



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Caracterización morfológica y molecular de dos especies de nematodos fitoparásitos de mayor prevalencia asociados al cultivo de piña en el Valle del Cauca, Colombia

Elmer Rafael Márquez Paz

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ciencias
Biológicas

Palmira, Colombia

2020

Caracterización morfológica y molecular de dos especies de nematodos fitoparásitos de mayor prevalencia asociados al cultivo de piña en el Valle del Cauca, Colombia

Elmer Rafael Márquez Paz

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

- **Magíster en Ciencias Agrarias**

Director:

Ph.D. MSc., I.A. Eyder Daniel Gómez López

Codirector:

Ph.D., MSc., I.A. Donald Heberth Riascos Ortiz

Línea de Investigación:

Protección de Cultivos Grupo de Investigación:

Protección Vegetal para el Mejoramiento de la Productividad

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ciencias Agrícolas Palmira,
Colombia

2020

Dedicatoria

*A mis padres: María Santana Paz
Alvarenga y José Fermín Márquez Hernández,
y demás familia*

Agradecimientos

A mis padres y demás familia por ayudarme y apoyarme en todo.

Al director de mi tesis Eyder Daniel Gómez López PhD. por abrirme un espacio en el laboratorio de Diagnóstico Vegetal para realizar la investigación y por su valiosa orientación y apoyo durante la investigación.

A mi codirector Donald Heberth Riascos Ortiz por su apoyo en toda mi maestría y por su inconmensurable colaboración con sus conocimientos en mi tesis.

Al profesor Jaime Eduardo Muñoz Florez PhD. por darme espacio en el Laboratorio de Biología Molecular.

A la doctora Paula Andrea Rugeles PhD. por apoyarme con conocimiento y materiales en el Laboratorio de Biología Molecular.

A Herman Alberto Revelo por su valioso apoyo en parte de la bioinformática.

A David Velásquez Ortiz, Angela Liliana Rivera, Viviana Sánchez Soto y al Profesor Carlos Alberto Huertas Davey por el trato a mi persona, su espectacular amistad, apoyo y consejos.

A todos los compatriotas hondureños por su amistad y apoyo.

Gran agradecimiento a los productores de piña que visité por escuchar mis llamadas y permitirme entrar a sus cultivos a coleccionar las muestras en sus fincas y por su agradable trato.

Resumen

Los nematodos fitoparásitos en el cultivo de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr) en Colombia y a nivel mundial han sido poco estudiados y se carece de información sobre su taxonomía. Las pocas investigaciones sobre fitonemátodos en piña no han caracterizado poblaciones a nivel de especie mediante diagnóstico morfo métrico, molecular y filogenético, por lo tanto, se desconocen las especies presentes en las zonas de mayor producción. En ese sentido, surge la necesidad de conocer con certeza las especies de estos microorganismos asociadas al cultivo. El conocimiento de las especies de fitonemátodos en un cultivo permite proponer medidas de manejo adecuadas que mantengan poblacionales por debajo de niveles de daño económico y evitar su diseminación entre las áreas productoras de este frutal y otros cultivos. Por tal razón, en esta investigación se planteó identificar con diagnóstico morfológico, morfo métrico y molecular especies de nematodos fitoparásitos de mayor prominencia en el cultivo de piña en municipios productores en el Valle del Cauca. Los géneros más prevalentes fueron: *Helicotylenchus*, *Pratylenchus* y *Rotylenchulus*. En este trabajo se detalla información sólo de *Helicotylenchus* y *Rotylenchulus*, a los cuales se les hizo diagnóstico morfológico, análisis morfo métrico y molecular. En el género *Helicotylenchus* se incluyeron datos morfo métricos de 12 caracteres, secuencias de la región D2-D3 de la región de expansión 28S e ITS las cuales mostraron alta afinidad con secuencias de referencia de *H. dihystra* (superior a 99% de similitud), a partir de análisis filogenético de máxima verosimilitud se observó clara y estrecha agrupación en un mismo clado de las secuencias de este estudio con las secuencias de referencia para la especie *Helicotylenchus dihystra*. En el género *Rotylenchulus* se incluyeron 16 caracteres diagnóstico y secuencias D2-D3 de la región de expansión 28S del ADN ribosomal con alta afinidad con secuencias de referencia de *R. reniformis* (superior a 99% de similitud). En el análisis de máxima verosimilitud se observó que la especie *Rotylenchulus reniformis* se agrupó estrechamente en un mismo clado con poblaciones de referencia de *R. reniformis* tipo A. Los caracteres diagnóstico y las regiones D2-D3 e ITS fueron fundamentales para la identificación de *Helicotylenchus dihystra* y *Rotylenchulus reniformis* tipo A. Es el primer reporte en Colombia y a nivel mundial que incluye taxonomía integrativa de estos dos géneros en el cultivo de piña. Esta información contribuye al conocimiento de la taxonomía de los nematodos fitoparásitos asociados a piña en Colombia.

Palabras clave: fitonemátodos, especies, caracteres diagnóstico, D2-D3, ITS, máxima verosimilitud

Abstract

Phytoparasitic nematodes in the cultivation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) have been little studied in Colombia and worldwide, therefore, there is a lack of information on their taxonomy. The few investigations on pineapple phytonematodes have not characterized populations at the species level through morphometric, molecular and phylogenetic diagnosis. Hence, the species present in the areas of greatest production are unknown. In this sense, the need arises to know with certainty the species of these microorganisms associated with cultivation. The knowledge of the phytonematodes species in a crop allows us to propose adequate management measures that keep populations below levels of economic damage and avoid their spread among the areas that produce this fruit and other crops. For this reason, in this investigation, it was proposed to identify with morphological diagnosis, morphometric and molecular analysis species of phytoparasitic nematodes of greater prominence in the cultivation of pineapple in producing municipalities in Valle del Cauca. The most prevalent genera were: *Helicotylenchus*, *Pratylenchus* and *Rotylenchulus*. In this work, information is detailed only for *Helicotylenchus* and *Rotylenchulus*, for which morphological diagnosis, morphometric and molecular analysis were made. In the genus *Helicotylenchus*, 12-character morphometric data were included, sequences from the D2-D3 region of the 28S expansion region and ITS which showed high affinity with *Helicotylenchus dihystera* reference sequences (greater than 99% similarity), a clear and close grouping in the same clade of the sequences of this study with the reference sequences for the species *H. dihystera* was observed from maximum likelihood phylogenetic analysis. The genus *Rotylenchulus* included 16 diagnostic characters and D2-D3 sequences from the 28S expansion region of ribosomal DNA with high affinity for *R. reniformis* reference sequences (greater than 99% similarity). In the maximum likelihood analysis, it was observed that the species *Rotylenchulus reniformis* was closely grouped in the same clade with reference populations of *R. reniformis* type A. The diagnostic characters and the D2-D3 and ITS regions were fundamental for the identification of *Helicotylenchus dihystera* and *Rotylenchulus reniformis* type A. It is the first report in Colombia and worldwide that includes integrative taxonomy of these two genera in the cultivation of pineapple. This information contributes to increasing the knowledge of pineapple-associated phytoparasitic nematodes in Colombia.

Keywords: phytonematodes, species, diagnostic characters, D2-D3, ITS, maximum likelihood.

Contenido

	Pág.
Introducción general	I
Objetivos	V
Objetivo general.....	V
Objetivos específicos.....	V
1. Capítulo de poblaciones de nematodos fitoparásitos y sus parámetros ecológicos y parasíticos en el cultivo de piña	1
1.1 Introducción.....	3
1.2 Revisión de literatura.....	4
1.2.1 Importancia y producción de la piña.....	4
1.2.2 Producción de piña en Colombia	5
1.2.3 Plagas y enfermedades asociadas al cultivo de piña	5
1.2.4 Nematodos en el cultivo de piña	6
1.2.5 Sintomatología en el cultivo	7
1.2.6 Manejo de los nematodos.....	8
1.3 Materiales y métodos	9
1.3.1 Localización del experimento.....	9
1.3.2 Colecta de muestras.....	10
1.3.3 Extracción de nemátodos de muestras de suelo.....	11
1.3.4 Extracción de nematodos de muestras de raíces.....	11
1.3.5 Cuantificación de nematodos fitoparásitos.....	12
1.3.6 Análisis estadístico	13
1.4 Resultados	13
1.4.1 Poblaciones de nematodos fitoparásitos.....	15
1.5 Discusión	26
1.6 Conclusiones.....	32
1.7 Bibliografía	33
2. Capítulo sobre identificación morfológica, morfométrica y molecular de <i>Helicotylenchus dihystra</i> en el cultivo de piña	43
Resumen	43
2.1 Introducción.....	45
2.2 Revisión de literatura.....	46
2.2.1 Ciclo de vida	47
2.2.2 Importancia del nematodo	47
2.2.3 Identificación.....	48
2.2.4 Trabajos en Colombia.....	49

2.3	Materiales y métodos.....	50
2.3.1	Localización, muestreo y procesamiento de las muestras.....	50
2.3.2	Extracción de fitonemátodos de muestras de suelo.....	51
2.3.3	Extracción de fitonemátodos de muestras de raíces.....	51
2.3.4	Fijación de los nematodos.....	52
2.3.5	Caracteres diagnóstico considerados en la morfometría.....	52
2.3.6	Análisis estadístico.....	53
2.3.7	Análisis molecular.....	53
2.3.8	Análisis filogenético.....	54
2.4	Resultados.....	54
2.4.1	Identificación morfológica y morfométrica.....	54
2.4.2	Identificación molecular.....	61
2.5	Discusión.....	64
2.6	Conclusiones.....	67
2.7	Bibliografía.....	68
3. Capítulo sobre la identificación morfológica, morfométrica y molecular de <i>Rotylenchulus reniformis</i> en piña.....		75
3.1	Introducción.....	77
3.2	Revisión de literatura.....	78
3.2.1	Sintomatología.....	78
3.2.2	Biología.....	80
3.3	Materiales y métodos.....	82
3.3.1	Localización.....	82
3.3.2	Muestreo y procesamiento de las muestras.....	82
3.3.3	Extracción de fitonemátodos de muestras de suelo.....	82
3.3.4	Extracción de fitonemátodos de muestras de raíces.....	83
3.3.5	Fijación de los nematodos.....	84
3.3.6	Análisis estadístico.....	84
3.3.7	Análisis molecular.....	84
3.3.8	Análisis filogenético.....	85
3.4	Resultados.....	86
3.4.1	Identificación morfológica y morfométrica.....	86
3.4.2	Identificación molecular.....	91
3.5	Discusión.....	94
3.6	Conclusiones.....	97
3.7	Bibliografía.....	98

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1.1. Ubicación geográfica de los sitios muestreados (mapa elaborado por el autor).....	15
Figura 1.2. Biplot de las quince poblaciones analizadas en los diferentes municipios....	22
Figura 1.3. Dendrograma del análisis de conglomerado de las poblaciones estudiadas.	23
Figura 2.1. Morfología de <i>Helicotylenchus dihyстера</i> . (A) hábito <i>post-mortis</i> de una hembra de <i>H. dihyстера</i> , (B y C) región anterior de hembras de <i>H. dihyстера</i> , (D) región posterior de <i>H. dihyстера</i> . v = vulva, pia = perilla indentada anteriormente, prp = perilla redondeada posteriormente, dgo = orificio de la glándula dorsal esofágica, a = ano, cc = cola conoide. La foto A en escala de 20 μm y B – D a 10 μm . (Fotos tomadas por el autor).....	56
Figura 2.2. Árbol filogenético de ML de <i>Helicotylenchus dihyстера</i> de la región de expansión D2-D3 del gen 28S del ADN ribosomal y 1000 bootstrap con el modelo de sustitución nucleotídica HKY + I + G. El grupo externo es <i>Hoplolaimus galeatus</i> se observa en color gris. Las secuencias generadas en este trabajo se muestran en negrita. Los valores representan la probabilidad posterior y la escala representa el número de sustituciones por sitio.	62
Figura 2.3. Árbol filogenético de ML de <i>Helicotylenchus dihyстера</i> basado en la región ITS del ADN ribosomal y 1000 bootstrap y bajo el modelo de sustitución de nucleótidos F81 + I + G. El grupo externo es <i>Rotylenchus laurentinus</i> y se representa de color gris. Las secuencias generadas en este trabajo se muestran en negrita. Los valores de los representan la probabilidad posterior y la escala representa el número de sustituciones por sitio.....	63
Figura 3.1. Morfología de <i>Rotylenchulus reniformis</i> . (A y B) hembras inmaduras; (C) macho; (D y E) región anterior de hembras inmaduras. v = vulva; e = espícula, dgo = orificio de la glándula dorsal esofágica, pe = poro excretor. Fotos A – C en escala de 20 μm , D y E a 10 μm . (Fotos tomadas por el autor).	87
Figura 3.2. Biplot para las poblaciones colombianas (<i>Musa</i> 1 y 2 y Buga) de <i>R. reniformis</i> asociada al cultivo de piña y otras especies referencia del género.....	88
Figura 3.3. Árbol filogenético de ML de <i>Rotylenchulus reniformis</i> , basado en la subunidad larga D2-D3 del gen 28S del ADN ribosomal y 1000 bootstrap con modelo de sustitución de nucleótidos TPM1uf + I + G. El grupo externo <i>Pratylenchus scribneri</i> representado en color gris. Las secuencias generadas en este trabajo se representan en negrita. Los valores representan la probabilidad posterior y la escala representa el número de sustituciones por sitio	92

Figura 3.4. Árbol filogenético de máxima verosimilitud de *Rotylenchulus* con la región de expansión D2D3 del ADN ribosomal 28S y 1000 bootstrap y con modelo de sustitución de nucleótidos TrN + I + G. Las secuencias de *Rotylenchulus* de este estudio se agruparon con las de referencia de tipo A. Las secuencias generadas en este trabajo se representan con color negro. El grupo externo *Longidorus diadecturus* se observa en color gris 93

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1.1. Principales países productores de piña a nivel mundial en 2017.....	4
Tabla 1.2. Departamentos con mayor producción de piña en Colombia para el año 2018 5	
Tabla 1.3. Coordenadas y ubicación de las fincas incluidas en la investigación 2018-2019	10
Tabla 1.4. Fincas muestreadas en cinco municipios del Valle del Cauca (2018-2019)...	14
Tabla 1.5. Porcentajes de frecuencia de nematodos fitoparásitos en muestras de suelo y raíces de piña 2018 – 2019	16
Tabla 1.6. Parámetros ecológicos y parasíticos en muestras de suelo por municipio. ...	18
Tabla 1.7. Parámetros ecológicos y parasíticos de nematodos fitoparásitos asociados a raíces de piña.....	19
Tabla 1.8. Valores propios y porcentaje total de la varianza acumulada para cada componente principal.	20
Tabla 1.9. Correlación de cuatro componentes principales entre los géneros estudiados.	21
Tabla 1.10. Correlación de los fitonemátodos en muestras de suelo y raíces.	23
Tabla 1.11. Análisis de correlación entre los géneros encontrados en el estudio.	25
Tabla 2.1. Ubicación geográfica de las fincas muestreadas 2018-2019	50
Tabla 2.2. Valores propios y porcentaje total de la varianza acumulada para cada componente principal	57
Tabla 2.3. Correlación entre los primeros tres componentes principales y los caracteres evaluados en hembras de <i>Helicotylenchus</i> spp.	58
Tabla 2.4. Localidades de donde se obtuvieron las poblaciones.....	58
Tabla 2.5. Datos morfométricos de las poblaciones de <i>H. dihystra</i> en cultivo de piña estudiadas en este trabajo.	60
Tabla 3.1. Datos morfométricos de la población analizada de <i>R. reniformis</i>	89
Tabla 3.2. Valores propios y varianza total acumulada para cada componente	90
Tabla 3.3. Correlación de siete Componentes Principales y los caracteres morfométricos más relevantes para hembras inmaduras de <i>R. reniformis</i>	90

Introducción general

Desde los inicios de la agricultura, el ser humano ha tenido que enfrentarse a diferentes organismos que afectan la producción agrícola, entre ellos se encuentran los nematodos fitoparásitos, los cuales son un grupo muy diverso que causa daños en raíces, tallos o semillas, con subsecuentes pérdidas en cultivos de importancia económica (Oerke, 2006; Singh et al., 2015; Vieira & Gleason, 2019).

Los nematodos fitoparásitos son meso-organismos microscópicos, vermiformes, con dimorfismo sexual en algunos géneros, simetría bilateral, no segmentados, pseudocelomados y triploblásticos, carentes de órganos respiratorios y circulatorios, por ello, la circulación y la respiración la realizan a través de líquido que contiene en la cavidad del cuerpo. Su tamaño por lo general oscila entre 0.2 – 1.5 mm de longitud, su órgano de alimentación es un estoma (estomatoestilete u odontoestilete), con el cual penetran en el tejido vegetal para succionar su alimento (Van den Berg, Marais, & Swart, 2017; Hunt, Palomares-Rius, & Manzanilla-López, 2018).

Existen aproximadamente 3,400 especies de nematodos fitoparásitos (Hodda, 2011), distribuidas en todo el mundo, las cuales causan pérdidas económicas en la producción agrícola (Sasser & Freckman, 1987; Koenning et al., 1999; De Waele & Elsen, 2007; Nicol et al., 2011). Las investigaciones indican que las pérdidas anuales ocasionadas por estos fitoparásitos son de 8.8 – 14.6 % en la producción total de los cultivos, lo cual equivale de 100 – 150 mil millones de dólares a nivel mundial (Koenning et al., 1999; Abad et al., 2008; Nicol et al., 2011). Sin embargo, las pérdidas reales pueden ser mayores por la falta de datos de muchos países que carecen de experiencia nematológica, como también por las diversas y complejas interacciones entre planta, suelo, nematodos y otros organismos del suelo (Koenning et al., 1999; Coyne & Plowright, 2002).

A nivel mundial se reportan más de 100 especies de nematodos fitoparásitos asociados con el sistema radical del cultivo de piña, la mayoría de ellos de actividad parasítica desconocida (Sipes et al., 2005, 2017; Rabie, 2017). Estudios de diferentes partes del mundo reportan a más de 15 géneros que afectan las raíces del cultivo de piña. Las investigaciones indican que los géneros que generalmente se encuentran más relacionados con la disminución de la producción son: *Paratrichodorus christiei*, *Criconemella* spp., *Meloidogyne* spp., *Rotylenchulus* spp., *Helicotylenchus* spp., *Pratylenchus* spp. *Hoplolaimus*, *Tylenchus* y *Ditylenchus*, (Py, 1969; Rohrbach & Apt, 1986; Sasser, 1989; Redondo & Varón de Agudelo, 1991; Ko & Schmitt, 1996; Jiménez et al., 2001; García et al., 2005).

Además de los daños directos que ocasionan, también afectan los cultivos asociados con otros microorganismos. Según Mesa et al., (2014) las afecciones ocasionadas por estos microorganismos pueden facilitar la entrada de fitopatógenos como *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp, *Dickeya* spp. entre otros. Algunos autores asocian a los fitonemátodos como transmisores de *F. oxysporum*, (Castillo et al., 2003; Palomares, et al., 2011), *F. solani* ((Thuy et al., 2013) y algunos virus, entre ellos el virus del anillo negro del tomate (TBRV), virus del mosaico de la alfalfa (AMV) y el virus de la hoja de la vid (GFLV) (Murant & Lister, 1967; Villate et al., 2008; Van Ghelder et al., 2015).

La investigación de Sasser, (1989) es de las pocas que reporta, las pérdidas en el cultivo de piña ocasionada por éstos fitonemátodos son de 14.9 %. Por otra parte, los estudios de Sipes (2000) en Hawái, muestran que las pérdidas en rendimiento pueden llegar al 60 – 74%, lo cual indica la importancia que tienen estos microorganismos por la limitante que constituyen en la producción de este cultivo.

En Colombia, las investigaciones nematológicas se han enfocado generalmente a *Meloidogyne*. Alrededor del 50% de los trabajos en la literatura colombiana sobre nematodos, han sido investigaciones de tesis a nivel de licenciatura. Los temas que mayormente se han abordado son los relacionados con la identificación a nivel de género, especialmente en cultivos de café, frutales, banano, ornamentales, papa, tabaco, frijol, sorgo, soya y vegetales. Otras investigaciones corresponden a resistencia genética,

control químico y biológico, pérdidas e interacción con otros microorganismos (Muñoz, Múnera & Díaz, 2003; Ortiz, Guzmán & Ocampo, 2012).

Según Mosquera-Espinosa (2016) en Colombia día a día aumentan las zonas productoras de frutales, sin embargo, paralelo a ello también incrementan los problemas fitosanitarios, entre ellos los relacionados con nematodos fitoparásitos. Históricamente las plagas y enfermedades causan pérdidas en los rendimientos y la producción de piña. Uno de los problemas fitosanitarios que afectan este cultivo son los nematodos fitoparásitos (Sipes & Wang, 2017). Estos microorganismos han sido poco estudiados para el cultivo de piña, aunque son importantes por el daño que ocasionan en el sistema radical, ocasionando clorosis en órganos aéreos, menor desarrollo, marchitez y atrofiamiento, alterando el desarrollo normal de la planta. Además, por las lesiones que causan en el tejido que facilitan la entrada de otros patógenos (Vargas, Varón de Agudelo & Gómez 2002; Vera et al., 2017).

Redondo & Varón de Agudelo (1991) en el Valle del Cauca de Colombia han confirmado en piña la presencia de *Criconemella* sp., *Helicotylenchus dihystra*, *Pratylenchus neglectus*, *Rotylenchulus reniformis* y *Trichodorus* sp. En investigaciones realizada por Mesa y colaboradores (2014), reportaron nuevamente a *Helicotylenchus* spp. y *Pratylenchus* spp., lo cual se convierte en un riesgo para la producción de piña debido al potencial destructivo de estos nematodos.

Actualmente no existe información de las especies de nematodos fitoparásitos que pueden estar afectando el cultivo de piña en el Valle del Cauca, lo cual limita principalmente su manejo. Para contribuir al conocimiento de las especies de nematodos fitoparásitos asociados al cultivo de la piña, el presente estudio tuvo como propósito identificar fitonemátodos mediante caracterización morfológica, morfométrica, molecular y filogenético (Mullis et al., 1986; Powers, 2004; Subbotin et al., 2011). El uso de las técnicas moleculares son una herramienta que permite complementar la información que se obtiene mediante descripción morfológica y morfométrica (Caswell, Williamson & Wu 1992; Demey et al., 2003; Subbotin et al., 2011).

El objetivo de la investigación fue identificar hasta especie los nematodos fitoparásitos asociados al cultivo de piña en municipios productores como Pradera, Buga, Dagua, La Cumbre y Restrepo en el departamento del Valle del Cauca, Colombia.

El término 'prevalencia' utilizado en esta investigación 'se define como el número de unidades geográficas de muestreo (campos, explotaciones, condados, estados, regiones, etc.) en que se ha detectado una enfermedad o un agente patógeno, dividido por el número total de unidades geográficas de muestreo evaluadas' (Nutter, Teng, & Shokes, 1991; Nutter & Gaunt, 1996; Nutter, Esker, & Netto, 2006).

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar taxonómicamente las dos especies más prevalentes de nemátodos fitoparásitos asociados al cultivo de piña en cinco municipios del Valle del Cauca.

Objetivos específicos

1. Determinar los dos principales géneros de nemátodos asociados a cultivos de piña en las diferentes zonas de producción del Valle del Cauca.
2. Identificar mediante caracteres morfológicos y morfométricos las dos especies con mayor prevalencia de fitonemátodos asociadas al cultivo de piña.
3. Caracterizar a través de secuencias de ADN especies de nemátodos utilizando las regiones ITS y D2-D3 de gen 28S del ADNr

1. Capítulo de poblaciones de nematodos fitoparásitos y sus parámetros ecológicos y parasíticos en el cultivo de piña

Resumen

En este capítulo se detalla información de los géneros de nematodos fitoparásitos encontrados en 15 fincas de cultivo de piña muestreadas en los municipios de Pradera, Dagua, Buga, La Cumbre y Restrepo en el departamento del Valle del Cauca, Colombia. Este trabajo consistió en un reconocimiento de los fitonemátodos presentes en suelo y raíces de cultivos de piña entre 2018 – 2019. Los géneros encontrados y con mayor distribución en suelo y raíces fueron *Helicotylenchus*, con valores de 100 y 81.3%, seguido de *Pratylenchus* con 58.7 y 52%, *Rotylenchulus* con 34.7 y 22.7%, *Meloidogyne* con 20 y 5.3% y *Criconemella* con 2.7 – 0%, respectivamente. Basado en las densidades poblacionales registradas en todos los sitios muestreados, ninguno de estos géneros se encontró con valor de densidad absoluta igual o superior a los reportados en literatura para los umbrales de daño de estos fitonemátodos. El análisis de correlación de las poblaciones de estos géneros mostró asociaciones sinérgicas y antagónicas entre fitonemátodos. El análisis de conglomerados mostró diferentes grupos de poblaciones en el dendrograma, lo cual indica que la dinámica de las poblaciones de fitonemátodos es muy diversa, lo cual podría deberse en parte a las prácticas agronómicas y agrícolas que realizan los productores en sus sistemas de producción.

Palabras clave: piña, prevalentes, antagónicas, fitonemátodos, correlación, conglomerados

Abstract

This chapter provides details information on the genera of phytoparasitic nematodes found in 15 pineapple farms sampled in the municipalities of Pradera, Dagua, Buga, La Cumbre and Restrepo in the department of Valle del Cauca, Colombia. This work consisted in a recognition of phytonematodes present in soil and roots of pineapple crops between 2018 - 2019. The genera found and with greater distribution in soil and roots were *Helicotylenchus*, with values of 100 and 81.3%, followed by *Pratylenchus* with 58.7 and 52%, *Rotylenchulus* with 34.7 and 22.7%, *Meloidogyne* with 20 and 5.3% and *Criconemella* with 2.7 - 0%, respectively. Based on the population densities recorded in all the sites sampled, none of these genera was found with an absolute density value equal to or greater than those reported in the literature based on the damage thresholds for these phytonematodes. Correlation analysis of the populations of these genera showed synergistic and antagonistic associations between phytonematodes. Cluster analysis showed different population groups in the dendrogram, indicating that the dynamics of phytonematodes populations are very diverse, which could be due in part to the agronomic and farming practices that producers carry out in their production systems.

Keywords: pineapple, prevalent, antagonistic, phytonematodes, correlation, clusters

1.1 Introducción

La piña (*Ananas comosus* L. Merr), es una fruta tropical con alto valor comercial para Colombia. Según Agronet (2020), la producción en el país en 2018 fue de aproximadamente 1.058.109 toneladas (t), con un área cosechada de 25.093 hectáreas (has). Este cultivo es una base importante para el desarrollo económico por ser una fuente de divisas y empleo para el sector agrícola del país (Botero, 2015).

La producción de piña como la mayoría de cultivos, se ve afectada por diferentes problemas fitosanitarios, entre ellos los nematodos fitoparásitos. Estos organismos afectan la producción agrícola (Múnera, Bert, & Decraemer, 2009), causando daño directo en el sistema radical en la mayoría de cultivos, como también predisponiendo las plantas a ser atacadas por otros fitopatógenos (Vera et al., 2017). Están ubicados entre los cuatro grupos más importantes de patógenos de plantas junto con los virus, hongos y bacterias (Jones & Fosu-Nyarko, 2014). Los daños ocasionados por nematodos fitoparásitos son agallas, distorsión de las raíces, desorganización del sistema vascular, clorosis, menor número de raíces afectando la absorción de agua y nutrientes ocasionando marchitez y atrofiamiento lo que resulta en un retraso en el crecimiento de las plantas, afectando la floración y fructificación y, por ende, pérdidas económicas (Sikora & Fernández 2005).

Estos daños generalmente no son percibidos, debido a que en la mayoría de los casos se desconoce su sintomatología, además los síntomas se tienden a confundir con deficiencias nutricionales, dificultando así su diagnóstico (Tamayo, 2001). Cabe recalcar que el comportamiento de las poblaciones y el grado de parasitismo en el cultivo están relacionados con las prácticas agronómicas implementadas por los productores en sus sistemas de producción (Mosquera-Espinosa, 2016).

Para el caso del Valle del Cauca, ya se han reportado algunos géneros asociados al cultivo de piña, entre ellos *Pratylenchus*, *Helicotylenchus*, *Rotylenchulus*, *Trypodosorus* y *Criconebella* (Redondo & Varón de Agudelo, 1991; Mesa et al., 2014). Sin embargo, es poca la información científica sobre estos microorganismos en el cultivo de piña en el Valle del Cauca, a nivel nacional e internacional, razón por la cual se planteó proporcionar información cuantitativa de las densidades poblacionales y frecuencias de los principales géneros de nematodos fitoparásitos asociados al cultivo de piña en cinco municipios del Valle del Cauca, Colombia.

1.2 Revisión de literatura

1.2.1 Importancia y producción de la piña

La piña *Ananas comosus* (L.) Merr, es uno de los cultivos comerciales más importantes en el mundo, con un 25% de la producción mundial de frutas tropicales (Yacob, 2010; Baruwa, 2013). Este cultivo tiene cada vez mayor relevancia a nivel mundial, ubicándose en el tercer lugar después de los cítricos, plátano y banano por la alta aceptación de la fruta (García et al., 2011). Los registros reportan aproximadamente a 90 países dedicados a la producción de este cultivo (Ming et al., 2015; Thingbaijam et al., 2015; FAO, 2020), siendo Costa Rica el mayor productor. (Tabla 1.1) (FAO, 2020).

Tabla 1.1. Principales países productores de piña a nivel mundial en 2017.

País	Producción (t)	Área cosechada (has)	Rendimiento (t/ha)
Costa Rica	3.056.445	44.500	68,68
Filipinas	2.671.711	66.088	40,43
Brasil	2.253.897	62.116	36,29
China	2.129.936	80.115	26,59
Tailandia	2.123.177	86.454	24,56
India	1.861.000	111.000	16,77

FAO, 2020

1.2.2 Producción de piña en Colombia

La producción de esta fruta en Colombia ha tenido alto impacto en los últimos años por su valor comercial, notándose un incremento en la producción, que contribuye a mejorar la economía de los productores a nivel nacional, pasando de 444.686 t en 2010 a 1.058.109 t en 2018 con lo cual se posiciona en el puesto 11 a nivel mundial en producción de piña. En la Tabla 1.2 se muestran los datos de producción en 2018 de los principales departamentos productores en el país (Agronet, 2020).

