

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Caracterización morfológica,
morfométrica y molecular de
Pratylenchus y *Radopholus* en *Musa*
spp., en el eje cafetero y el Valle del
Cauca, Colombia**

Carlos Emiro Arboleda Riascos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Palmira, Colombia

2022

Caracterización morfológica, morfométrica y molecular de *Pratylenchus y Radopholus* en *Musa* spp., en el eje cafetero y el Valle del Cauca, Colombia

Carlos Emiro Arboleda Riascos

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Agropecuarias

Director:

Jaime Eduardo Muñoz Flórez, Ph.D.

Codirector:

Donald Heberth Riascos Ortiz, Ph.D.

Línea de Investigación:
Protección de Cultivos

Grupo de Investigación:
Diversidad Biológica

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Palmira, Colombia
2022

Dedicatoria

Dedico con todo mi corazón a mi hija Lauren Sofía Arboleda Valencia por ser quien me motiva cada día a cumplir mis propósitos. La amo, espero ser su apoyo hasta que Dios me lo permita. A mis padres por inculcarme valores y enseñarme a luchar para alcanzar mis metas. A mis hermanas por ese apoyo incondicional conmigo. A Eimy Paola Hinstroza S por siempre apoyarme y no dejarme desfallecer en este proceso.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Carlos Emiro Arboleda Riascos

24/Noviembre/2021

Agradecimientos

A mis padres, hermanas y Eimy Paola Hinestroza S por ese apoyo incondicional.

Al profesor Jaime Eduardo Muñoz Flórez, vinculado a la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, por permitirme hacer parte del grupo de investigación (diversidad biológica) así como por el apoyo y guía en la estructuración y ejecución de la propuesta de investigación. Siempre dispuesto a atender mis inquietudes y con su gestión y diligencia facilitó los procesos académicos, investigativos y administrativos para culminar con éxito esta investigación.

Al profesor Donald Heberth Riascos Ortiz, vinculado al programa de Agronomía de la Universidad del Pacífico, Buenaventura por sus invaluable aportes académicos y científicos durante la formulación y ejecución de esta propuesta, mostrando plena disposición siempre para atender y resolver mis inquietudes. Cada observación que me han hecho fueron recibidas de la mejor manera ya que tenían como único propósito ayudar a mi crecimiento académico – investigativo y como persona.

A la Doctora Francia Varón de Agudelo, docente del curso de Nematología agrícola para postgrado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, por enseñarme a identificar fitonemátodos, además por mostrarme la importancia de la Nematología agrícola y estar muy pendiente de la ejecución de esta propuesta dando aportes muy valiosos para culminar de la mejor manera esta investigación

A Paula Rúgeles y Jeison Eduardo García vinculados Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, por su orientación y apoyo brindado durante mi estancia en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. También, por ser unas personas muy diligentes, su experiencia y eficiencia permitió que la investigación no se para por algún trámite que se requirió en su momento.

A Francisco José Sánchez Marín por el soporte brindado para el análisis e interpretación estadística de los datos morfométricos registrados para los fitonemátodos *Pratylenchus* y *Radopholus* asociados a *Musa* spp.

A los productores de plátano y banano, quienes nos permitieron el ingreso y toma de muestra en sus agrosistemas de producción con la mejor disposición posible, siendo esto un eslabón fundamental en la ejecución de esta propuesta.

Al grupo de investigación en Diversidad Biológica y los compañeros del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira.

A Patricia Mosquera, estudiante de doctorado en Ciencias Agrarias, por su acompañamiento en la preparación de muestras de fitonematodos y análisis de Microscopía en el museo de historia natural de la Universidad del Cauca.

A los jurados evaluadores, por la disposición para evaluar la propuesta de investigación y los resultados de la misma. Sus recomendaciones y aportes fueron importantes para culminar de buena manera esta investigación.

Resumen

Caracterización morfológica, morfométrica y molecular de *Pratylenchus* y *Radopholus* en *Musa* spp., en el eje cafetero y el Valle del Cauca, Colombia.

Los nematodos fitoparásitos causan pérdidas entre 30 y 80% de la producción de plátano (*Musa* AAB Simmonds - Dominico Hartón) y banano (*Musa acuminata*) en campos altamente infestados. En las zonas de mayor producción de *Musa* en Colombia, su manejo fitosanitario ha sido limitado por el desconocimiento de las especies de nematodos presentes. Con el propósito de conocer las especies de *Pratylenchus* y *Radopholus* asociadas a cultivos de plátano y banano en los departamentos de Caldas, Quindío, y Valle del Cauca se colectaron muestras compuestas de raíces y suelo rizosférico de diferentes sistemas de producción. En el laboratorio de sanidad vegetal de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, los nematodos fueron extraídos por el método de Cobb modificado e identificados mediante análisis morfológico, morfométrico (mediciones de caracteres diagnósticos) y molecular (amplificación por PCR y secuenciación del segmento D2-D3 del ARN ribosomal y Citocromo oxidasa subunidad I [COI] del ADN mitocondrial para *Pratylenchus* e Internal Transcribed Spacer-ITS del ARN ribosomal para *Radopholus*). Los resultados mostraron, cinco poblaciones de *P. araucensis*, así: dos del Valle del Cauca, dos de Quindío y una de Caldas, lo cual indica que esta especie de nematodo, previamente reportada en Arauca (Colombia), se encuentra ampliamente distribuida en el país. Mediante pruebas moleculares, COI, las poblaciones se separaron por origen geográfico sugiriendo una amplia variabilidad intraespecífica. Este estudio reporta las primeras secuencias de COI para *P. araucensis* en el mundo. Por otro lado, tres poblaciones fueron identificadas como *R. similis*, (dos de Caldas y una de Quindío) confirmándose la presencia de esta especie de nematodo en las zonas estudiadas. A partir de esta información, a futuro podrán plantearse eficientes programas de manejo integrado para las especies identificadas.

Palabras clave: Plátano, banano, fitonematodos, morfometría, segmento D2-D3, COI e ITS.

Abstract

Morphological, morphometric and molecular characterization of *Pratylenchus* and *Radopholus* in *Musa* spp., In the coffee region and Valle del Cauca, Colombia.

Phytoparasitic nematodes cause losses between 30 and 80% of plantain (*Musa* AAB Simmonds - Dominico Hartón) and banana (*Musa acuminata*) production in highly infested fields. In the areas of greater production in Colombia, their phytosanitary management has been limited by the wide ignorance of the nematode species present. In order to know the *Pratylenchus* and *Radopholus* species associated with plantain and banana crops in the departments of Valle del Cauca, Caldas and Quindío, samples composed of roots and rhizospheric soil from different production systems were collected. In the laboratory, the nematodes were extracted by the modified Cobb method and identified by morphological, morphometric (measurements of diagnostic characteristics) and molecular analysis (PCR amplification and sequencing of the D2-D3 segment of ribosomal RNA and Cytochrome oxidase I subunit [COI] of mitochondrial DNA for *Pratylenchus* and Internal Transcribed Spacer-ITS of ribosomal RNA for *Radopholus*). According to the results, five populations were identified as *P. araucensis*, two from Valle del Cauca, two from Quindío and one from Caldas, which indicates that this nematode species, previously reported in Arauca (Colombia), is widely distributed in the country. Using molecular data, but especially COI, populations were separated by geographic origin suggesting wide intraspecific variability. This study reports the first COI sequences for *P. araucensis* in the world. On the other hand, three populations (two from Caldas and one from Quindío) were identified as *R. similis*, confirming the presence of this nematode species in the studied areas. Based on this information, efficient integrated management programs for the identified species may be proposed in the future.

Keywords: Plantain, banana, phytonmatodes, morphometry, D2-D3, COI, ITS.

Tabla de contenido

| | |
|--|----|
| Dedicatoria | 5 |
| Agradecimientos | 7 |
| Resumen | 10 |
| Abstract | 11 |
| Lista de gráficas | 14 |
| Lista de tablas | 15 |
| Introducción General | 16 |
| Objetivos | 20 |
| General: | 20 |
| Específicos: | 20 |
| Capítulo 1: identificación morfológica, morfométrica y molecular de <i>Pratylenchus araucensis</i> asociado a plantas de plátano y banano. | 21 |
| Introducción | 21 |
| 1.2.1 Localización | 23 |
| 1.2.2 Muestreo | 23 |
| 1.2.3 Extracción de fitonematodos de suelo y raíces | 24 |
| 1.2.4 Identificación de poblaciones de fitonematodos | 25 |
| 1.2.5 Análisis morfológico y morfométrico | 26 |
| 1.2.6 Análisis estadístico | 26 |
| 1.2.7 Análisis molecular | 26 |
| 1.2.8 Análisis filogenético | 27 |
| 1.3 Resultados | 28 |
| 1.3.1 Identificación morfológica y morfométrica de nematodos | 28 |
| 1.3.2. Identificación molecular | 34 |
| 1.3.3. Análisis filogenético | 35 |
| 1.4 Discusión | 40 |
| Capítulo 2: identificación morfológica, morfométrica y molecular de <i>Radopholus</i> asociado a plátano. | 46 |
| 2.1. Introducción | 46 |
| 2. 2 Materiales y métodos | 48 |
| 2.2.1. Muestreo y extracción de nematodos | 48 |

| | |
|---|----|
| | 49 |
| 2.2.2 Extracción de fitonematodos de suelo y raíces | 49 |
| 2.2.3 Identificación de poblaciones de fitonematodos | 50 |
| 2.2.4. Análisis morfológico y morfométrico | 51 |
| 2.2.5. Análisis estadístico | 51 |
| 2.2.6. Análisis molecular | 51 |
| 2.2.7. Análisis filogenético | 52 |
| 2.3 Resultados | 52 |
| 2. 3.1 Identificación morfológica y morfométrica de nematodos | 52 |
| 2.3.2 Identificación molecular | 60 |
| 2.3.3 Análisis filogenético | 60 |
| 2.4 Discusión | 63 |
| 3. Conclusiones | 66 |
| 4 Recomendaciones | 67 |
| 5 Bibliografía | 68 |
| 6 Anexos | 78 |

Lista de figuras

Figura 1-1. Ubicación geográfica de las zonas muestreadas, departamentos: Valle del Cauca, Quindío y Caldas. 25

Figura 1-2. *Pratylenchus araucensis*. A. Habitus *post-mortem* de una hembra, B y C. Región anterior del cuerpo de una hembra, D, E y F. Región media del cuerpo de una hembra. G y H. Región posterior del cuerpo de un macho. I, J y K. Región posterior del cuerpo de una hembra. v = Vulva, an = Ano, spc = Espícula. 30

Figura 1-3. Poblaciones de *P. araucensis* del eje cafetero y Valle del Cauca fueron asignadas a su especie correspondiente basado en datos morfométricos. Se muestran los dos primeros ejes del Análisis de Componentes Principales (PCA). Pa= *Pratylenchus araucensis*, Ara= Arauca, Za= Zabaletas, Del= Delfina, Cal= Caldas y B= Buenaventura. 33

Figura 1-4. Árbol filogenético obtenido mediante Máxima verosimilitud de la región parcial LSU de especies del género *Pratylenchus*. Los aislamientos correspondientes a este trabajo se encuentran señalados en negrilla. Los números sobre los nodos indican los valores de bootstrap > 70 %. *Belonolaimus longicaudatus* (MG422913) fue utilizado como grupo externo del árbol. 38

Figura 1-5. Árbol filogenético obtenido mediante Máxima verosimilitud de la región parcial COI de especies del género *Pratylenchus*. Los aislamientos correspondientes a este trabajo se encuentran señalados en negrilla. Los números sobre los nodos indican los valores de bootstrap > 70 %. *Mesocriconema xenoplax* (MG422913) fue utilizado como grupo externo del árbol. 39

Figura 2-1. ubicación geográfica de las zonas muestreadas, departamentos de Quindío y Caldas 49

Figura 2-2. *Radopholus similis*. A. Habitus *post-mortem* de un macho, B. Habitus *post-mortem* de una hembra, C. Región anterior del cuerpo de un macho, D y E. Región anterior del cuerpo de una hembra, F, G y L. Región media del cuerpo de una hembra, H, I y J. Región posterior, K. Región posterior del cuerpo de un macho. v = Vulva, an = Ano, spc = Espícula, bm= bulbo medio, sptc= espermateca. 53

Figura 2-3. Poblaciones de *R. similis* del eje cafetero fueron asignadas a su especie correspondiente basado en datos morfométricos. Se muestran los dos primeros ejes del Análisis de Componentes Principales (PCA). Rs= *Radopholus similis*, P= Palestina, Ara= Arauca, Cal= Caldas, M= Montelindo, Da= Donde Alfredo y Q= Quindío. 58

Figura 2-4. Árbol filogenético obtenido mediante máxima verosimilitud de la región parcial ITS de especies del género *Radopholus*. Los aislamientos correspondientes

a este trabajo se encuentran señalados en negrilla. Los números sobre los nodos indican los valores de bootstrap > 70 %. *Helicotylenchus asiaticus* (MN764345) fue utilizado como grupo externo del árbol.

Lista de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1-1. Ubicación de los sistemas de producción en los diferentes departamentos. | 25 |
| Tabla 1-2. Datos morfométricos (μm) de poblaciones estudiadas y de referencia de <i>P araucensis</i> | 32 |
| Tabla 1-3. Correlación de datos morfométricos – <i>Pratylenchus araucensis</i> | 33 |
| Tabla 1-4 Valores propios y varianza total para cada componente principal. | 34 |
| Tabla 1-5. Correlaciones entre los primeros tres componentes principales y los parámetros morfométricos de hembras de <i>P araucensis</i> | 35 |
| Tabla 1-6. Numero de accesiones como aparecen las secuencias de <i>P. araucensis</i> en el GenBank la región D2-D3 -LSU y COI | 37 |
| Tabla 2-1. Ubicación de los sistemas de producción en los diferentes departamentos. | 49 |
| Tabla 2-2 Datos morfométricos de poblaciones estudiados en esta investigación y poblaciones de referencias de <i>Radopholus (machos)</i> | 56 |
| Tabla 2-3 Datos morfométricos de poblaciones estudiados en esta investigación y poblaciones de referencias de <i>Radopholus (hembras)</i> | 57 |
| Tabla2-4. Matriz de correlaciones de datos morfométricos – <i>Radopholus similis</i> . | 58 |
| Tabla 2-5 Valores propios y varianza total para cada componente principal. | 60 |
| Tabla 2-6. Correlaciones entre los primeros dos componentes principales y los parámetros morfométricos de <i>R. similis</i> | 60 |
| Tabla 2-7. Identificación de accesiones como aparecen en las secuencias de <i>R. similis</i> en el GenBank para la región ITS | 61 |

Introducción General

El plátano (*Musa* AAB Simmonds - Dominico Hartón) y banano (*Musa acuminata*) tienen como centro de origen Papua Nueva Guinea, de donde fue dispersado a Europa y luego al continente americano (Caicedo, 2015). Actualmente, el plátano y banano están entre los cultivos agrícolas de mayor importancia en el mundo, con un volumen de producción anual que supera 39.000.000 t; entre las regiones más productivas se destacan África, Asia-Pacífico y la región caribe latinoamericana, las cuales aportan alrededor de 13.000.000 toneladas. En ese sentido, 120 países producen plátanos en regiones tropicales y subtropicales, entre los que se incluyen a Colombia con el tercer puesto en producción con 3.077.564 t, después de Uganda con 7.204.041 t y Filipinas con 3.224.059 t, y el primer lugar en volúmenes de exportación con 117.913 t (FAO, 2020).

De acuerdo con MADER (2018), los departamentos con mayor producción de *Musa* spp. son Arauca con 584.043 t, seguido por Antioquia (474.860 t), Meta (350.172 t), Valle del Cauca (342.462 t), Córdoba (304.687 t), Caldas (283.574 t) y Quindío (269.482 t). En estas zonas productoras, el plátano y banano son cultivados por pequeños agricultores, en los cuales se concentra el 87% de la producción, destinada para autoconsumo o comercialización en mercados locales y/o regionales, debido a que estos productos son una fuente de alimento básico para más de 400 millones de personas (CGIAR, 2014). El 13% restante de la producción mundial, especialmente banano, es obtenido en sistemas de producción tecnificados para comercialización en mercados internacionales (Roux et al., 2008). En países en vía de desarrollo (África occidental) la ingesta de alimentos a base de plátano y/o banano supera los 400 g/día. En Colombia, el consumo de estos productos se hace en diferentes presentaciones (patacones, cocido, colada etc.), en repetidas ocasiones en una misma semana (Riascos, 2019).

La producción de plátano y banano es afectada por insectos plaga y enfermedades. Entre las enfermedades más frecuentes e importantes por sus pérdidas potenciales

se incluyen a la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*), marchitamiento vascular (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4), moko del plátano (*Ralstonia solanacearum*) y aquellas ocasionadas por nematodos fitoparásitos (*Radopholus similis*, *Helicotylenchus multicinctus*, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *Pratylenchus araucensis*, *P. coffeae*, *P. goodeyi*, *P. speijeri* y *Rotylenchulus reniformis*) (Castaño y Guzmán, 2004 y 2007; Pandales & Mosquera, 2007; Castaño y Torrado, 2004 y 2009; Mayary & Castaño, 2009; Chagueza, 2011; Villegas, 1989; Múnera 2009; Riascos 2019). Aunque estos problemas fitosanitarios son importantes, en algunas zonas productoras, el principal problema son los nematodos fitoparásitos, incluso por encima de la sigatoka negra e insectos plagas como: el picudo negro (*Cosmopolites sordidus*), Picudo rayado y amarillo (*Metamasius hemipterus* y *Metamasius hebetatus*) (Speijer et al., 2001).

En cuanto a los nematodos fitoparásitos que infestan (o se alimentan) el sistema racial y el cormo del plátano y banano, se han documentado 43 géneros y 146 especies atacando estos cultivos, algunas de las cuales, como *Radopholus similis*, comparten centro de origen con las Musáceas y por lo tanto fueron dispersados desde su centro de diversificación a través de cormos (semilla asexual) hacia Europa y posteriormente a América (Palomares–Rius et al, 2014; Caicedo, 2015). Fuera de sus centros de origen, la presión de selección mediada por las condiciones ambientales y las prácticas agrícolas, principalmente, han estado asociadas a eventos recientes de especiación (Palomares – Rius et al, 2014).

