J., y Sierra, E. (s.f). *PCR: Reacción en cadena de la polimerasa*. Recuperado de:
<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcr.pdf>
- Shanti, A., & Rajendran, G. (2006). Biological control of lesión nematodes in banana. *Nematologia mediterránea*, 34: 69-75.
- Sharma, G., & Bhatia, M. (2002). Effect of cultural practices on nematode populations and yield of french beans. *Nematologia mediterranea*, 30: 23-25.

- Sher, S. (1966). Revision of the Hoplolaiminae (Nematoda) VI *Helicotylenchus* (Steiner, 1945). *Nematologica*, 12(1966), 1-56.
- Siddiqi, M., y Pinochet, J. (1979). *Helicotylenchus stylocercus* n. sp. and *Rotylenchus phaliurus* n. sp. (Nematoda: Hoplolaimidae) from Costa Rica. *Journal of Nematology*, 11(4), 333-338.
- S'Jacob, J y Van Bezooijen, J. (1984). *A manual for practical work in nematology*. Wageningen Agricultural University. Wageningen, Netherland.
- Skantar, A., Handoo, Z., Akinbade, S., Mojtahedi, H., & Guerra, L. (2015). *Direct Submission*. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KM603531>
- Solano, F., Beachman, J., Thomasm, S., Steinberger, Y., Hanson, S. (2013). Assessment of soil nematode biodiversity in preserved soil samples nematodes. *Phytopathology*, 103(2), 2-136.
- Solís, A. (2007). *El cultivo de plátano (género Musa) en México* (trabajo final de grado). Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, Coahuila, México.
- Sosa, D., Tigano, S., y Arantes, O. (1998). Caracterizaçao de entomopatogenos. En Alves, S. (Ed.), *Controle microbiano de insetos. (Characterization of entomopathogenic. Control microbial of insects)*. (pp. 731-763). Piracicaba: FEALQ-USP.
- Stirling, G., Halpin, N., & Bell, J. (2011). A surface mulch of crop residues enhances suppressiveness to plant-parasitic nematodes in sugarcane soils. *Nematropica*, 41(1), 109-121.
- Subbotin, S., Dieter, S., Vovlas, N., Castillo, P., Tanti, J., Moens, M., & Baldwin, J. (2007). Application of the secondary structure model of rRNA for phylogeny: D2-D3 expansion segments of the LSU gene of plant-parasitic nematodes from the family

Hoplolaimidae Filipjev, 1934. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43(2007), 881-890.

Subbotin, S., Inserra, R., Marais, M., Mullin, P., Powers, T., Roberts, P.,...Baldwin, J. (2011). Diversity and phylogenetic relationships within the spiral nematodes of *Helicotylenchus* Steiner 1945 (Tylenchida: Hoplolaimidae) as inferred from analysis of the D2-D3 expansion segments of 28S rRNA gene sequences. *Nematology*, 13(3), 333-345.

Subbotin, S., Vovlas, N., Yeates, G., Hallmann, J., Kiewnick, S., Chizhov... Castillo, P. (2015). Morphological and molecular characterization of *Helicotylenchus pseudorobustus* (Steiner, 1914) Golden, 1956 and related species (Tylenchida: Hoplolaimidae) with a phylogeny of the genus. *Nematology*, 17(2015), 27-52.

Talwana, H., Speijer, P., Gold, C., Swennen, R., & De Waele, D. (2006). Effect of nematode infection and damage on the root system and plant growth of three *Musa* cultivars commonly grown in Uganda. *Nematology*, 8(2), 177-189.

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.

Tanha Maafi, Z., Subbotin, S., y Moens, M. (2003). Molecular identification of cyst-forming nematodes (Heteroderidae) from Iran and a phylogeny based on ITS-rDNA sequences. *Nematology*, 5(1), 99-111.