Tabla 1.2. Departamentos con mayor producción de piña en Colombia para el año 2018

Departamento	Área cosechada (ha)	Producción (t)	Rendimiento (t/ha)
Santander	11.085,2	455.700,9	41,11
Valle del Cauca	2.343,3	145.162,2	61,94
Meta	3.064,5	126.800	41,48
Cauca	1.155	72.987	63,19
Antioquia	855,1	72.848,8	85,18
Quindío	1.246,5	53.069,8	42,58
Casanare	529,2	31.978,3	60,43

Agronet, 2020

1.2.3 Plagas y enfermedades asociadas al cultivo de piña

La piña al igual que la mayoría de los cultivos es afectada por diferentes plagas y enfermedades (Sipes & Matos, 2018). De acuerdo con Mesa et al., (2014) los problemas fitosanitarios de mayor importancia en este cultivo son: la tecla o barrenador del fruto (*Strymon basilides*), picudo (*Metamasius dimidiatipennis*), sinfílicos (*Scutigerella immaculata*) y cochinilla rosada (*Dysmicoccus brevipes*) pudrición radical o fusariosis

(*Fusarium* spp.), pudrición del cogollo y del fruto (*Phytophthora* spp.), pudrición de hojas, cogollo y fruto (*Dickeya* spp.) y nematodos fitoparásitos.

1.2.4 Nematodos en el cultivo de piña

Las investigaciones indican que el cultivo de piña es susceptible al ataque de fitonemátodos y constituyen una limitante en la producción a nivel mundial y considerables pérdidas económicas (Guerout, 1975; Rohrbach & Apt, 1986; Sasser & Freckman, 1987; Malezieux 1998; Hernández, 1998; Suárez & Rosales, 2008; Crozzoli, 2009 y Daramola &

Los nemátodos fitoparásitos asociados al cultivo de piña *Ananas comosus* (L) Merr, son un riesgo por el daño directo que pueden ocasionar al cultivo, llegando a alcanzar pérdidas entre 14.9 hasta un 74% dependiendo de los niveles poblacionales presentes y las estrategias de manejo aplicadas (Sasser, 1989; Sipes, 2000), esto refleja la importancia de estos microorganismos en la explotación de este frutal.

Estudios de diferentes partes del mundo señalan a más de 15 géneros de fitonemátodos que atacan el sistema radical de la piña (Sasser, 1989; Rohrbach & Apt, 1986; Redondo & Varón De Agudelo, 1991; Nath et al., 1997; Jiménez et al., 2001; Daramola et al., 2013; Guzmán-Hernández et al., 2014; Vera et al., 2017). De igual forma, más de 100 especies de nematodos fitoparásitos han sido encontrados asociados con las raíces de este cultivo (Sipes et al., 2005; Rabie, 2017; Sipes & Matos, 2018).

Algunos países que han reportado estos organismos en piña: Colombia (Redondo & Varón de Agudelo, 1991), Costa Rica (León, 2007; Carvajal, 2009; Guzmán- Hernández et al., 2014; Araya, 2019), Cuba (Hernández, 1998; Gandarilla, Bofill, & González, 2014), Guatemala (Pac, 2005), Hawái (Sipes & Schimitt, 1994; Sipes, 2000; Chinnasri & Sipes, 2005), Filipinas (Davide, 1988), México (García et al., 2005), Nigeria (Daramola et al., 2013), Perú (Julca, 1997; Vera et al., 2017), South África (Rabie, 2017), Venezuela (Jiménez et al., 2001; Crozzoli, 2002).

Entre las especies de mayor importancia económica reportadas en este frutal, sobresalen *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *Rotylenchulus reniformis* y *Pratylenchus brachyurus* (Sipes et al., 2005; Daramola et al., 2013; Sipes & Chinnasri, 2018; Sipes & Matos, 2018).

Otras especies de fitonemátodos asociados al cultivo de piña que contribuyen con la disminución del rendimiento de este frutal son *Pratylenchus neglectus* (Redondo & Varón de Agudelo, 1991) *Paratylenchus minutus* (Linford, Oliveira, & Ishii, 1949 y Masdek et al., 2007), *Helicotylenchus dihystera* (Ko & Schmitt, 1992), *Scutellonema* sp. (Sipes & Matos, 2018), *Aorolaimus* sp. (da Costa et al., 1998). Sin embargo, los reportes de la mayoría de ellas son consideradas de baja incidencia y desconocida patogenicidad (Rabie, 2017; Sipes & Chinnasri, 2018).

1.2.5 Sintomatología en el cultivo

La presencia y ataque de nematodos fitoparásitos se sospecha cuando las plantas muestran estrés en el follaje aun cuando las condiciones climáticas y agronómicas son idóneas para el cultivo. Generalmente, al observar cuidadosamente las raíces se puede diagnosticar el ataque de fitonemátodos, sin embargo, es necesario el monitoreo frecuente a partir de la colecta de muestras de suelo para establecer la presencia de nematodos asociados al cultivo y así mismo conocer los niveles poblacionales (Sipes & Chinnasri, 2018).

En los cultivos de piña, la sintomatología inducida por fitonemátodos en la parte aérea puede confundirse con excesos de humedad o estrés por nutrientes, sin embargo, la presencia de estos fitoparásitos está asociada a un crecimiento atrofiado de las plantas, disminución en el número de hojas, peso y ancho de las mismas. Las hojas pueden mostrar coloración amarillo-rosado a rojizo, pierden turgencia y las puntas pueden morir cuando el ataque es severo. Los síntomas en las raíces son difíciles de identificar, aunque se pueden observar lesiones necróticas, las cuales pueden extenderse en toda la raíz. Los daños también se manifiestan en la disminución significativa del peso del fruto, retraso en su

madurez y floración desuniforme (Py et al., 1987; Sijmons et al., 1994; Sipes, 2000; Sipes et al., 2005; Rabie, 2017).

1.2.6 Manejo de los nematodos

La importancia del manejo de nematodos fitoparásitos en el cultivo de piña radica en proteger el sistema radical joven y en crecimiento, de lo contrario las plantas presentarán disminución en el crecimiento y desarrollo, frutos de menor calidad y peso y, por ende, menor rendimiento. Las prácticas que generalmente se llevan a cabo previo al establecimiento del cultivo incluyen la aplicación de nematicidas, rotación de cultivos con plantas no hospederos, barbecho y enmiendas al suelo. La aplicación de nematicidas se evita una vez el cultivo es establecido (Sipes & Chinnasri, 2018).

Sin embargo, la eficacia de estas estrategias de manejo dependen de una correcta identificación de los fitonemátodos asociados al cultivo. Un diagnóstico adecuado permitirá conocer el rango de hospederos de la (s) especie (s) y con ello proponer adecuadas medidas de control para prevenir su distribución y así disminuir los niveles poblacionales. La carencia de conocimiento de las especies puede llevar a desconocer el daño ocasionado por estos microorganismos, hacer aplicaciones nematicidas erróneas lo cual incurre en mayores costos de producción (Brücher et al., 2019).

Muchos patógenos de plantas afectan la parte aérea y visualmente se puede evaluar y cuantificar el daño, sin embargo, en el caso de los fitonemátodos el daño generalmente es desapercibido, debido principalmente a que ocurre en las raíces y se confunde con deficiencias nutricionales o no es considerado por los productores principalmente por el desconocimiento de esta plaga, aunado a ello el manejo fitosanitario es deficiente e incluso la mayoría de productores no hacen control de estos microorganismos (Tamayo, 2001). Por otra parte, Mosquera-Espinosa (2016) enfatiza que el comportamiento de las poblaciones y el grado de parasitismo están directamente relacionados con las diferentes prácticas agronómicas y control que se implementan en los sistemas de producción. Todo

ello repercute mayormente por el desconocimiento de estos importantes microorganismos en la producción agrícola.

Actualmente en Colombia se carece de información actualizada sobre las especies de nematodos fitoparásitos asociados al cultivo de piña, como también sus niveles poblacionales. Es por ello que este trabajo tiene como propósito: a) Identificar especies de fitonemátodos asociados al cultivo de piña en cinco municipios del Valle del Cauca, b) analizar estadísticamente la incidencia de las poblaciones de los dos principales géneros de nemátodos en las diferentes zonas muestreadas del Valle del Cauca.

1.3 Materiales y métodos

1.3.1 Localización del experimento

Este trabajo se realizó en el departamento del Valle del Cauca, Colombia, en los municipios de Pradera, Dagua, Buga, La Cumbre y Restrepo, en los cuales se colectaron muestras de suelo y raíces en cultivos de piña; estas fueron procesadas y analizadas en el laboratorio de Diagnóstico Vegetal de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. La Tabla 1.3 contiene información detallada de los sistemas de producción donde fueron colectadas las muestras de suelo y raíces.

Tabla 1.3. Coordenadas y ubicación de las fincas incluidas en la investigación 2018-2019

Municipio	Finca	Latitud	Longitud	Altitud msnm
Pradera	Manantial	3° 23' 50.41"	76° 14' 7.371"	1069
	Potrerillos	3° 22' 18.379"	76° 14' 32.967"	1042
	La Fría	3° 23' 1.133"	76° 12' 3.171"	1206
Dagua	Bella Vista	3° 39' 46.512"	76° 40' 41.235"	1017
	El Hato	3° 40' 29.723"	76° 40' 12.658"	1184
	El Piñal	3° 39' 55.462"	76° 40' 36.958"	1004
La Cumbre	Las Violetas	3° 38' 5.593"	76° 35' 7.551"	1558
	El Bosque	3° 42' 7.51"	76° 35' 50.042"	1620
	La Piedra	3° 40' 33.578"	76° 01' 0"	1395
Restrepo	La Sombra	3° 49' 23.891"	76° 30' 51.508"	1423
	La Chila	3° 51' 23.587"	76° 31' 38.067"	1573
	El Jardincito	3° 51' 59.702"	76° 28' 43.715"	1620
Buga	San Juanito 1	4° 36' 37.26"	76° 3' 14.065"	945
	San Juanito 2	4° 36' 34.387"	76° 3' 11.469"	935
	Líbano	4° 36' 29.563"	76° 3' 11.926"	952

1.3.2 Colecta de muestras

Se seleccionaron 15 fincas cultivadas con piña de la variedad MD2 en los cinco municipios seleccionados (tres fincas/municipio). El criterio para la selección de fincas fue la presencia de cultivos de piña con mínimo ocho (8) meses de haber sido establecidos.

En cada uno de los cultivos de piña se tomaron muestras compuestas de suelo y raíces siguiendo un muestreo de reconocimiento (Varón de Agudelo & Castillo, 2001). Para tal fin, en cada cultivo se realizaron recorridos entre los surcos, dejando 5 surcos de por medio sin muestrear. En cada lote muestreado y con ayuda de un palín se colectaron 30 submuestras de suelo y raíces por hectárea a una profundidad de 0 a 20 cm en la base de la planta. Posteriormente, las submuestras se mezclaron para formar una muestra compuesta. Las muestras fueron empacadas cuidadosamente, rotuladas y llevadas en cajas de icopor refrigeradas para su posterior análisis en laboratorio.

1.3.3 Extracción de nemátodos de muestras de suelo

La extracción de nemátodos de las muestras de suelo se realizó siguiendo el método de agitación-decantación de Cobb modificado (S´Jacob & Bezooijen, 1977). Para ello, de cada muestra compuesta se hicieron 5 repeticiones de 100 cc del suelo cada una, cada repetición se suspendió en uno a dos litros de agua. La suspensión resultante se agitó vigorosamente por espacio de cinco minutos. Transcurrido este tiempo, la suspensión se dejó reposar por 10 segundos y se procedió a pasarla por una columna de tamices de 10, 325 y 400 mesh. Posteriormente, el suelo contenido en los tamices de 325 y 400 se colectó en un vaso de precipitado (beaker) y se depositó sobre papel facial previamente contenido en un tamiz de decantación. Seguidamente, el tamiz de decantación con la muestra de suelo, se colocó en un plato de decantación con agua corriente y el montaje se dejó reposar por 48 horas para separar los nematodos.

Transcurrido este tiempo, se recuperó los nematodos en un volumen de 20 ml utilizando un tamiz de 400 mesh y conservada en tubos Falcon. Finalmente se almacenaron en nevera a 4°C para posteriormente hacer la respectiva cuantificación (S´Jacob & Bezooijen, 1977; Volcy, 1998).

1.3.4 Extracción de nematodos de muestras de raíces

Para extraer los fitonemátodos de la muestra compuesta de raíces se utilizó el método de maceración- decantación de Cobb modificado (S´Jacob & Bezooijen, 1977; Volcy, 1998; Ravichandra, 2014). Inicialmente las raíces se enjuagaron para remover agregados de suelo, se prepararon 5 repeticiones de 10 gr cada una y se licuaron de manera intermitente a baja velocidad en un volumen de 200 ml de agua corriente durante 5 segundos para cada repetición. Seguidamente, el macerado de raíces se pasó por una columna de tamices de 10, 325 y 400 mesh; el contenido del tamiz de 325 y 400 mesh se recuperó en un volumen de 100 ml y éste fue depositado sobre el papel facial previamente ubicado en un tamiz de

decantación. El tamiz de decantación con el macerado se colocó en un plato de decantación con agua corriente, con el propósito de separar los nemátodos durante un lapso de tiempo de 48 hrs. Transcurrido este tiempo, se procedió a recuperar los nemátodos utilizando un tamiz de 400 mesh, estos se concentraron en tubos Falcon en un volumen de 20 ml y se almacenaron en nevera entre 4°C (Cobb, 1917; S´Jacob & Bezooijen, 1977; Volcy, 1998).

1.3.5 Cuantificación de nematodos fitoparásitos

De cada suspensión de nematodos se tomaron alícuotas de 3 ml y se depositaron en una cámara de cuantificación para determinar al microscopio los géneros de nematodos presentes y el número de individuos en cada género. Para cada repetición se hicieron 3 lecturas, que representaban el 45% de observación y finalmente las 3 lecturas se promediaron. Con los datos registrados se determinaron diferentes parámetros ecológicos, como Frecuencias absoluta y relativa, Densidades absoluta y relativa y Valor de prominencia, utilizando las respectivas fórmulas (Volcy, 1998; Papamija, 2002).

$$\text{Frecuencia absoluta} = \frac{\text{Número de muestras con el nematodo}}{\text{Total de muestras evaluadas}} * 100$$

$$\text{Frecuencia relativa} = \frac{\text{Frecuencia absoluta}}{\sum \text{de frecuencia absoluta de todos los nematodos}} * 100$$

Densidad absoluta = Número promedio de individuos del nematodo en 100 cc de suelo ó 10 g de raíces

$$\text{Densidad relativa} = \frac{\text{Densidad absoluta del nematodo}}{\sum \text{de densidad absoluta de todos los nematodos}} * 100$$

$$\text{Valor de prominencia absoluto} = \text{Densidad absoluta} * \sqrt{\text{frecuencia absoluta}}$$

$$\text{Valor de prominencia relativa} = \frac{\text{Valor de prominencia}}{\sum \text{del valor de prominencia de todos los nematodos}} * 100$$

1.3.6 Análisis estadístico

Los datos generados en este trabajo fueron sometidos a un análisis estadístico utilizando el software SAS (Statistical Analysis System) con el propósito de interpretar la información registrada y de esta manera conocer sobre la ecología de los fitonemátodos presentes en suelo y raíces en el cultivo de piña. Se hizo un análisis de correlación, Análisis de Componentes Principales (ACP) y análisis de conglomerados para conocer la diversidad, el agrupamiento o separación de las poblaciones encontradas y un análisis de correlaciones para determinar las posibles relaciones sinérgicas o antagónicas entre los fitonemátodos encontrados.

1.4 Resultados

En 15 sistemas de producción de cultivos de piña, distribuidos en cinco municipios del Valle del Cauca, se encontraron nematodos fitoparásitos de los géneros *Helicotylenchus*, *Rotylenchulus*, *Pratylenchus*, *Meloidogyne* y *Criconemella*. La Tabla 1.1 y Figura 1.1 proveen información de la ubicación geográfica de las fincas muestreadas.

Tabla 1.4. Fincas muestreadas en cinco municipios del Valle del Cauca (2018-2019)

Ubicación	Finca	Área (ha)	Número de muestras compuestas	
			Suelo	Raíces
Pradera	Manantial	1	1	1
	Potrerosillos	1	1	1
	La Fría	1	1	1
Dagua	Bella Vista	1	1	1
	El Hato	1	1	1
	El Piñal	1	1	1
La Cumbre	Las Violetas	1	1	1
	El Bosque	1	1	1
	La Piedra	1	1	1
Restrepo	La Sombra	1	1	1
	La Chila	1	1	1
	El Jardincito	1	1	1
Buga	San Juanito 1	1	1	1
	San Juanito 2	1	1	1
	Líbano	1	1	1

Nota: En cada muestra compuesta se tomaron 5 repeticiones

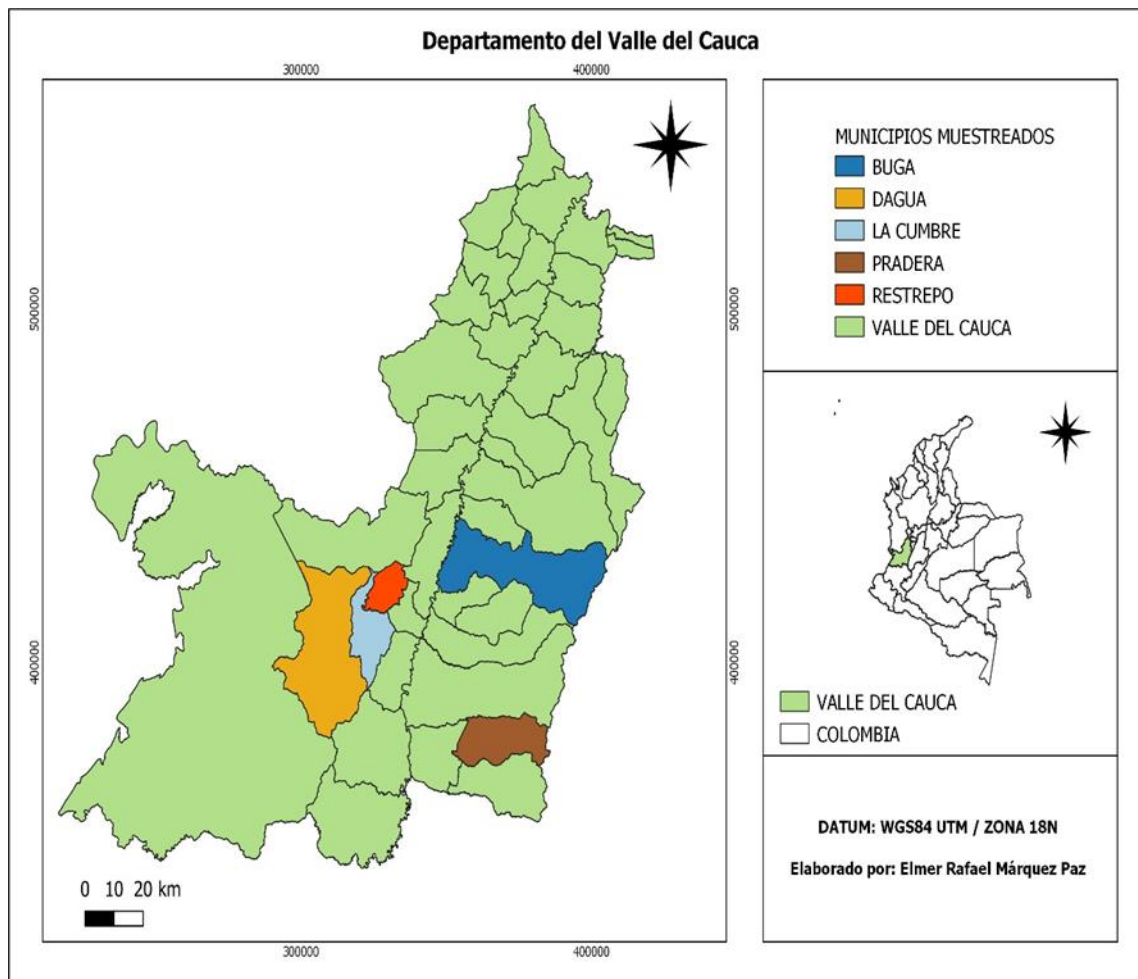


Figura 1.1. Ubicación geográfica de los sitios muestreados (mapa elaborado por el autor).

1.4.1 Poblaciones de nematodos fitoparásitos

A partir de observaciones al microscopio, se estableció que todas las fincas muestreadas presentaron nematodos fitoparásitos. En muestras de suelo se encontraron cinco géneros de nematodos fitoparásitos asociados al cultivo de piña, *Pratylenchus*, *Rotylenchulus*, *Helicotylenchus*, *Meloidogyne* y *Criconemella* (Sinonimia: *Mesocriconema*). Estos mismos géneros fueron registrados en muestras de raíces a excepción de *Criconemella*.

En general y de acuerdo con los datos de frecuencia absoluta, *Helicotylenchus* spp. fue el fitonemátodo con mayor distribución, estuvo presente en el 100% de las muestras de suelo y en un 81,3% en muestras de raíces, respectivamente, seguido de *Pratylenchus* spp. con 58,7 y 52,0%, *Rotylenchulus* spp. con 34,7 y 22,7%, *Meloidogyne* spp. con 20,0 y 5,3% y *Criconemella* spp. presente sólo en suelo con un 2,7%, (Tabla 1.5).

Tabla 1.5. Porcentajes de frecuencia de nematodos fitoparásitos en muestras de suelo y raíces de piña 2018 – 2019

Géneros	Suelo (%) * 5 muestras/ha	Raíces (%) * 5 muestras/ha
<i>Helicotylenchus</i>	100,0	81,3
<i>Pratylenchus</i>	58,7	52,0
<i>Rotylenchulus</i>	34,7	22,7
<i>Meloidogyne</i>	20,0	5,3
<i>Criconemella</i>	2,7	0

* 75 muestras de suelo y 75 muestras de raíces

En la Tabla 1.6 se muestra información de parámetros ecológicos y parasíticos registrados para cada género en suelo rizosférico en los diferentes municipios. La frecuencia absoluta de *Helicotylenchus* fue del 100% en todos los municipios, lo cual indica que la dispersión de este fitonemátodo es alta, seguido de *Pratylenchus* con una menor distribución, con valores entre 33,3 – 80,0%, y *Rotylenchulus* con 20 – 73% respectivamente.

Las densidades absolutas representan el promedio de individuos/100 cc de suelo. Los valores más altos correspondieron a *Helicotylenchus* en los municipios de Pradera con 1.451 y La Cumbre 1.311, *Rotylenchulus* en Buga con 165 y *Pratylenchus* en La Cumbre con 96 y Buga 67 individuos/100cc de suelo. Los valores de prominencia indican la importancia relativa que presenta cada género basado en su distribución y densidad en el suelo. Los valores de prominencia más altos en todos los municipios correspondieron a *Helicotylenchus* 14.511, seguido de *Rotylenchulus* 1.410 y *Pratylenchus* 701.

La Tabla 1.7 corresponde a los datos de parámetros ecológicos y parasíticos generados en muestras de raíces, en las cuales, claramente se observa la misma tendencia que en muestras de suelo, siendo *Helicotylenchus* el más frecuente seguido de *Pratylenchus* y *Rotylenchulus*. Para todos los géneros los valores fueron inferiores a lo registrado en suelo.

Los valores de frecuencia absoluta para *Helicotylenchus* estuvieron en un rango entre 60 y 100%, *Pratylenchus* 33,33 – 66,67% y *Rotylenchulus* 0 – 53,33%.

En muestras de raíces los valores de densidad absoluta indica el promedio de individuos/10 g de raíces. Se observa que para los tres géneros los valores fueron generalmente bajos, mostrando *Helicotylenchus* valores entre 10,22 – 215,13; *Pratylenchus* 7,13 – 56,47, *Rotylenchulus* 0 – 15.53 individuos/10 g de raíces frescas.

Los valores de prominencia más altos en muestras de raíces fueron *Helicotylenchus* 2.078,39; *Pratylenchus* 350.67 y *Rotylenchulus* 98,24

Tabla 1.6. Parámetros ecológicos y parasíticos en muestras de suelo por municipio.

Ubicación	Género	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa	Densidad absoluta	Densidad relativa	Valor de prominencia	de Valor de promi. relativa
Dagua	<i>Helicotylenchus</i>	100,00	44,12	300,89	95,87	3.008,89	96,81
	<i>Pratylenchus</i>	80,00	35,29	9,80	3,12	87,65	2,82
	<i>Rotylenchulus</i>	20,00	8,82	1,33	0,42	5,96	0,19
La Cumbre	<i>Helicotylenchus</i>	100,00	44,12	1.311,13	92,80	13.111,33	91,09
	<i>Pratylenchus</i>	53,33	23,53	96,00	6,79	701,08	4,87
	<i>Rotylenchulus</i>	20,00	8,82	1,33	0,09	5,96	0,04
Buga	<i>Helicotylenchus</i>	100,00	26,32	281,80	52,38	2818,00	57,21
	<i>Pratylenchus</i>	53,33	14,04	66,67	12,39	486,86	9,88
	<i>Rotylenchulus</i>	73,33	19,30	164,67	30,61	1410,12	28,63
Pradera	<i>Helicotylenchus</i>	100,00	41,67	1.451,13	97,11	14.511,33	98,30
	<i>Pratylenchus</i>	33,33	13,89	29,80	1,99	172,05	1,17
	<i>Rotylenchulus</i>	33,33	13,89	6,67	0,45	38,49	0,26
Restrepo	<i>Helicotylenchus</i>	100,00	42,86	950,67	96,26	9.506,70	97,53
	<i>Pratylenchus</i>	73,33	31,43	18,23	1,85	156,11	1,60
	<i>Rotylenchulus</i>	26,67	11,43	6,67	0,68	34,44	0,35

Tabla 1.7. Parámetros ecológicos y parasíticos de nematodos fitoparásitos asociados a raíces de piña.

Ubicación	Género	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa	Densidad absoluta	Densidad relativa	Valor de prominencia	Valor de promi. relativa
Dagua	<i>Helicotylenchus</i>	73,33	52,38	10,22	52,21	87,54	59,87
	<i>Pratylenchus</i>	46,67	33,33	7,13	36,44	48,73	33,33
	<i>Rotylenchulus</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
La Cumbre	<i>Helicotylenchus</i>	100,00	35,71	85,33	69,04	853,33	73,57
	<i>Pratylenchus</i>	66,67	23,81	28,47	23,03	232,43	20,04
	<i>Rotylenchulus</i>	53,33	19,05	4,00	3,24	29,21	2,52
Buga	<i>Helicotylenchus</i>	60,00	28,13	19,56	22,44	151,48	25,55
	<i>Pratylenchus</i>	46,67	21,88	56,47	64,79	350,67	59,15
	<i>Rotylenchulus</i>	20,00	9,38	2,67	3,06	11,93	2,01
Pradera	<i>Helicotylenchus</i>	80,00	33,33	198,67	85,31	1.776,93	86,78
	<i>Pratylenchus</i>	33,33	13,89	12,87	0,13	74,29	3,63
	<i>Rotylenchulus</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Restrepo	<i>Helicotylenchus</i>	93,33	41,18	215,13	87,06	2.078,39	90,25
	<i>Pratylenchus</i>	66,67	29,41	13,78	5,58	112,50	4,88
	<i>Rotylenchulus</i>	40,00	17,65	15,53	6,29	98,24	4,27

Con el Análisis de Componentes Principales se determinaron 4 CP con valores propios mayores o igual a 1 que explicaron el 85.2% de la varianza, notándose que los componentes principales 1 y 2 son los que muestran mayor variancia (Tabla 1.8)

Tabla 1.8. Valores propios y porcentaje total de la varianza acumulada para cada componente principal.

Componente principal	Valores propios	% total de la varianza	% total de la varianza acumulada
1	3.397	37.8	37.8
2	2.045	22.7	60.5
3	1.168	13.0	73.5
4	1.051	11.7	85.2
5	0.792	8.8	94.0

En la Tabla 1.9 se presenta la correlación en suelo y raíces para cada género en cada componente, siendo *Pratylenchus* y *Rotylenchulus* los más importantes en el CP1, *Helicotylenchus* en CP2, *Meloidogyne* en el CP3 y *Criconmella* en el CP4 en suelo. En raíces se observó la misma tendencia excepto *Criconemella* que no se encontró en raíces.

Tabla 1.9. Correlación de cuatro componentes principales entre los géneros estudiados.

Medio	Géneros	1	2	3	4
Suelo	<i>Criconemella</i>	-0.040	0.311	0.395	0.742
	<i>Helicotylenchus</i>	-0.151	0.635	-0.040	-0.041
	<i>Meloidogyne</i>	0.191	-0.170	-0.680	0.309
	<i>Pratylenchus</i>	0.445	0.153	-0.184	-0.159
	<i>Rotylenchulus</i>	0.452	-0.037	0.316	-0.146
Raíz	<i>Helicotylenchus</i>	-0.116	0.575	-0.121	-0.362
	<i>Meloidogyne</i>	-0.095	-0.286	0.458	-0.262
	<i>Pratylenchus</i>	0.511	0.149	0.106	-0.191
	<i>Rotylenchulus</i>	0.503	0.107	0.107	0.263

Nota: Los valores de los géneros más importantes en cada componente se muestran en negrita. *Criconemella* solo se encontró en muestra de suelo.

En el biplot (Figura 1.2) y en el dendrograma (Figura 1.3) se observa que las poblaciones se agruparon en cuatro grupos, indicando diferencias en la estructura y composición de las comunidades de nematodos fitoparásitos en los cultivos de piña muestreados.