En cultivos de plátano y banano los nematodos fitoparásitos pueden ocasionar pérdidas entre 20 y 80% en plantaciones con 3 – 5 años de edad, especialmente en agrosistemas con presencia de cultivares susceptibles, condiciones agroecológicas favorables y altos niveles poblacionales de nematodos fitoparásitos (Araya, 2004; Guzmán, 2011). De acuerdo con Tripathi et al. (2015) y Moens et al. (2006), la presencia de nematodos fitoparásitos en niveles poblacionales altos afecta drásticamente el sistema de raíces de las *Musáceas*, y en consecuencia se reduce el área foliar y el tamaño del racimo. Un buen racimo de un cultivar comercial de banano (*Musa* AAA) consiste de ocho manos de quince dedos, cada uno con un

peso promedio de 150 g y un peso de racimo de 20 Kg (Roux et al., 2008). Sin embargo, en presencia de fitonematodos como *R. similis*, con niveles poblacionales de 3000 individuos/100 g de raíces, el peso del racimo se reduce potencialmente en un 47% (Tripathi et al., 2015).

Diferentes estudios taxonómicos de poblaciones de nematodos asociadas a cultivos de plátano y banano han sido realizados en Colombia, destacándose los realizados por Múnera (2008), Riascos et al (2019) y Guzmán et al. (2021), en los cuales se reportaron las especies *Meloidogyne incógnita*, *M. arenaria*, *M. acrita* y *M. hispanica* mediante análisis morfológico, morfométrico, bioquímico y molecular. Barriga y Cubillos (1980) reportaron a *Pratylenchus coffeae* en plantaciones de *Musa* spp. de Santa Marta, Urabá, zona cafetera (Quindío) y Caquetá, sin embargo, este estudio carece de registros morfométricos y moleculares. Múnera et al. (2008, 2009 y 2010), registraron mediante soporte morfológico, morfométrico y molecular las especies *Radopholus similis* y *Pratylenchus araucensis* en algunas zonas productoras de Arauca, La Tebaida, Magdalena y Carepa. Recientemente Riascos et al. (2021), a partir de muestras recolectadas en el eje cafetero y Valle del Cauca encontraron que la distribución de los géneros *Radopholus* y *Pratylenchus* estuvo restringida a algunas zonas productoras, sin embargo, no reportaron las especies de estos géneros presentes en estas regiones; Estos mismos autores en el trabajo mencionaron que en estas zonas de estudio los géneros con mayores frecuencias fueron: *Meloidogyne*, *Helicotylenchus*, *Rotylenchulus*, *Radopholus* y *Pratylenchus* sin embargo no se realizó la identificación hasta nivel de especie para los dos últimos géneros.

Con el propósito de conocer las especies de *Pratylenchus* y *Radopholus* asociadas a cultivos de plátano y banano del eje cafetero y el departamento Valle del Cauca, mediante análisis morfológico, morfométrico y molecular, se planteó el siguiente objetivo general: Identificar a nivel morfológico, morfométrico y molecular las especies de *Pratylenchus* y *Radopholus* asociadas a *Musa* spp. en el eje cafetero y el Valle del Cauca.

Objetivos

General:

Identificar mediante análisis morfológico, morfométrico y molecular las especies de *Pratylenchus* y *Radopholus* asociadas a *Musa* spp. en el eje cafetero y el Valle del Cauca.

Específicos:

1. Establecer la identidad taxonómica de las especies de *Pratylenchus* y *Radopholus* mediante análisis morfológicos y morfométricos.
2. Determinar molecularmente las especies de *Pratylenchus* y *Radopholus* basado en ADNr y ADNmt.
3. Conocer las posiciones y relaciones evolutivas de las especies de *Pratylenchus* y *Radopholus* en *Musa* spp. a partir de diferentes métodos filogenéticos.

Capítulo 1: Identificación morfológica, morfométrica y molecular de poblaciones de *Pratylenchus* asociadas a *Musa* AAB (subgrupo plátano) y *Musa* AAA (subgrupo Cavendish).

Introducción

Pratylenchus es un fitonematodo limitante de la producción de cultivos agrícolas económicamente importantes en zonas tropicales y subtropicales del mundo, incluidos el plátano y el banano. El hábitat alimenticio del nematodo es endoparásito migratorio y en estos cultivos afecta raíces y rizomas, donde causa diferentes síntomas (Sasser y Freckman, 1987; Múnera, 2009 y Castillo y Vovlas, 2007).

Los síntomas inducidos por este patógeno van desde reducción del sistema de raíces, retraso del crecimiento, disminución del peso del racimo, alargamiento del ciclo productivo y volcamiento de las plantas además de necrosis causada en las raíces lo anterior toda vez que el nematodo ingresa a las células y penetra de manera intracelular e intercelular (De Luca et al., 2012). Las pérdidas causadas por *Pratylenchus* están alrededor del 15% y aumentan considerablemente en plantaciones de más de 3 años y con poco manejo agronómico (Castillo y Vovlas, 2007).

El ciclo de vida de nematodos del género *Pratylenchus* en *Musa* spp. es de aproximadamente 30 días a temperatura entre 25-30°C (Bridge et al, 1997) e inicia cuando las hembras depositan los huevos de manera individual o en pequeños grupos (4-8 huevos) al interior o muy cerca al exterior de las raíces. Posteriormente, el segundo estado juvenil eclosiona del huevo, el cual sufre tres mudas adicionales hasta alcanzar el estado adulto. Contrario a otros géneros de nematodos (*Radopholus* y *Meloidogyne*), todos los estados fuera del huevo son infectivos (J2, J3, J4 y adulto). Aunque existe poca información referente a la duración precisa de los ciclos de vida de *Pratylenchus*, en condiciones de laboratorio se han probado varias combinaciones entre nematodos y hospederos. En el trébol rojo, *P. penetrans*

completó una generación en 54-65 días y produjo 16-35 huevos por hembra a una tasa de 1-2 huevos por día (Turner y Chapman, 1972; Castillo y Vovlas, 2007). El ciclo de vida completo de *P. vulnus* fue estudiado por Chitimbar y Raski (1985) en discos de zanahoria bajo condiciones controladas, con una duración de 3-4 semanas.

El género *Pratylenchus* alberga más de 68 especies (Castillo y Vovlas, 2007). Las especies del género *Pratylenchus* reportadas en cultivos de plátano y banano son: *P. araucensis*, *P. speijeri*, *P. coffeae* y *P. goodeyi* (Backiyarani et al., 2014.; Luambano et al, 2019.; Moens et al, 2005.; Handoo et al, 2021.; Múnera, 2009.; De Luca et al, 2012.; Bridge et al, 1997.; Souza, 2008.; Castillo y Vovlas, 2007. y Múnera, 2009). De estas especies, en Colombia se han registrado a *P. coffeae* (Santa Marta, Urabá, zona cafetera [Quindío] y Caquetá) (Barriga y Cubillos, 1980) y *P. araucensis* (Arauca, La Tebaida, Magdalena y Carepa), de las cuales solo existen registros morfométricos y moleculares para la última especie (Múnera et al., 2009).

Basado en el reporte de Barriga y Cubillos (1980), en Colombia existe una tendencia generalizada a asociar la presencia de *Pratylenchus* en plátano y banano con la especie *P. coffeae*. Estos juicios a priori pueden llevar a un mal diagnóstico de poblaciones del nematodo, debido a que morfológica y morfométricamente, *P. coffeae* presenta similitud para diferentes caracteres diagnósticos con *P. araucensis*, *P. loosi* y *P. jaehni* (Duncan et al. 1999; Múnera, 2009). Las similitudes entre *P. coffeae*, *P. araucensis*, *P. loosi* y *P. jaehni*., se pueden observar respectivamente en el valor promedio de algunos caracteres diagnóstico para los cuales hay solapamiento (overlap), como posición de la vulva (80.5, 77.3, 80.2 y 78.4%), longitud total del cuerpo (601.9, 500.8, 521.7 y 488.4 μm), longitud del estilete (16.9, 13.5, 16.1 y 14.5 μm), ancho máximo del cuerpo (19.5, 18.6, 18.1, 20.2 μm), diámetro del cuerpo en la región anal (13.2, 12.1, 12.1, 13.0 μm), índice c (20.9, 18.8, 18.3 y 19.2 μm) e índice a (28.7, 26.4, 24.7 y 20.7).

Para un manejo eficiente de poblaciones de *Pratylenchus* es indispensable realizar una correcta identificación hasta nivel de especie. La identificación de especies de *Pratylenchus* es una tarea difícil debido al solapamiento entre especies de los registros de De Man (Castillo y Vovlas, 2007 y Múnera, 2009). Por lo anterior, es recomendado la identificación de especies de *Pratylenchus* mediante taxonomía integrativa mediante el registro de características: 1) morfológicas como: forma de la cola, forma de la región anterior, forma de la espermateca. 2) morfométricas como: longitud del estilete, posición de la vulva, longitud total de los nematodos, diámetro máximo del cuerpo, diámetro del cuerpo a la altura del ano, longitud de la cola, longitud del saco post uterino entre otros. 3) moleculares como: región LSU y COI (Luc, 1987; Anderson y Townshend, 1980; Corbett y Clark, 1982; Inserra et al., 1996, 1998, 2001, 2007; Rashid y Khan, 1976; Roman y Hirschmann, 1969; Tarjan y Frederick, 1978; Tarté y Mai, 1976a, 1976b; Taylor y Jenkins, 1957; Loof, 1991; Múnera, 2009).

Aunque el género *Pratylenchus* ha sido reportado en cultivos de plátano y banano del eje cafetero y el Valle del Cauca, a la fecha no existen datos morfométricos y moleculares que soporten la identidad taxonómica de la mayoría de especies reportadas en el pasado. En ese sentido, los objetivos de esta investigación fueron: (i) identificar poblaciones de *Pratylenchus* en el Eje Cafetero y Valle del Cauca mediante análisis morfológico, morfométrico y molecular, (ii) conocer la diversidad intraespecífica de las poblaciones de *Pratylenchus* identificadas, a partir de datos moleculares, y (iii) Conocer las relaciones evolutivas de las poblaciones analizadas basado en el segmento D2-D3 del ARNr y COI del ADNmt.

1.2 Materiales y métodos

1.2.1 Localización

El estudio se realizó en diferentes zonas productoras de plátano y banano de los departamentos de Valle del Cauca (Buenaventura), Quindío (Calarcá) y Caldas (Palestina) (Figura 1-1). El procesamiento de muestras se realizó en los laboratorios de Microbiología y Sanidad Vegetal y de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira.

1.2.2 Muestreo

Un total de 9 Muestras compuestas de suelo rizosférico y raíces de cultivos de plátano y banano con edades entre 3 – 5 años fueron colectadas, tres en el departamento de Valle del Cauca (en el municipio de Buenaventura), tres en el departamento de Caldas (en el municipio de Palestina), y tres en el departamento de Quindío (en el municipio de Calarcá) mediante recorridos en zig-zag, donde una muestra estaba conformada por submuestras de 15-20 plantas/ha de aproximadamente un kilogramo. Las muestras se recolectaron en tres puntos equidistantes entre 20-30 cm de distancia del pseudotallo, y entre 0-30 cm de profundidad, el material colectado fue empacado, rotulado y posteriormente llevado al laboratorio para su análisis (Ravichandra, 2014).

Tabla 1-1. Ubicación geográfica, altitudinal, temperatura promedio, precipitación anual y especies vegetales muestreadas en los municipios de los departamentos del Valle del Cauca, Quindío y Caldas.

| Departamento | Municipio | Latitud | Longitud | msn m | Temperatura (°C) | Precipitación / año (mm) | Especies y variedad de <i>Musa</i> |
|-----------------|--------------|---------------|----------------|----------|---------------------|-----------------------------|---|
| Valle del Cauca | Buenaventura | 3°45'15.71" N | 76°58'21.61" O | 10 | 26 | 9000 | (<i>Musa</i> AAB Simmonds) Dominico Hartón |
| Valle del Cauca | Buenaventura | 3°35'19.51" N | 76°18'06.22" O | 85 | 26 | 9000 | (<i>Musa</i> AAB Simmonds) Dominico Hartón |
| Caldas | Palestina | 4°58'01.56" N | 75°35'36.75" O | 1050 | 18 | 2859 | (<i>Musa</i> AAB Simmonds) Dominico Hartón |
| Quindío | Calarcá | 4°31'46.20" N | 75°37'17.96" O | 1573 | 19 | 2500 | (<i>Musa</i> AAB Simmonds) Dominico Hartón |
| Quindío | Calarcá | 4°31'46.20" N | 75°37'17.96" O | 1573 | 19 | 2500 | Banano |

Departamentos: Valle del Cauca, Quindío y Caldas

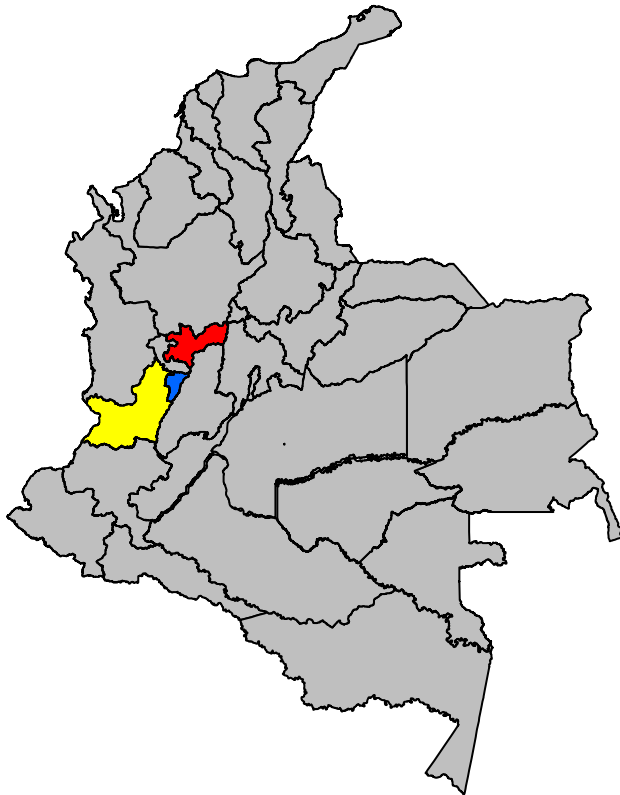


Figura 1-1. Ubicación geográfica de los municipios muestreados en los departamentos del Valle del Cauca, Quindío y Caldas.

1.2.3 Extracción de fitonematodos de suelo y raíces

Los fitonemátodos fueron extraídos de suelo y raíces a través de las técnicas resumidas por Varón y Castillo (2001) y Ravichandra (2014):

1) En relación al método de tamizaje y decantación de Cobb modificado (agitación, filtración y decantación), Ravichandra (2014) y Varón y Castillo (2001) afirman que:

Para la recuperación de nematodos parásitos de plantas vivos y móviles, se suspendieron 100 cc de suelo en 1,5 L de agua y se homogenizó por un lapso de 5 minutos. La suspensión se dejó reposar durante 10 segundos y transcurrido este tiempo se filtró en una columna de tamices de 30, 270, 325 y 400 mesh. El suelo retenido en los tamices 325 y 400 mesh se re-suspendió

en 100 cc de agua. Posteriormente, la suspensión se colocó sobre una capa de papel filtro contenido en un tamiz de decantación de 20 mesh. Para finalizar, el tamiz de decantación con el suelo se colocó sobre un plato de decantación, al cual se le adicionó 200 cc de agua aproximadamente hasta cubrir superficialmente el suelo y se dejó en reposo durante 48 horas.

2) Para la extracción de nematodos en raíces se siguió la metodología (maceración o de licuadora) propuesta por Ravichandra (2014) y Varón y Castillo (2001).

Para extraer fitonematodos endoparásitos migratorios y sedentarios, a las raíces colectadas se le retiraron las partículas de suelo, después, las raíces se fraccionaron en sesiones de 1-2 cm de longitud, para luego tomar 10 g para ser suspendidos y licuados en un volumen de 50 cc de agua por espacio de 30s intermitentemente por cinco veces. La suspensión resultante se pasó por una columna de tamices de 30, 270, 325 y 400 mesh. Las raíces retenidas en los tamices 325 y 400 mesh se re-suspendieron en 100 cc de agua. Posteriormente, la suspensión se colocó sobre una capa de papel filtro contenido en un tamiz de decantación. Finalmente, el tamiz de decantación con las raíces se colocó sobre un plato de decantación, el cual se llenó con un volumen de agua de 200 cc aproximadamente hasta cubrir superficialmente los fragmentos de raíces y se dejó en reposo durante 48 horas.

1.2.4 Análisis morfológico y morfométrico

Los nematodos fitoparásitos extraídos e identificados como *Pratylenchus* basados en caracteres morfológicos fueron sometidos a 60°C por cuatro minutos y posteriormente fijados en formalina al 2%. después, para cada población se realizaron preparaciones semipermanentes de al menos 14 hembras y datos morfométricos fueron registrados de acuerdo con (Castillo y Vovlas, 2007) y (Múnera, 2009), así: L = longitud total del cuerpo, a = longitud total del cuerpo

dividida por el diámetro máximo del cuerpo, c = longitud total del cuerpo dividida por la longitud de la cola, c' = longitud total del cuerpo dividida por el diámetro del cuerpo en región anal, $V\%$ = posición de la vulva, DEGO = orificio de la glándula esofágica dorsal, longitud del estilete(μm), número de anillos de la cabeza, longitud de la cola (μm), presencia o ausencia de machos, forma de la espermateca y forma de la cola. Se tomaron microfotografías de los especímenes usando un microscopio compuesto equipado con Contraste Diferencial de Interferencia (DIC), marca Nikon modelo 80i y sistema de captura de imágenes Nis elements.

1.2.5 Análisis estadístico

Los datos morfométricos registrados en este estudio y otros tomados de literatura para comparar nuestros datos con datos de referencias (Munera, 2009; De Luca et al, 2012; Kolombia et al, 2020) fueron tratados estadísticamente mediante Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés), análisis de correlación y análisis de conglomerados para determinar agrupamientos y caracteres diagnósticos que puedan discriminar especies, usando el paquete estadístico SAS, versión 9.4.

1.2.6 Análisis molecular

Para la extracción de ADN de los fitonematodos se utilizó el protocolo propuesto por Riascos et al. (2019). Para lo cual un solo espécimen fue cortado y transferido a un tubo con 15 μL de buffer de lisis (50 Mm KCl, 10 Mm Tris pH 8,3; 2,5 Mm MgCl_2 ; 0,45% NP 40; 0,45% Tween - 20; 60 $\mu\text{g ml}^{-1}$ proteinasa K). Posteriormente, el tubo fue incubado a -80°C (15 minutos), 65°C (1 hora) y a 95°C (15 minutos). Transcurridos estos tiempos, el tubo se centrifugó (16000 revoluciones/1 minuto) y se almacenó a -20°C . Mediante PCR la región D2 - D3 de la Subunidad grande (LSU) del ADN ribosomal (28S) fue amplificada usando primers D2A (forward, 5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3') y D3B (reverse, 5'-TCCTCGGAAGGAACCAGCTACTA-3'), como también la región Citocromo oxidasa

subunidad I del ADN mitocondrial (COI) usando los primers JB3 (forward, 5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3') y JB4.5 (reverse, 5'-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3'). Las condiciones de PCR fueron 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C por 40 ciclos para la región D2-D3y 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 54°C y 1 minuto a 72°C por 40 ciclos para COI. Los productos de PCR fueron secuenciados en ambas direcciones por BIONEER Korea.