Tinoco, R., y Acuña, A. (2009). *Cultivo de arroz*. Recuperado de: http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual/bibliotecavirtual/a00177.pdf

- Tomazini, M., Ferraz, L., & Monteiro, A. (2008). Estrutura Trófica e Índices de Maturidade de Comunidades de Nematóides em Áreas Contíguas de Vegetação Natural e Submetidas a Diferentes Tipos de Uso Agrícola. *Nematologia Brasileira*, 32(3), 220-230.
- Torrado, M., y Castaño, J. (2009). Incidencia de nematodos en plátano en distintos estados fenológicos. *Agronomía Colombiana*, 27(2), 237-244.
- Torres, S. (2012). *Guía práctica para el manejo de banano orgánico en el valle del Chira*. Recuperado de: https://www.swisscontact.org/fileadmin/user_upload/COUNTRIES/Peru/Documents/Publications/manual_banano.pdf
- Tzortzakakis, E., Cantalapiedra, C., Castillo, P., Palomares, J., & Archidona, A. (2017). Morphological and Molecular Identification of *Longidorus euonymus* and *Helicotylenchus multicinctus* from the Rhizosphere of Grapevine and Banana in Greece. *Journal of Nematology*, 49(3), 233-235.
- Universidad de California (UC Davis). (s.f). *Parámetros morfométricos de nematodos*. Recuperado de: <http://plpnemweb.ucdavis.edu/nemaplex/Courseinfo/Curso%20en%20Español/Parámetros.html>
- Urek, G., Širca, S., & Karssen, G. (2003). A review of plant-parasitic and soil nematodes in Slovenia. *Nematology*, 5(3), 391-403.
- Uzma, I., Nasira, K., Firoza, K., & Shahina, F. (2015). Review of the genus *Helicotylenchus* Steiner, 1945 (Nematoda: Hoplolaimidae) with updated diagnostic compendium. *Pakistan Journal of Nematology*, 33(2), 115-160.

- Valero, E. (2017). *Análisis de las buenas prácticas agrícolas en el cultivo de uva (Vitis vinífera) en el litoral ecuatoriano* (trabajo final de grado). Universidad Técnica de Babahoyo, Babahoyo, Ecuador.
- Valcarce, E. (2015). *Contribución al estudio y control del “nematodo de los cítricos” T. semipenetrans Cobb, 1913* (tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Van Dessel, P., Coyne, D., Dubois, T., De Waele, D., & Franco, J. (2011). *In Vitro* nematicidal effect of endophytic *Fusarium oxysporum* against *Radopholus similis*, *Pratylenchus goodeyi* and *Helicotylenchus multicinctus*. *Nematropica*, 41(2), 154-160.
- Vargas, R., & Rodríguez, R. (2001). Bioremediative management of soybean nematode population densities in crop rotations with velvetbean, cowpea and winter crops. *Nematropica*, 31(1), 37-46.
- Vargas, E. (2011). *Guía para la identificación y manejo integrado de plagas en piña*. Recuperado de: <http://cep.unep.org/repcar/proyectos-demostrativos/costa-rica-1/publicaciones-proagroin/Guia%20Manejo%20de%20plagas%20en%20pina.pdf>
- Vegas, U. (2013). *Manejo integrado de banano orgánico*. Recuperado de: <https://www.agrobanco.com.pe/data/uploads/ctecnica/009-c-banano.pdf>
- Vejl, P., Skupinová, S., Sedlák, P., y Domkárová, J. (2002). Identification of PCN species (*Globodera rostochiensis*, *G. pallida*) by using of ITS-1 region's polymorphism. *ROSTLINNÁ VÝROBA*, 48(11), 486-489.
- Vera, N., Maicelo, J., Guevara, E., y Oliva, S. (2017). Nematodos fitoparásitos asociados al cultivo de piña (*Ananas comosus*) en Amazonas, Perú. *Scientia Agropecuaria*, 8(1), 79-84