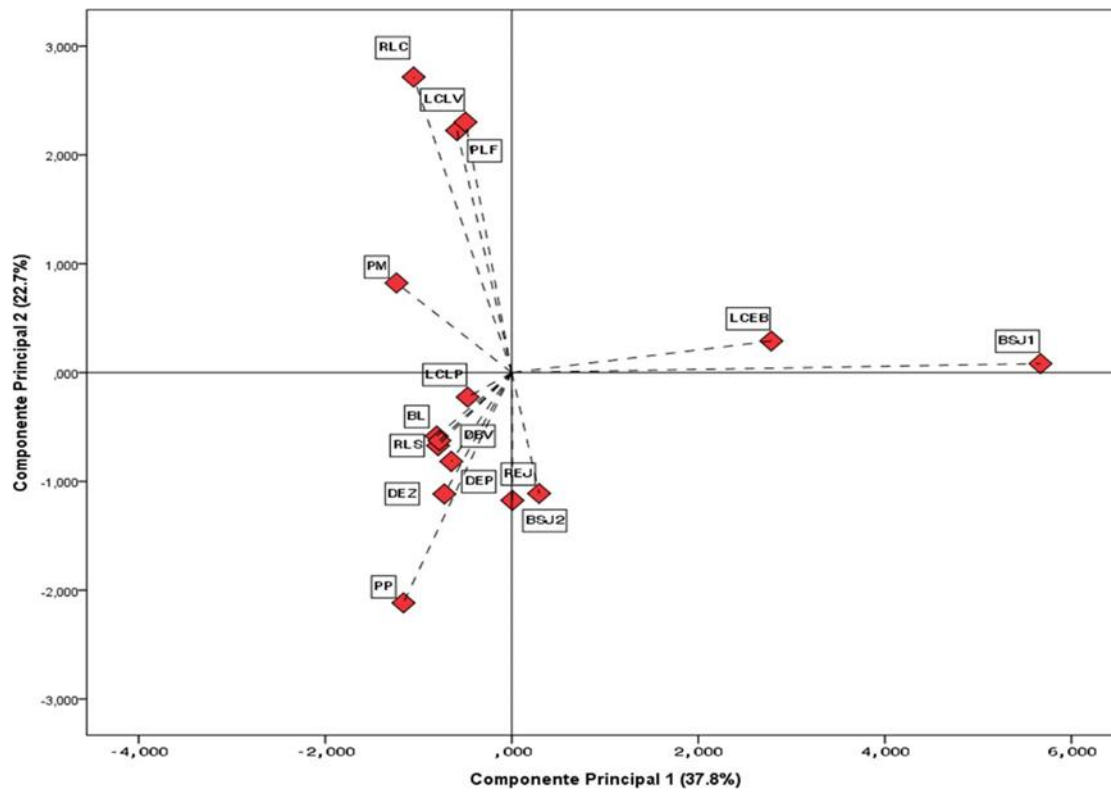


Figura 1.2. Biplot de las quince poblaciones analizadas en los diferentes municipios.

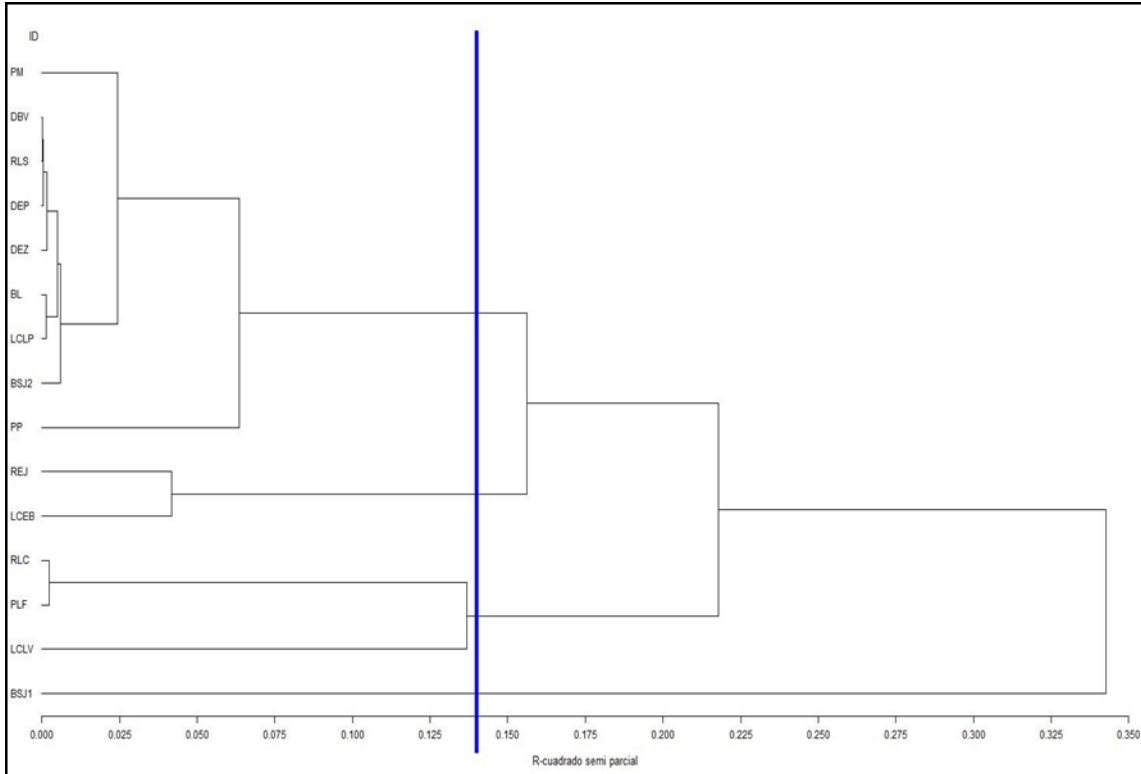


Figura 1.3. Dendrograma del análisis de conglomerado de las poblaciones estudiadas.

Al comparar los fitonemátodos de muestras de suelo y de raíces, hubo alta correlación de acuerdo con el coeficiente de correlación de Pearson (0.77152) ver Tabla 1.10.

Tabla 1.10. Correlación de los fitonemátodos en muestras de suelo y raíces.

	Nematodos en raíces	Nematodos en suelo
Nematodos en raíces	1.00000	0.77152 <0.0008
Nematodos en suelo	0.77152 <0.0008	1.00000

La Tabla 1.11 muestra los resultados del análisis de correlación. Se observa que existe una correlación negativa y altamente significativa ($r = -0.25913$; $P = 0.0001$) entre *Rotylenchulus* y *Helicotylenchus* en suelo, de igual manera hubo correlación negativa y altamente significativa entre *Rotylenchulus* en suelo y *Helicotylenchus* en raíces ($r = -0.17590$; $P = 0.0082$). La correlación entre *Helicotylenchus* en suelo y *Meloidogyne* en raíz

también fue negativa y significativa ($r = -0.13722$; $P = 0.0397$), lo cual demuestra que hay antagonismos entre cada pareja de géneros, debido a la competencia por sitios de alimentación. Las correlaciones positivas, aunque sean significativas, indican que no hay antagonismo entre los fitonemátodos, y la presencia de uno no interfiere en la del otro, como en el caso de *Rotylenchulus* – *Pratylenchus* y *Rotylenchulus* - *Meloidogyne*, los cuales, pueden convivir en el mismo medio y no habrá competencia por espacio y alimento.

Tabla 1.11. Análisis de correlación entre los géneros encontrados en el estudio.

Géneros	Índice de correlación	Nivel de significancia (0.05)
<i>Rotylenchulus</i> suelo vs <i>Helicotylenchus</i> suelo	-0.25913	0.0001
<i>Rotylenchulus</i> suelo vs <i>Helicotylenchus</i> raíz	-0.17590	0.0082
<i>Rotylenchulus</i> suelo vs <i>Pratylenchus</i> suelo	0.43037	0.0001
<i>Rotylenchulus</i> suelo vs <i>Pratylenchus</i> raíz	0.33134	0.0001
<i>Rotylenchulus</i> suelo vs <i>Meloidogyne</i> suelo	0.03526	0.5988
<i>Rotylenchulus</i> suelo vs <i>Meloidogyne</i> raíz	-0.05211	0.4366
<i>Rotylenchulus</i> suelo vs <i>Criconemella</i> suelo	-0.01741	0.7951
<i>Rotylenchulus</i> raíz vs <i>Helicotylenchus</i> suelo	-0.00337	0.9599
<i>Rotylenchulus</i> raíz vs <i>Helicotylenchus</i> raíz	-0.06674	0.3190
<i>Rotylenchulus</i> raíz vs <i>Pratylenchus</i> suelo	0.28188	0.0001
<i>Rotylenchulus</i> raíz vs <i>Pratylenchus</i> raíz	0.70615	0.0001
<i>Rotylenchulus</i> raíz vs <i>Meloidogyne</i> suelo	0.18470	0.0055
<i>Rotylenchulus</i> raíz vs <i>Meloidogyne</i> raíz	-0.04209	0.5299
<i>Rotylenchulus</i> raíz vs <i>Criconemella</i> suelo	0.08658	0.1957
<i>Helicotylenchus</i> suelo vs <i>Pratylenchus</i> suelo	0.04943	0.4606
<i>Helicotylenchus</i> suelo vs <i>Pratylenchus</i> raíz	-0.00771	0.9084
<i>Helicotylenchus</i> suelo vs <i>Meloidogyne</i> suelo	-0.06346	0.3433
<i>Helicotylenchus</i> suelo vs <i>Meloidogyne</i> raíz	-0.13722	0.0397
<i>Helicotylenchus</i> suelo vs <i>Criconemella</i> suelo	0.11194	0.0939
<i>Helicotylenchus</i> raíz vs <i>Pratylenchus</i> suelo	0.04302	0.5209
<i>Helicotylenchus</i> raíz vs <i>Pratylenchus</i> raíz	0.04828	0.4712
<i>Helicotylenchus</i> raíz vs <i>Meloidogyne</i> suelo	-0.11010	0.0995
<i>Helicotylenchus</i> raíz vs <i>Meloidogyne</i> raíz	-0.10242	0.1256
<i>Helicotylenchus</i> raíz vs <i>Criconemella</i> suelo	0.00431	0.9487
<i>Pratylenchus</i> suelo vs <i>Meloidogyne</i> suelo	0.10060	0.1325
<i>Pratylenchus</i> suelo vs <i>Meloidogyne</i> raíz	-0.08732	0.1919
<i>Pratylenchus</i> suelo vs <i>Criconemella</i> suelos	-0.03309	0.6215
<i>Pratylenchus</i> suelo vs <i>Meloidogyne</i> suelo	0.05750	0.3907
<i>Pratylenchus</i> suelo vs <i>Meloidogyne</i> raíz	-0.05023	0.4534
<i>Pratylenchus</i> suelo vs <i>Criconemella</i> suelo	-0.01903	0.7765
<i>Meloidogyne</i> suelo vs <i>Criconemella</i> suelo	-0.01788	0.7896
<i>Meloidogyne</i> raíz vs <i>Criconemella</i> suelo	-0.01178	0.8605

1.5 Discusión

Los nematodos fitoparásitos encontrados en este trabajo coinciden con los reportados a nivel mundial para el cultivo de piña: Costa Rica (Guzmán et al., 2013), Cuba (Hernández, 1998; Gandarilla, Bofill, & González, 2014), Hawái (Rohrbach & Apt, 1986; Caswell & Apt, 1989;), Nigeria (Daramola et al., 2013), Perú (Julca, 1997; Vera et al., 2017), South África (Rabie, 2017) y Venezuela (Jiménez et al., 2001). Los trabajos realizados en Colombia son pocos, sin embargo, este estudio es consistente con el de Redondo & Varón de Agudelo (1991) que se llevó a cabo en los departamentos del Cauca y Valle del Cauca, Colombia.

Es de anotar que la mayor frecuencia de *Helicotylenchus* y *Pratylenchus* en esta investigación concuerda con los trabajos de otros investigadores (Hutton, 1975; Redondo & Varón de Agudelo, 1991; Julca, 1997; Araya, 2019) en donde destacan a estos dos géneros como los más frecuentes asociados al cultivo de piña.

La presencia de *Helicotylenchus* en raíces y suelo se debe a que este nematodo tiene hábito de alimentación ectoparásito o semi-endoparásito (Ravichandra, 2014).

Las densidades absolutas más altas encontradas en este estudio para *Helicotylenchus* fueron de 1.451 y 1.311 individuos/100cc de suelo, estos valores son superiores a los reportados por Figueroa (1985), quien en su trabajo menciona que 1.100 individuos/100cc de suelo no causan daño al cultivo de piña. Sin embargo, los valores registrados en este estudio son superiores y podrían representar algún riesgo para el cultivo.

En el trabajo realizado por Redondo & Varón de Agudelo (1991) inocularon densidades poblacionales de *Helicotylenchus dihystra* más altas con respecto a las encontradas en esta investigación y las plantas de piña no fueron afectadas. Es necesario aclarar que los

materiales de piña inoculadas y evaluadas por dichos autores era de la variedad 'Manzana' y ellos mismos concluyen que el motivo por el cual no se observó daño pudo deberse a que: 1) *Helicotylenchus* no induce la sintomatología en hospedero, 2) la variedad 'Manzana' mostró algún tipo de tolerancia y 3) el nematodo requiere más tiempo para afectar el cultivo ya que sus evaluaciones duraron cinco meses y según Thorne (1961) *Helicotylenchus* requiere más de un año de alimentación en una misma planta susceptible para ocasionar síntomas (Redondo & Varón de Agudelo, 1991; Julca, 1997; Castellano et al, 2004). Cabe mencionar que las fincas visitadas en este estudio tenían más de un año de haber sido establecidas con la variedad MD2, por lo tanto, esto indicaría que el cultivo probablemente podría estar siendo afectado por *Helicotylenchus*, por las diferencias en susceptibilidad que puede haber entre materiales. En ese sentido, es necesario hacer más estudios relacionados con el parasitismo de este fitonemátodo y su relación con el rendimiento en el cultivo.

Es de mencionar que otros autores reportan a *H. dihystra* como fitonemátodo parásito en otros cultivos, los cuales son de referencia para considerar las poblaciones encontradas en este trabajo. En una investigación realizada por Rao & Swarup (1974) en caña determinaron que más de 1000 *H. dihystra* en 500 cc de suelo pueden ser perjudiciales para el cultivo de la caña.

En otro trabajo realizado por Rashid & Azad (2013) en plantas ornamentales (*Celosia cristata*) concluyeron que 2.000 hembras de *H. dihystra* por kg de suelo, causaron disminución del crecimiento de la planta. En el mismo estudio de Rashid & Azad (2013) determinaron que los inóculos superiores a 4.000 hembras/planta reduce significativamente su factor de reproducción ya que a mayor inóculo hay menor multiplicación de los nematodos, según los autores puede deberse principalmente a la competencia por espacio y alimento.

Otro estudio de Zahid y colaboradores (2002) en el ornamental trébol blanco (*Trifolium repens*) evaluaron inóculos con densidades poblacionales entre 10 - 500 *H. dihystra* y ninguna mostró afección a la planta, por ende, se determina que densidades bajas de este fitonemátodo no causan daño.

La investigación de Firoza & Maqbool (1994) utilizando diferentes densidades poblacionales en berenjena, trigo y tomate, determinaron que 4000 *H. dihystra* por kg de suelo son el umbral perjudicial para estos cultivos.

En India realizaron experimentos en macetas y observaron que *H. dihystra* redujo el crecimiento de *Capsicum annuum* con niveles de inóculo iniciales de 50 nematodos/1500 g de suelo y superiores. En los niveles más bajos de inóculo hubo un aumento en el peso de los brotes y raíces, lo cual indica que aun con poblaciones bajas el fitonemátodo pueden influir en el desarrollo normal de la planta. Por otra parte, también se determinó que la tasa de multiplicación del nematodo fue inversamente proporcional al nivel de inóculo inicial (Muthukrishnan, Rajendran & Chandrasekaran, 1975).

En este mismo país (India) evaluaron 21 cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor*) y observaron que poblaciones de 10.000 *H. dihystra*/planta redujeron el crecimiento y peso del cultivo (Jain & Hasan, 1987).

Pratylenchus fue el segundo fitonemátodo más frecuente en este estudio, sin embargo, los valores encontrados en todos los municipios, estuvieron por debajo del umbral de riesgo para el cultivo, partiendo de la investigación de Sipes et al., (2005) en la cual inocularon 200 *Pratylenchus* por planta y encontraron una reducción del 25% en el crecimiento de la planta después de 10 meses, esto indica la importancia de este fitonemátodo en el cultivo de piña.

La especie *Pratylenchus neglectus* también ha mostrado ser patogénica en el cultivo de piña. En el estudio de Redondo & Varón de Agudelo (1991) encontraron que inoculaciones de 880 *P. neglectus* en 6 kg de suelo se redujo en más del 50% el follaje y raíces del cultivo de piña.

En otros cultivos también se ha reportado como perjudicial este fitonemátodo. El estudio de Simões & Inomoto (2008) demostró que *P. brachyurus* es patogénico para el cultivo de frijol caupí, en el cual determinaron que densidades de 5,000 *P. brachyurus* por planta (2300 g) causaron retraso en el crecimiento de las plantas y afectaron la formación y llenado de las vainas. También concluyeron que altas densidades de inóculo causan menos daño a las plantas y se lo atribuyen a que probablemente hay competencia intraespecífica. Otra investigación hecha por Machado, Ferraz, & Inomoto (2012) en el cultivo de algodón observaron que densidades poblacionales de 12.000 *P. brachyurus*/400 cc de suelo causan daño al cultivo.

El tercer fitonemátodo de mayor importancia fue *Rotylenchulus*. En el municipio de Buga se encontraron las poblaciones más altas, sin embargo, los valores encontrados en este trabajo no representan una amenaza para el cultivo de piña. Cabe recalcar que es de vital importancia el monitoreo constante de los niveles poblacionales de *Rotylenchulus* ya que en Hawái (Davide, 1988; Gianessi et al., 2002), Filipinas (Davide, 1988) Puerto Rico, partes de Tailandia, (Queensland) Australia y (Oxaca) México (Sipes & Chinnasri, 2018) ha sido reportado como el principal nematodo fitoparásito del cultivo de piña.

El estudio de Sipes & Schmitt (2000) en el cultivo de piña indica que *R. reniformis* en densidades poblacionales superiores a 1.000 nematodos/250 cc de suelo causan daño al cultivo de piña y se convierten en la principal limitante para este cultivo en el suelo. Los mismos autores mencionan que si antes de plantar el cultivo se encuentran poblaciones por debajo de 300 *R. reniformis*/250 cc de suelo, estas pueden causar daño al cultivo, sin embargo, indican que la disminución del rendimiento puede atribuirse a los nematodos y a la fertilidad del suelo.

En el cultivo de algodón cuando la densidad poblacional excede 2 *R. reniformis*/cc de suelo en primavera y 10 *R. reniformis*/cc de suelo en otoño son suficientes para causar daño, por ende, el servicio de extensión de Mississippi y Alabama recomiendan hacer aplicaciones para controlar este parásito de plantas (Wang, 2007).

En general, para los tres géneros (*Helicotylenchus*, *Pratylenchus* y *Rotylenchulus*) es importante considerar los muestreos constantes para conocer el flujo de las poblaciones en el cultivo para determinar si disminuyen, se mantienen o incrementan, y si es necesario, considerar las respectivas estrategias de control.

Con el análisis de correlación se pudo determinar que entre *Helicotylenchus* y *Rotylenchulus* hubo correlación negativa y altamente significativa, por lo tanto, se confirma que hay antagonismo entre estos dos géneros, es decir, la presencia de uno afecta al otro. Esto podría deberse a que *Helicotylenchus* spp. algunas veces presenta el mismo tipo de parasitismo que *Rotylenchulus*, (Ravichandra, 2014), por lo tanto, ello podría explicar en cierta medida la ausencia de poblaciones de *Rotylenchulus* en presencia de *Helicotylenchus* en los sitios muestreados.

La correlación negativa y significativa entre *Helicotylenchus* y *Meloidogyne* según Eisenback (1993) se debe a que *Helicotylenchus* puede alimentarse en los sitios de penetración de preferencia en los estados infectivos de *Meloidogyne* y por ende no establecer un sitio de alimentación exitoso. Por otra parte, el mismo autor indica que por ser un ectoparásito puede dañar la raíz disminuyendo así los sitios de alimentación disponibles para *Meloidogyne*, aunque también menciona que las interacciones entre fitonemátodos ecto y endoparásitos sedentarios puede ser benéfica para uno de ellos o para ambos. La correlación para poblaciones de *Pratylenchus* y *Rotylenchulus* fue positiva y altamente significativa, lo que indica que pueden convivir dadas las diferencias en sus hábitos de alimentación (Eisenback, 1993).

Los agrupamientos observados en el análisis de componentes principales y conglomerados podrían atribuirse a diferencias en los niveles de intensificación agrícola, como también a las diferentes prácticas agronómicas que cada productor realiza en su sistema de producción, incluyéndose la fertilización, rotación de cultivos, barbecho, forma de preparar y transportar la semilla para la siembra, control de malezas y aplicación de productos químicos. Por otra parte, las condiciones climáticas y el tipo de suelo son factores importantes que también influyen en el comportamiento, estructura, composición de los fitonemátodos en el suelo y raíces (Norton, 1979; Kumar et al., 2014).

1.6 Conclusiones

Los géneros con mayor distribución en los cultivos de piña en el Valle del Cauca fueron *Helicotylenchus* y *Pratylenchus*, siendo las poblaciones de *Helicotylenchus* las más altas en suelo y raíces.

Las poblacionales encontradas deben ser estudiadas para conocer su parasitismo y nivel de infestación en los sistemas de producción de piña.

Con el análisis de correlación se determinaron relaciones antagónicas entre algunos géneros, sin embargo, son necesarios futuros trabajos para mayor comprensión de estas relaciones.

1.7 Bibliografía

- Abad, P., Gouzy, J., Aury, J. M., Castagnone-Sereno, P., Danchin, E. G. J., Deleury, E., Wincker, P. (2008). Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology*, 26(8), 909–915. <https://doi.org/10.1038/nbt.1482>
- Agronet., (2020). Sistema de Estadísticas Agropecuarias – SEA. Cifras Agropecuarias. Disponible en: <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx> (Último acceso: febrero, 2020).
- Araya, M. (2019). Frequencies and population densities of parasitic nematodes in Costa Rican pineapple plantations. *Acta Horticulturae*, 1239, 153–166. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1239.19>
- Baruwa, O. I. (2013). Profitability and constraints of pineapple production in Osun State, Nigeria. *Journal of Horticultural Research*, 21(2), 59–64. <https://doi.org/10.2478/johr-2013-0022>
- Botero, D. (2015). Factibilidad de un cultivo de piña variedad MD2 en Caucasia para exportación a USA. Universidad EAFIT, Medellín.
- Brücher, E., Vuletic, E., Guerra, F., Rossi, R., Plazas, M., Guerra, G., ... Doucet, M. (2019). Characterization of a population of *Helicotylenchus dihystera* (Cobb, 1893) Sher, 1961, parasitizing maize roots, in Southern Córdoba, Argentina. *Nematropica*, (September), 10. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/335682015%0ACharacterization>
- Carvajal, D. (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. Instituto Tecnológico de Costa Rica Sede Regional San Carlos.
- Castellano Quijada, O., Jiménez-Pérez, N., & Briceño, E., G. (2004). Nematodos fitoparásitos asociados con merey, tamarindo y semeruco en el estado Zulia y respuesta de dos cultivares de merey ante el nematodo agallador *Meloidogyne incognita*. *Fitopatología Venezolana*, 17(1), 6--8.

- Castillo, P., Navas, J., Gomar, D., Di Vito, M., & Jiménez, R. (2003). Interactions Between *Meloidogyne artiellia*, the Cereal and Legume Root-Knot Nematode, and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* Race 5 in Chickpea. *Phytopathology*, 93(12), 1513–1523. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.12.1513>
- Caswell, E. P., & Apt, W. J. (1989). Pineapple nematode research in Hawaii: past, present, and future. *Journal of Nematology*, 21(2), 147–157.
- Caswell-Chen, E. P., Williamson, V. M., & Wu, F. F. (1992). Random Amplified Polymorphic DNA Analysis of *Heterodera cruciferae* and *H. schachtii* populations. *Journal of Nematology*, 24(3), 343–351.
- Chinnasri, B., & Sipes, B. (2005). Effect of a systemic acquired resistance inducer on nematodes infecting pineapple. *Acta Horticulturae*, 666, 213–222. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.666.22>
- Cobb, N. A. (1917). Notes on Nemas. *Contributions to a Science of Nematology*.
- Coyne, D. L., & Plowright, R. A. (2002). Assessment of the importance of individual plant-parasitic nematode species in a community dominated by *Heterodera sacchari* on upland rice in Côte d'Ivoire. *Nematology*, 4(6), 661–669. <https://doi.org/10.1163/156854102760396511>
- Crozzoli, R. (2002). Especies de nematodos fitoparasíticos en Venezuela. *Interciencia*, 27(7), 354–364.
- Crozzoli, R. (2009). Nematodes of Tropical Fruit Crops in Venezuela. In A. Ciancio & K. G. Mukerji (Eds.), *Integrated Management of Fruit Crops and Forest Nematodes* (pp. 63–83). https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9858-1_2
- da Costa, D. D. C., dos Santos, J. M., & Sanches, N. F. (1998). Association of *Aorolaimus* sp. (Nemata: Hoplolaiminae) with pineapple reddish leaf symptoms in the Itaberaba region, Bahia, Brazil. *Revista Brasileira de Fruticultura* (Brazil).
- Daramola, F., & Afolami, S. (2014). Studies on the distribution of plant-parasitic nematodes associated with pineapple in Delta, Imo and Cross River states of Nigeria. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 8(7), 248–256.
- Daramola, F. Y., Afolami, S. O., Idowu, A. A., & Nwanguma, E. I. (2013). Studies on the occurrence and distribution of plant-parasitic nematodes in some pineapple-producing states in Nigeria. *Asian Journal of Crop Science*, Vol. 5, pp. 190–199. <https://doi.org/10.3923/ajcs.2013.190.199>
- Davide, R. G. (1988). Nematode problems affecting agriculture in the Philippines. *Journal of Nematology*, 20(2), 214–218.
- De Waele, D., & Elsen, A. (2007). Challenges in Tropical Plant Nematology. *Annual Review of Phytopathology*, 45(1), 457–485. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094438>

- Demey, J. R., Zambrano, A. Y., Fuenmayor, F., & Segovia, V. (2003). Relación entre caracterizaciones molecular y morfológica en una colección de yuca. *Interciencia*, 28(12), 684–689+719+720.
- Eisenback, J. D. (1993). Interactions between nematodes in cohabitation. In *Nematode Interactions*. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-1488-2>
- FAO. 2020. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Production quantity and yield of pineapple. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Último acceso 6 de enero de 2020).
- Figuerola, M. A. (1985). Reconocimiento de nematodos fitoparásitos y sus efectos en la piña, *Ananas comosus* L. (Merr) *Revista de la Asociación Bananera Nacional (ASBANA) San José, Costa Rica* 9(23):6-20
- Firoza, K., & Maqbool, M. A. (1994). A diagnostic compendium of the genus *Helicotylenchus* Steiner, 1945 (Nematoda: Hoplolaimidae). *Pakistan Journal of Nematology*, 12, 11-50.
- Gandarilla, H., Bofill, R., & González, F. (2014). Reseña Fitonemátodos asociados a los cultivos de frutos tropicales. *Fitosanidad*, 18. La Habana, Cuba.
- García, R., Palma, D., García, R., Rodríguez, M., & González. (2005). Effect of legumes rotation on pineapple root diseases in Huimanguillo, Tabasco, Mexico. *Acta Horticulturae*, 666 (March, 2018), 247–256. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.666.27>
- García, Y., Pérez, J., García, A., & Hernández, A. (2011). Determinación de las propiedades de calidad de la piña (*Ananas Comosus*) variedad Cayena Lisa almacenada a temperatura ambiente. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 20(1), 62-65.
- Gianessi, L., Silvers, C., Sankula, S., & Carpenter, J. (2002). Plant biotechnology current and potential impact for improving pest management in U. S. agriculture insect resistant field corn (1). (202), 75. Retrieved from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.410.2094&rep=rep1&type=pdf>
- Guerout, R. (1975). Nematodes of pineapple: A review. *PANS Pest Articles and News Summaries*, 21(2), 123–140. <https://doi.org/10.1080/09670877509411384>
- Guzmán, T., Durán, J., Montero, W., Vargas, H., Castro, Z., Carvajal, D., & León, D. (2013). Diagnóstico y dinámica poblacional de nematodos fitoparásitos en dos sistemas de cultivos de piña en Costa Rica. *Revista Tecnología En Marcha* 27, 58–81.