1.2.7 Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas fueron editadas y los consensos construidos mediante el programa BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999). Después de depuradas las secuencias, su identidad se confirmó comparándolas con la base de datos del GenBank, empleando el software BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Posteriormente, las secuencias presentadas bajo los números de acceso en la Tabla 1-6 y 1-7 fueron alineadas, analizadas y editadas manualmente con la ayuda del programa MEGA6 (Tamura et al., 2013). Con base en la matriz obtenida para las dos regiones utilizadas (LSU y COI), fue posible determinar el modelo de sustitución de nucleótidos, teniendo en cuenta el Criterio de Información Bayesiana (BIC) mediante el software Model Generator v.0.851 (Keane et al., 2006). El análisis filogenético se determinó mediante el método de máxima verosimilitud (ML) empleando el modelo de Kimura 2 parámetros, y la confiabilidad interna de los nodos fue determinada utilizando el método de bootstrap con 1000 interacciones. Como grupo externo del árbol filogenético de la región parcial COI se empleó la especie *Mesocriconema xenoplax* (MG422913) y para la región LSU la especie *Belonolaimus longicaudatus* (KF963100).

1.3 Resultados

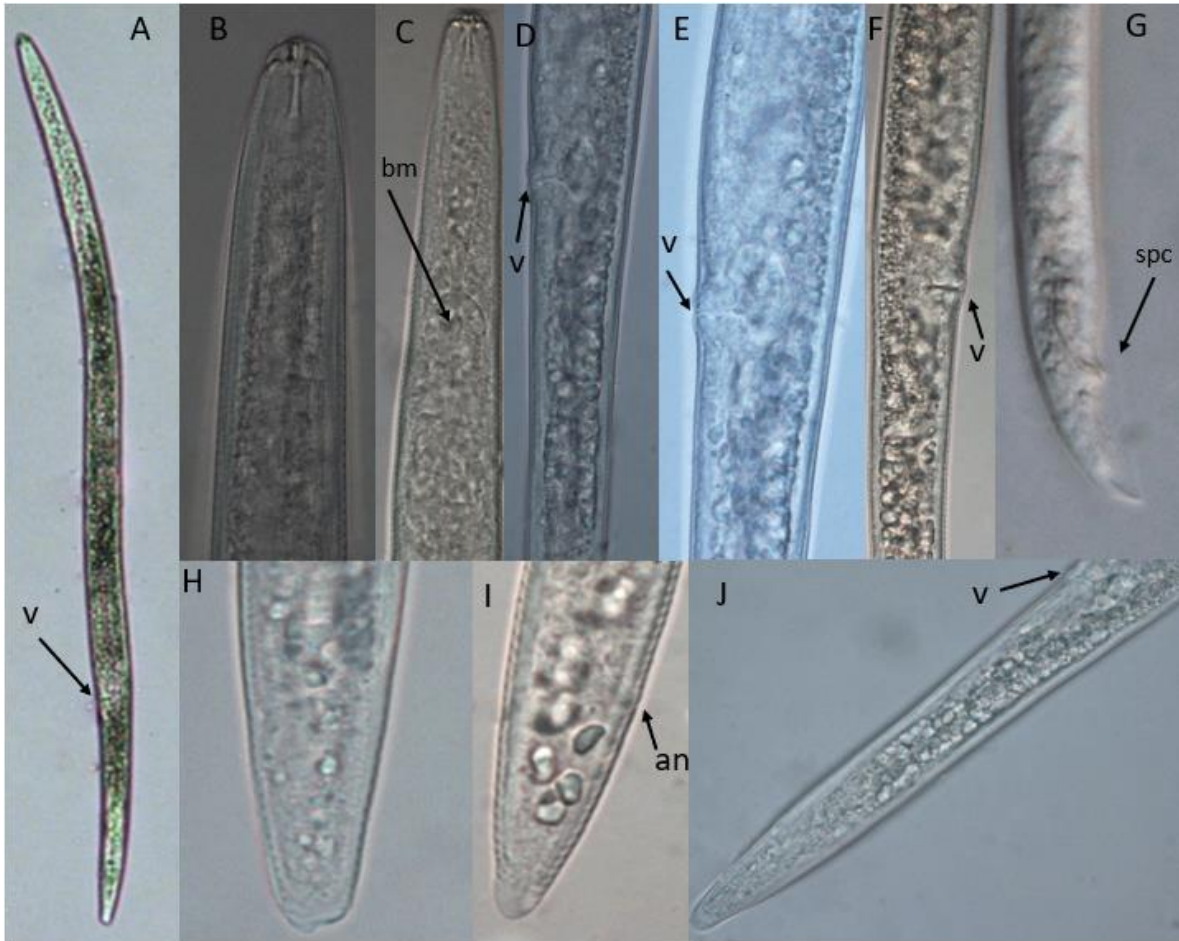
1.3.1 Identificación morfológica y morfométrica de nematodos

Cinco poblaciones de *Pratylenchus*, cuatro de plátano de *Musa* AAB Palestina (Caldas), Calarcá (Quindío), Buenaventura (Zabaletas y La delfina) (Valle del Cauca), y una de banano *Musa* BBB de Calarcá (Quindío), fueron identificadas como *Pratylenchus araucensis*. Los registros morfológicos y morfométricos tuvieron correspondencia con los datos reportados para las poblaciones tipo y de referencia de dicha especie (Tablas 1-2).

Las Poblaciones de *P. araucensis*, se caracterizaron por presentar hábito posterior a ser inmovilizados vermiforme (Figura1-2), región labial aplanada- achatada, perillas basales del estilete redondas y aplanadas, espermateca redonda, cola espatulada y presencia de machos.

En la Tabla 1-3 se presenta la matriz de correlación de datos morfométricos de las poblaciones analizadas, observándose que la longitud del saco postuterino (μm), longitud del orificio de la glándula dorsal esofágica (μm), longitud total de los fitonematodos (μm), longitud cola (μm), ancho máximo cuerpo (μm) y ancho del cuerpo en región anal (μm) tienen una correlación directa con la longitud del estilete; del mismo modo se observó una correlación directamente proporcional entre la longitud saco postuterino (μm) con los siguientes caracteres: longitud total (μm), longitud cola (μm), ancho máximo del cuerpo (μm) y ancho del cuerpo a nivel del ano (μm); por el contrario no se evidenció correlación entre caracteres como Posición Vulva (%) y el la longitud saco postuterino (μm).

Figura 1-2. Características morfológicas de *Pratylenchus araucensis*.



A. hábito posterior a ser inmovilizados de una hembra (10x), B y C. Región anterior del cuerpo de una hembra (100 y 40x respectivamente), D, E y F. Región media del cuerpo de una hembra (100, 100 y 40x respectivamente). G y H. Región posterior del cuerpo de un macho (40 y 100x respectivamente). I y J. Región posterior del cuerpo de una hembra (100 y 40x respectivamente). v = Vulva, an = Ano, spc = Espícula, bm= bulbo medio.

Tabla 1-2. Datos morfométricos (μm) de poblaciones estudiadas en este estudio y de referencia de *Pratylenchus araucensis*.

| | <i>P araucensis</i> (propias) | <i>P araucensis</i> (propias) | <i>P araucensis</i> (propias) | <i>P araucensis</i> (propias) | <i>P araucensis</i> (propias) | <i>P araucensis</i> (Múnera, 2009) |
|-------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| | <i>Musa</i> AAB (subgrupo plátano) | <i>Musa</i> AAB (subgrupo plátano) | <i>Musa</i> AAB (subgrupo plátano) | <i>Musa</i> AAB (subgrupo plátano) | <i>Musa</i> BBB (subgrupo banano) | <i>Musa</i> |
| | Zabaletas - Buenaventura | Delfina - Buenaventura | Caldas - Colombia | Calarcá - Quindío | Calarcá - Quindío | Arauca - Colombia |
| Caracteres | n = 19 | n = 14 | n = 19 | n=15 | n=10 | n = 40 |
| L | 456 \pm 24,0 (401,2 – 496,3) | 501,8 \pm 56,0 (449,3 – 668,7) | 484,5 \pm 24,7 (444,4 – 538,0) | 549,2 \pm 13,9(518,4-578,3) | 551,3 \pm 13,5 (534,7-570,4) | 462 \pm 31 (376 - 511) |
| a | 26,3 \pm 2,1 (20 - 29,8) | 28,2 \pm 1,9 (23,5 - 31) | 29,9 \pm 2,0 (23,0 - 32,8) | 25,2 \pm 1,3 (21,6-26,9) | 24,8 \pm 1,4 (21,6-26,3) | 23,9 \pm 2,3 (19,6 - 29,2) |
| b | 5,8 \pm 1,0 (4,7 - 7,0) | 6,1 \pm 0,7 (5,1 - 6,9) | 6,4 \pm 0,5 (4,9- 7,3) | 6,2 \pm 1,7 (5,1- 7,4) | 6,7 \pm 1,4 (5,5- 7,7) | 6,2 \pm 0,6 (4,8 - 7,8) |
| b' | 4,4 \pm 0,6 (4,0 - 5,7) | 4,7 \pm 0,2 (3,7 - 6,0) | 4,3 \pm 0,5 (3,7 - 5,2) | 4,1 \pm 0,8 (3,7 - 5,0) | 4,5 \pm 1,0 (4,0 - 4,9) | 4,7 \pm 0,4 (3,6 - 5,9) |
| c | 17,3 \pm 1,2 (14,1 - 22,3) | 18,2 \pm 1,5 (14,9 - 21,8) | 18,9 \pm 1,3 (15,2 - 23,4) | 18,3 \pm 1,0 (16,7-20,2) | 17,5 \pm 0,4 (16,6-18,0) | 17,6 \pm 1,4 (14,5 - 21,1) |
| c' | 2,3 \pm 0,5 (1,4 - 2,8) | 2,5 \pm 0,4 (1,7 - 3,0) | 2,6 \pm ,02 (1,9 - 3,1) | 2,1 \pm 0,1 (2,0-2,3) | 2,2 \pm 0,1 (2,1-2,5) | 2,3 \pm 0,3 (1,7 - 2,9) |
| V% | 76,7 \pm 1,8 (73,9 – 80,1) | 77,6 \pm 1,1 (75,7 – 79,4) | 80,1 \pm 1,6 (76,5 – 83,6) | 76,5 \pm 1,95 (72,9-81,4) | 74,7 \pm 0,6 (74,0-75,9) | 78 \pm 1,2 (75-80) |
| estilete | 12,1 \pm 0,6 (11,1 – 13,1) | 12,6 \pm 1,1 (10,7 – 14,0) | 11,9 \pm 0,6 (10,6 – 12,9) | 14,4 \pm 0,4 (13,5-14,9) | 14,7 \pm 0,4 (14,2-15,6) | 15,3 \pm 0,4 (14,7 - 15,9) |
| Long cola | 26,3 \pm 2,0 (20,9 -29,6) | 27,5 \pm 1,8 (24,0 – 31,1) | 25,7 \pm 1,8 (22,0 – 29,4) | 30,1 \pm 2,0 (27,1-34,6) | 31,5 \pm 0,8 (30,2-32,7) | 26,3 \pm 2,5 (21,5 - 31,9) |
| Vulva | 349,9 \pm 23,6 (296,3 - 388,5) | 389,9 \pm 44,2 (351,2 - 516,3) | 388,1 \pm 21,1 (360,2 - 428,6) | 419,8 \pm 10,1 (394,6-433,1) | 411,7 \pm 9,8 (399,2-425,3) | 359 \pm 24,4 (298 -401) |
| DGO | 2,8 \pm 0,6 (2,3 – 4,1) | 2,9 \pm 0,5 (2,1 – 3,6) | 2,6 \pm 0,4 (2,0 – 3,2) | 2,3 \pm 0,1 (2,1-2,5) | 2,5 \pm 0,1 (2,3-2,6) | 2,7 \pm 0,4 (1,8 - 3,1) |
| Diámetro máximo | 16,7 \pm 1,5 (13,7 – 19,7) | 17,8 \pm 2,0 (14,0 – 20,5) | 15,7 \pm 1,2 (12,3 – 17,2) | 21,8 \pm 1,4 (20,5-26,0) | 22,3 \pm 1,3 (21,2-24,7) | 17,0 \pm 1,8 (13,5 - 20,9) |
| Diámetro - ano | 11,1 \pm 0,8 (9,7 – 12,5) | 11,6 \pm 0,9 (10,0 – 13,2) | 10,2 \pm 0,8 (9,0 – 11,5) | 14,1 \pm 0,6 (13,1-15,2) | 14,1 \pm 0,6 (13,2-14,8) | 11,4 \pm 1,5 (8,6 - 17,2) |
| No anillos R cefálica | 2,0 \pm 0,0 (2,0 -2,0) | 2,0 \pm 0,0 (2,0 -2,0) | 2,0 \pm 0,0 (2,0 -2,0) | 2,0 \pm 0,0 (2,0 -2,0) | 2,0 \pm 0,0 (2,0 -2,0) | |
| Ancho región labial | 6,1 \pm 0,5 (4,7 – 6,8) | 7,1 \pm 0,9 (5,6 – 9,1) | 6,3 \pm 0,5 (5,5 – 7,3) | 8,2 \pm 0,4 (7,7-8,9) | 8,1 \pm 0,3 (7,5-8,5) | 7,2 \pm 0,3 (6,7 - 7,4) |
| Alto región labial | 2,5 \pm 0,6 (1,5 – 3,6) | 2,8 \pm 0,3 (2,3 – 3,2) | 2,5 \pm 0, 4(1,8 – 3,1) | 2,1 \pm 0,2 (1,8-2,4) | 2,4 \pm 0,2 (1,9-2,6) | 2,5 \pm 0,7 (2,0 - 4,0) |
| Long lóbulo - glándula | 35,7 \pm 5,3 (25,8 – 45,7) | 31,7 \pm 1,4 (30,1 – 34,4) | 32,8 \pm 4,7(24,0 – 39,2) | 28,6 \pm 3,6 (24,1-33,8) | 40,5 \pm 1,1 (38,9-42,2) | 24,2 \pm 7,7 (10,4 - 46,6) |
| Long sac post uterino | 18,5 \pm 5,5 (8,4 – 27,3) | 31,2 \pm 1,6 (29,8 – 33,2) | 24,5 \pm 4,8(14,8 – 32,0) | 29,6 \pm 0,8 (28,6-31,4) | 30,4 \pm 1,2 (28,8-32,0) | 18,1 \pm 4,0 (9,8 - 24,5) |

Mediciones en μm ; promedio \pm s.d. (desviación estándar) y (rango).

Tabla 1-3. Correlación de caracteres morfométricos – *Pratylenchus araucensis*

| Variables | Long Estilete (µm) | Posición Vulva (%) | Longitud Saco Postuterino (µm) | Longitud orificio Glándula Dorsal Esofágica (µm) | Longitud Total (µm) | Longitud Cola (µm) | Ancho Máximo Cuerpo (µm) | Ancho Cuerpo Ano (µm) | Orificio Glándula Dorsal Esofágica (µm) | Longitud Región Cefálica (µm) | Ancho Región Cefálica (µm) | Índice a (µm) | Índice b (µm) | Índice c(µm) | |
|--|--------------------|--------------------|--------------------------------|--|---------------------|--------------------|--------------------------|-----------------------|---|-------------------------------|----------------------------|-----------------|----------------|--------------|--|
| Longitud Estilete (µm) | 1,000 | | | | | | | | | | | | | | |
| Posición Vulva (%) | -0,186 0,291 | 1,000 | | | | | | | | | | | | | |
| Longitud Saco Postuterino (µm) | 0,577 0,000 | -0,261 0,136 | 1,000 | | | | | | | | | | | | |
| Longitud Lóbulo Glándula Dorsal Esofágica (µm) | 0,437 0,010 | -0,396 0,021 | 0,185 0,296 | 1,000 | | | | | | | | | | | |
| Longitud Total (µm) | 0,825 0,000 | -0,258 0,141 | 0,753 0,000 | 0,247 0,159 | 1,000 | | | | | | | | | | |
| Longitud Cola (µm) | 0,637 0,000 | -0,596 0,000 | 0,743 0,000 | 0,390 0,023 | 0,781 0,000 | 1,000 | | | | | | | | | |
| Ancho Máximo Cuerpo (µm) | 0,669 0,000 | -0,676 0,000 | 0,634 0,000 | 0,414 0,015 | 0,723 0,000 | 0,785 0,000 | 1,000 | | | | | | | | |
| Ancho Cuerpo Ano (µm) | 0,748 0,000 | -0,567 0,001 | 0,628 0,000 | 0,381 0,026 | 0,748 0,000 | 0,713 0,000 | 0,902 0,000 | 1,000 | | | | | | | |
| Orificio Glándula Dorsal Esofágica (µm) | -0,093 0,602 | -0,010 0,955 | -0,274 0,117 | 0,145 0,413 | -0,221 0,209 | -0,073 0,683 | -0,345 0,046 | -0,295 0,090 | 1,000 | | | | | | |
| Longitud Región Cefálica (µm) | -0,225 0,202 | 0,081 0,649 | -0,012 0,948 | -0,224 0,202 | -0,199 0,259 | -0,087 0,625 | -0,213 0,227 | -0,153 0,389 | 0,197 0,264 | 1,000 | | | | | |
| Ancho Región Cefálica (µm) | 0,003 0,985 | -0,615 0,000 | 0,458 0,006 | 0,228 0,195 | 0,342 0,047 | 0,551 0,001 | 0,537 0,001 | 0,438 0,010 | -0,408 0,017 | -0,118 0,505 | 1,000 | | | | |
| Índice a (µm) | -0,479 0,004 | 0,640 0,000 | -0,309 0,075 | -0,428 0,012 | -0,288 0,099 | -0,484 0,004 | -0,814 0,000 | -0,719 0,000 | 0,178 0,314 | 0,052 0,770 | -0,203 0,250 | 1,000 | | | |
| Índice b (µm) | 0,230 0,190 | -0,289 0,098 | 0,313 0,072 | 0,032 0,858 | 0,376 0,028 | 0,277 0,112 | 0,390 0,023 | 0,194 0,271 | -0,195 0,268 | -0,192 0,276 | 0,156 0,378 | -0,210 0,234 | 1,000 | | |
| Índice c(µm) | 0,045 0,800 | 0,623 0,000 | -0,240 0,172 | -0,244 0,164 | 0,015 0,932 | -0,604 0,000 | -0,323 0,063 | -0,173 0,327 | -0,167 0,347 | -0,114 0,522 | -0,438 0,010 | 0,373 0,030 | 0,016 0,928 | 1,000 | |

El análisis multivariado mostró que las poblaciones de *P. araucensis* del Valle del Cauca, Caldas y Quindío se agruparon en un mismo clúster con la población tipo de referencia de la misma especie del departamento de Arauca – Colombia, y aparte de otras especies reportadas en musáceas (Figuras 1-3) como *P. loosi*, *P. coffea* y *P. speijeri* (Múnera et al., 2009; Souza, 2008 y De Luca et al, 2012). El componente principal 1, 2 y 3 presentaron valores propios iguales o mayores a 1 explicando el 86,84% de la variación (Tabla 1-5).