- Villegas, O., Vargas, F., Pérez, J., García, R., Porras, S., Meneses... Alfaro, D. (2007). *Caracterización y plan de acción para el desarrollo de la agrocadena de Piña en la región Huetar Norte*. Recuperado de: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/ac-pina-rhn-2007.pdf>
- Wang, K., & Hooks, C. (2009). Survey of Nematodes on Banana in Hawaii, and Methods Used for Their Control. *Plant Disease*, 69: 1-7.
- Wing-Ching, R., Salazar, L., Flores, L., y Rojas, A. (2008). Reconocimiento de nematodos en pastos tropicales en las comunidades de Sucre y San Vicente, cantón de San Carlos. *Agronomía Costarricense*, 32(2), 129-136.
- Xiao, Y., Zhang, S., & Liu, G. (2013). *Direct Submission*. Recuperado de: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KF443214.1?report=genbank&log\\$=nucleotide&blast_rank=1&RID=6JTEBPH101R](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KF443214.1?report=genbank&log$=nucleotide&blast_rank=1&RID=6JTEBPH101R)
- Zhang, S. (2017). *Identification of Helicotylenchus species parasitized on Taiwan long mulberry*. Recuperado de: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KX822142.1?report=genbank&log\\$=nucleotide&blast_rank=1&RID=6JPZGC3G016](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KX822142.1?report=genbank&log$=nucleotide&blast_rank=1&RID=6JPZGC3G016)
- Zerpa, S., y Renaud, J. (s.f). Identificación de géneros de la familia Hoplolaimidae en Venezuela, con énfasis en especies de *Peltamigratus*. *Bioagro*, 4(3), 83-88.

ANEXOS

Anexo 1. Secuencias obtenidas a partir de la amplificación de los dominios D2-D3 de la región 28S del ARNr.

>Secuencia. Muestra de Piña. Pital de San Carlos, Alajuela. Costa Rica. *H. dihystera*. 28S 674 pb.

```
TGAGGGAAAGTTGCAAAGCACTTTGAAGAGAGAGTTAAAGAGGACGTGAAAC
CGATGAGGTGGAAACGGACAGAGCTGGCGTATCTGGCCTGCATTCAGCCGCTG
CGCGTCGGGCCCCGGTTTGCCGCACTCCAGATTGGGAAGGTGGCTGGGCTGCT
GGCGTGCTGGTGGTGCATTTGCAGGTGGAGTGCGCCGAGGCGCCCCGGTTCAGC
GGCATGAGCTCGGCTTTGAGGCCAGTCGCGCAAGCGGTCTGGTACCCGGGTCG
GGGGAGTGTTGTTTGGGCTGGGTGTTTCGCTGGGGCACAGGTTTCGGGCCTGGGT
GGGTGCCGAGCTGGCGGTTCGGCGGCGGTTCGCGTGCGACACGTGCCAGCAGTCA
GTTCCGGTCCTGCTCGAGCTCTCTCGTGTCCGGCCTCGGTGTAAAAGCCGGTCAT
CTGTCCGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTTTAGCGTGTGCGCGAGTC
ATTGGGTGTTGAAAACCCAGAGGCGTAATGAAAGTGAAGGTCTGCCTTGTGCA
GCTGATGTGTGATCCTGGGCGCCGCGGTGCCCGGGCGCAACATAGTCCCGTCC
CGACTGCATGCAGTGGGGCGGAGACAGAGCGTACGCGCTGAGACCCGAAAGA
TGGTGAACCTATTCCTGAGCAGGATGAAGCCAGAGGAAA
```

>Secuencia. Muestra de Uva. Pozos, Santa Ana, San José. Costa Rica. *H. dihystera*. 28S 731 pb.

```
GAGGGAAAGTTGCAAAGCACTTTGAAGAGAGAGTTAAAGAGGACGTGAAACC
GATGAGGTGGAAACGGACAGAGCTGGCGTATCTGGCCTGCATTCAGCCGCTGC
GCGTCGGGCCCCGGTTTGCCGCACTCCAGATTGGGAAGGTGGCTGGGCTGCTG
GCGTGCTGGTGGTGCATTTGCAGGTGGAGTGCGCCGAGGCGCCCCGGTTCAGCG
GCATGAGCTCGGCTTTGAGGCCAGTCGCGCAAGCGGTCTGGTACCCGGGTCGG
GGGAGTGTTGTTTGGGCTGGGTGTTTCGCTGGGGCACAGGTTTCGGGCCCCGGT
GGGTGCCGAGCTGGCGGTTCGGCGGCGGTTCGCGTGCGACACGTGCCAGCAGTCA
GTTCCGGTCCTGCTCGAGCTCTCTCGTGTCCGGCCTCGGTGTAAAAGCCGGTCAT
CTGTCCGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTTTAGCGTGTGCGCGAGTC
ATTGGGTGTTGAAAACCCAGAGGCGTAATGAAAGTGAAGGTCTGCCTTGTGCA
GCTGATGTGTGATCCTGGGCGCTGCGGCGCCCGGGCGCAACATAGTCCCGTCC
CGACTGCATGCAGTGGGGCGGAGACAGAGCGTACGCGCTGAGACCCGAAAGA
TGGTGAACCTATTCCTGAGCAGGATGAAGCCAGAGGAACTCTGGTGGAAAGTCC
GAAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCTGACTTGGGTATA
```