- Guzmán-Hernández, T. D. J., Varela-Benavides, I., Hernández-Villalobos, S., Durán-Mora, J., & Montero-Carmona, W. (2014). Principales géneros de nematodos fitoparásitos asociados a plátano y piña en las regiones Huetar Norte y Huetar Atlántica de Costa Rica. *Revista Tecnología En Marcha*, 27(1), 85. <https://doi.org/10.18845/tm.v27i1.1699>
- Hernández, H. R. (1998). Los nematodos parásitos de la piña. Opciones para su manejo. *Institución de Investigaciones En Fruticultura Tropical*, 10(3005), 1–30. Retrieved from <http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/5007/cuf0122s.pdf>
- Hodda, M. (2011). "Phylum Nematoda Cobb 1932. In: Zhang, Z.-Q. (Ed.) *Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness*. *Zootaxa*, 3148(1), 63. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3148.1.11>
- Hunt, D. J., Palomares-Rius, J. E., & Manzanilla-López, R. H. (2018). Identification, morphology and biology of plant parasitic nematodes. In *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture: 3rd Edition* (3rd ed., pp. 11–52). <https://doi.org/10.1079/9780851997278.0011>
- Hutton, D. G. (1974). Response of two pineapple varieties to select nematicides. In *Symposium on the Protection of Horticultural Crops in the Caribbean*, St. Augustine (Trinidad and Tobago), 8-11 Apr 1974.
- Jain, R., & Hasan, N. (1987). Relative susceptibility of some selected forage sorghum (*Sorghum bicolor* L.) varieties to spiral nematode, *Helicotylenchus dihystera*. *Indian Journal of Nematology*, 17(2), 199–201.
- Jiménez, N., Crozzoli, R., Petit, P., & Greco, N. (2001). Nematodos fitoparásitos asociados con el cultivo de la piña, *Ananas comosus*, en los estados de Lara y Trujillo, Venezuela. *Nematología Mediterránea*, 29, 13–17.
- Jones, M. G. K., & Fosu-Nyarko, J. (2014). Molecular biology of root lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) and their interaction with host plants. *Annals of Applied Biology*, 164(2), 163–181. <https://doi.org/10.1111/aab.12105>
- Julca, A. (1997). Nematodos asociados al cultivo de piña (*Ananas comosus*) 'Samba de Chanchamayo' y su relación con los componentes de producción y calidad. *Universidad Nacional Agraria La Molina*.
- Ko, M. P., & Schmitt, D. P. (1992). Pineapple inter-cycle cover crops to reduce plant-parasitic nematode populations. In *I International Pineapple Symposium* 334 (pp. 373- 382).
- Ko, M. P., & Schmitt, D. P. (1996). Changes in plant-parasitic nematode populations in pineapple fields following inter-cycle cover crops. *Journal of Nematology*, 28(4), 546–556.

- Koenning, S. R., Overstreet, C., Noling, J. W., Donald, P. A., Becker, J. O., & Fortnum, B. A. (1999). Survey of crop losses in response to phytoparasitic nematodes in the United States for 1994. *Journal of Nematology*, 31(4S), 587–618.
- Kumar, M., Balamohan, T., Jeyakumar, P., & Seenivasan, N. (2014). Population dynamics of banana nematodes as influenced by weather parameters correlation studies for nematode population in banana Population dynamics of banana nematodes as influenced by weather parameters correlation studies for nematode. *Current Nematology*, 25(1,2), 51–55.
- León, D. (2007). Diagnóstico y dinámica poblacional de nematodos en el cultivo de piña (*Ananas comosus*) (L.) Merr. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Pp. 76
- Linford, M. B., Oliveira, J. M., & Ishii, M. (1949). *Paratylenchus minutus*, n. sp., A nematode parasitic on roots. *Pacific Sci*, 3(3), 111-119.
- Machado, A. C. Z., Ferraz, I. L. C. C. B., & Inomoto, M. M. (2012). Pathogenicity of *Pratylenchus brachyurus* on cotton plants. *Journal of Cotton Science*, 16(4), 268–271.
- Malezieux, E. (1998). Global network for pineapple research. In III International Pineapple Symposium 529 (pp. 35-48).
- Masdek, H. N., Ismail, A. B., Zulkifli, M., & Malip, M. (2007). *Paratylenchus* sp. associated with pineapple yield decline. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*, 35(1), 191–199.
- Mesa, N. C., Gómez, E. D., Huertas, C. A., Mena, Y. M., García, Y., Imbachi, K. (2014) Programa de manejo fitosanitario en piña en el departamento del Valle del Cauca. Universidad de Colombia, Sede Palmira Pp. 12-47
- Ming, R., VanBuren, R., Wai, C. M., Tang, H., Schatz, M. C., Bowers, J. E., Yu, Q. (2015). The pineapple genome and the evolution of CAM photosynthesis. *Nature Genetics*, 47(12), 1435–1442. <https://doi.org/10.1038/ng.3435>
- Mosquera-Espinosa, A. T. (2016). Fitonemátodos asociados a *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn., *Solanum quitoense* Lam. y *Daucus carota* L. en el Departamento de Boyacá, Colombia. *Acta Agronómica*, 65(1), 87–97. <https://doi.org/10.15446/acag.v65n1.45180>
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. <https://doi.org/10.1101/SQB.1986.051.01.032>
- Múnera, G. E., Bert, W., & Decraemer, W. (2009). Morphological and molecular characterisation of *Pratylenchus araucensis* n. sp. (Pratylenchidae), a root-lesion nematode associated with Musa plants in Colombia. *Nematology*, 11(6), 799–813. <https://doi.org/10.1163/156854109X415524>

- Muñoz, L., Múnera, G., & Díaz, C. (2003). Literatura gris y proyectos recientes sobre problemas fitosanitarios, con énfasis en nematodos, en los cultivos de lulo, tomate de árbol y passifloras en Colombia.
- Murant, A. F., & Lister, R. M. (1967). Seed-transmission in the ecology of nematode-borne viruses. *Annals of Applied Biology*, 59(1), 63–76. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1967.tb04417.x>
- Muthukrishnan, T. S., Rajendran, G., & Chandrasekaran, J. (1975). Pathogenicity of *Helicotylenchus dihystera* to chilli (*Capsicum annuum*) and its host range. *Indian Journal of Nematology*, 5(2), 180-184.
- Nath, R. C., Mukherjee, B., Dasgupta, M. K., & Siddiqi, M. R. (1997). Density, diversity and community structure of plant parasitic nematodes in pineapple plantations of Tripura, India. *International Journal of Nematology*, 7(1), 51-56.
- Nicol, J., Turner, S., Coyne, D., Nijs, L., Hockland, S., & Tahna, Z. (2011). Current Nematode Threats to World Agriculture. *Genomics and Molecular Genetics of Plant- Nematode Interactions*, 369–393. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-0434-3>
- Norton, D. C. (1979). Relationship of physical and chemical factors to populations of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, 21.
- Nutter, F., Teng, P., & Shokes, F. (1991). Disease assessment terms and concepts. *Plant Disease*, 75(11), 1187–1188.
- Nutter, F. W., & Gaunt, R. E. (1996). Recent developments in methods for assessing disease losses in forage/pasture crops. *Pasture and Forage Crop Pathology*, (January 1996), 93–118. <https://doi.org/10.2134/1996.pastureforagecroppathol.c6>
- Nutter, Forrest W., Esker, P. D., & Netto, R. A. C. (2006). Disease assessment concepts and the advancements made in improving the accuracy and precision of plant disease data. *European Journal of Plant Pathology*, 115(1), 95–103. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-1230-z>
- Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31–43. <https://doi.org/10.1017/S0021859605005708>
- Ortiz, R., Guzmán, O., & Ocampo, A. (2012). Identificación de nematodos fitoparásitos en el Banco de Germoplasma de maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) en Colombia. *Acta Agronómica*, 61(4), 295–304.
- Pac, P. (2005). Experiencias en el cultivo de piña (*Annanas comosus* L. Merr.) con el híbrido MD" en finca La Plata, Coatepeque, Quetzaltenango. Universidad de San Carlos, Guatemala
- Palomares, J. E., Castillo, P., Navas, J. A., Jiménez, R. M., & Tena, M. (2011). A proteomic study of in-root interactions between chickpea pathogens: The root-knot nematode *Meloidogyne artiellia* and the soil-borne fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* race 5. *Journal of Proteomics*, 74(10), 2034–2051. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.026>

- Papamija, R. (2002). Estudio de las poblaciones de nemátodos como bioindicadores de sanidad en suelos cultivados con maracuyá *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*, en los municipios de Roldanillo, La Unión y Toro. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira.
- Powers, T. (2004). Nematode Molecular Diagnostics: From bands to barcodes. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 367–383. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140348>
- Py, C. 1969. La Piña Tropical. Editorial BLUME. Barcelona. España. 269 p.
- Py, C., Lacoëuilhe, J. J., & Teisson, C. (1987). The pineapple. Cultivation and uses. G.-P. Maisonneuve et Larose.
- Rabie, E. (2017). Nematology in South Africa: A View from the 21st Century. Nematodes pests of pineapple. In H. Fourie et al., (Eds.), *Nematology in South Africa* (pp. 395–407). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-44210-5>
- Rao, V., & Swarup, G. (1974). Pathogenicity of the Spiral Nematode, *Helicotylenchus dihystera*, to sugarcane. *Indian Journal of Nematology*, 4, 160–166.
- Rashid, A., & Azad, S. A. (2013). Studies on the pathogenicity of *Helicotylenchus dihystera* on *Celosia cristata*. *Indian Journal*, 4(1), 153–154.
- Ravichandra, N. G. (2014). Horticultural Nematology. Department of Plant Pathology, University of Agricultural Science, Bangalore, Karnataka India. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1841-8>
- Redondo, E., & Varón de Agudelo, F. (1991). Efecto de los nematodos en el cultivo de la piña *Ananas comosus* L. (Merr.). *Fitopatología Colombiana*, 16, 180-192. Retrieved from http://sipco.ica.gov.co:8080/bitstream/123456789/16756/1/Redondo_Varon_1991.pdf
- Rohrbach, K. G., & Apt, W. J. (1986). Nematode and Disease Problems of Pineapple. *Plant Disease*, Vol. 70, pp. 81–87. <https://doi.org/10.1094/PD-70-81>
- S'Jacob, J. J., & Van Bezooijen, J. (1977). A manual for practical work in nematology. Wageningen, The Netherlands, Wageningen Agricultural University, 21-23.
- Sasser, J. N. (1989). Plant-parasitic nematodes: the farmer's hidden enemy. Department of Plant Pathology North Carolina State University. U.S.A. 115p.
- Sasser, J.N. and Freckman, D.W. (1987) A World Perspective on Nematology: The Role of the Society. In: Veech, J.A. and Dickson, D.W., Eds., *Vistas on Nematology*, Hyattsville, Maryland, 7-20.
- Sijmons, P. C., Atkinson, H. J., & Wyss, U. (1994). Parasitic strategies of root nematodes and associated host cell responses. *Annual Review of Phytopathology*, 32(1), 235-259.

- Sikora, R.A., Fernández, E., 2005. Nematodes parasites of vegetables. In: Luc, M., Sikora, R.A., Bridge, J. (Eds.), *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. CAB International, Wallingford (GBR), pp. 319-392.
- Simões, K., & Inomoto, M. (2008). Pathogenicity and reproductive fitness of *Pratylenchus brachyurus* on cowpea. *Nematology*, 10(4), 495–500. <https://doi.org/10.1163/156854108784513897>
- Singh, S., Singh, B., & Singh, A. P. (2015). Nematodes: A Threat to Sustainability of Agriculture. *Procedia Environmental Sciences*, 29(Agri), 215–216. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2015.07.270>
- Sipes, B., & Schmitt, D. (1994). Population fluctuation of *Rotylenchulus reniformis* in pineapple fields and the effect of the nematode on fruit yield. *Plant Diseases*, 78, 4.
- Sipes, B. (2000). Crop Profile for Pineapples in Hawaii. USDA, 9. Retrieved from <https://ipmdata.ipmcenters.org/documents/cropprofiles/Hlpineapples.pdf>
- Sipes, B. S., & Chinnasri B. (2018). Nematode parasites of pineapple. CAB International and USDA 2018. *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture* (eds R.A. Sikora et al.)
- Sipes, B. S., & Schmitt, D. P. (2000). *Rotylenchulus reniformis* damage thresholds on pineapple. In III International Pineapple Symposium 529 (pp. 239-246).
- Sipes, B. S., Caswell Chen, E. P., Sarah, J. L., & Apt, W. J. (2005). Nematode parasites of pineapple. Department of Plant and Environmental Protection Sciences, University of Hawaii
- Sipes, B., & Matos, A. (2018). Pests, diseases and weeds. In K. G. R. and M. W. Johnson (Ed.), *The Pineapple, Botany, Production and Uses* (2nd ed., pp. 269–294). <https://doi.org/10.1002/9781118967355.ch4>
- Sipes, Brent, & Knoon-Hui Wang. (2017). Pests, diseases and weeds. In *Plant and Environmental Protection Science* (Third Edit, p. 27). Manoa Honolulu, Hawaii.
- Suárez H, Z., & Rosales, L. C. (2008). Behavior of the pineapple (*Ananas comosus*) genetic materials to the attack of *Meloidogyne incognita* race 1. *Revista de Protección Vegetal*, 23(3), 191–195. Retrieved from <http://web.b.ebscohost.com.ezproxy.unal.edu.co/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=4&sid=5ebd8423-63a4-49d5-adcd-28dfc44b53c5%40sessionmgr103&hid=123>
- 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. <https://doi.org/10.1163/138855410X520936>
- Tamayo, M. P. J. (2001). *Meloidogyne incognita* on passion fruit. *Ascolfi Informa*, 27(3), 18-19.

- Thingbaijam, L., Das, K., Singh, N., & Zimisai, S. (2015). Resource Use Efficiency in Pineapple Cultivation – a Case Study from Manipur, India. *International Journal of Bio-Resource*, 6(0), 407–412. <https://doi.org/10.5958/0976-4038.2015.00062.7>
- Thorne, G. (1962). Principles of nematology. *Soil Science*, 93(1), 70.
- Thuy, T. T. T., Chi, N. T. M., Yen, N. T., Anh, L. T. N., Te, L. L., & De Waele, D. (2013). Fungi associated with black pepper plants in Quang Tri province (Vietnam), and interaction between *Meloidogyne incognita* and *Fusarium solani*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 46(4), 470–482. <https://doi.org/10.1080/03235408.2012.744621>
- Van den Berg, E., Marais, M., & Swart, A. (2017). Nematode morphology and classification. In H. Fourie, V. W. Spaull, R. K. Jones, M. S. Daneel, & D. De Waele (Eds.), *Nematology in South Africa: A View from the 21st Century* (pp. 33–71). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-44210-5>
- Van Ghelder, C., Reid, A., Kenyon, D., & Esmenjaud, D. (2015). Development of a real-time PCR method for the detection of the dagger nematodes *Xiphinema index*, *X. diversicaudatum*, *X. vuittenezi* and *X. italiae* and for the quantification of *X. index* numbers. *Plant Pathology*, 64(2), 489–500. <https://doi.org/10.1111/ppa.12269>
- Vargas, Z., Varón, F., & Gómez, E. (2002). Nematodos asociados a la granadilla (*Passiflora ligularis* Juss) en el Valle del Cauca. *Fitopatología Colombiana*, 11. Retrieved from https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/17664/42220_45977.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Varón de Agudelo, F.; y Castillo, G. 2001. Seminario – Taller sobre identificación de nematodos de importancia agrícola. ICA-Palmira. Asociación Colombiana de Fitopatología (Ascolfi). 25 p.
- Vera, N., Maicelo, J., Guevara, E., & Oliva, S. (2017). Plant parasitic nematodes associated with pineapple cultivation (*Ananas comosus*) in Amazonas, Peru. *Scientia Agropecuaria*, 8(1), 79–84. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.01.08>
- Vieira, P., & Gleason, C. (2019). Plant-parasitic nematode effectors — insights into their diversity and new tools for their identification. *Current Opinion in Plant Biology*, 50, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.02.007>
- Villate, L., Fievet, V., Hanse, B., Delemarre, F., Plantard, O., Esmenjaud, D., & Van Helden, M. (2008). Spatial Distribution of the Dagger Nematode *Xiphinema index* and Its Associated Grapevine fanleaf virus in French Vineyard. *Phytopathology*, 98, 942–948. <https://doi.org/doi:10.1094/PHYTO-98-8-0942>
- Volcy, C. (1998). Nematodos. Tomo 2. Diversidad y parasitismo en plantas. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín pp 43-58.

- Wang, K. H. (2007). Reniform Nematode, *Rotylenchulus reniformis* Linford and Oliveira (Nematoda: Tylenchida: Tylenchoidea: Hoplolaimidae: Rotylenchulinae). University of Florida, IFAS Extension, 1–5.
- Yacob, A. (2010). Global overview and trade of the pineapple industry. In 7th International Pineapple Symposium. July (pp. 13-15).
- Zahid, M. I., Gurr, G. M., Hodda, M., Nikandrow, A., & Fulkerson, W. J. (2002). Orientation, reproduction and effect of spiral nematode (*Helicotylenchus dihystera*) on growth of white clover (cv. Haifa). *Australasian Plant Pathology*, 31(1), 55–56. <https://doi.org/10.1071/AP01052>

2. Capítulo sobre identificación morfológica, morfométrica y molecular de *Helicotylenchus dihystra* en el cultivo de piña

Resumen

El género *Helicotylenchus* es prevalente en el cultivo de piña, encontrándose en todas las fincas muestreadas. En este capítulo se presenta información de la identificación de trece poblaciones de *Helicotylenchus* obtenidas de cultivos de piña en los municipios de Pradera, Dagua, Buga, La Cumbre y Restrepo, todos ubicados en el Valle del Cauca, Colombia. Estas poblaciones fueron caracterizadas mediante descripción morfológica, análisis morfométrico y molecular. Los caracteres diagnóstico considerados en este trabajo fueron: L, a, c, c', V%, DGO, longitud del estilete, diámetro máximo del cuerpo, diámetro del cuerpo en el ano, longitud de la cola, número de ámulos en la cabeza y número de ámulos en la cola. Los datos morfométricos de las poblaciones evaluadas en este trabajo, fueron similares a los reportados en la literatura para *H. dihystra*. Secuencias de las regiones D2-D3 e ITS del ADN ribosomal fueron obtenidas para las poblaciones estudiadas. Las secuencias de las regiones D2-D3 e ITS del ADN ribosomal mostraron alta afinidad (99% de similitud) con las secuencias de referencia de *H. dihystra* previamente publicadas. El análisis filogenético de Máxima Verosimilitud mostró que las poblaciones de *H. dihystra* de este trabajo agruparon en un mismo clado con poblaciones de referencia de la misma especie. Este es el primer reporte en Colombia y a nivel mundial de *H. dihystra* asociado a cultivos de piña con soporte morfológico, morfométrico y molecular.

Palabras clave: *Helicotylenchus dihystra*, piña, caracteres diagnóstico, D2-D3, ITS

Abstract

The genus *Helicotylenchus* is predominant in pineapple cultivation, finding it all sampled farms. This chapter shows the information on the identification of thirteen *Helicotylenchus* populations obtained from pineapple crops from municipalities of Pradera, Dagua, Buga, La Cumbre, and Restrepo, all of them located in Valle del Cauca, Colombia. These populations were characterized by morphological description, morphometric, and molecular analysis. The characters diagnostic into consideration in this research were: L, a, c, c, V%, DGO, stylet length, maximum body diameter, body diameter at the anus, tail length, number of annules at the tail and head. The morphometric data of the populations evaluated in this work were similar to those reported in the literature for *H. dihystra*. Sequences of D2-D3 and ITS Ribosomal DNA were obtained for the studied populations. The sequences from the D2-D3 and ITS regions of ribosomal DNA showed high affinity (99% similarity) with the reference sequences published for *H. dihystra*. The phylogenetic analysis of maximum likelihood showed that the thirteen populations of *H. dihystra* in this work clustered in the same clade with reference populations of the same specie. This is the first report in Colombia and globally of *H. dihystra* associated with pineapple crop with the morphological, morphometric, and molecular assessment.

Keywords: *Helicotylenchus dihystra*, pineapple, diagnostic characters, D2-D3, ITS

2.1 Introducción

Helicotylenchus spp. es conocido como el nematodo espiral (Marais, 2001; Cuadra, 2016; Crow, 2017). La especie tipo de este género es *Helicotylenchus dihystra* (antes *Helicotylenchus nannus*), la cual fue descrita por Cobb en 1893 y ubicada inicialmente dentro del género *Tylenchus* Bastian, 1865 (Marais, 2001). En 1934, Filipjev trasladó a esta y otras especies relacionadas en el género *Tylenchorhynchus* Cobb, 1913. Posteriormente, en 1945 el científico Steiner estableció el género *Helicotylenchus* (Marais, 2001). Este género, es uno de los más grandes y cosmopolita del orden Tylenchida con más de 200 especies descritas (Marais, 2001; Kashi & Karegar, 2013), distribuidas a nivel mundial en una gran variedad de hábitats (Marais, 2001; Subbotin et al., 2015).

Helicotylenchus dihystra es un fitonemátodo ectoparásito con múltiples hospederos a nivel mundial (Fortuner, Merny, & Roux, 1981), entre ellos la piña (Redondo & Varón de Agudelo, 1991; Ko & Schmitt, 1996; Jiménez *et al.*, 2001; Daramola et al., 2013). Los síntomas ocasionados por este fitonemátodo son lesiones necróticas en la superficie de las raíces, lo cual disminuye el peso de las mismas, brotes y hoja D, resultando plantas menos desarrolladas (Ko & Schmitt, 1996).

Las pérdidas en producción ocasionadas por este fitonemátodo aún se debaten, tomando como referencia los trabajos de Redondo & Varón de Agudelo (1991), quienes demostraron que *H. dihystra* se multiplicó en la variedad manzana, pero no observaron parasitismo. Por otra parte, la investigación de Ko & Schmitt (1996) confirma que este fitonemátodo afecta las raíces, brotes y hoja D, sin embargo, indican que hay una relación negativa entre el número de *H. dihystra* y el crecimiento del cultivo, por lo que sugieren realizar

investigaciones que permitan identificar el daño en producción. En el estudio de Ferreira y colaboradores (2014), observaron que los daños ocasionados por este fitonemátodo fueron reducción en el peso y retraso en la madurez del fruto, no obstante, enfatizan en la necesidad de desarrollar estudios para comprender el parasitismo de *Helicotylenchus* en el cultivo de piña.

En Colombia, específicamente en el Valle del Cauca, Redondo & Varón de Agudelo, (1991) reportaron a *H. dihystera* en el cultivo de piña a partir de análisis morfológico, sin embargo, en la actualidad no hay información con soporte morfométrico y molecular de las especies de *Helicotylenchus* asociadas a cultivos de piña.

2.2 Revisión de literatura

El género *Helicotylenchus* spp. Steiner 1945 es conocido como el nematodo espiral (Marais, 2001; Cuadra, 2016; Crow, 2017) por su posición en estado de reposo o *post-mortis*, tiene hábito de alimentación ecto y semi-endoparásito (Ravichandra, 2014; Hunt et al., 2018). Este género comprende más de 200 especies (Marais, 2001; Ravichandra, 2014; Uzma et al., 2015) distribuidas a nivel mundial en diversos hábitats y cultivos de importancia agrícola (Marais, 2001; Decraemer & Hunt, 2006; Rashid & Azad, 2013; Subbotin et al., 2015).

Especies de *Helicotylenchus* se han encontrado en áreas donde las precipitaciones anuales son inferiores a 100 mm, puede entrar en fase de anhidrobiosis y sobrevivir por más de 8 meses en condiciones extremas (Wharton, 1986). Este fitonemátodo también se ha encontrado en suelos con pH de 3.3 – 10.6 y con porcentajes de arcilla y arena de 66% y 100% respectivamente, lo que indica que se adapta a suelos pesados, arenosos, arcillosos y orgánicos (Marais & Swart, 1999; Crow, 2017).

2.2.1 Ciclo de vida

En el cultivo de caña se evaluó el ciclo de vida de *H. dihystera* y se determinó que, de huevo al estado adulto, el fitonemátodo se tarda entre 35 – 37 días a una temperatura entre 22 – 33°C. También se ha determinado que todas las etapas del ciclo, a excepción del huevo, se desarrollan dentro de los tejidos corticales de la raíz. Esto conduce a que las paredes celulares alrededor del fitonemátodo se engruesen y se forme una pequeña mancha color marrón alrededor del punto de penetración y algunas veces desprendimiento del tejido cortical (Rao & Swarup, 1975).

2.2.2 Importancia del nematodo

Se sabe que al menos cinco especies influyen en la supresión del crecimiento y desarrollo normal de las plantas: *H. digonicus* Perry, Darling & Thorne, 1959, *H. dihystera* Cobb, 1896 Sher, 1961, *H. indicus* Siddiqi, 1963, *H. multicinctus* (Cobb, 1893) Golden, 1956 and *H. pseudorobustus* (Steiner, 1914) Golden, 1956 (Marais, 2001; Subbotin et al., 2011, 2015).

Asociadas al cultivo de piña se han reportado las siguientes especies: *H. multicinctus* (Ayala, 1961; Guerout, 1975; Babatola, 1985 y Julca, 1997), *H. pseudorobustus* (Julca, 1997), *H. erythrine* (Ayala, 1961 y Guerout, 1975) y *H. dihystera* (Redondo & Varón de Agudelo, 1991; Ko & Schmitt, 1996; Jiménez et al., 2001; Marais, 2001).

En cultivos de piña, *H. dihystera* ha sido reportado como nemátodo fitoparásito de importancia por su amplia distribución y las altas densidades poblacionales encontradas en este cultivo (Julca, Carbonel, & Bello, 2004; Daramola & Afolami, 2014; Ferreira et al.,

2014). Los daños reportados de *H. dihystra* en piña son la reducción en el peso de las raíces, brotes y hoja D, suprimiendo el desarrollo de las plantas (Ko & Schmitt, 1996).

Según Ferreira y colaboradores (2014) relacionan a *Helicotylenchus* con la marchitez de la piña, induciendo menor turgencia en hojas y clorosis en hojas más viejas. Los mismos autores en su trabajo resaltan que el parasitismo de este fitonemátodo resulta en una disminución significativa del peso del fruto y retraso de la madurez de los mismos (Ferreira et al., 2014). Por otra parte, además de afectar el sistema radical, facilitan la entrada de otros fitopatógenos (Vargas, Varón de Agudelo, & Gómez, 2002; Ravichandra, 2014).

En el estudio de Ferreira et al., (2014) en el cual evaluaron la interacción de *Helicotylenchus* spp. con la marchitez de la piña (*Dysmicoccus brevipes*), determinaron que, como respuesta a esta enfermedad, las plantas generalmente activan sus mecanismos de resistencia después de que ha ocurrido la infección. Además, cuando hay un incremento de la población del fitonemátodo a través del tiempo la interacción nematodo-planta se considera compatible. Estos procesos en conjunto, probablemente signifiquen un alto gasto de energía para las plantas y como consecuencia pueden influir negativamente en la producción.

2.2.3 Identificación

La identificación de especies de *Helicotylenchus* es un trabajo difícil debido a que muchas especies tienen caracteres diagnóstico similares y alta variabilidad intraespecífica (Fortuner, 1984). Existen diferentes claves dicotómicas y politómicas de gran utilidad propuestas por varios autores para la identificación de especies de *Helicotylenchus* (Sher, 1966; Krall, 1978; Anderson, 1979; Boag & Jairajpuri, 1985; Fotedar & Kaul, 1985; Fortuner & Quénéhervé, 1980; Fortuner, Merny, & Roux, 1981; Fortuner, 1984; Firoza & Maqbool, 1994).

Para facilitar la identificación de especies de *Helicotylenchus*, Uzma et al., (2015), propuso 16 caracteres diagnósticos informativos para la delimitación de especies dentro de este género: Hábito (posición en reposo), L (longitud del cuerpo), a (L/DMC), c (longitud de la cola/L), c' (longitud de la cola/DCA), V% (longitud de la parte anterior a la vulva), DGO (orificio de la glándula dorsal esofágica), longitud del estilete, DMC (diámetro máximo del cuerpo), DCA (diámetro del cuerpo en el ano), longitud de la cola, forma de la cabeza y número de ámulos, forma de la cola y número de ámulos, forma de la cabeza o región cefálica, forma de la cola, forma de las perillas basales, fásmidio y presencia de machos.

A nivel molecular, Subbotin et al., (2007, 2011); Bae, Szalanski, & Robbins 2009 y Brücher et al., (2019), utilizando el segmento de expansión D2-D3 del gen 28S y la región ITS del ARNr, demostraron la gran utilidad de secuenciar estas regiones del genoma para la identificación de especies de *Helicotylenchus*, como también para la construcción de las relaciones filogenéticas dentro de este género.

2.2.4 Trabajos en Colombia

Los trabajos realizados en Colombia que reportan a *H. dihystra* asociado al cultivo de piña *Ananas comosus* L. Merr son muy escasos y únicamente sobresale el de Redondo & Varón de Agudelo (1991) y el de Mesa y colaboradores (2014) que también reportaron al género *Helicotylenchus* spp. en el cultivo.

Además, los pocos trabajos con reportes de especies de *Helicotylenchus* en piña carecen de soporte morfométrico y molecular; en ese sentido, el desconocimiento de las especies de fitonemátodos asociadas al cultivo, dificultan el control de las mismas. Por tal razón, este estudio tuvo como propósito: identificar a través de análisis morfológico, morfométrico y molecular especies de *Helicotylenchus* asociadas a piña en los municipios de Pradera, Dagua, Buga, La Cumbre y Restrepo ubicados en el Valle del Cauca, Colombia.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Localización, muestreo y procesamiento de las muestras

Se colectaron muestras de suelo y raíces durante el 2018 y 2019 en los municipios de Pradera, Dagua, Buga, La Cumbre y Restrepo del departamento del Valle del Cauca, Colombia. En un área de muestreo de aproximadamente 1 hectárea (ha) por finca, se seleccionaron plantas al azar y con ayuda de un palín y cuchillo se colectaron entre 25 – 30 submuestras de suelo y raíces a una profundidad de 0 – 20 cm, que conformaron una muestra compuesta de 1 kg. Las muestras se empacaron cuidadosamente, se procesaron y analizaron en el laboratorio de Diagnóstico Vegetal de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. La Tabla 2.1 muestra información y coordenadas de los sitios muestreados muestra información de ubicación y coordenadas de los sitios muestreados.