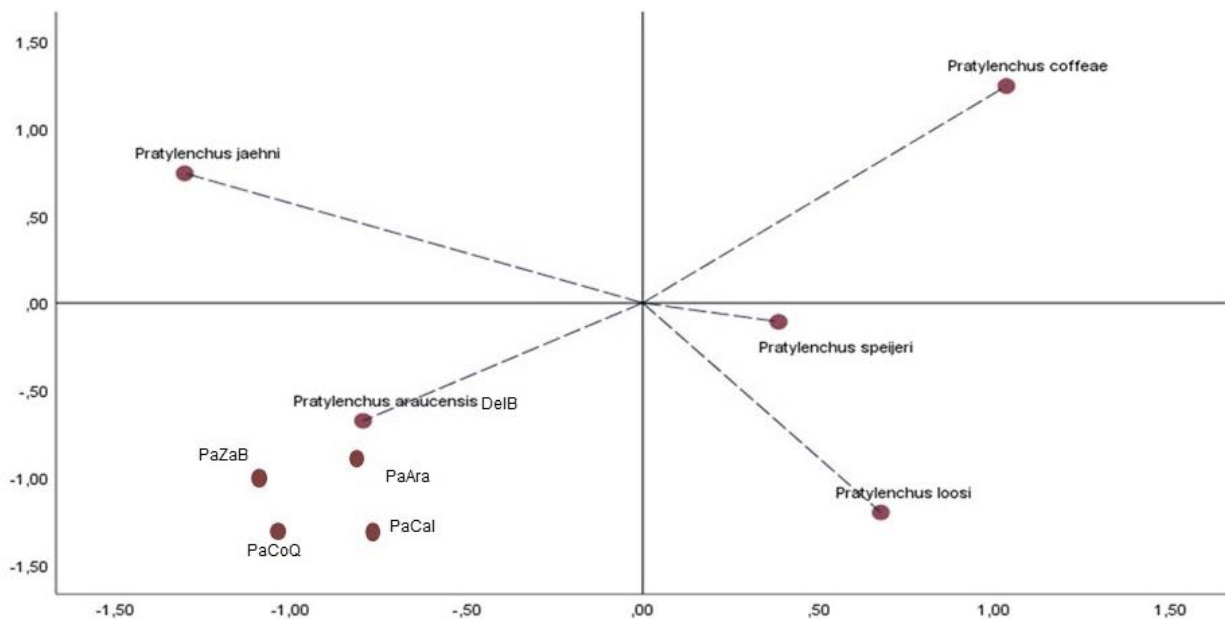


Figura 1-3. Biplot (separación) basado en datos morfométricos de poblaciones de *P. araucensis*. Poblaciones de *P. araucensis* del eje cafetero y Valle del Cauca fueron asignadas a su especie correspondiente basado en datos morfométricos. Se muestran los dos primeros ejes del Análisis de Componentes Principales (PCA). Pa= *Pratylenchus araucensis*, Ara= Arauca, Za= Zabaletas, Del= Delfina, Cal= Caldas y B= Buenaventura.

Tabla 1-4 Valores propios y varianza total para cada componente principal de parámetros morfométricos de hembras de *P. araucensis*

| Autovalores de la Matriz de Correlación | | |
|---|------------|-----------|
| Autovalor | Proporción | Acumulado |
| 1 | 5,798 | 57,98 |
| 2 | 1,827 | 76,25 |
| 3 | 1,059 | 86,84 |

Tabla 1-5. Correlaciones entre los primeros tres componentes principales y los parámetros morfométricos de hembras de *P. araucensis*

| Variable | Autovectores | | |
|---|----------------------|--------------|--------------|
| | Componente Principal | | |
| | Prin1 | Prin2 | Prin3 |
| Longitud Estilete (μm) | 0,298 | 0,440 | -0,159 |
| Posición Vulva (%) | -0,288 | 0,431 | 0,178 |
| Longitud Saco Postuterino (μm) | 0,315 | 0,176 | 0,407 |
| Longitud Total (μm) | 0,330 | 0,370 | 0,245 |
| Longitud Cola (μm) | 0,379 | -0,046 | 0,235 |
| Ancho Máximo Cuerpo (μm) | 0,396 | 0,005 | -0,182 |
| Ancho Cuerpo Ano (μm) | 0,377 | 0,133 | -0,188 |
| Ancho Región Cefálica (μm) | 0,242 | -0,345 | 0,447 |
| Índice a (μm) | -0,294 | 0,122 | 0,620 |
| Índice c(μm) | -0,182 | 0,547 | -0,097 |

El análisis de componentes principales (ACP) permitió determinar que los caracteres diagnósticos más discriminantes para delimitar entre las especies *P. araucensis*, *P. coffeae* son: longitud saco postuterino (μm), longitud total (μm), longitud cola (μm), ancho máximo del cuerpo (μm) y ancho del cuerpo a nivel del ano (μm) en el componente principal (CP)1; longitud del estilete (μm), posición de la vulva (%) e índice c(μm) en el CP2; ancho de la región cefálica (μm) e índice a (μm) en el CP3.

1.3.2. Identificación molecular

Treinta y tres secuencias de ADN fueron obtenidas en el presente estudio, dieciséis correspondientes al segmento D2-D3 del ARN ribosomal y diecisiete para COI del ADN mitocondrial (Tabla 1-4). Todas las secuencias del segmento D2-D3 mostraron una afinidad entre 99,73% de similitud con secuencias de referencia de *P. araucensis* (FJ463261.1, FJ463260.1 y FJ463258.1). La identidad taxonómica de

las poblaciones analizadas no pudo ser resuelta basado en secuencias correspondientes a COI, debido a que en el Centro Nacional para la Información de Biotecnología (NCBI por sus siglas en inglés) no hubo secuencias de referencia con homología igual o mayor al 99%. Por lo tanto, el presente estudio reporta las primeras secuencias de COI para la especie *P. araucensis*.

Basado en el análisis de 16 secuencias parciales del segmento D2-D3 de 746 pb, de tres regiones geográficas, Buenaventura, Caldas y Quindío, se observó una variación intraespecífica para *Pratylenchus araucensis* de 0,27% (2 pb) entre las poblaciones del Valle del Cauca (Buenaventura) respecto a las poblaciones de Caldas, Quindío y Arauca. Así mismo, y basado en 16 secuencias parciales del gen COI, de las mismas áreas geográficas, con un tamaño de 393 pb, se determinó una mayor variabilidad intraespecífica, con valor de 2,04% (8 pb) entre las poblaciones del Valle de Cauca (Buenaventura) y las de Caldas y Quindío (eje cafetero)

1.3.3. Análisis filogenético

El alineamiento basado en la región LSU comprendió un total de 50 taxas con 837 caracteres analizados; de los cuales 406 fueron conservados, 412 variables y 294 fueron parsimoniosos-informativos. Para la región COI comprendió 47 taxas, con un total de 470 caracteres; en los cuales 201 fueron conservados, 262 variables y 234 fueron parsimoniosos-informativos. El análisis filogenético para ambas regiones permitió la agrupación de las secuencias obtenidas en el presente estudio con la especie *P. araucensis* con un soporte de bootstrap sobre la rama de 70% y aparte de otras especies morfológicamente similares como *P. coffeae*, (Figura 1-4 y 1-5). De acuerdo con la filogenia construida para el gen COI, se evidencia una separación de las poblaciones de *P. araucensis* por origen geográfico.

Tabla 1-6. Número de accesiones como aparecen las secuencias de *P. araucensis* en el GenBank la región D2-D3 -LSU y COI

| Aislamiento | Localidad | Número de accesión LSU | Número de accesión COI |
|--------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | Zabaletas, Buenaventura | MZ636668 | MZ636684 |
| 2 | Zabaletas, Buenaventura | MZ636669 | MZ636685 |
| 3 | Zabaletas, Buenaventura | MZ636670 | MZ636686 |
| 4 | Zabaletas, Buenaventura | MZ636671 | MZ636687 |
| 5 | Zabaletas, Buenaventura | MZ636672 | MZ636688 |
| 6 | La Delfina, Buenaventura | MZ636673 | MZ636689 |
| 7 | La Delfina, Buenaventura | MZ636674 | MZ636690 |
| 8 | Corozal, Quindío | MZ636675 | MZ636691 |
| 9 | Corozal, Quindío | MZ636676 | MZ636692 |
| 10 | Corozal, Quindío | MZ636677 | MZ636693 |
| 11 | Corozal, Quindío | MZ636678 | MZ636694 |
| 12 | Corozal, Quindío | MZ636679 | MZ636695 |
| 13 | Granja Montelindo- Palestina, Caldas | MZ636680 | MZ636696 |
| 14 | Granja Montelindo- Palestina, Caldas | MZ636681 | MZ636697 |
| 15 | Granja Montelindo- Palestina, Caldas | MZ636682 | MZ636698 |
| 16 | Granja Montelindo- Palestina, Caldas | MZ636683 | MZ636699 |
| 17 | Granja Montelindo- Palestina, Caldas | | MZ636700 |

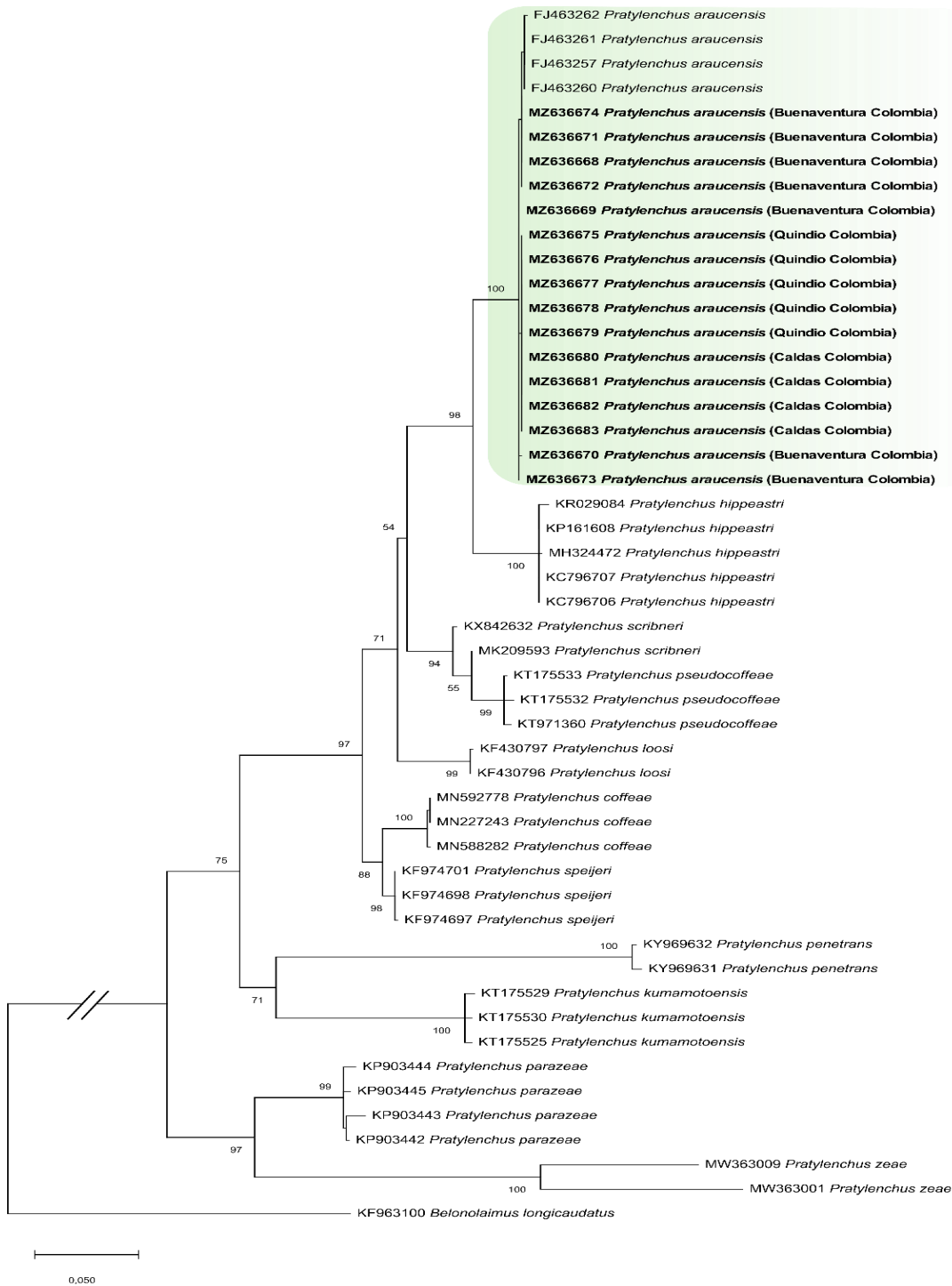


Figura 1-4. Árbol filogenético obtenido mediante máxima verosimilitud de la región parcial LSU de especies del género *Pratylenchus*. Los aislamientos correspondientes a este trabajo se encuentran señalados en negrilla. Los números sobre los nodos indican los valores de bootstrap > 70 %. *Belonolaimus longicaudatus* (MG422913) fue utilizado como grupo externo del árbol.

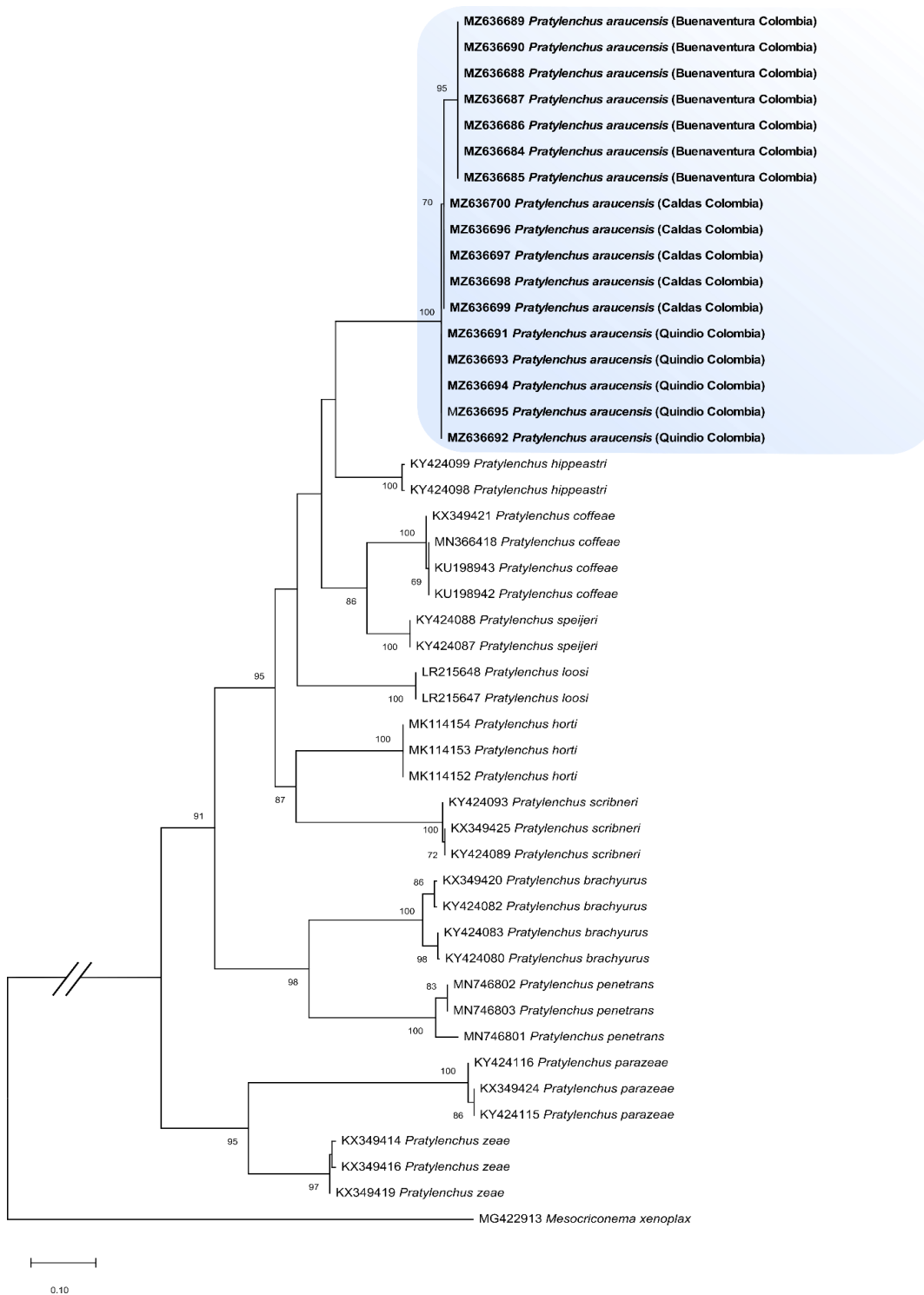


Figura1-5. Árbol filogenético obtenido mediante máxima verosimilitud de la región parcial COI de especies del género *Pratylenchus*. Los aislamientos correspondientes a este trabajo se encuentran señalados en negrilla. Los números sobre los nodos indican los valores de bootstrap > 70 %. *Mesocriconema xenoplax* (MG422913) fue utilizado como grupo externo del árbol.

1.4 Discusión

Las poblaciones obtenidas en este estudio asociadas a cultivos de *Musa* spp fueron claramente identificadas como *P. araucensis* basado en la caracterización morfológica, morfométrica y molecular. Las características morfológicas y los datos morfométricos registrados para las poblaciones analizadas son similares a los reportados para la población tipo de *P. araucensis* (Múnera, 2009).