>Secuencia. Muestra de Cítricos. La Virgen, Los Chiles, Alajuela. Costa Rica. *H. dihystra*. 28S 722 pb.

GGAGGGAAAGTTGCAAAGCACTTTGAAGAGAGAGTTAAAGAGGACGTGAAAC
CGATGAGGTGGAAACGGACAGAGCTGGCGTATCTGGCCTGCATTCAGCCGCTG
CGCGTCGGGCCCCGGTTTGCCGCACTCCAGATTGGGAAGGTGGCTGGGCTGCT
GGCGTGCTGGTGGTGCATTTGCAGGTGGAGTGCGCCGAGGCGCCCGTTTCAGC
GGCATGAGCTCGGCTTTGAGGCCAGTCGCGCAAGCGGTCTGGTACCCGGGTCG
GGGGAGTGTGTTGGGCTGGGTGTTTCGCTGGGGCACAGGTTTCGGGCCTGGGT
GGGTGCCGAGCTGGCGGTTCGGCGGCGGTTCGCGTGCGACACGTGCCAGCAGTCA
GTTTCGGTCTGCTCGAGCTCTCTCGTGTCCGGCCTCGGTGTAAAAGCCGGTCAT
CTGTCCGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTTTAGCGTGTGCGCGAGTC
ATTGGGTGTTGAAAACCCAGAGGCGTAATGAAAGTGAAGGTCTGCCTTGTGCA
GCTGATGTGTGATCCTGGGCACCGCGGTGCCCGGGCGCAACATAGTCCCGTCC
CGACTGCATGCAGTGGGGCGGAGACAGAGCGTACGCGCTGAGACCCGAAAGA
TGGTGAACCTATTCCTGAGCAGGATGAAGCCAGAGGAAACTCTGGTGGAAAGTCC
GAAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCTGA

>Secuencia. Muestra de Plátano. Talamanca, Limón. Costa Rica. *H. dihystra*. 28S 921 pb.

GGCGGCCGCGGGAATTCGATTACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGCAAAGCACT
TTGAAGAGAGAGTTAAAGAGGACGTGAAACCGATGAGGTGGAAACGGACAGA
GCTGGCGTATCTGGCCTGCATTCAGCCGCTGCGCGTCGGGCCCCGGTTTGCCGC
ACTCCAGATTGGGAAGGTGGCTGGGCTGCTGGCGTGCTGGTGGTGCATTTGCA
GGTGGAGTGCGCCGAGGCGCCCGTTTCAGCGGCATGAGCTCGGCTTTGAGGCC
AGTCGCGCAAGCGGTCTGGTACCCGGGTTCGGGGGAGTGTTGTTTGGGCTGGGT
GTTTCGCTGGGGCACAGGTTTCGGGCCTGGGTGGGTGCCGAGCTGGCGGTTCGGC
GGCGGTTCGCGTGCGACACGTGCCAGCAGTCAGTTCGGTCTGCTCGAGCTCTCT
CGTGTCCGGCCTCGGTGTAAAAGCCGGTCATCTGTCCGACCCGTCTTGAAACAC
GGACCAAGGAGTTTAGCGTGTGCGCGAGTCATTGGGTGTTGAAAACCCAGAGG
CGTAATGAAAGTGAAGGTCTGCCTTGTGCAGCTGATGTGTGATCCTGGGCACC
GCGGTGCCCGGGCGCAACATAGTCCCGTCCCGACTGCTTGCAGTGGGGCGGAG
ACAGAGCGTACGCGCTGAGACCCGAAAGATGGTGAACCTATTCCTGAGCAGGAT
GAAGCCAGAGGAAACTCTGGTGGAAAGTCCGAAGCGATTCTGACGTGCAAATCG
ATCGTCTGACTTGGGTATAGGGGCGAAAGACTAATCGAACCATCTAGTAGCTG
GTTCCCTCCGAAATCACTAGTGAATTCGCGGCCCGCCTGCAGGTCGACCATATGG
GGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTA
AATAGCTTGCCGTAAT