Tabla 2.1. Ubicación geográfica de las fincas muestreadas 2018-2019

Municipio	Finca	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)
Pradera	Manantial	3° 23' 50.41"	76° 14' 7.371"	1069
	Potrerosillos	3° 22' 18.379"	76° 14' 32.967"	1042
	La Fría	3° 23' 1.133"	76° 12' 3.171"	1206
Dagua	Bella Vista	3° 39' 46.512"	76° 40' 41.235"	1017
	El Hato	3° 40' 29.723"	76° 40' 12.658"	1184
	El Piñal	3° 39' 55.462"	76° 40' 36.958"	1004
La Cumbre	Las Violetas	3° 38' 5.593"	76° 35' 7.551"	1558
	El Bosque	3° 42' 7.51"	76° 35' 50.042"	1620
	La Piedra	3° 40' 33.578"	76° 01' 0"	1395
Restrepo	La Sombra	3° 49' 23.891"	76° 30' 51.508"	1423
	La Chila	3° 51' 23.587"	76° 31' 38.067"	1573
	El Jardincito	3° 51' 59.702"	76° 28' 43.715"	1620
Buga	San Juanito 1	4° 36' 37.26"	76° 3' 14.065"	945
	San Juanito 2	4° 36' 34.387"	76° 3' 11.469"	935
	Líbano	4° 36' 29.563"	76° 3' 11.926"	952

2.3.2 Extracción de fitonemátodos de muestras de suelo

La metodología utilizada para la extracción de nemátodos de las muestras de suelo se hizo utilizando el método de agitación-decantación de Cobb (1917) modificado (S´Jacob & Bezooijen, 1977; Volcy, 1998; Ravichandra, 2014). Se midieron 100 cc del suelo y se suspendieron en uno a dos litros de agua. La suspensión resultante se agitó vigorosamente por espacio de cinco minutos. Transcurrido este tiempo, la suspensión se dejó reposar por 10 segundos y se procedió a pasarla por una columna de tamices de 10, 325 y 400 mesh. Posteriormente, el suelo contenido en los tamices de 325 y 400 se depositó sobre papel facial previamente contenido en un tamiz de decantación. Seguidamente, el tamiz de decantación con el suelo, se colocó en un plato de decantación con agua corriente y el montaje se dejó reposar por 48 horas para separar los nematodos. Transcurrido este tiempo, se recuperó la suspensión de nematodos en un volumen de 20 ml utilizando un tamiz de 400 mesh y depositándolo en tubos Falcon. Finalmente se almacenaron en nevera a 4°C para posteriormente hacer la respectiva cuantificación (S´Jacob & Bezooijen, 1977; Volcy, 1998).

2.3.3 Extracción de fitonemátodos de muestras de raíces

Para extraer los fitonemátodos de las raíces se utilizó el método de maceración-decantación de Cobb modificado (S´Jacob & Bezooijen, 1977; Volcy, 1998; Ravichandra, 2014). Inicialmente se enjuagaron para remover agregados de suelo, seguidamente se pesaron 10 gr y se licuaron de manera intermitente a baja velocidad en un volumen de 200 ml de agua corriente durante 5 segundos. Seguidamente, el macerado de raíces se pasó por una columna de tamices de 10, 325 y 400 mesh; el contenido del tamiz de 325 y 400 mesh se recuperó en un volumen de 100 ml y este fue depositado sobre el papel facial previamente ubicado en un tamiz de decantación. El tamiz de decantación con el macerado se colocó en un plato de decantación con agua corriente, con el propósito de separar los

nemátodos durante un lapso de tiempo de 48 hrs. Transcurrido este tiempo, se procedió a recuperar los nemátodos utilizando un tamiz de 400 mesh, estos se concentraron en tubos Falcon en un volumen de 20 ml y se almacenaron en nevera entre 4°C (S´Jacob & Bezooijen, 1977; Volcy, 1998).

2.3.4 Fijación de los nematodos

En tubos Eppendorf con 1 ml de agua corriente se depositaron nematodos adultos, los cuales se llevaron a baño maría a 60 °C durante 4 minutos para relajarlos (matarlos), seguidamente se colocaron a centrifugar a 13,000 rpm durante 1 min. Finalizada la centrifugación, se retiró un exceso de agua de 0.5 ml del tubo Eppendorf e inmediatamente se le agregó 0.5 ml de formalina al 2% (Rosa et al., 2014), una vez fijados se procedió a realizar preparaciones semipermanentes para realizar observaciones al microscopio y hacer las respectivas mediciones morfométricas (Uzma et al., 2015).

2.3.5 Caracteres diagnóstico considerados en la morfometría

Los caracteres diagnóstico registrados en las poblaciones analizadas fueron: longitud del cuerpo, relación a, c, c', posición de la vulva (%), orificio de glándula dorsal esofágica (DGO) desde la base de las perillas basales, longitud del estilete, forma de las perillas basales anteriormente y posteriormente, número de ámulos en la cabeza, número de ámulos de la cola, forma y longitud de la cola, ancho máximo del cuerpo, ancho máximo del cuerpo en el ano, presencia de espermateca y presencia de machos. También se hicieron observaciones morfológicas con respecto al hábito o forma del cuerpo en reposo *post-mortis*, forma de las perillas basales anteriormente y posteriormente, forma de la cola y presencia de machos (Uzma et al., 2015).

2.3.6 Análisis estadístico

Los datos de morfometría obtenidos en este trabajo y junto a otros de literatura para *Helicotylenchus* (Sher, 1961; Wouts & Yeates, 1994; Marais, 2001; Uzma et al., 2015; Subbotin et al., 2015; Tzortzakakis et al., 2017; Shokoohi et al., 2018) se sometieron a un Análisis de Componentes Principales (ACP) con el software SAS (Statistical Analysis System) con el propósito de comprender la relación de los datos obtenidos con los de referencia.

2.3.7 Análisis molecular

La extracción de ADN se hizo siguiendo el protocolo de Múnera et al., (2009) con modificaciones (Riascos-Ortiz et al., 2019). Se colocó un único nematodo en una placa portaobjeto esterilizada y se trituró con una punta de micropipeta esterilizada. Inmediatamente las partes del nematodo se depositaron en un tubo Eppendorf en un volumen de 15 microlitros (μ l) de buffer de lysis (50 mM KCl, 10 Mm Tris pH 8.0, 15 mM MgCl₂, 0.5% Triton x-100, 4.5% Tween-20, 0.09% Proteinasas K). Seguidamente el tubo se almacenó a -80°C por 15 min, transcurrido este tiempo se colocaron en un termociclador para incubarlo a 65°C durante 1 hora y 95°C por 15 minutos. Por último, el tubo se centrifugó a 16,000g por 1 minuto y almacenado a -20°C hasta ser procesada.

La región de expansión D2-D3 de la subunidad grande (LSU) del ADN ribosomal 28S fue amplificada utilizando el cebador D2A forward (5'-ACAAGTACCGTGAGGG AAAGTTG-3') y D3B reverse (5'- CCTCGGAAGG AACCAGCTACTA-3') (De Ley et al., 1999). También se amplificó la región ITS utilizando el cebador TW81 forward (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC - 3') y AB28 reverse (5'- ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT - 3') (Tanha, Subbotin, & Moens, 2003). Las condiciones de PCR para la amplificación de

la región D2-D3 e ITS fueron desnaturalización inicial de 2 min a 94°C seguido de 40 ciclos de 45 seg a 94°C, 45 seg a 55°C, 1 min a 72°C y una extensión final de 10 min a 72°C. Para la amplificación de ITS las condiciones de PCR fueron las mismas de D2A-D3B. Los productos de PCR se enviaron a secuenciar en ambas direcciones (forward y reverse) con BIONEER a Korea del Sur.

2.3.8 Análisis filogenético

Las secuencias consenso fueron editadas utilizando el software Geneious (<https://www.geneious.com>). Posteriormente, se utilizó la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST) en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) con el propósito de confirmar la identidad de las secuencias de ADN (Altschul et al, 1990). Se realizó un alineamiento múltiple utilizando Clustal W dentro de MEGA-X y usando las secuencias generadas en este estudio y otras secuencias referencia de *Helicotylenchus* obtenidas del GenBank. Se construyeron árboles filogenéticos basados en D2D3 e ITS según los criterios de Máxima Verosimilitud (ML) utilizando 1000 bootstrap utilizando el programa MEGA-X (Powers, 2018). También se hizo uso del software jModelTest v.2.2.10 para determinar el modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se ajustara a cada alineamiento basado en el criterio de información de Akaike corregido para muestras pequeñas (Posada, 2008). Como grupo externo se utilizó a *Hoplolaimus galeatus*.

2.4 Resultados

2.4.1 Identificación morfológica y morfométrica

Las trece poblaciones analizadas, procedentes de los municipios de Pradera (3), Dagua (2), La Cumbre (3), Restrepo (3) y Buga (2), fueron identificadas a través de diagnóstico

morfológico, morfométrico y molecular, las cuales todas coincidieron con *H. dihystra*, integrando estos tres análisis se obtuvo una identificación precisa de la especie.

Morfológicamente se observaron las características tipo de la especie *H. dihystra*: hábito *post-mortis* en forma de espiral, cola conoide, perillas basales aplanadas o indentadas anteriormente y redondeadas posteriormente y machos ausentes (Fortuner et al., 1981; Riascos-Ortiz et al., 2020) Figura 2.1.

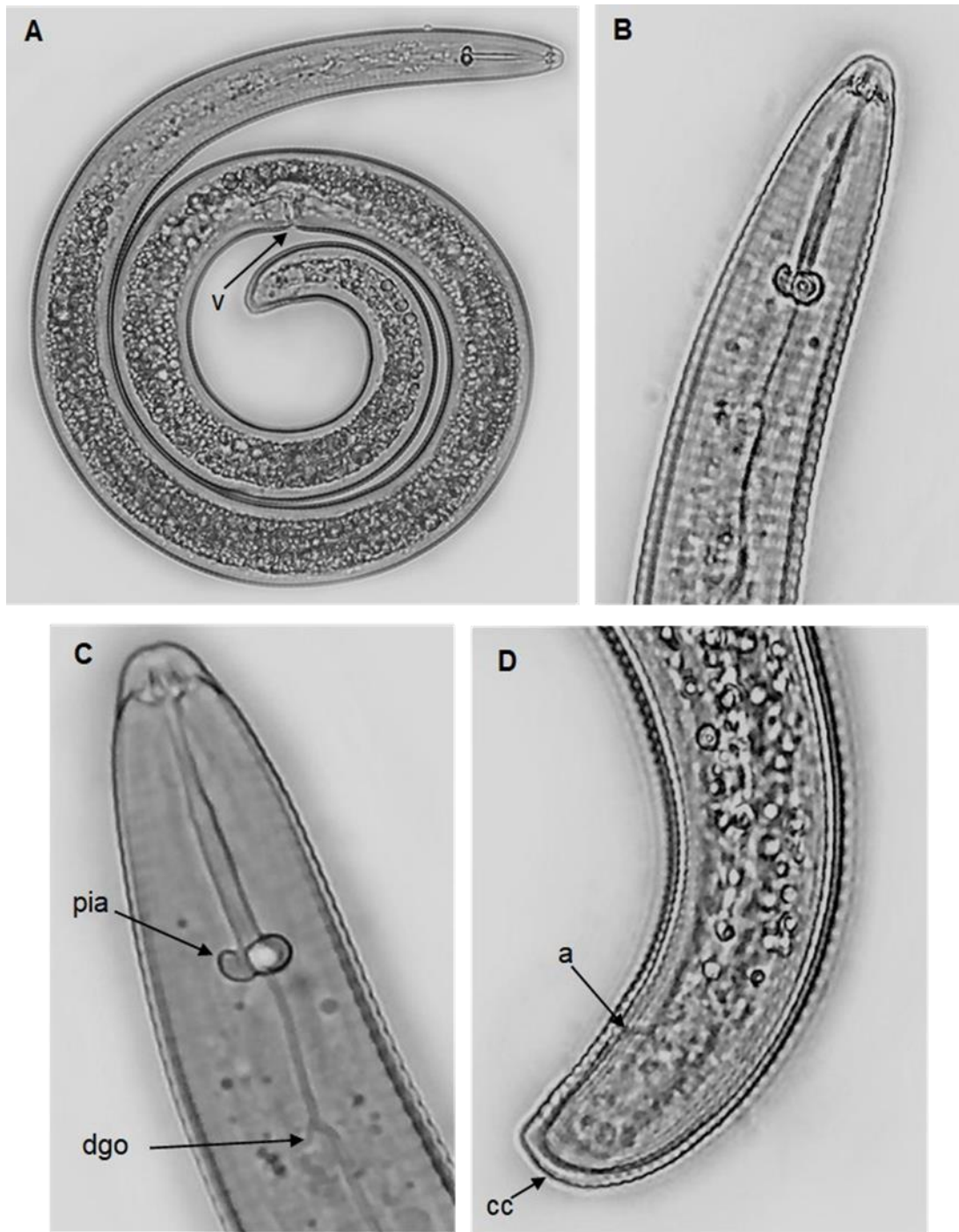


Figura 2.1. Morfología de *Helicotylenchus dihystra*. (A) hábito *post-mortis* de una hembra de *H. dihystra*, (B y C) región anterior de hembras de *H. dihystra*, (D) región posterior de *H. dihystra*. v = vulva, pia = perilla indentada anteriormente, prp = perilla redondeada posteriormente, dgo = orificio de la glándula dorsal esofágica, a = ano, cc = cola conoide. La foto A en escala de 20 μ m y B – D a 10 μ m. (Fotos tomadas por el autor).

De acuerdo con el análisis multivariado, los Componentes Principales (CP) 1, 2 y 3 presentaron valores propios mayores o igual a 1, los cuales explicaron el 84.02% de la varianza. Sin embargo, los CP1 y CP2 permitieron precisar sobre la identificación de la especie (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Valores propios y porcentaje total de la varianza acumulada para cada componente principal

Componente principal	Valores propios	Total acumulado	% total de la varianza	% total de la varianza acumulada
1	5.01099	5.01099	45.5544	45.5544
2	3.21976	8.23075	29.2705	74.825
3	1.01208	9.24283	9.20076	84.0257
4	0.919999	10.1628	8.36363	92.38
5	0.412218	10.575	3.74744	96.1368
6	0.195525	10.7706	1.7775	97.9143
7	0.146274	10.9168	1.32927	99.244
8	0.075212	10.9921	0.683745	99.9278
9	0.0071197	10.9992	0.064725	99.9925
10	0.0005891	10.9998	0.0053560	99.9979
11	0.0002333	11.00	0.0021209	100

Con el ACP se determinaron los caracteres diagnóstico discriminantes para la correcta identificación de especies para este género de nematodos fitoparásitos: diámetro del cuerpo en el ano, diámetro máximo del cuerpo, posición de la vulva, longitud total del cuerpo y longitud del estilete en el CP1; relación c, relación c' y número de ámulos en la cola en el CP2 y orificio de la glándula dorsal esofágica en el CP3 (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Correlación entre los primeros tres componentes principales y los caracteres evaluados en hembras de *Helicotylenchus* spp.

Vector	Caracter diagnostico	1	2	3	4	5
1	L	-0.3753	-0.2833	0.1134	-0.1221	-0.1151
2	a	-0.2625	-0.3323	0.3306	-0.4252	-0.0358
3	c	-0.2114	-0.4833	0.0838	-0.0829	0.1273
4	c'	0.0688	0.4527	0.3046	-0.3982	-0.3320
5	V%	0.3754	-0.2381	-0.1338	0.0503	-0.1487
6	DGO	-0.1396	0.1079	-0.6700	-0.6343	0.2956
7	Longitud del estilete	-0.3603	0.1359	0.3712	0.0393	0.3642
8	DMC	-0.3824	-0.0657	-0.2651	0.3583	-0.2409
9	DCA	-0.3934	-0.0033	-0.3192	0.1939	-0.2609
10	Longitud de la cola	-0.3063	0.3448	0.0097	-0.0944	-0.4871
11	Número de ámulos en cola	-0.2354	0.4007	0.0317	0.2398	0.5033

Nota: Los caracteres diagnóstico claves para discriminar la especie de *Helicotylenchus* se presentan en cursiva y en negrita

El nombre de las localidades de donde se extrajeron las poblaciones estudiadas se observa en la Tabla 2.4, de igual manera en esta tabla se muestran los códigos con los que se identifica cada población de la Tabla 2.5.

Tabla 2.4. Localidades de donde se obtuvieron las poblaciones

Localidad	Código
Población 1 El Bosque, La Cumbre	P1EBLC
Población 2 Las Violetas, La Cumbre	P2LVLC
Población 3 La Piedra, La Cumbre	P3LPLC
Población 4 La Chila, Restrepo	P4LCR
Población 5 La Sombra, Restrepo	P5LSR
Población 6 El Jardincito, Restrepo	P6EJR
Población 7 La Fría, Pradera	P7LFP
Población 8 Potrerillos, Pradera	P8PP
Población 9 Manantial, Pradera	P9MP
Población 10 Bella Vista, Dagua	P10BVD
Población 11 El Piñal, Dagua	P11EPD
Población 12 San Juanito, Buga	P12SJB
Población 13 Líbano, Buga	P13LB

En la Tabla 2.5 se muestran los registros morfométricos de cada carácter diagnóstico de las trece poblaciones estudiadas de *Helicotylenchus* spp. y los cuales son similares a los reportados para las poblaciones tipo y de referencia de *H. dihystra*. L, longitud total del cuerpo; a, longitud total del cuerpo dividido por el diámetro máximo del cuerpo; c, longitud total del cuerpo dividido por la longitud de la cola; c', longitud de la cola dividido por el diámetro máximo del cuerpo; V, posición de la vulva desde el extremo anterior expresada como porcentaje de la longitud del cuerpo; DGO, orificio de la glándula dorsal esofágica; LE, longitud del estilete; DCM, diámetro máximo del cuerpo; DCA, diámetro del cuerpo en el ano; LC, longitud de la cola; NACa, número de ámulos en la cabeza; NACo, número de ámulos en la cola. *Los valores se presentan en μm , media \pm desviación estándar (rango).

Tabla 2.5. Datos morfométricos de las poblaciones de *H. dihystra* en cultivo de piña estudiadas en este trabajo.

Municipio	La Cumbre		Restrepo				Pradera			Dagua		Bugá	
	P1EBLC	P2LVLC	P3LPLC	P4LCR	P5LSR	P6EJR	P7LFP	P8PP	P9MP	P10BVD	P11EPD	P12SJB	P13LB
	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
L	718.4 ± 54.2 (600.0 - 804.1)	705.2 ± 51.6 (615.1 - 774.5)	688.8 ± 70.1 (603.2 - 801.9)	715.7 ± 50.2 (653.7 - 812.2)	626.6 ± 67.3 (529.6 - 737.5)	626.6 ± 69.6 (550.0 - 772.7)	747.2 ± 86.0 (579.7 - 846.0)	784.1 ± 81.3 (674.3 - 924.7)	861.7 ± 97.2 (719.8 - 993.3)	730.0 ± 79.5 (604.4 - 869.2)	609.7 ± 36.6 (562.0 - 662.5)	680.5 ± 46.6 (569.0 - 743.3)	650.3 ± 44.9 (567.2 - 728.3)
a	28.0 ± 1.7 (26.1 - 32.1)	31.0 ± 1.5 (29.0 - 33.7)	28.0 ± 1.9 (25.6 - 31.0)	27.9 ± 1.5 (25.3 - 31.2)	27.1 ± 1.7 (25.0 - 30.9)	26.9 ± 1.3 (24.8 - 28.5)	31.0 ± 2.3 (25.7 - 34.8)	30.8 ± 2.1 (27.3 - 34.0)	33.2 ± 2.9 (28.5 - 37.9)	30.3 ± 2.5 (27.4 - 34.3)	27.1 ± 1.3 (24.9 - 29.9)	28.5 ± 1.5 (24.7 - 30.2)	26.4 ± 1.2 (23.9 - 28.4)
c	45.2 ± 3.3 (40.0 - 51.6)	49.4 ± 5.6 (44.0 - 62.6)	50.4 ± 7.1 (42.4 - 63.0)	45.8 ± 2.9 (41.6 - 50.2)	39.1 ± 4.1 (34.3 - 45.9)	42.2 ± 3.4 (36.5 - 47.2)	51.0 ± 5.8 (38.7 - 59.1)	53.6 ± 6.4 (42.7 - 63.7)	54.9 ± 4.9 (44.2 - 62.6)	48.6 ± 6.0 (36.8 - 57.8)	45.5 ± 3.8 (39.9 - 53.7)	46.8 ± 5.4 (37.4 - 55.3)	44.9 ± 3.8 (40.0 - 53.2)
c'	1.0 ± 0.0 (1.0 - 1.1)	1.0 ± 0.1 (0.8 - 1.2)	0.9 ± 0.1 (0.8 - 1.0)	1.0 ± 0.1 (0.9 - 1.1)	1.1 ± 0.1 (1.0 - 1.2)	1.1 ± 0.1 (0.9 - 1.2)	1.0 ± 0.1 (0.8 - 1.1)	0.9 ± 0.1 (0.8 - 1.1)	1.0 ± 0.1 (0.8 - 1.2)	1.0 ± 0.1 (0.9 - 1.2)	1.0 ± 0.1 (1.0 - 1.2)	1.0 ± 0.1 (0.8 - 1.2)	1.0 ± 0.1 (0.8 - 1.2)
V%	63.6 ± 1.6 (60.0 - 66.5)	65.3 ± 1.7 (62.2 - 67.4)	65.0 ± 2.1 (62.7 - 70.4)	64.6 ± 0.9 (63.1 - 66.1)	64.2 ± 1.2 (62.7 - 66.0)	64.2 ± 1.4 (61.9 - 67.1)	65.0 ± 1.4 (61.5 - 66.9)	64.7 ± 1.1 (62.7 - 66.4)	63.3 ± 2.1 (58.2 - 66.4)	64.7 ± 1.3 (62.7 - 66.7)	66.0 ± 1.2 (64.1 - 68.8)	64.9 ± 1.1 (62.9 - 66.5)	65.3 ± 1.6 (63.4 - 68.6)
DGO	15.7 ± 0.9 (14.0 - 17.0)	14.9 ± 0.8 (13.6 - 16.5)	14.8 ± 0.8 (13.7 - 16.9)	14.6 ± 0.5 (13.6 - 15.2)	15.1 ± 0.7 (14.0 - 16.5)	15.1 ± 0.7 (14.1 - 16.0)	15.1 ± 0.6 (14.4 - 16.4)	15.1 ± 1.1 (13.5 - 16.6)	15.3 ± 0.8 (14.1 - 16.9)	15.9 ± 1.1 (14.2 - 17.8)	14.7 ± 0.8 (13.5 - 16.3)	15.9 ± 1.1 (13.2 - 17.5)	15.6 ± 0.9 (13.9 - 16.9)
LE	24.4 ± 0.4 (23.7 - 25.0)	24.2 ± 0.8 (22.2 - 25.1)	24.0 ± 0.6 (23.3 - 25.3)	24.4 ± 0.9 (23.0 - 25.7)	23.9 ± 0.9 (22.5 - 25.4)	24.3 ± 0.8 (23.0 - 25.6)	24.0 ± 0.5 (23.5 - 25.2)	23.7 ± 0.7 (22.6 - 25.2)	24.9 ± 1.0 (23.1 - 26.5)	23.7 ± 0.6 (23.0 - 24.7)	22.9 ± 0.8 (21.2 - 24.3)	24.0 ± 0.6 (23.0 - 25.0)	23.7 ± 1.0 (21.9 - 25.5)
NACa	3.4 ± 0.5 (3.0 - 4.0)	3.6 ± 0.5 (3.0 - 4.0)	3.8 ± 0.4 (3.0 - 4.0)	3.7 ± 0.5 (3.0 - 4.0)	3.7 ± 0.5 (3.0 - 4.0)	3.8 ± 0.4 (3.0 - 4.0)	3.7 ± 0.5 (3.0 - 4.0)	3.9 ± 0.3 (3.0 - 4.0)	3.8 ± 0.4 (3.0 - 4.0)	3.9 ± 0.3 (3.0 - 4.0)	3.8 ± 0.4 (3.0 - 4.0)	3.9 ± 0.3 (3.0 - 4.0)	3.7 ± 0.5 (3.0 - 4.0)
NACo	10.4 ± 0.8 (9.0 - 12.0)	8.4 ± 0.9 (7.0 - 10.0)	8.8 ± 1.2 (7.0 - 11.0)	9.4 ± 0.5 (9.0 - 10.0)	9.5 ± 0.8 (8.0 - 11.0)	8.9 ± 0.9 (8.0 - 11.0)	8.4 ± 1.3 (7.0 - 10.0)	8.0 ± 1.5 (6.0 - 11.0)	8.7 ± 1.0 (7.0 - 10.0)	8.4 ± 0.8 (7.0 - 10.0)	7.3 ± 1.3 (6.0 - 10.0)	8.9 ± 1.4 (6.0 - 10.0)	7.7 ± 0.9 (6.0 - 9.0)
LC	16.1 ± 1.5 (13.5 - 17.9)	14.4 ± 1.2 (12.2 - 16.3)	13.5 ± 1.4 (11.1 - 15.8)	15.8 ± 1.1 (13.4 - 17.4)	16.1 ± 1.9 (13.6 - 19.3)	14.9 ± 1.6 (12.8 - 17.0)	14.8 ± 2.0 (10.6 - 17.3)	14.7 ± 1.4 (12.5 - 17.3)	15.7 ± 1.6 (13.3 - 19.1)	15.1 ± 1.7 (12.5 - 18.5)	13.5 ± 1.3 (11.8 - 15.1)	14.8 ± 2.2 (11.2 - 18.4)	14.7 ± 1.9 (11.4 - 18.7)
DMC	25.7 ± 1.3 (23.0 - 28.0)	22.7 ± 1.1 (20.8 - 24.6)	24.3 ± 1.7 (22.5 - 28.2)	25.6 ± 1.1 (23.8 - 28.3)	23.2 ± 1.7 (20.4 - 25.4)	23.3 ± 1.9 (20.6 - 27.3)	24.1 ± 2.0 (21.6 - 27.1)	25.4 ± 1.9 (22.6 - 28.6)	26.1 ± 1.3 (23.9 - 28.1)	24.0 ± 1.4 (21.7 - 26.0)	22.5 ± 1.2 (21.1 - 24.6)	23.8 ± 0.8 (22.9 - 25.3)	24.7 ± 0.8 (23.8 - 26.1)
DCA	15.3 ± 1.4 (13.1 - 17.3)	13.9 ± 1.3 (11.4 - 15.3)	14.6 ± 1.2 (12.8 - 16.1)	15.4 ± 1.0 (14.1 - 17.2)	14.8 ± 1.5 (12.7 - 17.2)	14.1 ± 1.1 (12.6 - 15.9)	14.9 ± 1.4 (13.4 - 18.2)	15.6 ± 1.1 (13.6 - 17.4)	15.9 ± 1.4 (14.2 - 18.5)	14.6 ± 0.9 (13.4 - 15.8)	13.3 ± 1.0 (11.8 - 14.6)	15.1 ± 1.0 (13.8 - 16.9)	15.2 ± 0.9 (13.0 - 16.3)

2.4.2 Identificación molecular

Las secuencias consenso del segmento de expansión D2-D3, obtenidas para las poblaciones de los municipios de Pradera, Dagua, La Cumbre, Restrepo y Buga, mostraron alta afinidad (99% de similitud) con otras secuencias de referencia de *H. dihystra* de origen y hospederos diferentes: KX822142 en mora larga taiwanesa *Morus macroua* (China); AB933469 y AB933471 en caña de azúcar *Saccharum officinarum* (Japón), KF486503 en plátano *Musa paradisiaca* (China); HM014260 en guayaba *Psidium* sp. (South África); HM014257 en bromelias (USA), HM014258 en *Ficus* sp. (USA) y MN445997 en *Mangifera indica* (Myanmar).

De igual manera, las secuencias consenso de ITS mostraron alta afinidad (99% de similitud), con las secuencias de referencia para *H. dihystra*: MG437304 en caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) de China; MN445996 en *Musa* sp. de Myanmar; FJ440620 en *Musa* sp. de Malasia y KX822142 en mora larga taiwanesa (*Morus macroua*) de China.

De acuerdo con análisis filogenético de Máxima Verosimilitud (ML), basado en la región de expansión D2-D3, se observó que todas las secuencias obtenidas se agruparon estrechamente con las secuencias de referencia de *H. dihystra*, con un bootstrap de 97% (Figura 2.2).

De igual manera, el análisis filogenético de ML de la región ITS, mostró que todas las secuencias de este estudio se agruparon en un mismo clado con secuencias de referencia de *H. dihystra* con un bootstrap de 96% (Figura 2.3).