La especie identificada en este estudio estuvo presente en las localidades estudiadas en el eje cafetero y Valle del Cauca, estos resultados indicaron que *P. araucensis*, reportada por primera vez en el departamento de Arauca, se encuentra también presente en los departamentos de Quindío, Caldas y Valle del Cauca. Lo anterior, puede estar relacionado con la movilización de cormos infestados con el nematodo entre zonas productoras dada la forma de propagación asexual de los cultivos de plátano y banano.

La presencia de *P. araucensis* en zonas productoras de plátano con condiciones climáticas contrastantes indica que esta especie de nematodo tiene un amplio rango de adaptación térmica (desde 18°C en el eje cafetero hasta 26°C en Buenaventura, Valle del Cauca), pluviométrica (desde 2500 mm/año en el eje cafetero hasta 9000 mm en Buenaventura), altitudinal (desde 7 msnm en Buenaventura, Valle del Cauca, hasta 1573 msnm en Calarcá, Quindío) (Orión et al, 1979; Glazer et al, 1983; Orión et al, 1984; Talavera et al, 1998; Munera, 2009; Bucki et al, 2020 y Orión, 2000).

En este estudio se observó la existencia de correlaciones entre caracteres diagnósticos en la especie *P. araucensis*. Para diferentes especies de *Pratylenchus* han sido reportadas correlaciones entre distintos caracteres, como *P. thornei* (Divsalar et al, 2018) y *P. neglectus* (Divsalar et al, 2019). A pesar de las similitudes reportadas entre *P. coffeae*, *P. araucensis*, *P. loosi* y *P. jaehni*, a partir del análisis de PCA, pudo separarse estas especies mediante datos morfométricos. Este mismo análisis indicó que entre los caracteres diagnósticos con mayor resolución para

discriminar o delimitar entre estas especies, se encuentran la longitud del saco post-uterino, longitud total del cuerpo, longitud de la cola, ancho máximo del cuerpo y ancho del cuerpo a nivel del ano, principalmente.

Las poblaciones analizadas en esta investigación fueron identificadas mediante la utilización de caracteres morfológicos y morfométricos. El análisis de PCA separó la especie identificada en este estudio de otras morfológica y morfométricamente similares, evidenciando la importancia de los datos morfológicos y morfométricos, además de los análisis estadísticos multivariados para la identificación de especies del género *Pratylenchus* (Castillo y Vovlas, 2007; Múnera, 2009; Singh et al, 2018; Qing et al, 2019 y Riascos, 2019).

Basado en la filogenia construida mediante secuencias del segmento D2-D3 de ARNr, con datos moleculares generados en el presente estudios y otros descargados del GenBank, se confirmó que *P. araucensis* está en un clado aparte de *P. coffeae*, *P. loosi* y *P. jaehni*, confirmándose que D2-D3 es un marcador molecular confiable para discriminar entre las especies analizadas. En el presente estudio se secuenciaron dieciséis productos LSU parciales de 746 pb, de tres poblaciones geográficas: Buenaventura, Caldas y Quindío. Las variaciones intraespecíficas para *P. araucensis* fueron de 0,27% (2 pb) entre las poblaciones de Buenaventura respecto a las poblaciones de Caldas, Quindío y Arauca (FJ463262, FJ463261, FJ463260 y FJ463257) Esta baja diversidad intraespecífica observada, puede estar relacionada con la baja tasa de sustitución reportada para la subunidad grande del ARNr, por lo cual esta región es recomendada principalmente para análisis interespecíficos Wang et al. (2015). Aunque el segmento de expansión D2-D3 es altamente conservado para *Pratylenchus*, se ha podido evidenciar diversidad intraespecífica con esta región del genoma para *P. coffeae* por Duncan et al. (1999) y *P. parazeae* y *P. zaea* por Wang et al. (2015). Sin embargo, de acuerdo con los resultados del presente estudio, el segmento de expansión D2-D3, es una buena región para análisis interespecíficos en el género *Pratylenchus*.

El árbol filogenético generado mediante datos moleculares de COI mostró que las poblaciones de *P. araucensis* analizadas en la presente investigación se agruparon por origen geográfico, indicando la existencia de diversidad intraespecífica en esta especie de nematodo. A partir del análisis de 16 secuencias parciales del gen COI, se encontró una variabilidad nucleotídica de 2,04% (8 pb) entre poblaciones de *P. araucensis* del Valle del Cauca y del eje cafetero. Usando el gen COI distintos trabajos de investigación han establecido los niveles de diversidad intraespecífica para varias especies de *Pratylenchus*. Por ejemplo, Kolombia et al. (2020) registraron una baja variabilidad intraespecífica 0–8 pb (0–1.93%) entre poblaciones de *P. hexincisus* de China, Italia y Estados Unidos y una alta variabilidad intraespecífica de 54–102 pb (19.1–24.5%) entre poblaciones de los mismos países. Mirghasemi et al (2019) reportaron una baja variabilidad intraespecífica de 0.0 - 0.96% (0–4 pb) entre poblaciones de *P. loosi* de Irán, China y Japón. Basado en estas investigaciones, la variabilidad intraespecífica registrada para *P. araucensis* en el presente estudio puede considerarse baja. Sin embargo, los cambios nucleotídicos entre poblaciones de *P. araucensis* del Valle del Cauca y el eje cafetero pueden estar relacionadas con las diferencias climáticas contrastantes entre regiones, específicamente la precipitación pluvial. Castillo y Vovlas (2007).

Aunque esta especie fue reportada previamente por Munera et al. (2009) en Arauca, departamento de Arauca, Colombia, el presente estudio reporta por primera vez con fines de manejo integrado, a este nematodo en el centro y sur occidente de Colombia, permitiendo ampliar el conocimiento del estatus fitosanitario del plátano y banano en las zonas estudiadas.

Capítulo 2: Identificación morfológica, morfométrica y molecular de *Radopholus* asociado a plátano.

2.1. Introducción

El género *Radopholus* alberga alrededor de 51 especies, siendo *Radopholus similis* la especie tipo más relevante (Múnera, 2009; Mgonja et al, 2020; Volcy, 2011; Roy et al. 2018 y Gaidashova et al., 2004). Este nematodo afecta alrededor del mundo a más de 250 especies vegetales entre las que se destacan plantas ornamentales como *Anthurium*, *Calathea* y *Dracaena*, y otras de interés alimentario como pimienta negra, café, caña de azúcar, aguacate, plátano, banano, entre otras (Haegeman et al., 2010; Roy et al. 2018; Volcy, 2011). Además de *R. similis* se han reportado en cultivos de *Musa* spp. del mundo las especies *Radopholus musicola* y *Radopholus arabocoffeae*, en Australia y Vietnam, respectivamente (Stanton et al., 2001; Trinh et al. 2004).

R. similis es un nematodo endoparásito migratorio, considerado como el más limitante de la producción de cultivos de *Musa* spp. en el mundo (Múnera, 2009., Volcy, 2011; Roy et al. 2018). El nematodo ataca el sistema de raíces de las plantas, migra rápidamente al córtex donde se alimenta y desarrolla, induciendo lesiones necróticas hundidas de color rojizo – marrón (Guzmán y Castaño, 2004). Otros síntomas en raíces incluyen cavidades y túneles, en los cuales el nematodo completa su ciclo biológico (Guzmán y Castaño, 2004). En estados avanzados de la enfermedad, las heridas ocasionadas por el nematodo favorecen infecciones secundarias en las raíces por bacterias y hongos que dañan aún más el sistema radical (Zunke, 1991; Babu et al., 2014). En consecuencia, el sistema de raíces de la planta se reduce significativamente, afectándose la capacidad para absorber agua y nutrientes, pero también el anclaje de la misma siendo uno de los principales síntomas el volcamiento. En la parte aérea, las plantas afectadas por el nematodo

presentan un pobre desarrollo (Agrios, 2005; Múnera, 2009; Volcy, 2011; Roy et al. 2018; Riascos, 2019 y Mgonja et al, 2020).

R. similis, generalmente se reproduce sexualmente, sin embargo, algunas poblaciones presentan reproducción por partenogénesis, en cuanto a su ciclo de vida, cada hembra pone en promedio de cuatro a cinco huevos por día (dos por día en especies de cítricos) durante varias semanas (Duncan y Moens, 2006; Brooks, 2008). A temperaturas óptimas (24-32°C), la eclosión de los huevos se produce después de cuatro o seis días en algunos hospederos y hasta siete días en otros (Duncan y Moens, 2006). Después de eclosionar, el juvenil emergente en el segundo estadio (J2) penetra las raíces en cualquier zona, sin embargo, el ingreso suele ocurrir con mayor frecuencia en puntos cercanos a la caliptra (Duncan y Moens, 2006). Una vez dentro de las raíces, los nematodos se mueven intercelularmente en el parénquima cortical, sufren tres mudas adicionales hasta alcanzar la etapa adulta, se alimentan del citoplasma de las células cercanas, provocando lesiones, cavidades y descomposición de las raíces (CABI, 2014).

La reproducción de *R. similis* es dependiente de la temperatura (Elbadri et al., 2001) ya que el nematodo es sensible a bajas temperaturas, pero se desarrolla bien a temperaturas más altas y en condiciones de suelo húmedo. En el rango de temperatura de 24–32 °C, el ciclo de vida dura 18–25 días (Tarjan y O'Bannon, 1984; Gowen y Quénehervé, 1990). Generalmente, este nematodo no se reproduce a temperaturas por debajo de 16-17 °C (Pinochet et al., 1995; Sarah et al., 1996) o por encima de 33 °C (Sarah et al., 1996). Sin embargo, las poblaciones expuestas a temperaturas más bajas durante un período prolongado podrían adaptarse a las condiciones más frías y reproducirse a 15 °C (Elbadri et al., 2001).

Un buen racimo de un cultivar comercial de banano (*Musa AAA*) consiste de ocho manos de quince dedos, cada uno con un peso promedio de 150 g y un peso de racimo de 20 Kg (Roux et al., 2008). Sin embargo, en presencia de *R. similis* en niveles poblacionales de 3000 individuos/100 g de raíces, el área foliar de la planta

disminuye y en consecuencia el peso del racimo se reduce potencialmente en un 47% (Tripathi et al., 2015).

En Colombia, *R. similis* fue reportado afectando cultivos de plátano y banano desde inicios de los años 80, con distribución restringida a la región del Urabá (Barriga y Cubillos, 1980). Sin embargo, en los años siguientes el nematodo empezó a ser reportado en otras zonas productoras del país, incluyéndose los departamentos de Santander, Risaralda, Quindío, Caldas y Valle del Cauca, posiblemente por el transporte de semilla infestada con el nematodo entre zonas de producción (Villegas, 1989; Guzmán y Castaño, 2004; Torrado y Castaño, 2009).

En la actualidad y de acuerdo con la investigación realizada por Múnera (2009), solo existe soporte morfométrico y molecular para poblaciones del nematodo de Urabá y los Llanos Orientales de Colombia. Debido al daño potencial y para efectos de confirmar la presencia de esta especie de nematodo en el eje cafetero, la presente investigación tuvo como objetivos: (i) caracterizar morfológica, morfométrica y molecularmente poblaciones de *Radopholus* del Eje Cafetero, (ii) Analizar las relaciones filogenéticas dentro del género *Radopholus* mediante datos moleculares correspondientes a la región ITS del ARNr.

2. 2 Materiales y métodos

2.1.1. Localización

El presente estudio se llevó a cabo en sistemas de producción de plátano y banano de los departamentos del Quindío (Calarcá) y Caldas (Palestina). (Figura 2-1). El procesamiento de muestras se realizó en los laboratorios de Microbiología y Sanidad Vegetal y de Biología molecular de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira.

2.2.2. Muestreo y extracción de nematodos

En los municipios arriba mencionados se seleccionaron tres fincas con cultivos de plátano con edades entre 3 – 5 años. Posteriormente, fueron colectadas tres muestras compuestas de suelo rizosférico y raíces por cada finca, de 15-20 plantas/ha (Tabla2-1). A partir de las muestras colectadas, fueron extraídos de raíces y suelo nematodos del género *Radopholus*, usando los métodos de maceración y Cobb modificado, respectivamente (Ravichandra, 2014).

Tabla 2-1. Ubicación geográfica, altitudinal y especies vegetales muestreadas en los municipios de los departamentos de Caldas y Quindío.

| Departamento | Municipio | Latitud | Longitud | msn m | Especies y variedad de Musa |
|--------------|-----------|---------------|---------------|-------|--|
| Caldas | Palestina | 4°58'01.56" N | 75°35'36.75"O | 1050 | (<i>Musa</i> AAB Simmonds) Dominico Hartón |
| Caldas | Palestina | 4°58'01.56" N | 75°35'36.75"O | 1573 | (<i>Musa</i> AAB Simmonds) Dominico Hartón |
| Quindío | Calarcá | 4°31'05.45"N | 75°38'41.27"O | 1573 | (<i>Musa</i> AAB Simmonds) Dominico Hartón |

Departamentos: Quindío y Caldas.



Figura 2-1. Ubicación geográfica de los municipios muestreados en los departamentos de Quindío y Caldas.

2.2.3. Análisis morfológico y morfométrico

Los nematodos fitoparásitos extraídos e identificados como *Radopholus* fueron sometidos a 60°C por cuatro minutos y posteriormente fijados en formalina al 2% (Riascos et al, 2019). Después, para cada población se realizaron preparaciones semipermanentes de al menos 12 hembras y 4 machos y datos morfométricos fueron registrados de acuerdo con Múnera(2009) y Roy et al. (2018): L = longitud total del cuerpo, a = longitud total del cuerpo dividida por el diámetro máximo del cuerpo, c = longitud total del cuerpo dividida por la longitud de la cola, c' = longitud total del cuerpo dividida por el diámetro del cuerpo a nivel del ano, V% = posición

de la vulva, DEGO = orificio de la glándula dorsal esofágica, longitud del estilete, longitud de la cola, parte hialina de la cola, forma de la cola y poro excretor, se tomaron microfotografías usando un microscopio compuesto equipado con Contraste Diferencial de Interferencia (DIC) marca Nikon modelo 80i y sistema de captura de imágenes Nis elements

2.2.4. Análisis estadístico

Un Análisis de Componentes Principales (PCA) fue realizado con los datos morfométricos registrados para las poblaciones analizadas en este estudio y otros datos morfométricos tomados de literatura de diferentes especies del género *Radopholus* (Elbadri, 2000; Nguyen et al, 2003; Trinh et al, 2004 y Munera, 2009), usando la versión 9.4 del paquete estadístico SAS.

2.2.5. Análisis molecular

Para la extracción de DNA de los fitonemátodos se utilizó el protocolo sugerido por Múnera, 2009 con modificaciones realizadas por Riascos et al. (2019): “para lo cual un solo espécimen fue cortado y transferido a 25 µl de buffer de lisis (50 Mm KCl, 10 Mm Tris pH 8.3; 2.5 Mm MgCl₂; 0.45% NP 40; 0.45% Tween - 20; 60 µg ml⁻¹ proteinasa K). El tubo fue incubado posteriormente a -80°C (15 minutos), 65°C (1 hora) y a 95°C (15 minutos). Transcurridos estos tiempos, el tubo se centrifugó (1 minuto a 16000 g). La región ITS fue amplificado usando primers TW81 (Forward 5´- GTTTCGTTAGGTGAACCTGC -3´) y AB28 (reverse, 5´- ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3´). Las condiciones de PCR fueron 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C por 40 ciclos y 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 54°C y 1 minuto a 72°C por ciclos para la amplificación de la región ITS. Los productos de PCR fueron secuenciados en ambas direcciones por BIONEER Korea. (Riascos et al, 2019).

2.2.6. Análisis filogenético

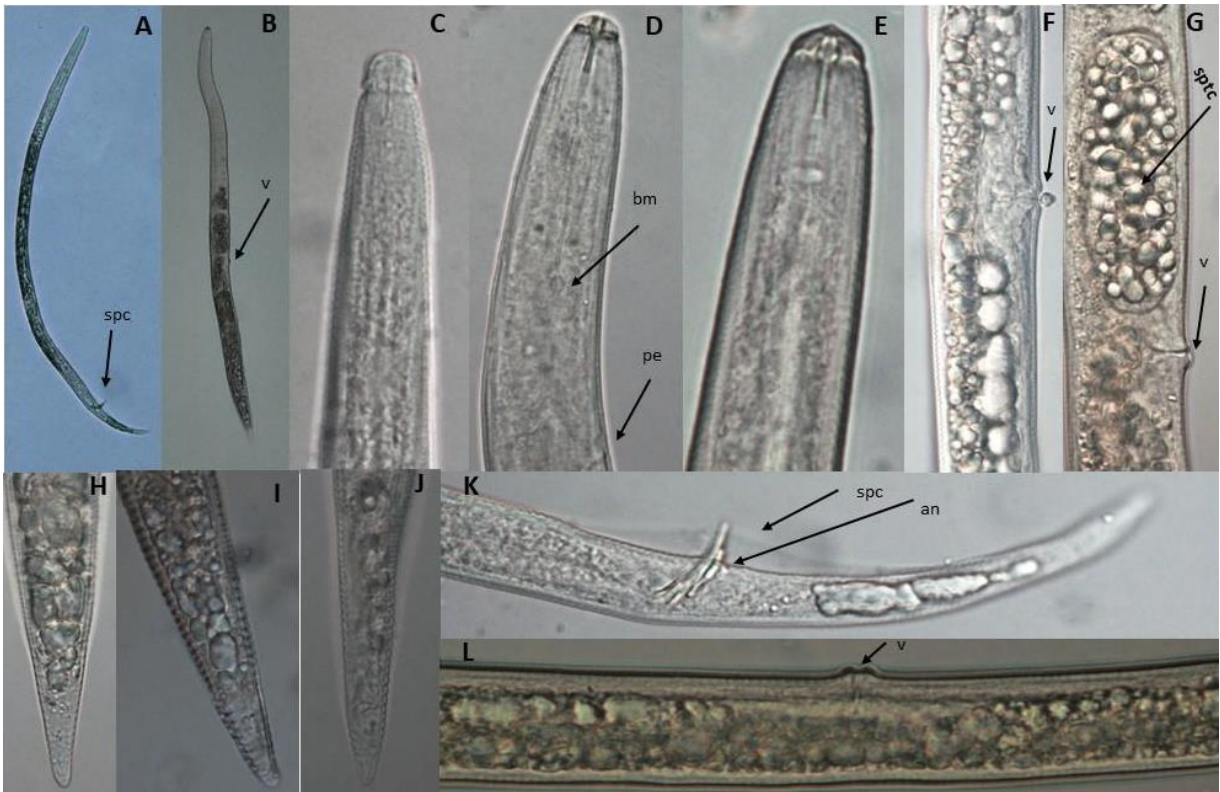
La herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST) del centro nacional para la información de biotecnología (NCBI por sus siglas en inglés), fue usada para confirmar la identidad de la especie para la secuencia de DNA obtenida en este estudio (Riascos et al, 2019). Las secuencias se editaron usando el software geneious R6 (Biomatters; www.geneious.com) con múltiples alineamientos desarrollados en MAFFT v7 (Riascos et al, 2019). Usando las secuencias generadas en este estudio para la región ITS las secuencias de *Radopholus* obtenidas en el GenBank, posteriormente se construyeron los arboles filogenéticos usando como grupo externo a *Helicotylenchus asiaticus* (MN764345).