>Secuencia. Muestra de Banano. La Tigra, Jicaral, Puntarenas. Costa Rica. *H. multicinctus*.
28S 722 pb.

GGAGGGAAAGTTGCAAAGCACTTTGAAGAGAGAGTTAAAGAGGACGTGAAAC
CGATGAGGTGGAAACGGACAGAGCTGGCGTATCTGGCCTGTATTCAGCCGCTC
GTTGTTCGGCCCACCGTTGCTGCACTCCAGATTGGGAAGGGCGGCGTGGGCGCT
GCTGCGTGTGGTGCATTTGCAGGTGGAGTGCCTGAGGCGCTCGGCTCAGCGG
CATGAGCTCAGCTTTGAGGCCAACCGTGCAAACGGTCTGGTACCCGGGCTGGG
GGAGTGTGTTTGGGCTGGGTGTTTCGCTTGTGGCTGTGGTTTCGGGCCCGGGTG
GGTGCCGAGCTGGCGGTCGGTGGCGGTCGCTTGCACACGTGCCAGCAGTCAG
TTCGGTCCTGCTCGAGCTCTCATTGTGGCCCGGCCTCGGTGTAAGCCGGTCA
TCTGTCCGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTTTAGCGTGTGCGCGAGT
CATTGGGCGTTGAAAACCCAAAGGCGCAATGAAAGTGAAGGTCTGCCTTGTGC
AGCTGATGTGTGATCCCGGGCGCTGCGGCGCACGGGCGCAACATAGTCCCGTC
CCGACTGCATGCAGTGGGGCGGAGACAGAGCGTACGCGCTGAGACCCGAAAG
ATGGTGAAGTATTCCTGAGCAGGATGAAGCCAGAGGAAACTCTGGTGGAAGTC
CGAAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCTGA

>Secuencia. Muestra de Arroz. Paso Canoas, Puntarenas. Costa Rica. *Helicotylenchus* sp.
28S 735 pb.

AAGTACCGTGAGGGAAAGTTGCAAAGCACTTTGAAGAGAGAGTTAAAGAGGA
CGTGAAACCGATGAGGTGGAAACGGACAGAGCTGGCGTATCTGGCCTGCATTC
AGCCGCTGCGGTGTCGGCCCCACGGTTGCCGCTCTCCAGATTGGGTGGGGTGG
CTTGGGCGCTGGCGTTGTGGTGGTGCATTTGCAGGTGGAGTGCGCCGAGGCGC
TCGGCTCAGCGGCATGAGCTCGGCTTTGAGGCCAACCGCGCAAGCGGTTTGGT
ACCCGGGTGCGGGGAGTGTGTTTGGGCTGGGCGTTCGCCTTCAGGGTTGTGGT
TTCGGGCCAGGGTGGGTGCCGAGCCGGCGGTTCGGCGGCGGTTCGCATGCGACAC
GTGCCAGCAGTCGGTTCGGTCTGCTCGAGCTCTCAACGGCCCCGGCCTCGGTGT
AAAAGCCGGTCATCTGTCCGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTTTAGC
GTGTGCGCGAGTCATTGGGCGTTGAAAACCCAAAGGCGCAATGAAAGTGAAGG
TCTGCCTTGTGCAGCTGATGTGTGATCCCGGGTGCCTCGGTGCCCGGGCGCAAC
ATAGTCCCGTCCCGACCGCTTGCGGTGGGGCGGAGACAGAGCGTACGCGCTGA
GACCCGAAAGATGGTGAAGTATTCCTGAGCAGGATGAAGCCAGAGGAAACTCT
GGTGGAAGTCCGAAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCTGA

>Secuencia, Muestra de Arroz. Paso Canoas, Puntarenas. Costa Rica. *Helicotylenchus* sp.
28S 1070 pb

GGCCAGTGAGCGCCACGCAATTTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCC
CAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGGTTTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG
ATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTA
GGTGACACTATAGAATACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCC
ATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTGATTACAAGTACCGTG
AGGGAAAGTTGCAAAGCACTTTGAAGAGAGAGTTAAGGAGGACGTGAAACCG

ATGAGGTGGAAACGGACAGAGCTGGCGTATCTGGCCTGCATTCAGCCGCTGCG
GTGTCCGCCCCACGGTTGCCGCTCTCCAGATTGGGTGGGGTGGCTTGGGCGCTG
GCGTTGTGGTGGTGCATTTGCAGGTGGAGTGCGCCGAGGCGCTCGGCTCAGCG
GCATGAGCTCGGCTTTGAGGCCAACCGCGCAAGCGGTCTGGTACCCGGGTTCGG
GGGAGTGCTGTTTGGGCTGGGCGTTCGCCTTCAGGGTTGTGGTTTTCGGGCCAGG
GTGGGTGCCGAGCCGGCGGTCCGGCGGGCGGTCGCATGCGACACGTGCCAGCAGT
CGGTTCCGGTCCTGCTCGAGCTCTCAACGGCCCCGGCCTCGGTGTA AAAAGCCGGTC
ATCTGTCCGACCCGTCTTAAAACACGGACCAAGGAGTTTAGCGTGTGCGCGAG
TCATTTGGGCGTTGAAAACCCAAAGGCGCAATGAAAGTGAAGGTCTGCCTTGTG
CAGCTGATGTGTGATCCCGGGTGCCGCGGTGCCCGGGCGCAACATAGTCCCGT
CCCGACCGCTTGCGGTGGGGCGGAGACAGAGCGTACGCGCTGAGACCCGAAA
GATGGTGAACCTTTCCTGAGCAGGATGAAGCCAGAGGAACTCTGGTGGAAAGT
CCGAAGCGATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCTGACTTGGGTATAGGGGCGAA
AGACTAATCGAACCATCTAGTAGCTGGTTCCTTCCGAATCGAATTCCCGCGGCC
GCCATG

Anexo 2. Secuencias obtenidas a partir de la amplificación de la región ITS del ARNr.

>Secuencia. Muestra de Piña. Pital, San Carlos, Alajuela. Costa Rica. *H. dihystra*. ITS
768 pb.

TTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTC
ATTACACCACTCAAGCTATGCTTGGTATTGGGCGTCGTCCTTAGTKGGGYGSGC
CTTRAAGACCTMGGCGAGGCCRCTCMGGCWKTAGGCGTAGTAGAATTKAWTC
SAACGTcTGTCAAAAGAGAGGAACCTGCGCGACWSAARCCTTTATTTTTCTAGG
TTGACCTCGGATCACGTAGGGATAACCCGCTGAACCGAcGCATATAGGTTCCGGCC
ACGCGAGGCCCGGGCCTAGACTTGATGAGCGCCAAGCATGTTGCGCCGCCAACAA
CCTCTTTTTTCACTAAAAATTTTTAAAGATGCACATGTGTGTGCAGTATGAACA
AAAATTCTAGCTTTATCGGTGGATCACTCGGCTCGTAGGTCGATGAAGAACGC
ACCCAACCTGCGATAAGTAGTGTGAACTGCAAAAACCTTGAACACAGAACATTC
GAATGCACATTGCGCCATTGGAGTGACATCCTTTGGCACGCCTGGTTCAGGGTC
GTAATCCTAAAGCGCACAGCGTGTGCGTGTACTGGCTGCCAGATCAACGTGTG
CGAACATACCGTTGTTTCAGGCATTGTGTTGTTGTGCGCCTGGCGGCGTCCGGGCT
AGCGCTGGCACGGACTTGTATGCATTCAGTTGCGTCCGTGTTCTGAAATTGGT
TTAAGCGTTGCTCGGCTGTCGCTGCGGTAGCACTCGCATCATTAAACATTTTCGA
CCTGAACTCAGACGTGAA

>Secuencia. Muestra de Cítricos. La Virgen, Los Chiles, Alajuela. Costa Rica. *H. dihystra*.
ITS 994 pb.