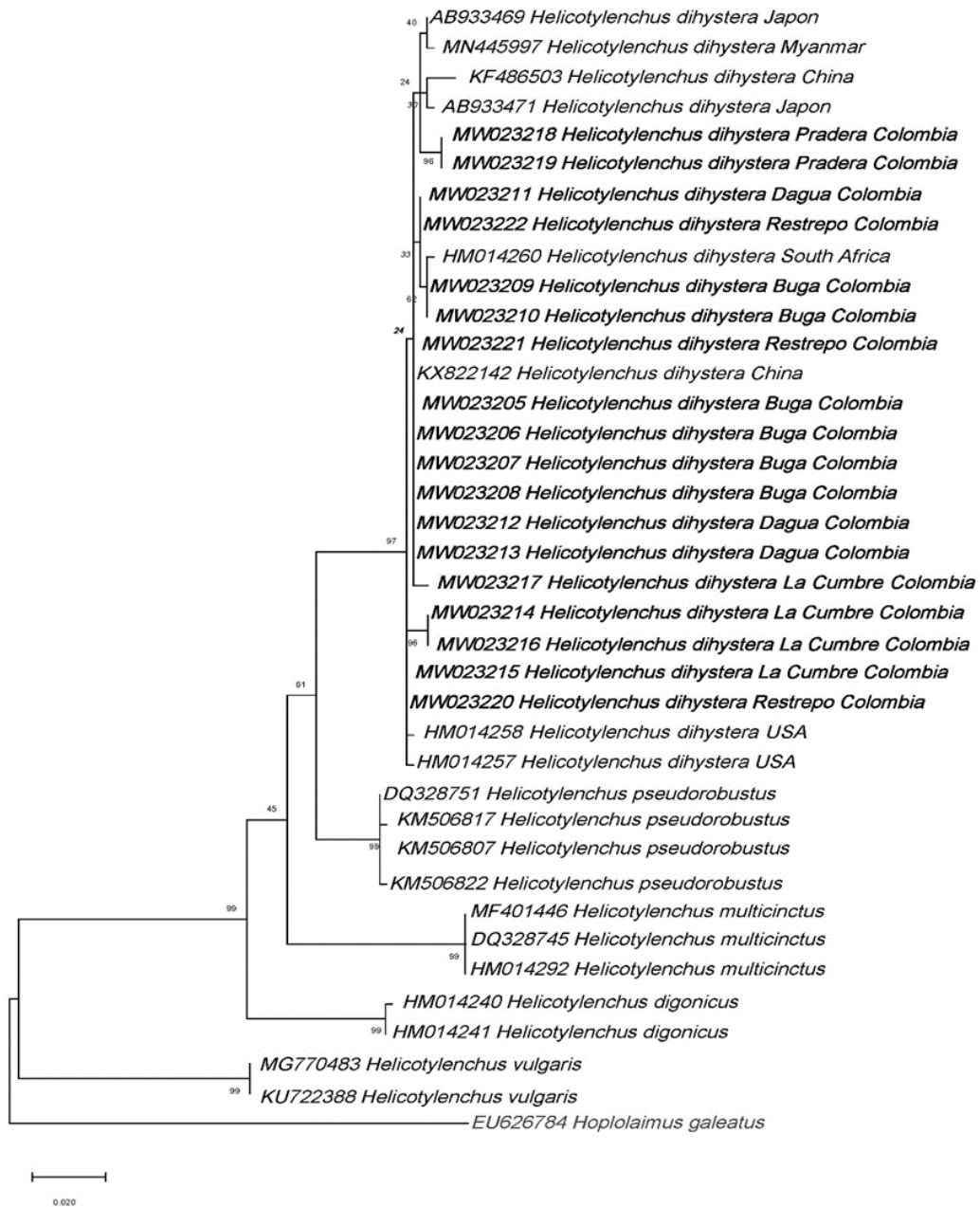


Figura 2.2. Árbol filogenético de ML de *Helicotylenchus dihystra* de la región de expansión D2-D3 del gen 28S del ADN ribosomal y 1000 bootstrap con el modelo de sustitución nucleotídica HKY + I + G. El grupo externo es *Hoplolaimus galeatus* se observa en color gris. Las secuencias generadas en este trabajo se muestran en negrita. Los valores representan la probabilidad posterior y la escala representa el número de sustituciones por sitio.

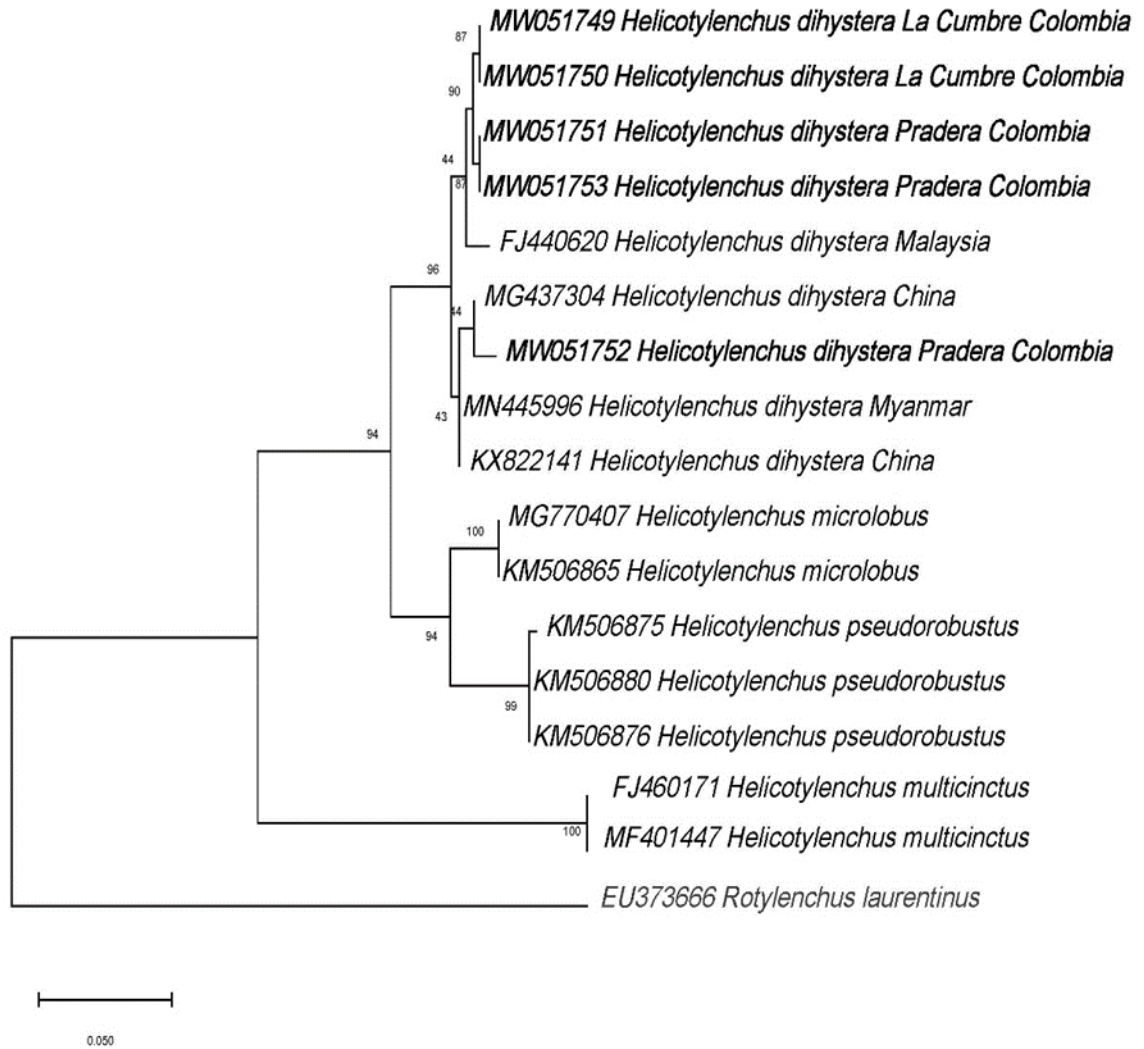


Figura 2.3. Árbol filogenético de ML de *Helicotylenchus dihystra* basado en la región ITS del ADN ribosomal y 1000 bootstrap y bajo el modelo de sustitución de nucleótidos F81 + I + G. El grupo externo es *Rotylenchus laurentinus* y se representa de color gris. Las secuencias generadas en este trabajo se muestran en negrita. Los valores de los representan la probabilidad posterior y la escala representa el número de sustituciones por sitio.

2.5 Discusión

Las poblaciones de nematodos obtenidas en este estudio asociadas al cultivo de piña fueron identificadas como *H. dihystra*. La identificación de estas poblaciones fue soportada mediante análisis morfológico, morfométrico, molecular y filogenético.

Las características morfológicas y datos morfométricos de las poblaciones de este estudio fueron similares a las de la población tipo y de referencia de *H. dihystra* (Fortuner & Quénéhervé, 1980; Uzma et al., 2015; Brücher et al., 2019 y Riascos-Ortiz et al., 2020). Las poblaciones presentaron las características del espécimen tipo: especímenes en posición de reposo en espiral, orificio de la glándula dorsal esofágica (DGO) ubicado un poco más que la mitad de la longitud del estilete de la base del mismo, glándula esofágica traslapada ventralmente con el intestino y región labial continua (Sher, 1966; Fortuner, 1984; Uzma et al., 2015). Además, los datos de las poblaciones de este trabajo coincidieron con claves dicotómicas propuestas para esta especie (Sher, 1966; Krall, 1978; Anderson, 1979; Fortuner, 1979, 1984; Fortuner, Merny, & Roux, 1981; Fotedar & Kaul, 1985; Boag & Jairajpuri, 1985).

Basado en el ACP, las poblaciones identificadas como *H. dihystra* mediante datos morfométricos son distintas entre sí, sugiriendo una amplia diversidad al interior de la especie. Para las poblaciones estudiadas, los caracteres más variables al interior de la especie fueron DCA, DMC, V, L, c, c', número de ámulos en la cola y DGO. Según la investigación de Fortuner (1979) en la que crió una hembra (según Fortuner, *H. dihystra*) en una maceta, determinó que la variabilidad es mucho mayor cuando las especies se reproducen por partenogénesis, la ausencia de machos es otro indicativo referencia en taxonomía para *H. dihystra* y *H. pseudorobustus*. Según Siddiqi (1995) y Hunt et al.,

(2018) muchas de las especies del género *Helicotylenchus* que se han encontrado en suelos agrícolas son partenogenéticas ya que los machos son muy escasos o están ausentes. En la agricultura son múltiples los cultivos que se explotan, por ende, el tipo de hospedero es otro factor importante que influye en la variabilidad de los caracteres diagnósticos utilizados para taxonomía (Fortuner & Quénéhervé, 1980).

Las secuencias de las regiones D2-D3 e ITS generadas en este estudio tuvieron alta afinidad con las secuencias referencias publicadas para *H. dihystra*. Filogenéticamente, las poblaciones identificadas como *H. dihystra* se ubicaron en un mismo clado con secuencias de literatura de la misma especie y se separó de otras especies de *Helicotylenchus* previamente reportadas para el cultivo de piña como *H. multicinctus* y *H. pseudorobustus* (Babatola, 1985; Ayala, 1961; Guerout, 1975; Julca, 1997).

La identificación generada con los análisis moleculares y filogenético fue congruente con la identificación previa mediante descripción morfológica y morfométrica, permitiendo obtener una identificación acertada y con alto nivel de precisión de la especie *H. dihystra*.

La identificación de *H. dihystra* asociado a piña en Colombia coincide con otros estudios a nivel mundial, en Brasil (Zen & Choairy, 1997; Mendes et al., 2007; Ferreira et al., 2014; Santos, 2016), Cuba (Hernandez, 1998), Hawái (Ko et al., 1995; Ko & Schmitt, 1996), India (Rama & Dasgupta, 1987), Nigeria (Daramola & Afolami, 2014), Perú (Julca, 1997), Puerto Rico (Ayala, 1961), South África (Keetch, 1982), Venezuela (Jiménez et al., 2001). En Colombia el trabajo que ha reportado a *H. dihystra* en piña es el de Redondo & Varón de Agudelo (1991) y Mesa y colaboradores (2014) que reportaron a *Helicotylenchus* spp.

La amplia distribución de *H. dihystra* para el departamento del Valle del Cauca probablemente se debe a que los productores no tienen precaución al usar maquinaria agrícola, herramientas (incluidos su vestimenta) al realizar labores agrícolas en los cultivos, lo cual son un medio de disseminación cuando cambian de cultivo y/o área de trabajo

(Cardona-Piedrahita & Guzmán-Piedrahita, 2013). Por otra parte, los sistemas de riego, drenajes, lluvias e inundaciones también son mecanismos importantes de diseminación (Agrios, 2005) En su trabajo Daramola et al., (2014) sugiere que los productores deben evitar la propagación de fitonemátodos sembrando semilla de calidad para evitar la diseminación de estos organismos.

Este es el primer reporte de *H. dihystra* en cultivo de piña en cinco municipios del Valle del Cauca, Colombia que integra observaciones morfológicas, análisis morfométricos y moleculares; a nivel mundial no hay reportes de este fitonemátodo con taxonomía integrativa en este cultivo, por lo tanto, también es el primer reporte para piña. La información de este trabajo fomenta el conocimiento sobre los nematodos fitoparásitos de Colombia, además, el adecuado reconocimiento es fundamental para considerar diferentes estrategias de manejo y prevenir o disminuir su diseminación a otras áreas o cultivos (Ahmed et al., 2016; Brücher et al., 2019).

2.6 Conclusiones

Las técnicas utilizadas para la caracterización permitieron identificar con certeza a *Helicotylenchus dihystera* asociado a piña en el Valle del Cauca, Colombia.

Este trabajo es el primer reporte con descripción morfológica, morfométrica y molecular de *Helicotylenchus dihystera* en el cultivo de piña en Colombia y a nivel mundial.

Filogenéticamente con ambas regiones, D2-D3 e ITS, la especie *H. dihystera* se agrupó en un mismo clado con secuencias de la misma especie y se separó claramente de las demás.

La identificación de la especie permitirá desarrollar investigaciones relacionadas con el parasitismo en el cultivo de piña.

2.7 Bibliografía

- Agrios, G. (2005). Plant pathology: Fifth edition. In Plant Pathology: Fifth Edition. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-02037-6>
- Ahmed, M., Sapp, M., Prior, T., Karssen, G., & Back, M. (2016). Technological advancements and their importance for nematode identification. *SOIL*, 3(2), 257–270. <https://doi.org/10.11114/aef.v3i2.1288>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 215, pp. 403–410. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Anderson, R. V. (1979). A supplemental key to species of *Helicotylenchus* Steiner, 1945 (Nematoda: Hoplolaimidae) described since 1972 and a description of *H. oscephalus* n.sp. *Canadian Journal of Zoology*, 57(2), 337–342. <https://doi.org/10.1139/z79-038>
- Ayala, A. (1961). An analysis of the quantitative and qualitative composition of the nematode population in pineapple fields in Puerto Rico. *Journal of Agriculture of University of Puerto Rico*, 45, 265–299.
- Babatola, J. O. (1985). Diseases and pests of fruits and their control. In Proc. Ntl. Fruit Production Workshop, FACU-NIHORT, Ibadan, Nigeria (pp. 120-132).
- Bae, C. H., Szalanski, L., & Robbins, R. T. (2009). Phylogenetic Analysis of the Hoplolaiminae Inferred from Combined D2 and D3 Expansion Segments of 28S rDNA. *Journal of Nematology*, 41(1), 28–34. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3365300&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Boag, B., & Jairajpuri, S. (1985). *Helicotylenchus scoticus* n. sp. and a conspectus of the genus *Helicotylenchus* (Tylenchida: Nematoda). *Sistematic Parasitology*, 47–58.
- Brücher, E., Vuletic, E., Guerra, F., Rossi, R., Plazas, M., Guerra, G., Doucet, M. (2019). Characterization of a population of *Helicotylenchus dihystra* (Cobb, 1893) Sher, 1961, parasitizing maize roots, in Southern Córdoba, Argentina. *Nematropica*, (September), 10.

- Cardona-Piedrahita, L. F., & Guzmán-Piedrahita, Ó. A. (2013). Mecanismos de diseminación de nematodos fitoparásitos en plátano (*Musa acuminata* Simmonds) grupo AAB, cultivariedad Dominico hartón. *Agronomía*, 21(1), 26–36.
- Cobb, N. A. (1917). Notes on Nemas. *Contributions to a Science of Nematology*
- Crow, W. T. (2017). Spiral Nematode *Helicotylenchus* spp. (Nematoda: Tylenchida: Hoplolaimidae). University of Florida, Entomology and Nematology Department, 1-4. Retrieved from <https://edis.ifas.ufl.edu>
- Cuadra Q. P. (2016). Identificación de fitoparásitos en raíces del cultivo de piña *Ananas comosus* l. var. roja trujillana en el valle de santa catalina La Libertad. Universidad Nacional de Trujillo.
- Daramola, F., & Afolami, S. (2014). Studies on the distribution of plant-parasitic nematodes associated with pineapple in Delta, Imo and Cross River states of Nigeria. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 8(7), 248–256.
- Daramola, F. Y., Afolami, S. O., Idowu, A. A., & Nwanguma, E. I. (2013). Studies on the occurrence and distribution of plant-parasitic nematodes in some pineapple-producing states in Nigeria. *Asian Journal of Crop Science*, Vol. 5, pp. 190–199. <https://doi.org/10.3923/ajcs.2013.190.199>
- De Ley, P., Félix, M., Frisse, L., Nadler, S., Sternberg, P., & Thomas, K. (1999). Molecular and morphological characterisation of two reproductively isolated species with mirror- image anatomy (Nematoda: Cephalobidae). *Nematology*, 1(6), 591–612. <https://doi.org/10.1163/156854199508559>
- Decraemer, W. & Hunt, D.J. (2006). Structure and classification. In: Perry, R.N. & Mones, M. (Eds.). *Plant Nematology*. CABI Publishing, Wallingford, UK, 3-32 pp.
- Ferreira, T., Souza, R., Silva, W., Ferreira, K., & Torres, P. (2014). Interaction of *Pratylenchus brachyurus* and *Helicotylenchus* sp. with mealybug wilt of pineapple in microplots. *Nematropica*, 44(2), 181–189.
- Firoza, K., & Maqbool, M. A. (1994). A diagnostic compendium of the genus *Helicotylenchus* Steiner, 1945 (Nematoda: Hoplolaimidae). *Pakistan Journal of Nematology*, 12, 11-50.
- Fortuner, R. (1979). Morphometrical variability in *Helicotylenchus* Steiner, 1945. I. The progeny of a single female. *Revue de Nématologie*, 2(2), 197–202.
- Fortuner, R. (1984). Morphometrical variability in *Helicotylenchus* Steiner, 1945. VI: Value of the characters used for specific identification. *Revue de Nématologie*, 7(3), 245– 264.

- Fortuner, R., & Quénéhervé, P. (1980). Morphometrical variability in *Helicotylenchus* Steiner, 1945. 2: Influence of the host on *H. dihystra* (Cobb, 1893) Sher, 1961. *Revue Nématologie*, 3(1979), 291–296.
- Fortuner, R., Merny, G., & Roux, C. (1981). Morphometrical variability in *Helicotylenchus* Steiner, 1945. 3: Observations on African populations of *Helicotylenchus dihystra* and considerations on related species. *Revue de Nématologie*, 4(2), 235–260.
- Fotedar, D., & Kaul, V. (1985). A revised key to the species of genus *Helicotylenchus* Steiner, 1945 (Nematoda: Rotylenchoidinae). *Indian Journal of Nematology*, 15(2), 138–147.
- Guerout, R. (1975). Nematodes of pineapple: A review. *PANS Pest Articles and News Summaries*, 21(2), 123–140. <https://doi.org/10.1080/09670877509411384>
- Hernández, H. R. (1998). Los nematodos parásitos de la piña. Opciones para su manejo. *Institución de Investigaciones En Fruticultura Tropical*, 10(3005), 1–30. Retrieved from <http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/5007/cuf0122s.pdf>
- Hunt, D. J., Palomares-Rius, J. E., & Manzanilla-López, R. H. (2018). Identification, morphology and biology of plant parasitic nematodes. In *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture: 3rd Edition* (3rd ed., pp. 11–52). <https://doi.org/10.1079/9780851997278.0011>
- Jiménez, N., Crozzoli, R., Petit, P., & Greco, N. (2001). Nematodos fitoparásitos asociados con el cultivo de la piña, *Ananas comosus*, en los estados de Lara y Trujillo, Venezuela. *Nematología Mediterránea*, 29, 13–17.
- Julca, A. (1997). Nematodos asociados al cultivo de piña (*Ananas comosus*) ‘Samba de Chanchamayo’ y su relación con los componentes de producción y calidad. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Julca, A., Carbonel, E., & Bello, S. (2004). Correlación entre población de fitonemátodos y componentes de producción y calidad de piña (*Ananas comosus* L. Merr) “Samba” en Chanchamayo, Perú. (October), 115–118.
- Kashi, L., & Karegar, A. (2013). Some species of *Helicotylenchus* (Nematoda: Hoplolaimidae) from Iran. *Iran Journal Plant Pathology*, 49(3), 95–97.
- Keetch, D. P. (1982). Nematode pests of pineapple. *Nematode pests of pineapple.*, 19-29
- Ko, M. P., & Schmitt, D. P. (1996). Changes in plant-parasitic nematode populations in pineapple fields following inter-cycle cover crops. *Journal of Nematology*, 28(4), 546–556. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2619719&tool=pmcentrez &rendertype=abstract>

- Ko, M. P., Bernard, E. C., Schmitt, D. P., & Sipes, B. S. (1995). Occurrence of Pasteuria-like Organisms on selected plant-parasitic nematodes of pineapple in the Hawaiian Islands. *Journal of Nematology*, 27(3), 395–408.
- Krall, E. L. (1978). Root-parasitic nematodes. Family Hoplolaimidae. (Keys to the nematodes of plants, soil and insects, No. 5). Academy of Sciences of the USSR, Leningrad, Nauka Publishers, Leningrad, 580 pp.
- Marais, M. (2001). A monograph of the genus *Helicotylenchus* Steiner, 1945 (Nemata: Hoplolaimidae) (Stellenbosch University; Vol. 11). Retrieved from <http://hdl.handle.net/10019.1/20988>
- Marais, M., & Swart, A. (1999). Plant nematodes in the Lottering Plantation, Eastern Cape Province. *Southern African Forestry Journal*, 186, 18–21. <https://doi.org/10.1080/10295925.1999.9631245>
- Mendes, C., Araújo, E., Oliveira, E., Soares, E., & Lacerda, J. (2007). Plantas antagônicas e alqueive sobre a dinâmica do abacaxizeiro cv. pérola. *Tecnologia & Ciência Agropecuária*, 1, 43–50.
- Mesa, N. C., Gómez, E. D., Huertas, C. A., Mena, Y. M., García, Y., Imbachi, K. (2014). Programa de manejo fitosanitario en piña en el departamento del Valle del Cauca. Universidad de Colombia, Sede Palmira pp 12-47
- Múnera, G. E., Bert, W., & Decraemer, W. (2009). Morphological and molecular characterisation of *Pratylenchus araucensis* n. sp. (Pratylenchidae), a root-lesion nematode associated with Musa plants in Colombia. *Nematology*, 11(6), 799–813. <https://doi.org/10.1163/156854109X415524>
- Palomares-Rius, J. E., Cantalapiedra-Navarrete, C., Archidona-Yuste, A., Vovlas, N., Tzortzakakis, E. A., & Castillo, P. (2018). Molecular and morphological characterization of the spiral nematode *Helicotylenchus oleae* Inserra, Vovlas & Golden, 1979 (Nematoda: Hoplolaimidae) in the Mediterranean Basin. *European Journal of Plant Pathology*, 150(4), 881–891. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1330-6>
- Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1253–1256. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>
- Powers, T., Harris, T., Higgins, R., Mullin, P., & Powers, K. (2018). Discovery and identification of Meloidogyne species using COI DNA barcoding. *Journal of Nematology*, 50(3), 399–412. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2018-029>
- Rama, K., & Dasgupta, M. K. (1987). Population ecology and community structure of plant parasitic nematodes associated with ginger in West Bengal. *Indian Journal of Nematology*, 28(1), 10–14.

- Rao, V., & Swarup, G. (1975). Studies on the life history of *Helicotylenchus dihystera* and on the histopathological of infested sugarcane root. *Indian Journal of Nematology*, 5, 56–61. <https://doi.org/10.3181/00379727-24-3559>
- Rashid, A., & Azad, S. A. (2013). Studies on the pathogenicity of *Helicotylenchus dihystera* on *Celosia cristata*. *Indian Journal*, 4(1), 153–154.
- Ravichandra, N. G. (2014). Horticultural Nematology. Department of Plant Pathology, University of Agricultural Science, Bangalore, Karnataka India. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1841-8>
- Redondo, E., & Varón de Agudelo, F. (1991). Efecto de los nematodos en el cultivo de la piña *Ananas comosus* L. (Merr). *Fitopatología Colombiana*, 16, 180-192. Retrieved from http://sipco.ica.gov.co:8080/bitstream/123456789/16756/1/Redondo_Varón_1991.pdf
- Riascos-Ortiz, D., Mosquera-Espinosa, A., Varón de Agudelo, F., Gonçalves, C., & Muñoz-Florez, J. (2020). An integrative approach to the study of *Helicotylenchus* (Nematoda: Hoplolaimidae) Colombian and Brazilian populations associated with *Musa* crops. *Journal of Nematology*, 52, 1–19. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2020-054>
- Riascos-Ortiz, D., Mosquera-Espinosa, A., Varón de Agudelo, F., Gonçalves de Oliveira, C. M., & Muñoz-Flórez, J. (2019). Morpho-molecular characterization of Colombian and Brazilian populations of *Rotylenchulus* associated with *Musa* spp. *Journal of Nematology*, 51. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2019-047>
- Rosa, J. M. O., de Oliveira, S. A., Jordão, A. L., Siviero, A., & de Oliveira, C. M. G. (2014). Nematoides fitoparasitas associados à mandioca na Amazônia Brasileira. *Acta Amazonica*, 44(2), 271–277. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672014000200013>
- S'Jacob, J. J., & Van Bezooijen, J. (1977). A manual for practical work in nematology. Wageningen, The Netherlands, Wageningen Agricultural University, 21-23.
- Santos, R. S. (2016). Nematoides associados a cinco fruteiras em Rondônia, RO. *Brazilian Journal of Agriculture - Revista de Agricultura*, 91(1), 101. <https://doi.org/10.37856/bja.v91i1.376>
- Sher, S. (1966). Revision of the Hoplolaiminae (Nematoda) VI. *Helicotylenchus* Steiner, 1945. *Nematologica*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Sher, S. A. (1961). Revision of the hoplolaiminae (Nematoda) I. Classification of nominal genera and nominal species. *Nematologica*, 6(2), 155–169. <https://doi.org/10.1163/187529261X00414>

- Shokoohi, E., Iranpour, F., Swart, A., Fourie, H., & Panahi, H. (2018). Morphological and molecular characters of three Ditylenchus species from Iran. *Tropical Zoology*, 31(4), 161–176. <https://doi.org/10.1080/03946975.2018.1482700>
- Siddiqi, M. R. (1995). Nematodes of tropical rainforests. 6. Ten new species of Rotylenchoidinae. *Afro-Asian Journal of Nematology*, 5(2), 186-197.
- Subbotin, S. A., Sturhan, D., Vovlas, N., Castillo, P., Tambe, J. T., Moens, M., & Baldwin, J. G. (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(3), 881–890. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.09.019>
- Subbotin, S. A., Vovlas, N., Yeates, G. W., Hallmann, J., Kiewnick, S., Chizhov, V. N., Castillo, P. (2015). Morphological and molecular characterisation of *Helicotylenchus pseudorobustus* (Steiner, 1914) Golden, 1956 and related species (Tylenchida: Hoplolaimidae) with a phylogeny of the genus. *Nematology*, 17(1), 27–52. <https://doi.org/10.1163/15685411-00002850>
- 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. <https://doi.org/10.1163/138855410X520936>
- Tanha Maafi, Z., Subbotin, S. A., & 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. <https://doi.org/10.1163/156854102765216731>
- Tzortzakakis, E. A., Cantalapiedra-Navarrete, C., Castillo, P., Palomares-Rius, J. E., & Archidona-Yuste, A. (2017). Morphological & molecular identification of *Longidorus euonymus* & *Helicotylenchus multincinctus* from the rhizosphere of grapevine & banana in Greece. *Journal of Nematology*, 49(3), 233–235. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2017-068>
- 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. <https://doi.org/10.18681/2015.v33.i02.p01201507310001>
- Vargas, Z., Varón de Agudelo, F., & Gómez, E. (2002). Nematodos asociados al tomate de árbol *Solanum betaceum* en el Valle del Cauca. *Fitopatología Colombiana*, 26, 8. Retrieved from https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/17664/42220_45977.pdf?sequence=1&isAllowed=y

-
- Volcy, C. (1998). Nematodos. Tomo 2. Diversidad y parasitismo en plantas. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín pp 43-58.
- Wharton, D. (1986). A Functional Biology of Nematodes. University of Otago, Journal of the Royal Society of New Zealand (1st ed., Vol. 16). <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8516-9>
- Wouts, W. M., & Yeates, G. W. (1994). *Helicotylenchus* species (Nematoda: Tylenchida) from native vegetation and undisturbed soils in New Zealand. New Zealand Journal of Zoology, 21(2), 213–224. <https://doi.org/10.1080/03014223.1994.9517988>
- Zen, A., & Choairy, S. (1997). Identificação de namatóides em abacaxizeiro no município de Mar, Paraíba. Ecosistema, 40.

3. Capítulo sobre la identificación morfológica, morfométrica y molecular de *Rotylenchulus reniformis* en piña

Resumen

En este estudio se evaluó una población de *Rotylenchulus*, se colectó en un cultivo de piña en el municipio de Buga departamento del Valle del Cauca, Colombia. La población se identificó con taxonomía integrativa que incluía identificación morfológica, análisis morfométrico y molecular. Los 16 caracteres diagnóstico evaluados en este trabajo fueron: L, a, b', c, c', DGO, V (%), longitud del estilete, longitud de la faringe, poro excretor, diámetro máximo del cuerpo, diámetro del cuerpo en el ano, altura de la región labial, ancho de la región labial, longitud de la cola y longitud hialina de la cola (h). De la población analizada se generaron secuencias de la región D2-D3 del gen 28S del ADN ribosomal. Los datos morfométricos de la población estudiada en este trabajo, fueron similares a los reportados en la literatura para *Rotylenchulus reniformis*. Las secuencias de la región D2-D3 del ADN ribosomal mostraron alta afinidad (99% de similitud) con las secuencias de referencia de *R. reniformis* previamente publicadas. El análisis filogenético de Máxima Verosimilitud (ML) mostró que la población de *R. reniformis* de este trabajo se agruparon en un mismo clado con poblaciones de referencia. El mismo análisis de Máxima Verosimilitud permitió agrupar claramente la población de *R. reniformis* tipo A con otras poblaciones de literatura y permitió observar una clara separación de *R. reniformis* tipo B. Este es el primer reporte en Colombia de *R. reniformis* tipo A asociado al cultivo de piña con soporte morfológico, morfométrico y molecular.