2.3 Resultados

2. 3.1 Identificación morfológica y morfométrica de nematodos

Tres poblaciones de nematodos, dos de Palestina (Caldas) y una de Calarcá (Quindío), fueron identificadas a nivel morfológico y morfométrico como *Radopholus similis*. Morfológicamente, las poblaciones analizadas e identificadas como *R. similis* presentaron habitus post-mortem recto, espermateca ovalada, forma de la cola espatulada, región labial aplanada (Figura2-2). Los datos morfométricos registrados para estas poblaciones, concuerdan con los reportados para las poblaciones tipo y de referencia de *R. similis* Múnera, (2009) (Tablas 2-2 y 2-3).

Figura 2-2. Características morfológicas de *Radopholus similis*.



A. Habitus *post-mortem* de un macho(10x), B. Habitus *post-mortem* de una hembra(10x), C. región anterior del cuerpo de un macho(100x), D y E. región anterior del cuerpo de una hembra(100x), F, G y L. región media del cuerpo de una hembra (100x), H, I y J. Región posterior(100x), K. región posterior del cuerpo de un macho(100x). v = vulva, an = Ano, spc = espícula, bm= bulbo medio, sptc= espermateca.

Tabla 2-2 Datos morfométricos de poblaciones estudiados en esta investigación y poblaciones de referencias de *Radopholus* (machos)

| | <i>Radopholus sp</i> | <i>Radopholus sp</i> | <i>Radopholus sp</i> | <i>Radopholus sp</i> | <i>Radopholus similis</i> | <i>Radopholus similis</i> | <i>Radopholus similis</i> | <i>Radopholus similis</i> | <i>Radopholus musicola</i> | <i>Radopholus arabocoffeae</i> |
|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| | Musa AAB (subgrupo plátano) | Musa AAB (subgrupo plátano) | Musa AAB (subgrupo plátano) | Banana | Anubia | Citrus | Plátano | Plátano | Plátano | Plátano |
| | Palma sola - Palestina | Montelindo-Caldas | Donde Alfredo | Vellayani - Kerala | Florida - EE. UU | Florida - EE. UU | Urabá-Colombia | Llanos-Colombia | Australia | Vietnam |
| Caracteres | n = 7 Machos | n = 8 Machos | n = 4 Machos | n = 11 Machos | n = 20 Machos | n = 20 Machos | n = 9 Machos | n = 8 Machos | n = 18 Hembras | n = 20 Machos |
| L | 628,9±39,9 (591,6-692,1) | 650,4±18,1 (626,3-681,0) | 684,7±51,9 (629,0-751,1) | 546,4±65,5 (440-685) | 643,8±37,7 (590,5-705,5) | 608,9±32,7 (562,5-666) | 597±41 (541-656) | 609±29 (574-654) | 614,2±27,6 (571,6-668,2) | 571±27,3 (525-619) |
| a | 32,4±2,6 (28,6-35,3) | 33,4±3,3 (27,6-38,8) | 27,2±1,2 (26,2-28,9) | 33,9±3,1 (30,3-37,5) | 33,9±2,4 (29,5-38,1) | 35,5±2,1 (32,0-38,0) | 33±3,5 (28-37) | 30±3,9 (27-37) | 35,5±2,2 (29,8-39,2) | 33±2,6 (25,8-38,3) |
| b | 5,5±0,6 (5,1-7,1) | 5,1±0,4 (5,1-6,8) | 6,1±0,7 (5,5-7,2) | 4,7±0,7 (4,1-5,6) | 7,4±0,4 (6,7-8,0) | 7,1±0,4 (6,5-7,8) | 7,7±0,5 (7,2-8,4) | 8,2±0,9 (6,9-9,3) | 9,6±1,0 (8,3-12,3) | 8,0±0,4 (7,4-8,9) |
| b' | 5,1±0,4 (4,4-5,7) | 5,1±0,1 (4,2-5,7) | 5,5±0,7 (4,9-6,5) | - | 5,0±0,3 (4,5-5,5) | 4,6±0,3 (4,1-5,0) | 5,2±0,5 (4,8-5,8) | 4,9±0,0 (4,9-4,9) | 6,4±0,8 (4,7-7,8) | 6,0±0,4 (5-6,6) |
| c | 9,3±0,7(8,2-10,1) | 9,6±0,7 (8,9-10,9) | 9,8±0,3 (9,6-10,2) | 8,8±0,8 (6,8-9,8) | 7,9±0,4 (7,1-8,6) | 8,9±0,4 (8,3-9,4) | 7,9±0,5 (6,9-8,6) | 8,2±0,5 (7,8-9,2) | 7,5±0,4 (7,0-8,8) | 7,4±0,4 (6,5-8,0) |
| c' | 5,4±0,6 (4,3-6,3) | 5,0±0,5 (4,2-5,7) | 5,5±0,2 (5,3-5,8) | 5,4±0,9 (3,6-7,0) | 6,0±0,6 (5,0-6,9) | 5,1±0,3 (4,6-5,5) | 6,0±0,6 (5,2-7,2) | 5,9±0,6 (5,2-6,9) | 7,5±1,2 (5,6-10,5) | 5,6±0,6 (4,2-7,0) |
| m% | 47,3±2,3(45,7-48,9) | 56,3±4,7(52,8-64,2) | - | - | - | - | - | - | - | - |
| estilete | 13,8±0,1(13,7-13,8) | 11,6±1,0(10,8-13,1) | 12,4±1,0(11,2-13,2) | 10,2±2,2(8-13) | 12,7±0,7(11,5-13,5) | 13,3±0,3 (13,0-13,5) | 12,8±1,9 (9,0-15,3) | 13,9±0,8 (13,5-15,3) | 10,4±2,1 (8,8-12,0) | 10,0±1,1 (8,2-11,6) |
| Longitud cola | 68±4,1(60,6-73,8) | 68,1±3,8(61,9-71,1) | 69,6±3,7(64,8-73,8) | 62,7±6,1(56-77) | 81,1±6,7(73,5-94,0) | 68,5±3,6(62,5-73,5) | 76±6,4(67-85) | 75±5,3(64-81,9) | 82,1±4,6(73,6-92,8) | 77,0±4,6(70,0-84,0) |
| Long cola/estilete | 5,0±0,1(5,0-5,1) | 5,9±0,7(4,7-6,6) | 5,6±0,6(4,9-6,2) | - | - | - | 6,2±0,8(5,2-7,7) | 5,4±0,5(4,7-6,0) | - | 7,8±1,0(6,5-9,5) |
| DGO | 2,4±0,0(2,4-2,4) | 2,5±0,2(2,4-2,7) | 2,5±0,5(3,0-3,4) | 2,1±0,5(1,5-3,0) | - | - | - | - | - | 2,8±0,5(1,7-3,4) |
| Ancho máximo del cuerpo | 19,6±2,9(17,4-23,9) | 19,6±2,2(17,1-23,6) | 25,2±0,9(23,9-26,0) | 20,9±4,6(15,4-25,0) | 19,0±0,9(17,5-20,5) | 17,2±0,9(16,0-18,5) | 18,5±1,7(15,3-20,9) | 20,3±2,2(16,6-23,3) | 17,4±2,3(15,5-21,6) | 17±1,6(15-22) |
| Ancho cuerpo ano | 12,9±1,8(10,8-16,2) | 13,7±1,2(12,5-15,3) | 12,6±0,8(11,9-13,7) | 11,9±1,8(10-16) | 13,5±0,5(13,0-14,5) | 13,4±0,6(13,0-14,5) | 12,7±1,1(11,0-14,7) | 12,6±0,9(11,7-14,1) | 11,2±2,2(8,8-14,4) | 14±1,3(11-17) |
| Ancho región labial | 8,0±0,5(7,5-8,8) | 8,0±0,4(7,5-8,8) | 9,1±1,2(7,5-10,3) | - | - | - | 7,5±1,0(6,1-8,6) | 7,6±1,0(6,7-9,2) | 7,5±0,8(5,6-8,8) | 7,1±0,5(6,0-7,7) |
| altura región labial | 5,3±0,6(4,3-6,3) | 4,9±0,4(4,4-5,5) | 4,7±0,6(3,9-5,2) | 5,4±0,5(5,0-6,0) | - | - | 5,4±0,7(4,3-6,1) | 5,8±0,9(4,3-7,4) | 5,6±0,6(4,4-6,8) | 5,4±0,4(4,3-6,0) |
| poro excretor | 81,0±5,5(75,3-87,6) | 80,8±3,4(76,9-86,4) | 87,3±2,4(84,9-89,6) | 86,2±8,4(78-98) | 100,5±5,2(88,0-105,0) | 94,5±3,0(90,0-98,0) | 84±6,7(69-90) | 84±4,9(79-93) | 65,1±7,4(50,4-78,4) | 81±4,4(72-88) |
| cabeza - bulbo basal | 117,2±9,2(102,9-127,8) | 125,9±3,3(120,8-130,4) | 123,2±6,5(116,7-129,7) | 123,8±6,9(114-132) | 127,5±5,2(120,5-137,5) | 130,8±7,1(121-144) | 113±8,3(106-125) | 126±0,0(126-126) | - | - |
| Parte hialina de la cola | 8,5±2,4(5,6-12,6) | 9,8±2,8(7,0-14,9) | 9,3±1,3(7,8-10,4) | - | 6,2±2,4(3,0-10,5) | 5,0±1,2(3,5-7,5) | 9,8±1,5(8,0-11,7) | 7,5±1,6(4,9-9,2) | 7,5±1,6(4,8-9,6) | 2,8±0,4(2,6-3,4) |
| Longitud de la espícula | 18,9±0,9(17,7-20,2) | 17,7±1,6(14,8-20,1) | 17,7±0,4(17,2-18,0) | 19,2±1,5(16-21) | 18,9±0,8(17,0-19,5) | 18,7±0,5(18,0-19,5) | 18,8±0,5(18,3-19,5) | 18,3±1,0(17,2-20,0) | 18,9±2,1(15,2-21,6) | 19,4±0,7(18-21) |
| Longitud del gubernaculo | 9,7±1,5(7,5-12,2) | 8,1±0,5(7,6-9,0) | 9,4±0,3(9,0-9,8) | 9,0±1,6(7-11) | 9,9±0,7(8,0-10,5) | 9,4±0,4(9,0-10,5) | 9,4±0,4(8,6-9,7) | 8,5±0,6(7,4-9,29) | 10,1±0,7(8,0-11,2) | 9,8±1,0(7,7-11,2) |

Mediciones en µm; promedio ± s.d. (rango).

Tabla 2-3 Datos morfométricos de poblaciones estudiados en esta investigación y poblaciones de referencias de *Radopholus* (hembras)

| | <i>Radopholus sp</i> | <i>Radopholus sp</i> | <i>Radopholus sp</i> | <i>Radopholus similis</i> | <i>Radopholus similis</i> | <i>Radopholus similis</i> | <i>Radopholus similis</i> | <i>Radopholus similis</i> | <i>Radopholus musicola</i> | <i>Radopholus arabocoffeae</i> |
|--------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| | <i>Musa</i> AAB (subgrupo plátano) | <i>Musa</i> AAB (subgrupo plátano) | <i>Musa</i> AAB (subgrupo plátano) | Banana | <i>Anubia</i> | <i>Citrus</i> | Plátano | Plátano | Plátano | Plátano |
| | Palma sola - Palestina | Montelindo-Caldas | Donde Alfredo | Vellayani - Kerala | Florida - EE. UU | Florida - EE. UU | Arauca-Colombia | Llanos-Colombia | Australia | Vietnam |
| Caracteres | n = 14 Hembras | n = 13 Hembras | n=12 Hembras | n = 20 Hembras | n = 20 Hembras | n = 20 Hembras | n = 27 Hembras | n= 22 Hembras | n = 18 Hembras | n = 20 Hembras |
| L | 647,0±33,0(579,2-690,0) | 668,6±38,2(626,6-742,1) | 719,3±105,9(645,7-939,6) | 550,4±44,8(500-660) | 748,1±47(647,5-837) | 696,4±60,2(588,5-794,5) | 594±53(504-722) | 599±44(511-654) | 695,9±52,3(603,8-780,9) | 615,4±23,3(590-682) |
| a | 23,4±1,6(20,0-25,5) | 26,1±1,5(23,8-30,0) | 26,8±2,4(21,6-31,3) | 31,7±2,4(27,3-35,0) | 29,6±1,8(25,7-33,0) | 31,0±2,7(23,4-36,8) | 31±3,8(20-36) | 30±4,4(23-37) | 28,9±2,6(24,0-33,3) | 29,9±2,4(23,6-33,6) |
| b | 5,7±0,8(5,3-6,9) | 6,6±0,5(5,9-7,1) | 6,9±0,4(6,0-7,3) | 5,2±1,0(4,2-6,6) | 7,4±0,5(6,3-8,4) | 7,2±0,4(6,6-7,9) | 8,2±0,5(7,4-9,2) | 8,4±0,7(7,1-9,8) | 8,0±0,7(6,9-9,0) | 8,0±0,3(7,5-8,8) |
| b' | 4,8±0,3(4,0-5,3) | 5,0±0,2(4,3-5,8) | 4,9±0,3(4,2-6,0) | - | 4,6±0,4(3,9-5,4) | 4,2±0,3(3,5-4,8) | 4,6±0,5(3,7-5,4) | 4,4±0,4(3,1-5,3) | 4,8±0,3(4,1-5,6) | 4,4±0,2(4,2-4,8) |
| c | 9,8±0,6(9,1-10,9) | 11,0±0,8(9,4-12,7) | 9,3±1,3(8,3-12,1) | 9,4±0,6(7,8-10,2) | 8,8±0,3(8,2-9,3) | 9,8±0,4(9,2-10,7) | 9,1±0,6(8,1-10,3) | 8,8±0,7(7,0-10,3) | 9,8±1,2(7,8-12,1) | 8,5±0,3(8,0-9,0) |
| c' | 3,5±0,3(3,0-4,2) | 3,5±0,3(3,1-3,9) | 4,0±0,5(2,8-4,5) | 3,2±0,3(2,8-3,8) | 4,9±0,3(4,2-5,4) | 4,3±0,4(3,5-4,8) | 4,5±0,4(3,8-5,3) | 4,5±0,8(3,3-5,8) | 4,5±0,5(3,8-5,8) | 4,5±0,5(3,0-5,2) |
| m% | 50,5±2,5(46,5-56,0) | 52,2±1,5(49,7-54,9) | 53,3±1,5(51,4-55,7) | 54,3±3,0(50,0-60,0) | - | - | - | - | - | - |
| V% | 54,0±1,0(52,3-56,2) | 55,0±1,5(51,8-57,0) | 54,5±2,5(51,9-59,1) | 58±1,3(56-59) | 55,7±1,7(52,0-57,0) | 57,5±0,1(55,0-59,0) | 57±1,6(51-59) | 58±1,3(55-62) | 54,9±1,5(52,6-57,0) | 55,3±1,5(50,9-58,3) |
| estilete | 16,3±0,7(15,4-17,3) | 16,9±0,6(16,0-18,1) | 18,2±0,5(17,2-19,2) | 15,8±1,5(14-18) | 18,3±0,5(17,5-19,5) | 18,3±0,4(17,5-19,0) | 18,5±1,1(15,9-21,5) | 19,0±0,7(17,2-20,2) | 17,8±1,1(15,2-20,8) | 15,9±0,8(14,6-17,2) |
| Longitud cola | 65,6±4,4(55,9-72,7) | 60,7±3,4(55,6-66,5) | 77,3±2,1(72,2-80,1) | 58,7±7,3(46-71) | 84,7±5,2(76,5-96,0) | 71,1±5,3(61,5-81,0) | 66±6,0(55-77) | 69±6,2(54-84) | 72,4±11,3(56,8-91,2) | 72,0±3,0(67,0-79,0) |
| Long cola/estilete | 4,0±0,3(3,3-4,4) | 3,6±0,3(3,2-4,1) | 4,3±0,1(3,9-4,5) | - | - | - | 3,5±0,4(2,8-4,2) | 3,6±0,4(3,0-4,6) | - | 4,6±0,3(4,1-4,9) |
| cabeza - Vulva | 348,8±19,4(312,4-377,2) | 367,5±23,0(340,5-410,1) | 393,4±71,4(335,0-535,2) | - | 417,5±27,7(369-472) | 400,2±35(341-465,5) | - | - | - | - |
| DGO | 3,2±0,4(2,7-3,9) | 3,3±0,2(3,1-3,7) | 3,2±0,1(3,0-3,4) | 4,4±0,6(3,5-5,0) | 4,3±0,3(4,0-5,0) | 4,8±0,4(4,5-5,5) | 2,6±0,7 (3,1-3,3) | 2,3±0,9(2,5-3,7) | 3,0±1,0(2,0-4,8) | 3,1±0,6(2,6-4,3) |
| Ancho máximo del cuerpo | 27,7±2,8(24,8-33,6) | 25,6±1,9(24,1-31,2) | 27,2±6,4(23,7-43,1) | 27,6±1,6(25,0-29,4) | 25,3±1,7(22,5-28,0) | 22,6±2,1(18,5-27,4) | 19,7±3,5(15,3-33,7) | 20,3±3,3(15,3-24,5) | 24,2±2,7(18,4-28,8) | 21±1,9(18-25) |
| Ancho cuerpo ano | 18,5±1,9(14,9-21,9) | 17,4±1,5(14,7-19,5) | 19,8±3,4(17,3-27,9) | 18,4±3,0(14-23) | 17,4±0,9(15,5-19,0) | 16,5±1,6(14,0-19,5) | 14,7±2,0(11,7-18,4) | 15,7±3,0(10,4-20,9) | 15,5±2,4(12,0-20,8) | 16±2,1(14-23) |
| Ancho región labial | 9,4±0,6(8,6-10,8) | 9,2±0,4(8,7-9,9) | 10,0±0,5(8,9-10,7) | - | - | - | 9,2±0,7(8,0-11,0) | 9,1±0,9(7,4-11,0) | - | 9,1±0,5(7,7-10,3) |
| Altura región labial | 3,8±0,5(3,0-5,3) | 3,7±0,3(3,1-4,2) | 4,1±0,2(3,9-4,5) | 3,3±0,4(3,0-4,0) | - | - | 3,7±0,6(3,1-4,9) | 4,0±0,4(3,1-4,9) | - | 3,2±0,4(2,6-3,4) |
| poro excretor | 83,8±5,0(76,3-91,9) | 81,7±6,3(73,2-96,5) | 88,8±1,6(86,2-91,2) | 74,3±7,2(63-84) | 102,4±7,6(87,0-112,5) | 99,2±8,5(85,0-116,5) | 84,0±6,2(73,0-99,0) | 85±4,0(76-94) | 88,0±9,1(74,4-108,0) | 84±4,7(74-90) |
| cabeza - bulbo basal | 126,2±5,2(114,5-132,1) | 127,8±5,7(117,4-139,9) | 131,6±1,3(129,4-133,7) | 125,5±14,4(104-148) | 163,7±11,2(137,5-180,5) | 166,1±12,0(142,0-182,5) | 130±11,6(112-155) | 138±15,5(115-186) | - | - |
| Parte hialina de la cola | 11,6±1,8(8,6-14,1) | 11,1±2,0(6,8-15,4) | 10,7±1,1(9,6-13,5) | - | 8,0±2,3(5,5-16,0) | 9,8±1,3(7,5-12,0) | 9,8±1,4(6,1-12,3) | 10,0±2,0(6,1-13,5) | 7,8±1,8(5,6-13,6) | 8,4±1,1(6,9-11,2) |

Mediciones en µm; promedio ± s.d. (rango).