TACCTGGCTGTATGGCGCTTGTGGGCGCACACTTCCCTCGCGGGTGTCCCATTG
CTTTGGGTACCTAAACGTCCGTGTTTCGGTCTACGGAGGCGAAGAGTCCAGGCT
GGTCTTCAAGAAGACTGGCTGCCACGAGTGCTGAACGGCCGAACGCCCTGTGG

GATTGTGGGGTGTTCAGTCTGGTGTGAGCATGGTGTGAGCGCACACTTCCCTCGCGG
GTGGCCATTGCCTTGGGCGCCTAAACGTCCGTGTTTCGGTCTACGGAGGCGAA
GAGTCCAGGAGACTCCCTATGCGTACGGGGGAATCCGCATCGTGTGTGCTGGA
CAGACACGCCCTCAGGGCACCAAACGGCTGCCGTTGGSGTCTATGCGTTGTTGA
GCAGTTGTTGTGCACTTGTGTTGTGGTGTCTTGGGTTGCATGCCTTGGAAACCT
GCGCATTGGTTCGCTCCATCGGTGTGTCCAGAGCGCCCCGAGCACTCGTGTACT
ACGTCCGTGGCTGCGATGAGACGACGCGACAGGGTTCGGCCACGCGAGGCCG
GCCTAKACTTGTGAGCGCCGAGCATGTTGCGCCGCCAACACCTCTTTTTTTCAC
TAAAAATTTTTAAAGATGCACATGTGTGTGAGTATGAACAAAAATTCTAGCTT
TATCGGTGGATCACTCGGCTCGTAGGTGATGAAGAACGCAGCCAACTGCRAT
AAGTAGTGTGAACTGCARAAACCTTGAACACAGAACATTCGAATGCACATTGC
GCCATTGGAGTGACATCCTTGGCACGCCTGGTTCAGGGTCGTAATCCTAAAGC
GCACAGCGTGTGCGTGTACTGGCTGCCAGATCAACGTGTGCGAACATAACCGTT
GTTTCARGCATTGTGTTGTTGTGCGCCTGGCGGCGTTCGGGCTAGCGCTGGCACGG
ACTTGTATGCATTtCAGTTGCGTCCGTGTTCTGAAATTGGTTTAAGCGTTGCTC
GGCTGTCGCTGCGGTAGCACTCGCATCA

>Secuencia. Muestra de Plátano. Talamanca, Limón. Costa Rica. *H. dihystra*. ITS 396 pb.

CTACCTGGCTGTATGGCGCTTGTGGGCGCACACTTCCCTCGCGGGTGTCCCATT
GCTTTGGGKACCTAAACGTCCGTGTTTCGGTCTACGGAGGCGAAGAGTCCAGGC
TGGTCTTCAAGAAGACTGGCTGCCACGAGTGCTGAACGGCCGAACGCCCTGTG
GGATTGTGGGGTGTTCAGTCTGGTGTGAGCATGGTGTGAGCGCACACTTCCCTCGCG
GGTGGCCATTGCCTTGGGCGCCTAAACGTCCGTGTTTCGGTCTACGGAGGCGA
AGAGTCCAGGAGACTCCCTATGCGTACGGGGGAATCCGCATCGTGTGTGCTGG
ACAGACACGCCCTCAGGGCACCAAACGGCTGCCGTTGGCGTCTATGCGTTGTT
GAGCAGTTGTTGTGCACTTGTGT

>Secuencia. Muestra de Banano. La Tigra, Jicaral, Puntarenas. Costa Rica. *H. multicinctus*. ITS 707 pb.