Palabras clave: Caracteres diagnóstico, D2-D3, *Rotylenchulus*, tipo A, piña

Abstract

The population of *Rotylenchulus*, presented in this section, was collected in pineapple crops in the municipality of Buga, department of Valle del Cauca, Colombia. The population was identified with integrative taxonomy that included morphological diagnostic, morphometric, and molecular analysis. The 16 characters diagnostic considered in this work were: L, a, b, c, c, DGO, V (%), stylet length, pharynx length, excretory pore, maximum body diameter, body diameter at the anus, height of the lip region, width of the lip region, tail length and hyaline tail length (h). The sequences from the D2-D3 region of the 28S gene of ribosomal DNA were generated from the analyzed population. The morphological data of the population studied in this work were similar to those reported in the literature for *Rotylenchulus reniformis*. The sequences of the D2-D3 region of ribosomal DNA showed high affinity (99% similarity) with the *R. reniformis* reference sequences. The phylogenetic analysis of Maximum Likelihood (ML) showed that the population of *R. reniformis* of this work was grouped into the same clade with reference populations. The same analysis of maximum Likelihood allowed to group the population of *R. reniformis* type A with other populations reviewed in the literature. Additionally, the ML allowed observing a clear separation of *R. reniformis* type B. This is the first report in Colombia of *R. reniformis* type A associated with pineapple crop using morphological, morphometric, and molecular support.

Keywords: Diagnostic characters, D2-D3, *Rotylenchulus*, type A, pineapple

3.1 Introducción

El fitonemátodo *Rotylenchulus reniformis* (Linford & Oliveira, 1940), llamado nematodo reniforme debido a su peculiar forma de riñón de las hembras maduras, fue observado por primera vez en 1938 por Francis Yap (un técnico del Instituto de Investigación de piña en Hawái), en raíces de caupí (*Vigna sinensis*) cultivado en un campo de piña (*Ananas comosus* L. Merr) en la Isla Oahu en Hawái, Estados Unidos y pocos días después fue encontrado en raíces de piña (Linford and Oliveira, 1940) y en 1940 el género fue descrito como una especie nueva por los investigadores Linford y Oliveira (Ayala, 1961).

Rotylenchulus es un fitonemátodo semi-endoparasito sedentario cuyo estado infectivo son las hembras en estado juvenil J4. Las hembras ingresan en la raíz, penetran el córtex y causan el daño en la planta debido a que establecen un sitio permanente de alimentación que les provee alimento durante todo su ciclo de vida. Las hembras introducen la región anterior de su cuerpo en la raíz, mientras que la parte posterior permanece en la superficie y estas se hinchan a medida que van alcanzando su madurez (Wang, 2007). El nematodo *R. reniformis* está ampliamente distribuido en zonas tropicales, subtropicales y templadas cálidas en América del Norte y del Sur, El Caribe, África, Sur de Europa, Oriente Medio, Asia, Australia y El Pacífico (Ayala & Román, 1964; Sipes & Chinnasri, 2018).

Este nematodo ha sido reportado como un fitoparásito con graves daños al cultivo de piña (Sipes & Chinnasri, 2018). En Hawái y Filipinas ha sido reportado como el principal problema en este cultivo (Rohrbach & Apt, 1986; Davide, 1988), también se ha reportado su importancia en otros países como Puerto Rico, Tailandia, Australia y México (Sipes & Chinnasri, 2018).

Actualmente en Colombia la información sobre *Rotylenchulus* en el cultivo de piña es poca, desconociéndose específicamente la (s) especie (s) de este nematodo asociadas a este cultivo. Es por ello que en este trabajo se enfocó en identificar morfológica, morfométrica y molecularmente las especies de *Rotylenchulus* asociadas a piña y la filogenia del fitonemátodo. Esto permitirá tener información actualizada y considerar medidas de control eficaces que eviten su diseminación e impactos negativos sobre la producción del cultivo.

3.2 Revisión de literatura

En el género *Rotylenchulus* se han reportado 10 especies válidas: *R. anamictus*, *R. borealis*, *R. brevitubulus*, *R. clavicaudatus*, *R. leptus*, *R. macrodoratus*, *R. macrosoma*, *R. macrosomoides*, *R. parvus*, *R. reniformis* y *R. sacchari* (Robinson et al., 1997; Van den Berg et al., 2016; Van den Berg, Marais & Swart, 2017). De las especies mencionadas anteriormente, la de mayor importancia es *R. reniformis*, el cual es un fitonemátodo semi-endoparásito sedentario que afecta cultivos en zonas tropicales y subtropicales (Robinson et al., 1997). Se ha reportado que este fitonemátodo ataca a más de 300 especies de plantas, entre ellas la piña (Robinson et al., 1997; Jones et al., 2013; Ravichandra, 2014). Varios investigadores reportan a *R. reniformis* como uno de los principales nematodos en este frutal (Guerout, 1975; Rohrbach & Apt, 1986; Py et al., 1987; Jiménez et al., 2001; Sipes et al., 2005; Sipes & Chinnasri, 2018; Daramola et al., 2013; Rabie, 2017), aunque en Sur África también se ha reportado a *R. parvus* por estar asociado con piña, sin embargo, su importancia económica en el cultivo aún se desconoce (Keetch, 1982).

3.2.1 Sintomatología

Los síntomas causados por *R. reniformis* en cultivos de piña incluyen una disminución en la erección de las hojas, las cuales se tornan de color rojizo y presentan disminución en el

crecimiento. Estos síntomas a nivel foliar son parecidos a los causados por estrés de humedad y nutrientes. A nivel edáfico ocurre una inhibición en la formación de raíces secundarias, lo cual conlleva a que la planta tenga un sistema radical poco desarrollado.

Cuando las infestaciones de *R. reniformis* son severas puede haber colapso y muerte de la planta si las poblaciones son superiores a 600 nematodos/250 cc de suelo (Sipes & Schimitt, 2000). Por otra parte, la planta forma menos retoños y si estos florecen sus frutos pueden tener maduración prematura o tardía. (Sipes et al., 2005; Sipes & Chinnasri, 2018). Otro daño observado es la disminución de la longitud de la hoja D (Julca-Otiniano, Carbonell & Bello- Amez, 2005). Según Sipes & Schmitt (2000), la altura de la hoja D y de la planta, están altamente correlacionadas con el peso final del fruto.

Cabe mencionar que las densidades poblacionales de *R. reniformis*, no se incrementa inmediatamente que se establece los cultivos de piña en campo y el sistema radical empieza a formarse. Las poblacionales permanecen en sus niveles previos hasta ocho meses después de plantar el cultivo, transcurrido este tiempo la población relativamente estática empieza a mostrar un crecimiento lineal y se mantiene en constante aumento hasta por 6 meses (Sipes & Schimitt, 1994).

Estas poblaciones permanecen en estos niveles altos durante todo el ciclo del cultivo, observándose una leve disminución de la población cuando el cultivo inicia su etapa de floración (Sipes & Schimitt, 1994). Esa ligera disminución de la población podría estar relacionado con inhibidores de proteasas endógenos que se localizan en el sistema radical de la piña (Rabovich, Paull, & Sipes, 2009). Las concentraciones de inhibidor de proteasa aumentan en la planta de piña cuando el cultivo está infectado con *R. reniformis*, mientras que en plantas no infectadas disminuye, esto indica que, como respuesta al ataque del nematodo, la planta responde con resistencia sistémica adquirida a la presencia de *R. reniformis* (Chinnasri & Sipes, 2005).

Los estudios reportan que 2 – 4 *R. reniformis* por cm³ pueden causar pérdidas significativas en el cultivo, alcanzando hasta un 40 – 60 % en la reducción del rendimiento (Sipes & Schmitt 2000; Jones et al., 2013). Según Sipes et al., (2002), el ataque de *R. reniformis* también incrementa la severidad del virus PMWaV-1 (closterovirus) que causa la marchitez en piña transmitido por cochinilla (*Dysmicoccus brevipes* Cockerell), y la coinfección entre estos dos fitopatógenos acelera la floración, reduce el tamaño de la fruta y por consiguiente el rendimiento.

3.2.2 Biología

El ciclo de vida de *R. reniformis* es relativamente corto, los huevos eclosionan después de una o dos semanas, emergiendo de ellos los juveniles en segundo estado (J2), que se mueven al suelo y sufren tres mudas sin alimentarse y se producen machos y hembras adultos (Linford & Oliveira, 1940; Bird, 1984). Los machos parece que no se alimentan (Sipes & Chinnasri, 2018) y son las hembras las que causan el daño y su etapa parasítica la alcanzan de una o dos semanas después de la eclosión. Las hembras entran al sistema radical e inician su proceso de alimentación, la maduración la alcanzan cuatro semanas después de que penetran la raíz, durante este tiempo continúan desarrollándose, se hinchan y se vuelven sedentarias. El macho permanece fuera de la raíz y puede copular a la hembra antes de la maduración de la gónada femenina. Al madurar, en una masa gelatinosa depositan entre 60 - 200 huevos (Linford & Oliveira, 1940; Bird, 1984). Generalmente se reproducen por anfigenesis, aunque algunas poblaciones lo hacen partenogénicamente (Nakasono, 1977; 2004; Wang, 2007).

Rotylenchulus reniformis puede tolerar temperaturas extremas y sobrevivir períodos extensos sin el hospedero. Poblaciones evaluadas de Louisiana, Texas y Puerto Rico sobrevivieron sin su huésped por 6 meses a temperaturas entre -5 y 25 °C. En suelos en barbecho también pueden sobrevivir por dos años en forma de huevo o juveniles en anhidrobiosis, sin embargo, ello depende de la humedad del suelo (Tsai & Apt, 1979).

Las hembras inducen su sincitio en la raíz (Robinson et al., 1997), el cual se forma a partir de una célula única que se agranda para incorporar células adicionales en el periciclo, parénquima o algunas veces en el floema (Rebois, Madden, & Eldridge, 1975; Robinson et al., 1997).

Las investigaciones indican que hay diferencias en la temperatura óptima con respecto al comportamiento reproductivo en las poblaciones de *R. reniformis* (Nakasono, 1977; 2004). El rango de temperatura óptima para el desarrollo de *Rotylenchulus* es de 25 – 29°C, la exposición a temperaturas bajas (15°C), como también superiores (36°C), afecta negativamente el proceso de reproducción ya que la disminuye. (Rebois, Madden, & Eldridge., 1975; Heald & Inserra, 1988).

Algunos trabajos de *Rotylenchulus* sp. han sido reportados en Colombia para algunos cultivos como: aguacate (Saltaren et al., 1999), granadilla (Vargas et al., 2002), maíz (Norton, & Varón de Agudelo, 1984), maracuyá (Sánchez, Manyoma & Agudelo, 1993; Ortiz-Paz, Guzmán-Piedrahita, & Ocampo, 2012), plátano y banano (Zuñiga, Ortiz, & Varón de Agudelo, 1979; Gómez, 2001; Riascos-Ortiz et al, 2019), tabaco (Barriga-Olivares & Aranda-Ramírez, 2000), uva (Rubiano & Varón de Agudelo, 1994). Sin embargo, en el cultivo de piña solo Redondo & Varón de Agudelo (1991) ha reportado a *Rotylenchulus* sp.

En general en Colombia son muy pocos los trabajos enfocados al estudio de *Rotylenchulus*. Por ende, no hay información actual de cuáles son especies de este fitonemátodo que están asociadas al cultivo de piña, lo cual limita el manejo de las poblaciones del nematodo en los cultivos de piña. Con el fin de tener información precisa y actualizada sobre las especies de *Rotylenchulus*, este estudio tiene como objetivo (i) identificar a través de análisis morfológico, morfométrico y molecular las especies de *Rotylenchulus* asociados al cultivo de piña en el Valle del Cauca, como también (ii) analizar las relaciones filogenéticas de las especies de *Rotylenchulus* asociadas a cultivos de piña en las áreas estudiadas.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Localización

Se colectaron muestras de suelo y raíces en la finca “San Juanito” en el municipio de Buga, Valle del Cauca Colombia entre el 2018 y 2019. Las muestras se procesaron y analizaron en el laboratorio de Diagnóstico Vegetal de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira.

3.3.2 Muestreo y procesamiento de las muestras

En un área de muestreo de aproximadamente 1 hectárea se seleccionaron plantas al azar con sintomatología similar a la ocasionada por fitonemátodos y se colectaron entre 25 –30 submuestras de suelo rizosférico y raíces a una profundidad de 0 – 20 cm, que conformaron una muestra compuesta de 1 kg. Las muestras se colectaron utilizando un palín y cuchillo. Los métodos utilizados para la extracción de fitonemátodos de las muestras de suelo y raíces se hizo con el método de maceración-decantación y agitación-decantación de Cobb modificado (Volcy, 1998; Ravichandra, 2014).

3.3.3 Extracción de fitonemátodos de muestras de suelo

El método de agitación-decantación de Cobb (1917) modificado (S´Jacob & Bezooijen, 1977; Volcy, 1998; Ravichandra, 2014) el cual consiste en midieron 100 cc del suelo y se suspendieron en uno a dos litros de agua. La suspensión resultante se agitó vigorosamente

por espacio de cinco minutos. Transcurrido este tiempo, la suspensión se dejó reposar por 10 segundos y se procedió a pasarla por una columna de tamices de 10, 325 y 400 mesh. Posteriormente, el suelo contenido en los tamices de 325 y 400 se depositó sobre papel facial previamente contenido en un tamiz de decantación.

Seguidamente, el tamiz de decantación con el suelo, se colocó en un plato de decantación con agua corriente y el montaje se dejó reposar por 48 horas para separar los nematodos. Transcurrido este tiempo, se recuperó la suspensión de nematodos en un volumen de 20 ml utilizando un tamiz de 400 mesh y depositándolo en tubos Falcon. Finalmente se almacenaron en nevera a 4°C para posteriormente hacer la respectiva cuantificación (S´Jacob & Bezooijen, 1977; Volcy, 1998).

3.3.4 Extracción de fitonemátodos de muestras de raíces

Para extraer los fitonemátodos de las raíces se utilizó el método de maceración-decantación de Cobb modificado (S´Jacob & Bezooijen, 1977; Volcy, 1998; Ravichandra, 2014). Inicialmente se enjuagaron para remover agregados de suelo, seguidamente se pesaron 10 gr y se licuaron de manera intermitente a baja velocidad en un volumen de 200 ml de agua corriente durante 5 segundos. Seguidamente, el macerado de raíces se pasó por una columna de tamices de 10, 325 y 400 mesh; el contenido del tamiz de 325 y 400 mesh se recuperó en un volumen de 100 ml y este fue depositado sobre el papel facial previamente ubicado en un tamiz de decantación. El tamiz de decantación con el macerado se colocó en un plato de decantación con agua corriente, con el propósito de separar los nemátodos durante un lapso de tiempo de 48 hrs. Transcurrido este tiempo, se procedió a recuperar los nemátodos utilizando un tamiz de 400 mesh, estos se concentraron en tubos Falcon en un volumen de 20 ml y se almacenaron en nevera entre 4°C (S´Jacob & Bezooijen, 1977; Volcy, 1998).

3.3.5 Fijación de los nematodos

En tubos Eppendorf con 1 ml de agua corriente se depositaron nematodos adultos, los cuales se llevaron a baño maría a 60 °C durante 4 minutos para relajarlos (matarlos), seguidamente se colocaron a centrifugar a 13,000 rpm durante 1 min. Finalizada la centrifugación, se retiró 0.5 ml del tubo Eppendorf e inmediatamente se le agregó 0.5 ml de formalina al 4% (Rosa et al., 2014), una vez fijados se procedió a realizar montajes semipermanentes de los fitonemátodos en láminas portaobjetos para realizar registros morfométricos para diferentes caracteres diagnóstico de acuerdo con Robinson et al.,(1997); Van Den Berg et al., (2016); Palomares-Rius et al., (2018): L, a, b', c, c', DGO, V. longitud del estilete, longitud de la faringe, poro excretor, diámetro máximo del cuerpo (DMC), diámetro máximo en el ano (DMA), altura de la región labial, ancho de la región labial, longitud de la cola, longitud hialina de la cola (h), longitud de la espícula, longitud del gobernáculo.

3.3.6 Análisis estadístico

Los datos morfométricos generados en este estudio junto a otros obtenidos de la literatura para especies de *Rotylenchulus* (Van den Berg et al., 2003, 2016; Agudelo et al., 2005), fueron sometidos a un Análisis de Componentes Principales (ACP) utilizando el software SAS (Statistical Analysis System).

3.3.7 Análisis molecular

La extracción de ADN se hizo siguiendo el protocolo de Múnera et al., (2009) con modificaciones (Riascos-Ortiz et al., 2019). Se colocó un único nematodo en una placa portaobjeto esterilizada y se trituró con una punta de micropipeta esterilizada.

Inmediatamente, las partes del nematodo se depositaron en un tubo Eppendorf en un volumen de 15 microlitros (μ l) de buffer de lysis (50 mM KCl, 10 Mm Tris pH 8.0, 15 mM MgCl₂, 0.5% Triton x-100, 4.5% Tween-20, 0.09% Proteinasa K). Seguidamente el tubo se almacenó a -50°C por 60 min, transcurrido este tiempo se colocaron en un termociclador para incubarlo a 65°C durante 1 hora y 95°C por 15 minutos. Por último, el tubo se centrifugó a 16,000g por 1 minuto y almacenado a -20°C hasta ser procesada.

La región de expansión D2-D3 de la subunidad larga (LSU) del ADN ribosomal (28S) fue amplificada utilizando el primer D2A forward (5'-ACAAGTACCGTGAGGG AAAGTTG-3') y D3B reverse (5'- CCTCGGAAGG AACCAGCTACTA-3') (De Ley et al., 1999). Las condiciones de PCR para la amplificación de la región D2-D3 fueron desnaturalización

inicial de 2 min a 94°C seguido de 40 ciclos de 45 seg a 94°C, 45 seg a 55°C, 1 min a 72°C y una extensión final de 10 min a 72°C. Los productos de PCR se enviaron a secuenciar en ambas direcciones (forward y reverse) con BIONEER en Korea del Sur.

3.3.8 Análisis filogenético

En este análisis se utilizó la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST) en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) con el propósito de confirmar la identidad de la especie encontrada en este estudio, a través de las secuencias de ADN (Altschul et al, 1990). Las secuencias consenso fueron editadas utilizando el software Geneious (<https://www.geneious.com>) con alineamiento múltiple en MEGA y utilizando las secuencias generadas en este estudio y otras secuencias de referencia de *Rotylenchulus* obtenidas del GenBank. Para determinar la filogenia de D2-D3 también se utilizó MEGA-X y se construyeron árboles filogenéticos según los criterios de Máxima Verosimilitud (ML) utilizando 1000 bootstraps (Powers, 2018). Para determinar el modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se ajustara a cada alineamiento basado en el criterio de información

de Akaike corregido para muestras pequeñas, se utilizó el software jModelTest v.2.2.10 (Posada, 2008). Como grupo externo se utilizó a *Pratylenchus scribneri* en el análisis de ML.

3.4 Resultados

3.4.1 Identificación morfológica y morfométrica

La población encontrada en la finca “San Juanito” municipio de Buga, Valle del Cauca Colombia fue analizada e identificada morfométrica y morfológicamente como *Rotylenchulus reniformis* (Tabla 3.1). Los datos morfométricos y las características morfológicas de la población estudiada son similares a las poblaciones tipo y topotipo (Tabla 3.1 y Figura 3.1). El análisis multivariado mostró que la población de Buga se agrupó estrechamente con poblaciones de referencia de *R. reniformis* asociadas a plátano en Colombia reportadas por Riascos-Ortiz et al., (2019) (Figura 3.2). También se observa que las poblaciones de *R. reniformis*, incluyendo la analizada en este estudio, se separan claramente de *R. macrodoratus*, *R. macrosoma*, *R. macrosomoides* y de *R. clavicaudatus* Van den Berg et al., (2016), Palomares-Rius et al., (2018) y Riascos-Ortiz et al., (2019). Los Componentes Principales (CP) 1, 2, 3 y 4 presentaron valores propios mayores o igual a 1, los cuales explicaron el 98.28% de la varianza (Tabla 3.2). Los caracteres morfológicos y morfométricos más discriminantes fueron en el CP1: L y a, en el CP2 y CP4: DGO y V, y en el CP3: b' y estilete (Tabla 3.3).

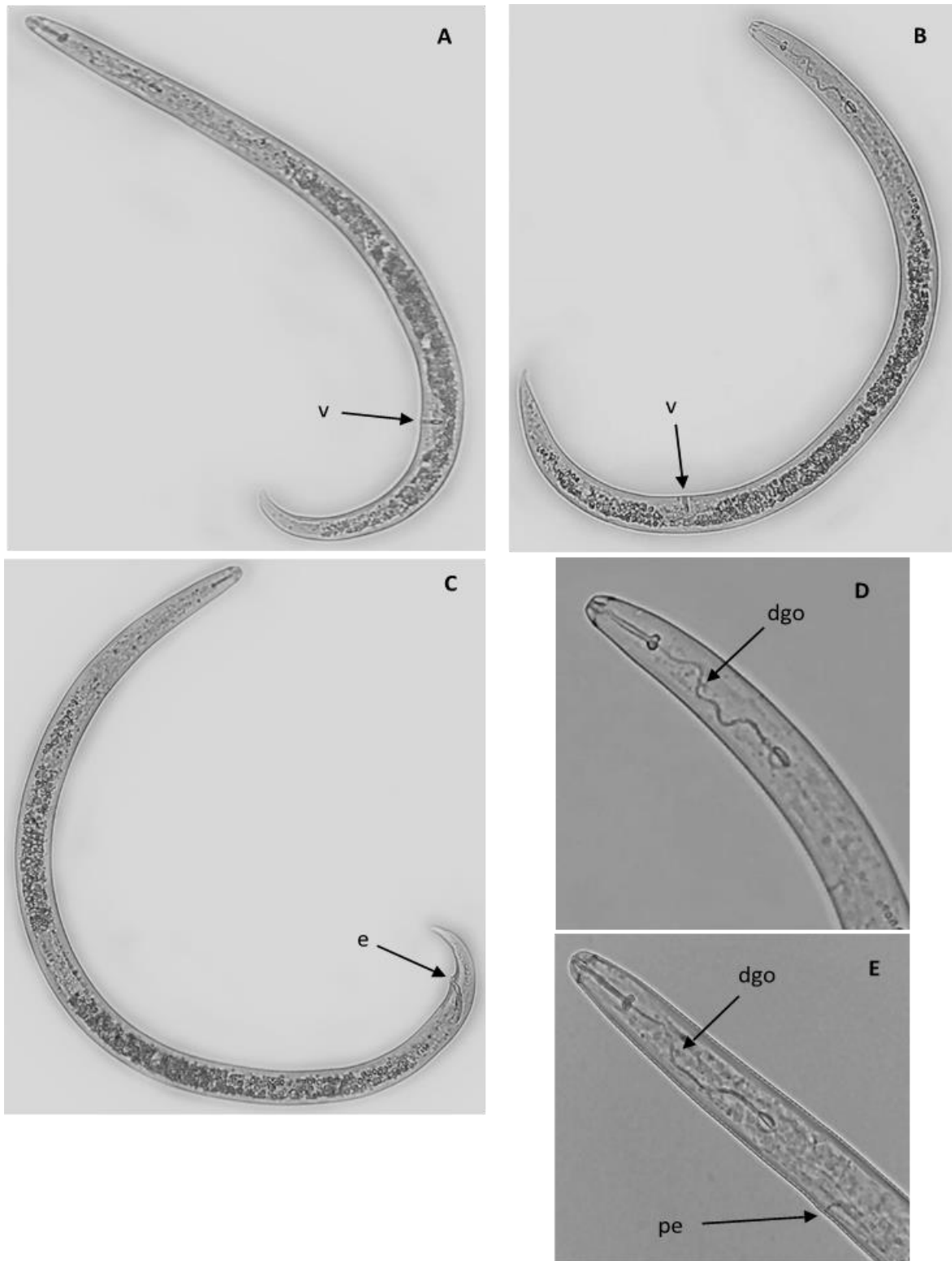


Figura 3.1. Morfología de *Rotylenchulus reniformis*. (A y B) hembras inmaduras; (C) macho; (D y E) región anterior de hembras inmaduras. v = vulva; e = espícula, dgo = orificio de la glándula dorsal esofágica, pe = poro excretor. Fotos A – C en escala de 20 μ m, D y E a 10 μ m. (Fotos tomadas por el autor).

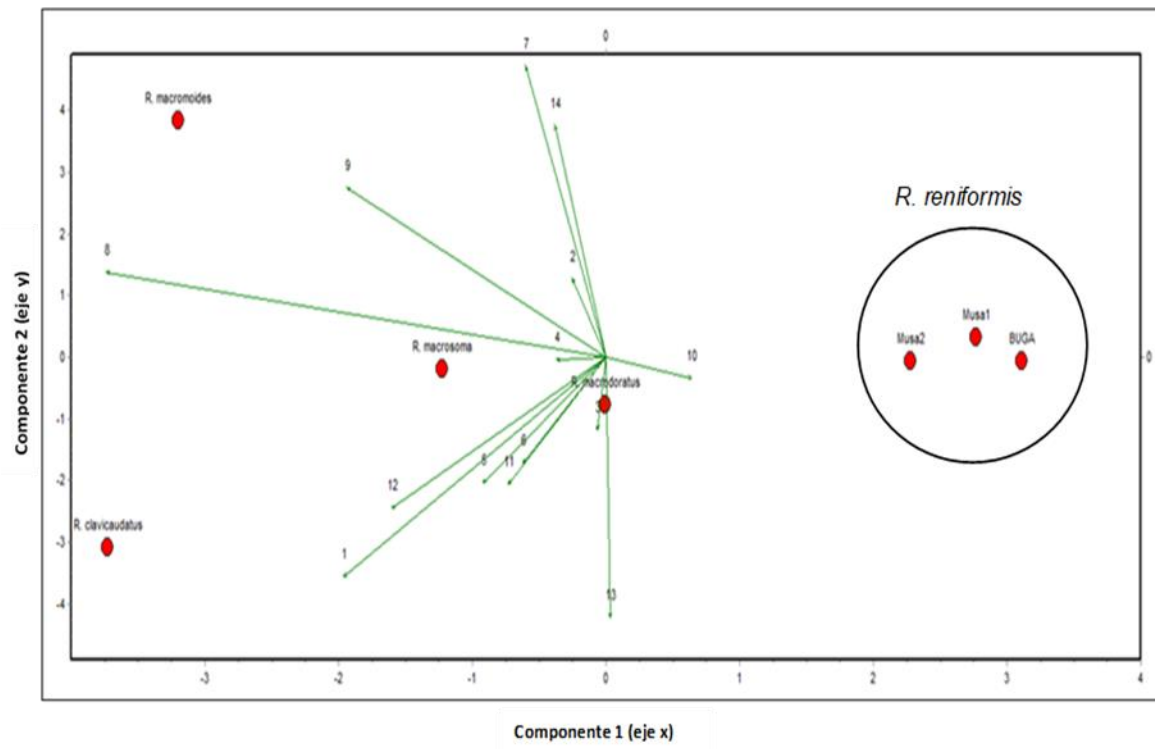


Figura 3.2. Biplot para las poblaciones colombianas (*Musa* 1 y 2 y Buga) de *R. reniformis* asociada al cultivo de piña y otras especies referencia del género.

Tabla 3.1. Datos morfométricos de la población analizada de *R. reniformis*

Localidad / Cultivo Sexo Especímenes	<i>Rotylenchulus reniformis</i>	
	Buga, Valle del Cauca Colombia / Piña	
	Hembras inmaduras n = 20	Machos n = 10
L	375.0 ± 29.3 (320.9 - 431.4)	396.1 ± 14.0 (363.1 - 413.0)
a	24.7 ± 1.0 (22.8 - 26.6)	26.2 ± 1.3 (23.8 - 28.0)
b'	2.9 ± 0.2 (2.5 - 3.2)	4.0 ± 0.1 (3.8 - 4.2)
c	15.6 ± 1.1 (14.0 - 18.2)	16.1 ± 0.8 (14.8 - 17.5)
c'	2.5 ± 0.1 (2.3 - 2.8)	2.4 ± 0.1 (2.3 - 2.7)
DGO	15.6 ± 3.6 (15.3 - 18.3)	-
V	71.4 ± 1.5 (69.2 - 75.5)	83.4 ± 27.8 (91.2 - 94.1)
Longitud del estilete	15.4 ± 0.5 (14.1 - 16.5)	9.8 ± 1.2 (8.2 - 12.2)
Longitud de la faringe	131.9 ± 7.5 (117.4 - 142.6)	98.9 ± 4.1 (91.4 - 105.7)
Poros excretor	78.2 ± 3.1 (71.2 - 84.8)	73.1 ± 2.1 (69.1 - 75.6)
Diámetro máximo del cuerpo	15.1 ± 0.8 (13.6 - 16.3)	15.1 ± 0.6 (14.3 - 16.2)
Diámetro del cuerpo en el ano	9.5 ± 0.4 (8.6 - 10.4)	10.2 ± 0.5 (9.2 - 11.1)
Altura de la región labial	3.4 ± 0.3 (3.0 - 4.0)	3.4 ± 0.3 (2.8 - 3.9)
Ancho de la región labial	7.6 ± 0.3 (7.0 - 7.9)	6.7 ± 0.2 (6.3 - 6.9)
Long de la cola	24.0 ± 1.1 (22 - 25.8)	24.7 ± 1.7 (20.7 - 27.0)
h (longitud hialina de la cola)	7.2 ± 0.8 (5.2 - 8.5)	6.3 ± 0.5 (5.5 - 7.3)
Longitud de la espícula	-	18.3 ± 1.6 (16.1 - 21.7)
Longitud del gubernáculo	-	6.5 ± 0.7 (5.5 - 7.4)

Nota: L, longitud total del cuerpo; a, longitud total del cuerpo dividido por el diámetro máximo del cuerpo; b', longitud total del cuerpo dividido por la distancia desde el extremo anterior del cuerpo hasta el extremo posterior de las glándulas faríngeas; c, longitud total del cuerpo dividido por la longitud de la cola; c', longitud de la cola dividido por el diámetro máximo del cuerpo; DGO, Orificio de la Glándula Dorsal Esofágica; V o T, posición de la vulva o testículos desde el extremo anterior expresada como porcentaje de la longitud del cuerpo. *Las mediciones están en μm , media \pm desviación estándar (rango).