Tabla 2-4. Matriz de correlaciones de caracteres morfométricos – *Radopholus similis*.

| Variables | Longitud Estilete (µm) | Longitud Total (µm) | Longitud Cola (µm) | Ancho Máximo Cuerpo (µm) | Ancho Cuerpo Ano (µm) | Longitud Poro Excretor desde Extremo Anterior (µm) | Índice a (µm) | Índice b (µm) | Índice c (µm) | Índice c' (µm) |
|--|------------------------|---------------------|--------------------|--------------------------|-----------------------|--|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| Longitud Estilete (µm) | 1,000 | | | | | | | | | |
| Longitud Total (µm) | 0,352 0,007 | 1,000 | | | | | | | | |
| Longitud Cola (µm) | -0,039 0,772 | 0,246 0,065 | 1,000 | | | | | | | |
| Ancho Máximo Cuerpo (µm) | 0,517 0,000 | 0,449 0,001 | -0,359 0,006 | 1,000 | | | | | | |
| Ancho Cuerpo Ano (µm) | 0,759 0,000 | 0,389 0,003 | -0,084 0,535 | 0,694 0,000 | 1,000 | | | | | |
| Longitud Poro Excretor desde Extremo Anterior (µm) | 0,271 0,041 | 0,293 0,027 | 0,441 0,001 | -0,024 0,857 | 0,137 0,310 | 1,000 | | | | |
| Índice a (µm) | -0,511 0,000 | -0,214 0,110 | 0,431 0,001 | -0,876 0,000 | -0,627 0,000 | 0,119 0,379 | 1,000 | | | |
| Índice b (µm) | -0,096 0,476 | -0,070 0,608 | 0,258 0,053 | -0,389 0,003 | -0,321 0,015 | 0,044 0,748 | 0,303 0,022 | 1,000 | | |
| Índice c (µm) | 0,269 0,043 | 0,324 0,014 | -0,810 0,000 | 0,590 0,000 | 0,283 0,033 | -0,283 0,033 | -0,515 0,000 | -0,258 0,052 | 1,000 | |
| Índice c' (µm) | -0,672 0,000 | -0,188 0,162 | 0,592 0,000 | -0,727 0,000 | -0,834 0,000 | 0,075 0,578 | 0,716 0,000 | 0,428 0,001 | -0,658 0,000 | 1,000 |

El análisis de correlación mostró que existe una relación significativa y directamente proporción entre longitud total y longitud del estilete; asimismo entre la longitud de la cola, ancho máximo del cuerpo, ancho del cuerpo a nivel del ano y la distancia de la cabeza al poro excretor.

En el PCA mostró que las poblaciones analizadas en este estudio, procedentes de los departamentos de Caldas y Quindío, agruparon en un mismo clúster con poblaciones de referencia de *R. similis* de Arauca y los Llanos orientales de Colombia y de la Florida - EE. UU, y aparte de las especies *Radopholus musicola* y *Radopholus arabocoffeae*.

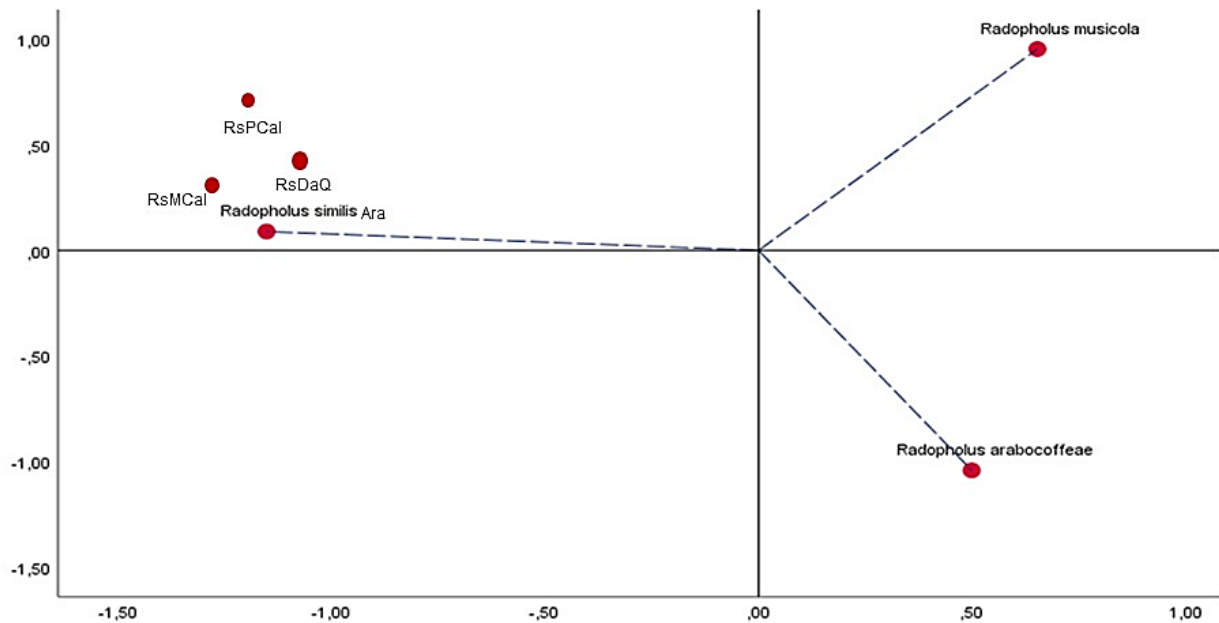


Figura 2-3. Biplot (separación) basado en datos morfométricos de poblaciones de *R. similis*.

Poblaciones de *R. similis* del eje cafetero fueron asignadas a su especie correspondiente basado en datos morfométricos. Se muestran los dos primeros ejes del Análisis de Componentes Principales (PCA). Rs= *Radopholus similis*, P= Palestina, Ara= Arauca, Cal= Caldas, M= Montelindo, Da= Donde Alfredo y Q= Quindío.

La Tabla 2-5, muestra que los primeros dos componentes principales presentan valores propios iguales o mayores a uno y explican el 83,88% de la variación, siendo el componente uno el cual explica el 62,76% y el componente dos el 21,12%. De

acuerdo con la Tabla 2.6, los caracteres diagnósticos más discriminantes que permiten separar las tres especies analizadas son: Ancho Máximo Cuerpo, Índice a, Índice c (μm), Índice c' en el primer componente principal (CP1); Longitud del estilete, Longitud de la cola y Ancho cuerpo a nivel del ano.

Tabla 2-5. Valores propios y varianza total para cada componente principal de parámetros morfométricos de *R. similis*

| Autovalores de la Matriz de Correlación | | | |
|---|-----------|------------|-----------|
| | Autovalor | Proporción | Acumulado |
| 1 | 4,393 | 62,76 | 62,76 |
| 2 | 1,478 | 21,12 | 83,88 |

Tabla 2-6. Correlaciones entre los primeros dos componentes principales y los parámetros morfométricos de *R. similis*.

| Variable | Autovectores | |
|---------------------------------------|----------------------|--------------|
| | Componente Principal | |
| | Prin1 | Prin2 |
| Longitud Estilete (μm) | 0,332 | 0,433 |
| Longitud Cola (μm) | -0,272 | 0,636 |
| Ancho Máximo Cuerpo (μm) | 0,421 | 0,056 |
| Ancho Cuerpo Ano (μm) | 0,383 | 0,416 |
| Índice a (μm) | -0,412 | -0,026 |
| Índice c (μm) | 0,346 | -0,482 |
| Índice c' (μm) | -0,451 | -0,006 |

2.3.2 Identificación molecular

Un total de 16 secuencias parciales correspondientes a la región ITS fueron obtenidas en este estudio, 13 de Caldas y cuatro de Quindío. Todas las secuencias mostraron una similaridad del 99,73% con secuencias de referencia de *R. similis* (GQ281453, GQ281454 y GQ281455 de Colombia). Las secuencias obtenidas en

el presente estudio fueron depositadas en el GenBank con los números de accesoión. Ver tabla 2-7.

2.3.3 Análisis filogenético

El análisis filogenético basado en el segmento ITS, a partir de secuencias obtenidas en el presente estudio y otras descargadas del NCBI, muestra que las secuencias obtenidas agruparon en un mismo clado con secuencias de referencia de *R. similis*, con un soporte bootstrap de 70% y aparte de otras especies del género *Radopholus* (Figura 2-4.).

Tabla 2-7. Numero de accesiones como aparecen las secuencias de *R. similis* en el GenBank la región ITS.

| Número de accesoión | Localidad |
|---------------------|---------------------------------------|
| MZ636650 | Granja Montelindo (Palestina, Caldas) |
| MZ636651 | Granja Montelindo (Palestina, Caldas) |
| MZ636652 | Granja Montelindo (Palestina, Caldas) |
| MZ636653 | Granja Montelindo (Palestina, Caldas) |
| MZ636654 | Palma Sola (Palestina, Caldas) |
| MZ636655 | Palma Sola (Palestina, Caldas) |
| MZ636656 | Palma Sola (Palestina, Caldas) |
| MZ636657 | Palma Sola (Palestina, Caldas) |
| MZ636658 | Palma Sola (Palestina, Caldas) |
| MZ636659 | Palma Sola (Palestina, Caldas) |
| MZ636660 | Palma Sola (Palestina, Caldas) |
| MZ636661 | Palma Sola (Palestina, Caldas) |
| MZ636662 | Palma Sola (Palestina, Caldas) |
| MZ636663 | Don Alfredo (Calarcá, Quindío) |
| MZ636664 | Don Alfredo (Calarcá, Quindío) |
| MZ636665 | Don Alfredo (Calarcá, Quindío) |
| MZ636666 | Don Alfredo (Calarcá, Quindío) |

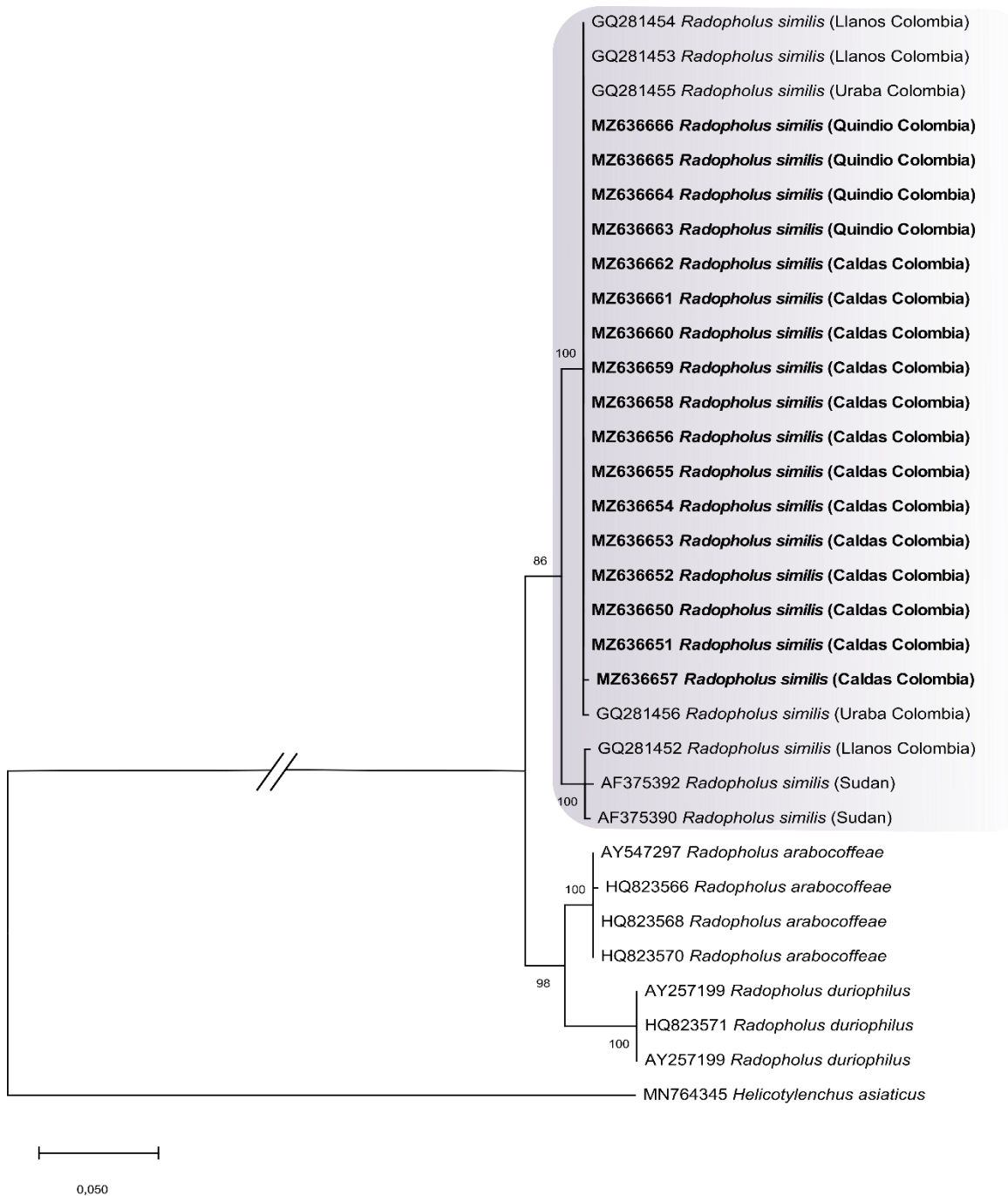


Figura 2-4. Árbol filogenético obtenido mediante Máxima verosimilitud de la región parcial ITS de especies del género *Radopholus*. Los aislamientos correspondientes a este trabajo se encuentran señalados en negrilla. Los números sobre los nodos indican los valores de bootstrap > 70 %. *Helicotylenchus asiaticus* (MN764345) fue utilizado como grupo externo del árbol.

2.4 Discusión

Un total de tres poblaciones, dos de Palestina (Caldas) y una de Calarcá (Quindío) fueron identificadas a nivel morfológico, morfométrico y molecular como *R. similis*. Las características morfológicas y las mediciones morfométricas registradas para las tres poblaciones fueron similares a las reportadas para las poblaciones tipo y de referencia de *R. similis* (Lehman et al, 2000; Múnera, 2009; Roy et al, 2018 y Mgonja et al, 2020). Sin embargo, las hembras de las poblaciones analizadas en el presente estudio presentaron valores ligeramente mayores en comparación con otras poblaciones de referencia de *R. similis* para los siguientes caracteres diagnóstico: longitud total, ancho máximo del cuerpo y ancho del cuerpo a nivel del ano.

La variación en los caracteres mencionados anteriormente, está relacionado con condiciones edafoclimáticas como: temperatura (que por debajo de los 15°C retrasa el crecimiento del nematodo), estructura del suelo y el contenido de nutrientes en las raíces del hospedero (Duncan et al, 1998; Lehman et al, 2000). En ese sentido Elbadri *et al.* (1999) analizaron los caracteres morfológicos de *R. similis* de diferentes hospederos (banano, pimiento, cítricos y plantas ornamentales) de diferentes continentes (Asia, América, Europa y Oceanía), y encontraron variaciones moderadas en los caracteres: longitud total, longitud de la cola, ancho máximo del cuerpo y la distancia del fásmido desde el extremo de la cola (Roy et al, 2018).

Basado en el Análisis de Componentes Principales, las poblaciones estudiadas en esta investigación agruparon con poblaciones de *R. similis* de Colombia (Arauca y Llanos orientales), pero también con poblaciones de Estados Unidos asociadas a cultivos Anubia (*Anubias barteri*). Este mismo análisis indicó que la longitud del estilete, longitud de la cola, ancho máximo del cuerpo, ancho del cuerpo a nivel del ano, Índice a, Índice c e Índice c', permiten discriminar entre las especies de *R. similis*, *R. musicola* y *R. arabocoffeae*, reportadas en cultivos de *Musa* spp. en el mundo (Stanton et al., 2001; Trinh et al. 2004). Se observa que los caracteres

asociados a la cola de las hembras, como longitud de la cola, ancho del cuerpo a nivel del ano, índices c y c' , están entre los de mayor resolución por ser más variables (Elbadri et al 1999; Munera, 2009 y Roy et al, 2018).

Los datos moleculares, correspondientes a la región parcial ITS del ARNr, confirmaron que las poblaciones analizadas en el presente estudio, tanto las de Caldas como la de Quindío, pertenecen a la especie *R. similis*. Estos resultados son consistentes con los registros morfológicos y morfométricos obtenidos para estas mismas poblaciones, lo cual indicó que las poblaciones fueron correctamente identificadas.

La identificación morfo-molecular de tres poblaciones de *R. similis* en el presente estudio, es consistente con los reportes previos del género del nematodo en el eje cafetero (Rivas et al, 1985; Múnera, 2009; Guzmán, 2011; Volcy, 2011; Roy et al, 2018; Mgonja et al, 2020). La confirmación de la especie *R. similis* en el eje cafetero, una de las zonas con mayor comercio de semilla de plátano hacia otras zonas del país, sugiere que esta especie de nematodo puede estarse dispersando masivamente a través de cormos (material de siembra).