CTCCTCGCGGTGAGGAGAAGCCGCATTGTGTGCTGGTGGCACSCCCCAGGGCT
AACGGCTGCCGTTGGCGTCTCTGCGTTGTTGAGCAGTTGTTGTGCACTTGCCTT
GTGCGGGATGCATACTGCGCTGGACATGTGGCAATTGGGCCARCCGTCCACTG
TGGTACCCGTGCGGCACTTGTGTGCTACGTCCGTGGCTGTGATGAGACAACGCG
ACaGGGTTTGGCCTTGCCTGGCCGGGCCTAGACTTGATGAGCCCCTCGCACGTT
GGGCCGCCAACAACCCTTTTTTTCACTAAAATTTTTTAAAGTCGCACTCGGTGC
GCAAGCAGAAAGAAATTCTAGTCTTATCGGTGGATCACTCGGCTCGTAGGTGCG
ATGAAGAACGCAGCCAACTGCGATAAGTAGTGTGAACTGCAGAAACCTTGAAC
ACAGAACATTCGAATGCACATTGCGCCATCGGAGTCACATCCTTTGGCACGCCT
GGTTCAGGGTCGTTTTCTTAAACGCACAGCGTGTGCGTGTACACTGGCTGTGCG
GATCAACGCGTGTGACCAAACCGTTGTTCTGGCATTGTTGTGTTGGTGCGCCCGGCG
GTGTCGAGTAGCGCTGGCATGGACTTGTTCACGCAATGCAACATTTGTGTGTCC
ATGTTCCATCTGTGAGTGGTTTAGGCGTGGCTTGGCACTTGTCTCGGGTGGCAGC
TTGTTGTAA

>Secuencia. Muestra de Banano. La Tigra, Jicaral, Puntarenas. Costa Rica. *H. multicinctus*. ITS 1040 pb.

ACCTGATTACAAATCACCACCGACCTTGGCCGATGTTGGAGAGGAGTGGGCGC
ACGCATCCCTCGCGGGGTTGCCGAGAGCAATACCTAAACGTCCGTGTTCCGGTCT
ACGGAGGCGATGTGTCCAGGCAGACAGCTGCCACTCCTCGCTCGGCCTAAACG
CCCTGTGGGTAACTGTTTTTGTGTGGGGTGTCAATTTGGTGCACAGTGGCGCAC
GCTTTCCTCTGGCGTGAGGCGAAGTGTCCGGGCAACTCCTCGCGGTGAGGAGA
AGCCGCATTGTGTGCTGGTGGCACGCCCCAGGGCTAACGGCTGCCGTTGGCGT
CTCTGCGTTGTTGAGCAGTTGTTGTGCACTTGCGTTGTGCGGGATGCATACTGC
GCTGGACATGTGGCAATTGGGCCAGCCGTCCACTGTGGTACCCGTGCGGCACTT
GTGTGCTACGTCCGTGGCTGTGATGAGACAACGCGACAGGGTTCGGCCTTGCCCT
GGCCGGGCCTAGACTTGATGAGCCCCTCGCACGTTGGGCCGCCAACAACCCTTT
TTTTCACTAAAATTTTTTAAAGTCGCACTCGGTGCGCAAGAAGAAAGAAATTCT
AGTCTTATCGGTGGATCACTCGGCTCGTAGGTCGATGAAGAACGCAGCCA
GCGATAAGTAGTGTGAACCTGCAGAAACCTTGAACACAGAACATTTCGAATGCAC
ATTGCGCCATCGGAGTCACATCCTTTGGCACGCCTGGTTCAGGGTCGTTTTCT
AAAACGCACAGCGTGTGCGTGTACACTGGCTGTCGGATCAACGCGTGTGACCA
AACCGTTGTTCTGGCATTGTTGTGTGGTGCGCCCGGCGGTGTCGAGTAGCGCTGGC
ATGGACTTGTTTACGCAATGCAACATTTGTGTGTCCATGTTCCATCTGTGAGTG
GTTTAGGCGTGGCTTGGCACTTGCTCGGGTGGCAGCTTGTTGTAAGCAAATCAA
CATTTTCGACCTGAACTCAGACGTGAACACCCGCTGAACTTAAGCATATAATCG
AATCCCGCGGCCGCCATGGC