Tabla 3.2. Valores propios y varianza total acumulada para cada componente

Componente principal	Valores propios	Total acumulado	Porcentaje total de varianza	Porcentaje total de la varianza acumulada
1	6.88605	6.88605	49.1861	49.1861
2	3.55621	10.4423	25.4015	74.5876
3	2.20477	12.647	15.7484	90.336
4	1.11271	13.7597	7.94795	98.2839
5	0.151008	13.9108	1.07863	99.3625
6	0.0892441	14	0.637458	100
7	2.3282E-7	14	1.663E-6	100
8	1.23296E-7	14	8.80042E-7	100
9	8.19087E-8	14	5.85062E-7	100
10	-9.1727E-10	14	-6.55193E-9	100
11	-2.18141E-8	14	-1.55815E-7	100
12	-1.18353E-7	14	-8.45376E-7	100
13	-1.80937E-7	14	-1.29241E-6	100
14	-3.00997E-7	14	-2.14998E-6	100

Tabla 3.3. Correlación de siete Componentes Principales y los caracteres morfométricos más relevantes para hembras inmaduras de *R. reniformis*.

Vector	Carácter diagnóstico	1	2	3	4	5	6	7
1	L	-0.38	-0.05	-0.01	-0.07	-0.17	-0.12	-0.11
2	a	-0.36	0.13	-0.12	-0.01	-0.21	-0.17	0.48
3	b'	0.14	0.24	0.53	-0.13	-0.18	-0.04	-0.17
4	c'	-0.27	-0.28	-0.29	0.11	0.02	-0.05	-0.09
5	DGO	-0.17	0.44	-0.02	0.25	-0.02	0.32	-0.38
6	V	0.13	0.47	-0.10	-0.26	-0.20	0.01	-0.06
7	Estilete	-0.25	0.22	0.38	-0.17	-0.03	-0.46	0.25

Nota: Los caracteres diagnóstico claves para discriminar la especie de *R. reniformis* se muestran en negrita

3.4.2 Identificación molecular

Las secuencias consenso obtenidas en este estudio, correspondientes al segmento de expansión D2-D3 para la población del nematodo encontrada en Buga, Valle del Cauca Colombia, mostraron alta afinidad con otras secuencias de referencia de *R. reniformis* con una similitud del 99.5% (DQ328713, MG835409, KT003745, KT003743, KT003744, HM131884, HM131878).

En la Figura 3.3 correspondiente al análisis de ML para la región de expansión D2-D3, se observó que todas las secuencias obtenidas en este estudio se agruparon estrechamente con las secuencias referencia de *R. reniformis*, las cuales son reportadas en diferentes países (EE. UU.: KT003745, KT003743, KT003744; Brasil: DQ328713; Paraguay: MG835409; China: HM131878, HM131884).

En este mismo análisis filogenético, se observó que las secuencias generadas en este trabajo de *R. reniformis* se agruparon con las secuencias de poblaciones de referencia de *R. reniformis* Tipo A (Figura 3.4), secuencias de referencia utilizadas: Japón KF999978, KF999977; China: GU120091; Brasil: GU120091; EE.UU.: KT003743, KT00374

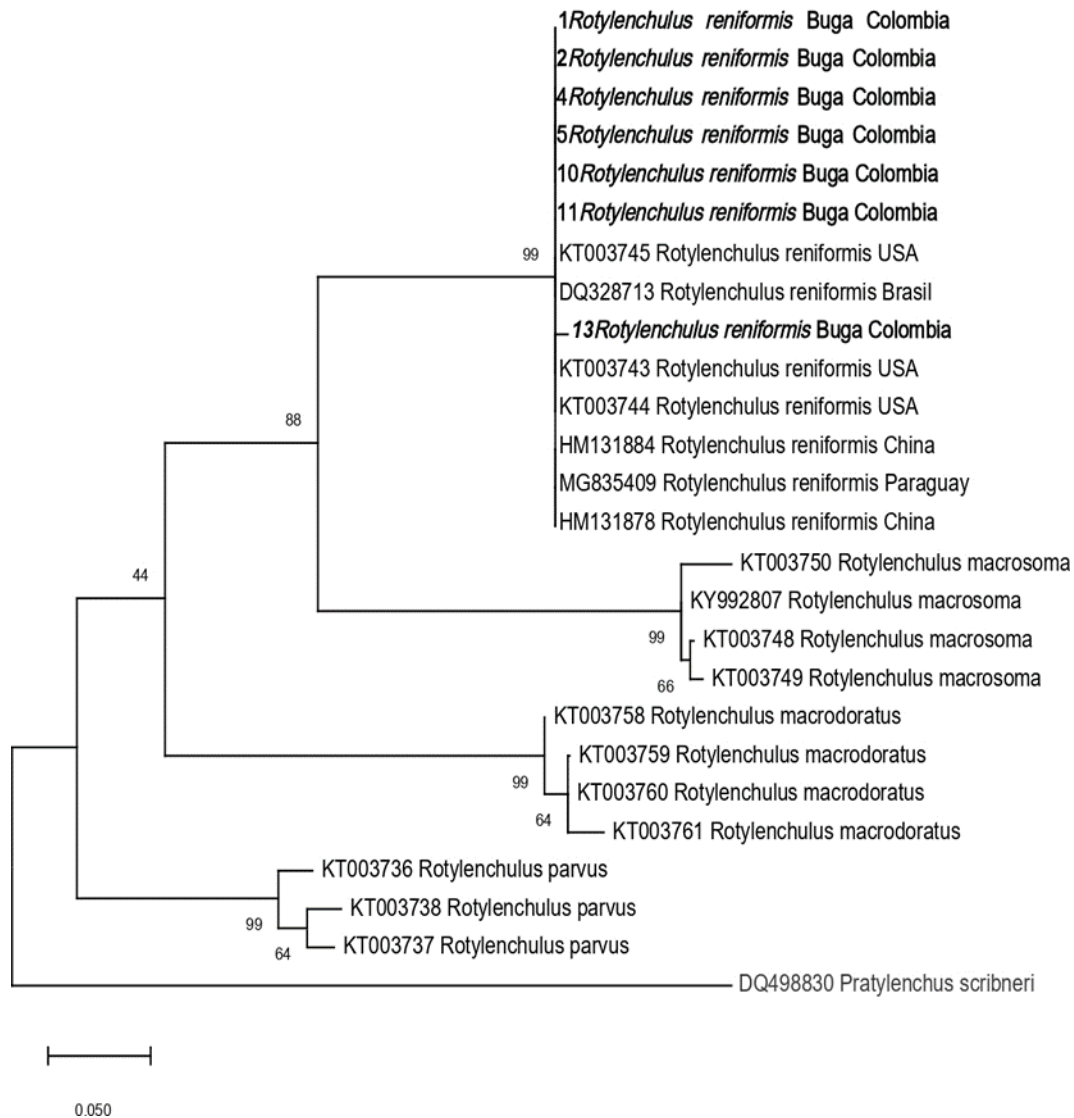


Figura 3.3. Árbol filogenético de ML de *Rotylenchulus reniformis*, basado en la subunidad larga D2-D3 del gen 28S del ADN ribosomal y 1000 bootstrap con modelo de sustitución de nucleótidos TPM1uf + I + G. El grupo externo *Pratylenchus scribneri* representado en color gris. Las secuencias generadas en este trabajo se representan en negrita. Los valores representan la probabilidad posterior y la escala representa el número de sustituciones por sitio

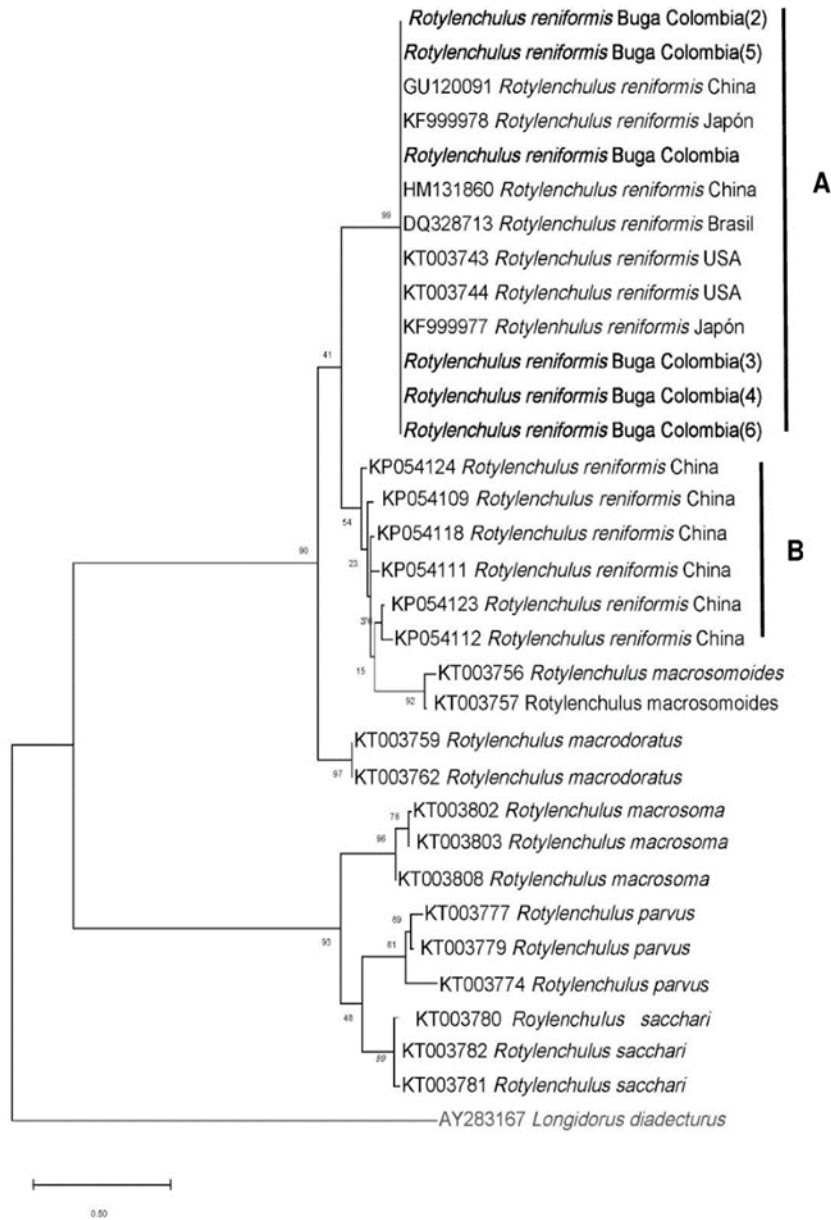


Figura 3.4. Árbol filogenético de máxima verosimilitud de *Rotylenchulus* con la región de expansión D2D3 del ADN ribosomal 28S y 1000 bootstrap y con modelo de sustitución de nucleótidos TrN + I + G. Las secuencias de *Rotylenchulus* de este estudio se agruparon con las de referencia de tipo A. Las secuencias generadas en este trabajo se representan con color negro. El grupo externo *Longidorus diadecturus* se observa en color gris

3.5 Discusión

Basado en análisis morfológico, morfométrico y molecular, se identificó una única población conformada por la especie *R. reniformis* con variantes en tipo A y tipo B asociada al cultivo de piña en el municipio de Buga, Valle del Cauca Colombia. El análisis morfométrico mostró que las mediciones de los caracteres diagnóstico son similares a las poblaciones tipo de *R. reniformis*, como también a las claves dicotómicas publicadas para este fitonemátodo (Linford & Oliveira 1940; Dasgupta, Raski & Sher, 1968; Robinson et al., 1997; Agudelo et al., 2005; Palomares-Rius et al., 2018). Cabe mencionar que la población estudiada presentó algunas diferencias para algunos caracteres morfométricos con respecto a las poblaciones de referencia, esto sugiere la existencia de variación intraespecífica. Las investigaciones de Nakasono (2004) y Nyaku et al., (2013, 2016) reportan que esta variación se debe principalmente a la temperatura, nutrientes y crecimiento de la planta hospedero.

Los estudios indican que la identificación basada en características morfológicas, se dificulta principalmente por la alta variabilidad intraespecífica que presenta este género (Germani, 1978; Robinson et al., 1997; Van Den Berg et al., 2016; Palomares-Rius et al., 2018). Los datos morfométricos se sometieron a un análisis multivariado, y se encontraron caracteres morfométricos discriminantes (L, a, b', c', DGO, V y longitud del estilete) de mucha importancia que permitieron identificar la población estudiada y separarla de otras especies pertenecientes a este género (Dasgupta, Raski & Sher, 1968; Robinson et al., 1997; Van Den Berg et al., 2016).

Rotylenchulus parvus es una especie que ha sido observada en cultivos de piña en Sudáfrica (Keetch, 1982), sin embargo, su parasitismo no ha sido confirmado en este cultivo (Keetch, 1982; Gaur & Perry, 1991; Robinson et al., 1997). Al comparar los datos morfométricos de literatura (Van Den Berg et al., 2016) se muestran diferencias marcadas

entre *R. parvus* con respecto a los datos de *R. reniformis* generados en este estudio, esto indica que la identificación morfométrica es correcta para *R. reniformis*.

En este trabajo se evaluó la región D2-D3 del gen 28S con la cual se pudo confirmar la presencia de *R. reniformis* en el cultivo de piña. Las secuencias obtenidas, presentaron una alta afinidad con secuencias publicadas pertenecientes a la especie *R. reniformis*. Los análisis moleculares fueron consistentes con los resultados obtenidos mediante diagnósticos morfológicos y morfométricos. La integración de estas tres técnicas es de vital importancia ya que permite hacer una identificación confiable, robusta y precisa.

A partir de las secuencias obtenidas en este estudio, se confirmó que la población identificada pertenece a *R. reniformis* tipo A, de acuerdo con lo reportado por Van Den Berg et al., (2016); estos investigadores encontraron dos tipos diferentes de ARNr D2D3 28S en el genoma de *R. reniformis*. La población de *R. reniformis* de Buga (Valle del Cauca, Colombia) formó un grupo bien definido con poblaciones tipo A en conjunto con poblaciones referencia de Brasil, Estados Unidos, China y Japón, y aparte de las poblaciones tipo B (Figura 3.4).

Con el ACP se determinó que la población de este estudio (*R. reniformis*) se agrupó con las especies de *Musa* spp. reportadas en Colombia por Riascos-Ortiz et al., (2019). Sin embargo, para el cultivo de piña en este país, los datos serían el primer reporte que integra análisis morfométrico y molecular en la identificación de poblaciones de *Rotylenchulus reniformis* asociado al cultivo de piña. La información generada en este estudio contribuye a ampliar el conocimiento sobre los nematodos fitoparásitos en Colombia, además de permitir el diseño de estrategias de manejo para *R. reniformis* asociado a piña.

La investigación de Sipes (1996) indica que las pérdidas en el rendimiento del cultivo pueden ser entre el 60 – 74% en la primera cosecha y entre el 40 – 45% en las cosechas subsiguientes. Por lo tanto, este fitonemátodo podría considerarse un riesgo en los cultivos de piña en Colombia, especialmente cuando las poblaciones son superiores a 2.4 nematodos/cc de suelo según lo indicado por Sipes & Schimitt (2000). Por ende, es de suma importancia los monitoreos y muestreos en el cultivo para identificar plantas con posibles síntomas y además conocer sus niveles poblacionales con fines de manejo.

Este fitonemátodo, *R. reniformis*, se disemina fácilmente por el uso inadecuado de maquinaria y herramientas agrícolas, riego y material vegetal infestado (Monar, 2012). Sin embargo, en este trabajo se encontró limitada distribución del nematodo en las fincas muestreadas, lo cual podría atribuirse a la posible relación antagónica con poblaciones de *Helicotylenchus*.

3.6 Conclusiones

La descripción morfológica, morfométrica y molecular, permitieron identificar a *Rotylenchulus reniformis* asociado al cultivo de piña en municipio de Buga en el Valle del Cauca Colombia.

La región de expansión D2-D3 fue determinante para caracterizar la especie *R. reniformis* tipo A.

La relación filogenética de la especie identificada como *R. reniformis* estuvo muy diferenciada de las demás especies y únicamente se agrupó con especies de *R. reniformis* tipo A.

Es el primer reporte de *R. reniformis* tipo A asociado al cultivo de piña que incluye descripción morfológica, morfométrica y molecular en Colombia y en el mundo.

3.7 Bibliografía

- Agudelo, P., Robbins, R. T., Stewart, J. M., & Szalanski, A. L. (2005). Intraspecific Variability of *Rotylenchulus reniformis* from Cotton-growing Regions in the United States. *Journal of Nematology*, 37(1), 105–114. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2620946&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 215, pp. 403–410. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Ayala, A. (1961). An analysis of the quantitative and qualitative composition of the nematode population in pineapple fields in Puerto Rico. *Journal of Agriculture of University of Puerto Rico*, 45, 265–299.
- Ayala, A., & Román, J. (1964). Distribution and host range of the burrowing nematode in Puerto Rican soils. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, 47(1), 28-37.
- Barriga-Olivares, R., & Aranda-Ramírez, A. J. (2000). Important phytoparasitic nematodes in the tobacco zone of Santander and Boyacá, Colombia. *Fitopatología Colombiana*, 24(1/2), 10-14.
- Bird, A. F. (1984). Growth and moulting in nematodes: Moulting and development of the hatched larva of *Rotylenchulus reniformis*. *Parasitology*, 89(1), 107–120. <https://doi.org/10.1017/S0031182000001165>
- Chinnasri, B., & Sipes, B. (2005). Effect of a systemic acquired resistance inducer on nematodes infecting pineapple. *Acta Horticulturae*, 666, 213–222. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.666.22>
- Cobb, N. A. (1917). Notes on Nemas. *Contributions to a Science of Nematology*
- Daramola, F. Y., Afolami, S. O., Idowu, A. A., & Nwanguma, E. I. (2013). Studies on the occurrence and distribution of plant-parasitic nematodes in some pineapple-producing states in Nigeria. *Asian Journal of Crop Science*, Vol. 5, pp. 190–199. <https://doi.org/10.3923/ajcs.2013.190.199>
- Dasgupta, D., Raski, D., & Sher, S. (1968). A revision of the genus *Rotylenchulus* Linford and Oliveira, 1940 (Nematoda: Tylenchidae). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 35(2), 169–192.

- Davide, R. G. (1988). Nematode problems affecting agriculture in the Philippines. *Journal of Nematology*, 20(2), 214–218.
- De Ley, P., Félix, M., Frisse, L., Nadler, S., Sternberg, P., & Thomas, K. (1999). Molecular and morphological characterisation of two reproductively isolated species with mirror- image anatomy (Nematoda: Cephalobidae). *Nematology*, 1(6), 591–612. <https://doi.org/10.1163/156854199508559>
- Gaur, H. S., & Perry, R. N. (1991). The biology and control of the plant parasitic nematode *Rotylenchulus reniformis*. *Agricultural Zoology Reviews*, 4, 177-212.
- Germani, G. (1978). Caractères morpho-biométriques de trois espèces ouest-africaines de *Rotylenchulus* Linford & Oliveira, 1940 (Nematoda: Tylenchida). *Revue de Nématologie*, 1(2), 241–250.
- Gómez, J. (2001). Nematodos fitoparásitos y su importancia económica en plantas de plátano en Colombia (p. 17). p. 17.
- Guerout, R. (1975). Nematodes of pineapple: A review. *PANS Pest Articles and News Summaries*, 21(2), 123–140. <https://doi.org/10.1080/09670877509411384>
- Heald, C. M., & Insearra, R. N. (1988). Effect of Temperature on Infection and Survival of *Rotylenchulus reniformis*. *Journal of Nematology*, 20(3), 356–35661.
- Jiménez, N., Crozzoli, R., Petit, P., & Greco, N. (2001). Nematodos fitoparásitos asociados con el cultivo de la piña, *Ananas comosus*, en los estados de Lara y Trujillo, Venezuela. *Nematología Mediterránea*, 29, 13–17.
- Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G. J., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G. K., Perry, R. N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14(9), 946–961. <https://doi.org/10.1111/mpp.12057>
- Julca-Otiniano, A., Carbonell, T., & Bello-Amez, S. (2004). Correlation between populations of plant nematodes and yield components and quality of Samba'pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) in Chanchamayo, Perú. In *Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture* (Vol. 48, pp. 115-118). Interamerican Society for Tropical Horticulture.
- Keetch, D.P. (1982). Nematode pests of pineapple. In *Nematology in South Africa*, D.P. Keetch, and J. Heyns, eds. (Pretoria, South Africa: Department of Agriculture and Fisheries), p.19–29.
- Linford, M. B., & Oliveira, J. M. (1940). *Rotylenchulus reniformis*, nov. gen., n. sp., a nematode parasite of roots. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 7(1), 35-42.

- Monar, J. (2012). Determinación del umbral de daño de *Rotylenchulus reniformis* en tomate (*Solanum lycopersicon* L), pimiento (*Capsicum annuum* L) y melón (*Cucumis melo* L). Universidad Técnica de Babahoyo.
- Múnera, G. E., Bert, W., & Decraemer, W. (2009). Morphological and molecular characterisation of *Pratylenchus araucensis* n. sp. (Pratylenchidae), a root-lesion nematode associated with Musa plants in Colombia. *Nematology*, 11(6), 799–813. <https://doi.org/10.1163/156854109X415524>
- Nakasono, K. (1977). Sexual attraction of *Rotylenchulus reniformis* females and some differences in the attractiveness between amphimictic and parthenogenetic populations (Nematoda: Nacobbiidae). *Applied Entomology and Zoology*, 12(2), 154–161.
- Nakasono, K. (2004). Studies on morphological and physio-ecological variation of the reniform nematode, *Rotylenchus reniformis* Linford and Oliveira, 1940 with an emphasis on differential geographical distribution of amphimictic and parthenogenetic populations in Japan. *Journal of Nematology*, 36, 356–419.
- Norton, D., & Varón de Agudelo, F. (1984). Plant-parasitic nematodes associated with maize in Cauca and Valle del Cauca, Colombia. *Plant Disease*, 68 (11), 950–953. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.py.17.090179.001431>
- Nyaku, S. T., Kantety, R. V., Cebert, E., Lawrence, K. S., Honger, J. O., & Sharma, G. C. (2016). Principal component analysis and molecular characterization of reniform nematode populations in Alabama. *Plant Pathology Journal*, 32(2), 123–135. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.09.2015.0194>
- Nyaku, S. T., Kantety, R. V., Lawrence, K. S., Van Santen, E., & Sharma, G. C. (2013). Canonical discriminant analysis of *Rotylenchulus reniformis* in Alabama. *Nematropica*, 43(2), 171–180.
- Ortiz, R., Guzmán, O., & Ocampo, A. (2012). Identificación de nematodos fitoparásitos en el Banco de Germoplasma de maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) en Colombia. *Acta Agronómica*, 61(4), 295–304.
- Palomares-Rius, J. E., Cantalapiedra-Navarrete, C., Archidona-Yuste, A., Tzortzakakis, E. A., Birmpilis, I. G., Vovlas, N., Castillo, P. (2018). Prevalence and molecular diversity of reniform nematodes of the genus *Rotylenchulus* (Nematoda: Rotylenchulinae) in the Mediterranean Basin. *European Journal of Plant Pathology*, 150(2), 439–455. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1292-8>
- Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1253–1256. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>
- Powers, T., Harris, T., Higgins, R., Mullin, P., & Powers, K. (2018). Discovery and identification of Meloidogyne species using COI DNA barcoding. *Journal of Nematology*, 50(3), 399–412. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2018-029>

- Py, C., Lacoeyuilhe, J. J., & Teisson, C. (1987). The pineapple. Cultivation and uses. G.-P. Maisonneuve et Larose.
- Rabie, E. (2017). Nematology in South Africa: A View from the 21st Century. Nematodes pests of pineapple. In H. Fourie et al., (Eds.), Nematology in South Africa (pp. 395–407). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-44210-5>
- Rabovich, C., Paull, R., & Sipes, B. (2009). Protease inhibitors and reproduction of reniform nematode in pineapple. *Annals of Applied Biology*, 154(1), 127–132. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2008.00279.x>
- Ravichandra, N. G. (2014). Horticultural Nematology. Department of Plant Pathology, University of Agricultural Science, Bangalore, Karnataka India. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1841-8>
- Rebois, R. V, Madden, P. A., & Eldridge, B. J. (1975). Some Ultrastructural Changes Induced in Resistant and Susceptible Soybean Roots Following Infection by *Rotylenchulus reniformis*. *Journal of Nematology*, 7(2), 4.
- Redondo, E., & Varón de Agudelo, F. (1991). Efecto de los nematodos en el cultivo de la piña *Ananas comosus* L. (Merr.). *Fitopatología Colombiana*, 16, 180-192. Retrieved from http://sipco.ica.gov.co:8080/bitstream/123456789/16756/1/Redondo_Varón_1991.pdf
- Riascos-Ortiz, D., Mosquera-Espinosa, A., Varón de Agudelo, F., Gonçalves de Oliveira, C. M., & Muñoz-Flórez, J. (2019). Morpho-molecular characterization of Colombian and Brazilian populations of *Rotylenchulus* associated with *Musa* spp. *Journal of Nematology*, 51. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2019-047>
- Robinson, A. F., Inserra, R. N., Caswell-Chen, E. P., Vovlas, N., & Troccoli, A. (1997). *Rotylenchulus* species: Identification, distribution, host ranges, and crop plant resistance. *Nematropica*, Vol. 27, pp. 127–180.
- Rohrbach, K. G., & Apt, W. J. (1986). Nematode and Disease Problems of Pineapple. *Plant Disease*, Vol. 70, pp. 81–87. <https://doi.org/10.1094/PD-70-81>
- Rosa, J. M. O., de Oliveira, S. A., Jordão, A. L., Siviero, A., & de Oliveira, C. M. G. (2014). Nematoides fitoparasitas associados à mandioca na Amazônia Brasileira. *Acta Amazonica*, 44(2), 271–277. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672014000200013>
- Rubiano, J.A y Varón de Agudelo, F. (1994). Identificación y Parasitismo de nemátodos en Vid *Vitis* sp. Universidad del Valle (Instituto Colombiano Agropecuario) ICA, Colombia. *Fitopatología Colombiana* /Vol. 19 No.2. Págs 27-35.

- S'Jacob, J. J., & Van Bezooijen, J. (1977). A manual for practical work in nematology. Wageningen, The Netherlands, Wageningen Agricultural University, 21-23.
- Saltaren, G., Luis, F., de Varón de Agudelo, F., H. y de la Torre F, M. (1999) Nematodos asociados con el cultivo de aguacate (*Persea americana* Mill). Fitopatología colombiana 22, 68–73.
- Sánchez, M.Y., I. Manyoma y F.V. de Agudelo. (1993). Identificación y parasitismo de nematodos asociados con maracuyá *Passiflora edulis* Simsé. Fitopatología Colombiana. 17(1), 12-20.
- Sipes, B. S. (1996). Control of *Rotylenchulus reniformis* in pineapple with fosthiozate. Fruits, 3(51), 173-177.
- Sipes, B. S., & Chinnasri B. (2018). Nematode parasites of pineapple. CAB International and USDA 2018. Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture (eds R.A. Sikora et al.)
- Sipes, B. S., Caswell Chen, E. P., Sarah, J. L., & Apt, W. J. (2005). Nematode parasites of pineapple. Department of Plant and Environmental Protection Sciences, University of Hawaii
- Sipes, B. S., Sether, D. M., & Hu, J. S. (2002). Interactions between *Rotylenchulus reniformis* and Pineapple mealybug wilt associated virus-1 in pineapple. Plant Disease, 86(9), 933–938. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.9.933>
- Sipes, B., & Schimitt, D. (1994). Population fluctuation of *Rotylenchulus reniformis* in pinealpple fields and the effect of the nematode on fruit yield. Plant Diseases, 78, 895–898.
- Sipes, B., & Schimitt, D. (2000). *Rotylenchulus reniformis* damage thresholds on pineapple. Acta Horticulturae, 239–245. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2000.529.29>
- Tsai, B. Y., & Apt, W. F. (1979). Anhydrobiosis of the reniform nematode: Survival and coiling. Journal of Nematology, 11, 316 [Abstract].
- Van den Berg, E, Marais, M., Gaidashova, S., & Tiedt, L. R. (2003). Hoplolaimidae Filip'ev, 1934 (Nemata), from Rwandan banana fields. African Plant Protection, 9(1), 31–42. Retrieved from <http://content.ajarchive.org/cgi-bin/showfile.exe?CISOROOT=/10233121&CISOPTR=42%5Cnhttp://hdl.handle.net/10499/AJ4888>
- Van Den Berg, Esther, Palomares-Rius, J. E., Vovlas, N., Tiedt, L. R., Castillo, P., & Subbotin, S. A. (2016). Morphological and molecular characterisation of one new and several known species of the reniform nematode, *Rotylenchulus* Linford & Oliveira, 1940 (Hoplolaimidae: Rotylenchulinae), and a phylogeny of the genus. Nematology, 18(1), 67–107. <https://doi.org/10.1163/15685411-00002945>

- Van Den Berg., E. Marais., & M. Swart, A. (2017). Nematode morphology and classification. *Nematology in South Africa: A view from the 21st Century*. DOI 10.1007/978-3-319-44210-5
- Vargas, Z., Varón, F., & Gómez, E. (2002). Nematodos asociados a la granadilla (*Passiflora ligularis* Juss) en el Valle del Cauca. *Fitopatología Colombiana*, 11. Retrieved from https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/17664/42220_45977.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Volcy, C. (1998). Nematodos. Tomo 2. Diversidad y parasitismo en plantas. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín pp. 43-58.
- Wang, K. H. (2007). Reniform Nematode, *Rotylenchulus reniformis* Linford and Oliveira (Nematoda: Tylenchida: Tylenchoidea: Hoplolaimidae: Rotylenchulinae). University of Florida, IFAS Extension, 1–5.
- Zúñiga, G., Ortiz, R., & Varón de Agudelo, F. E. (1979). Nematodos asociados con el cultivo del plátano (*Musa* AAB o ABB) en el Valle del Cauca. *Fitopatología Colombiana (Colombia)* v. 8 (2) p. 40-52 ISSN 0120-0143