3. Conclusiones

Dos especies de nematodos fitoparásitos, una del género *Pratylenchus* (identificada como *P. araucensis*) y otra del género *Radopholus* (*R. similis*) se encuentran atacando cultivos de plátano y banano de los departamentos de Caldas, Quindío y Valle del Cauca.

Los caracteres morfométricos, longitud del estilete, posición de la vulva, longitud del saco post-uterino, longitud total del cuerpo, longitud de la cola, ancho máximo cuerpo, ancho del cuerpo a nivel del ano, ancho de la región cefálica e índices a y c, en combinación con datos moleculares de segmento D2-D3 del ARNr permitieron identificar especies de *Pratylenchus* asociadas a cultivos de plátano y banano.

Si bien las poblaciones de *P. araucensis* se separaron por origen geográfico mediante la región COI, ubicándose en un subclado las poblaciones del Valle del Cauca (Buenaventura) y en otro las del eje cafetero, existe una baja diversidad nucleotídica basado en el gen COI. Sin embargo, la variabilidad nucleotídica podría estar siendo influenciada por factores edafoclimáticos como: altitud (msnm), precipitación pluvial y temperatura.

Pratylenchus araucensis presenta una amplia adaptación geográfica y su presencia en el eje cafetero y Valle del Cauca está relacionada con el transporte de semillas infestada con el parásito.

Por su alta resolución, caracteres morfométricos como la longitud del estilete, longitud de la cola, ancho máximo cuerpo, ancho del cuerpo a nivel del ano, índice a, índice c e índice c', y moleculares como la región ITS del ARNr, permiten discriminar entre especies del género *Radopholus* asociadas a cultivos de *Musa* spp.

4. Recomendaciones

A partir de los resultados obtenidos en esta investigación se recomienda:

Realizar pruebas de parasitismo con poblaciones de *P. araucensis* para establecer el potencial destructivo de esta especie de nematodo en los cultivos de plátano y banano. Al tiempo que se pueda determinar los niveles poblacionales, el umbral de acción y niveles de daño económico en las zonas productoras

Formular y ejecutar investigaciones tendientes a entender mejor la variabilidad intraespecífica de *P. araucensis*, mediante datos moleculares en relación con factores edafoclimáticos y elementos agroecológicos de los sistemas de producción.

Para futuras investigaciones evaluar inoculaciones individuales de *P. araucensis* sobre la producción de plátano al igual que proponer e implementar estrategias de control de tipo genético, cultural, físico, biológico y químico para el control de poblaciones de *P. araucensis* y *R. similis* en las zonas del estudio.

5. Bibliografía

- Agrios, G. (2005). Plant pathology. Fifth edition. Elsevier academic press. 922p.
- Alarcón, J.; Jiménez, Y. (2012). Manejo fitosanitario del cultivo del plátano (*Musa* spp.). Medidas para la temporada invernal. Instituto Colombiano Agropecuario -ICA. 48 p.
- Araya, M. (2004). Los fitonemátodos del banano (*Musa* AAA Subgrupo Cavendish cultivares Grande Naine, Valery y Williams) su parasitismo y combate. XVI Reunión Internacional ACORBAT. pp. 84-105.
- Babu RO, Krishna PB and Santhosh JE, (2014). Virtual screening and *in vitro* assay to explore novel inhibitors from black pepper against potential targets of *Radopholus similis*. International Journal of Computer Applications, 86, 35–43.
- Barriga, R.; Cubillos, G. (1980). Principales nematodos fitoparásitos asociados con cultivos de plátano (*Musa* AAB y *Musa* ABB) en cuatro regiones de Colombia. Fitopatol. Colomb., 9(2): 80-92.
- Bucki P, Qing X, Castillo P, Gamliel A, Dobrinin S, Alon T, and Braun S. (2020). The Genus *Pratylenchus* (Nematoda: *Pratylenchidae*) in Israel: From Taxonomy to Control Practices. *Plants Review*.
- Brooks FE, (2008). Burrowing nematode disease. The Plant Health Instructor. doi:10.1094/PHI-I-2008-1020-01.
- CAB International (Commonwealth Agricultural Bureaux International), (2014). *Radopholus similis*. CAB International, datasheet. Available online: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/46685> (accessed September 2014).
- Caicedo A. (2015). Caracterización y evaluación morfológica, física y química de introducciones del banco de germoplasma de *musáceas* en el Centro de Investigación Corpoica Palmira. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Tesis de maestría.

- Castillo, P. & Vovlas, N. (2007). *Pratylenchus* (Nematoda: *Pratylenchidae*): Diagnosis, biology, pathogenicity and management (Nematology monographs and perspectives. Leiden Koninklijke Brill.
- CGIAR-Consortium of International Agricultural Research Centers. (2014). Banana and Plantain. Disponible En: <http://www.cgiar.org/our-research/cropfactsheets/bananas/>
- Chihani-Hammas N, Hajji-Hedfi L, Regaieg H, Larayedh A, Badiss A, Qing Y and Horrigue-Raouani. (2018). First report of *Pratylenchus vulnus* associated with apple in Tunisia. Journal of Nematology. jofnem-2018-056.
- DANE-Departamento Administrativo Nacional de Estadística. (2014). El cultivo del plátano (*Musa paradisiaca*), un importante alimento para el mundo. Boletín mensual No. 22. 52 p.
- Davide, R.; Marasigan, L. (1985). Yield loss assessment and evaluation of resistance of banana cultivars to the nematode *Radopholus similis* Thorne and *Meloidogyne incognita* Chitwood. Philipp. Agric., 63: 335-349.
- DE LUCA F, Troccoll A, Duncan L, Subbotin S, Waeyenberge L, Coyne L, Brentu F and Inserra R. (2012). *Pratylenchus speijeri* n. sp. (Nematoda: *Pratylenchidae*), a new root-lesion nematode pest of plantain in West Africa. *Nematology*, 2012, Vol. 14(8), 987-1004
- De Man, J. (1876). Onderzoekingen over vrij in de aarde levende nematoden. Tijdschr. Ned. Dierk. Ver., 2: 78-196.
- De Man, J. (1880). Die Eingheimischen, frei in der reinen erde und im süssen wasser lebends Nematoden. Tijdschr. Ned. Dierk. Ver., 5: 1-104.
- Divsalar N, Shokoohi E, Hoseinipour A, Fourie H y Mahdikhani E. (2018). Morphological variation and molecular study of the root lesión nematode *P. thornei*. Russian Journal of Nematology.
- Divsalar N, Shokoohi E, Hoseinipour A, y Mashela P. (2019). Molecular and morphological variation of the root-lesion nematode *Pratylenchus neglectus*. *Biologia* 74:257–267. Institute of Zoology, Slovak Academy of Sciences 2018.

- Duncan LW and Moens M, (2006). Migratory endoparasitic nematodes. In: Plant nematology. Eds Perry RN and Moens M. CAB International, Wallingford, UK, 123–152.
- Elbadri GAA, De Waele D and Moens M, (2001). Reproduction of *Radopholus similis* isolates after inoculation of carrot disks with one or more females. *Nematology*, 3, 767–771.
- Elbadri, G.; Moon, I.; Wani, P.; Bukhari, K.; Lee, D.; Choo, H. (2009). Description of *Helicotylenchus zeidani* sp. nov., a new species of nematode from Guneid sugarcane, Sudan. *J. Asia Pacific Entomol.*, 12: 155–157.
- FAO-Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2015). Estadísticas cultivo de plátano. Disponible En: <http://faostat3.fao.org/download/T/TP/S>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO. (2020). Production quantity and yield of plantains and banana in the world and Colombia. Recuperado el día 20 de agosto de 2020. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Fortuner, R. (1984). Morphometrical variability in *Helicotylenchus* Steiner, 1945. 6: Value of the characters used for specific identification. *Revue. Nématol.*, 7(3): 245-264.
- Fortuner, R. (1990). Ratios and indexes in nematode taxonomy. *Nematology.*, 36: 205-216.
- Fortuner, R. (1984). Morphometrical variability in *Helicoplanchus* Steiner, 1945. 5: On the validity of ratios. *Revue de Nématologie* 7: 137-146.
- Fortuner R, Pierre-Yves Y Dominique G. (2018). On the morphometric identity of populations of *Helicotylenchus pseudorobustus* (Steiner, 1914) Golden, 1956 (Tylenchida: *Hoplolaimidae*). *Nematology* 0 1-17.
- Gaidashova S V, Okech S, Van den Berg E, Marais M, Gatarayiha C M & Ragama P E (2004). Plant-parasitic nematodes in banana-based farming systems in Rwanda: species profile, distribution and abundance. *African Plant Protection* 10(1): 27–33.

- Glazer I., Orion D. (1983). Estudios sobre anhidrobiosis de *Pratylenchus thornei*. *J. Nematol*; 15: 333. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Guzmán O (2011). El nematodo barrenador (*Radopholus similis* [COBB] THORNE) del banano y plátano. Luna Azul ISSN 1909-2474.
- Guzmán, O. & Castaño, J. (2007). Manejo de nematodos en plátano (*Musa* spp.) mediante tratamiento de la semilla. *Fitopatol. Colomb.*, 31(2)53-58.
- Guzmán, O.; Castaño, J. (2004). Reconocimiento de nematodos fitopatógenos en plátanos dominico hartón (*Musa* AAB Simmonds), África, FHIA-20 y FHIA-21, en la granja Montelindo, municipio de Palestina (Caldas), Colombia. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 28(107): 295-301.
- Handoo Z, Skantar A, Kantor M, Hafez S and Hult M (2020) Molecular and orphological characterization of the amaryllis lesion nematode, *Pratylenchus hippeastri* (Insera et al., 2007), from California. *Journal of Nematology*. e2020-58 | Vol. 52.
- Handoo, Z.; Carta, L.; Skantar, A. (2008). Taxonomy, Morphology and Phylogenetics of Coffee-Associated Root-Lesion Nematodes, *Pratylenchus* spp. In: Souza, R. (ed.). *Plant-Parasitic Nematodes of Coffee*. Springer Science+Business Media. pp. 29-50.
- Handoo, Z.A.; Yan, G.; Kantor, M.R.; Huang, D.; Chowdhury, I.A.; Plaisance, A.; Bauchan, G.R.; Mowery, J.D. (2021). Morphological and Molecular Characterization of *Pratylenchus dakotaensis* n. sp. (Nematoda: *Pratylenchidae*), a New Root-Lesion Nematode Species on Soybean in North Dakota, USA. *Plants*, 10, 168. <https://doi.org/10.3390/plants10010168>. *J Nematol.*, 45(2):122–127.
- Kamira M., S. Hauser, P. Van Asten, D. Coyne, and H. L. Talwana. (2013). Plant parasitic nematodes associated with banana and plantain in eastern and western Democratic Republic of Congo. *Nematropica* 43:216-225.

- Kanzaki, N.; Futai, K. (2002). A PCR primer set for determination of phylogenetic relationships of *Bursaphelenchus* species within the *xylophilus* group. *Nematology*, 4: 35–41
- Kaur, H.; Attri, R. (2013). Morphological and Morphometrical Characterization of *Meloidogyne incognita* from Different Host Plants in Four Districts of Punjab, India.
- Kim D, Chun J-Y, Lee K-Y (2016) Morphometric and molecular characterization of populations of *Pratylenchus kumamotoensis* and *P. pseudocoffeae* (Nematoda, *Pratylenchidae*) newly recorded in Korea. *ZooKeys* 600: 1–5. doi: 10.3897/zookeys.600.8508.
- Kolombia Y, Ogundero O, Olajide M, Viaene N, Kumar L, Coyne D and Bert W. (2020). Morphological and molecular characterization of *Pratylenchus* species from Yam (*Dioscorea* spp.) in West Africa. *Journal of Nematology*, e2020-126 | Vol. 52
- Lamberti, F.; Ciccicarese, F.; Sasanelli, N.; Ambrico, A.; D’addabbo T.; Schiavone, D. (2001). Relationships between plant parasitic nematodes and *Verticillium dahliae* on olive. *Nematol. Mediterr.*, 29: 3 – 9.
- Lehman, P.S., N. Vovlas, R. N. Inserra, L., W. Duncan, and D.T. Kaplan. (2000). Colonization of foliar tissues of an aquatic plant. *Anubias barteri* Schott, by *Radopholus similis*. *Nematropica* 30:63-75.
- Luambanoa N, Kashandoa B, Masungaa M, Mwenisongolea A, Mziraya M, Mbagaa J, Polinia R, and Mgonjab D. (2019). Status of *Pratylenchus coffeae* in banana-growing areas of Tanzania. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 105 (2019) 102–109.
- Mayary, J.; Castaño, J. (2009). Incidencia de nematodos en plátano en distintos estados fenológicos. *Agron. colomb.*, 27(2): 237-244.
- McClure, M. A., Nischwitz, C., Skantar, A. M., Schmitt, M. E., and Subbotin, S. A. (2012). Root-knot nematodes in golf course greens of the western United States. *Plant Dis.*, 96:635-647.

- Mgonja D., Temu G., Ndunguru J., Mziray M., Lyantagaye S and Luambano N. (2020). Molecular approach to confirm traditional identification of *Radopholus similis* sampled in Tanzania. JOURNAL OF NEMATOLOGY.
- Mirghasemi, N.; Fanelli, E.; Jamali, S.; Sohani, M.M.; De Luca, F. (2019). Molecular Characterization of Three B-1,4-Endoglucanase Genes in *Pratylenchus loosi* and Functional Analysis of PI-eng-2 Gene. Plants 2021, 10, 568. <https://doi.org/10.3390/>
- Múnera, G. (2008). Biodiversity of phytoparasitic nematodes associated with *Musaceae* and fruit crops in Colombia. Thesis submitted in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Science (Biology) - Gent University. 209 p.
- Múnera, G; 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.
- Múnera, G; Bert, W.; Vierstraete, A.; De la Peña, E.; Moens, M.; Decraemer, W. (2010). Burrowing nematodes from Colombia and their relationship with *Radopholus similis* populations, *R. arabocoffeae* and *R. duriophilus*. Nematology, 12(4): 619-629.
- Nguyen T, Le T, Nguyen T, Duong T, Liebanas G and Phap Q. (2017) Morphological and Molecular Characteristics of *Pratylenchus haiduongensis* sp. n., a New Species of Root-Lesion Nematodes Associated with Carrot in Vietnam. Journal of Nematology 49(3):276–285. The Society of Nematologists.
- Nguyen, C.; Subbotin, S.; Madani, M.; Trinh, P.; Moens, M. (2003). *Radopholus duriophilus* sp. n. (Nematoda: *Pratylenchidae*) from Western Highland of Vietnam. Nematology, 5(4): 549-558.
- Orion D., Amir J., Krikun J. (1984). Observaciones de campo sobre *Pratylenchus thornei* y sus efectos sobre el trigo en condiciones áridas. Rev. Nématol.; 7: 341–345. [[Google Académico](#)]

Orion D., Krikun J., Sullami M. (1979). La distribución, patogenicidad y ecología de *Pratylenchus thornei* en el norte del Negev. *Phytoparasitica.*; 7: 3-9. doi: 10.1007 / BF02980429. [[CrossRef](#)] [[Google Académico](#)].

Palomares-Rius J, & Guesmi L, Horrigue-Raouani N, Cantalapiedra-Navarrete C, Liébanas G y Castillo P. (2014). Morphological and molecular characterisation of *Pratylenchus oleae* n. sp. (Nematoda: *Pratylenchidae*) parasitizing wild and cultivated olives in Spain and Tunisia. *Eur J Plant Pathol* (2014) 140:53–67.

Palomares – Ruiz J, Cantalapiedra – Navarrete C, Castillo P. (2014). Cryptic species in plant – parasitic nematodes. *Nematology* 16- 11056-1118.

Pandales, P.; Mosquera, A. (2007). Reconocimiento de nematodos fitoparásitos asociados al plátano (*Musa paradisiaca*) en dos sistemas agroforestales en Buenaventura Valle del Cauca. Tesis programa de agronomía Universidad Del Pacífico, 72 p.

Pinochet J, Fernandez C and Sarah JL, (1995). Influence of temperature on *in vitro* reproduction of *Pratylenchus coffeae*, *P. goodeyi*, and *Radopholus similis*. *Fundamental and Applied Nematology*, 18, 391–392.

Quénéherve, P. (2009). Integrated management of banana nematodes. In: Ciancio, A. & Mukerji, K. (eds.), *Integrated management of fruit crops and forest nematodes*. Springer Science+ Business. pp. 3-61.

Quig X, Bert, Gamliel A, Bucki P, Duvrinin, Alon T, and Braun S. (2019). Phylogeography and Molecular Species Delimitation of *Pratylenchus capsici* n. sp., a New Root Lesion Nematode in Israel on Pepper (*Capsicum annum*). *Phytopathology – Nematology*.

Ravichandra, N. (2014). Nematological techniques: In: Ravichandra, N. (ed). *Horticultural Nematology*. Springer India. 293-368 p.

Riascos, D. (2019). Caracterización morfológica y molecular de fitonemátodos asociados a *Musa* spp., en el Valle del Cauca y el eje cafetero. Universidad Nacional de

Colombia, sede Palmira- Colombia. Tesis doctoral, Universidad Nacional de Colombia-Palmira. 131 p.

Roux, N., Baurens, F.C., Dolezel, J., Hribová, Harrison, P., Town, C., Sasaki, T., Matsumoto, T., Aert, R., Remy, S., Souza, M. & Lagoda, P. (2008). Genomics of Banana and Plantain (*Musa spp.*), Major Staple Crops in the Tropics. In Moore, P.H. & Ming, R. (eds.). Genomics of Tropical Crop Plants (pp. 83-111). Springer.

Roy, S. *et al.* (2018). Intra-specific Morphological and Morphometric Variability of *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949. *Journal of Applied and Natural Science*, 10(3): 841 – 846.

Ryss, A. (2003). Taxonomy, evolution and phylogeny of the genus *Radopholus* (didelphic species) according to morphological data, with a key to species (Nematoda: *Tylenchida*). *Zoosystematica Rossica*, 11(2): 243-256.

Ryss, A.; McClure, M.; Nischwitz, C.; Dhiman, C.; Subbotin, S. (2013). Redescription of *Robustodorus megadorus* with Molecular Characterization and Analysis of Its Phylogenetic Position within the Family *Aphelenchoididae*. *J Nematol.*, 45(4):237–252.

Sait M, Yavuzaslanoglu E, Imriz G and Ates O. (2020). Molecular characterization of the *Pratylenchus vulnus* populations on cereals in Turkey. *Journal of Nematology*, e2020-84 | Vol. 52.

Sasser, J. & Freckman, D. (1987). A world perspective on nematology: the role of society. In: Veech, J., Dickson, D. (eds.) *Vistas in nematology*. Society of Nematologists, Hyattsville, MD, USA, pp 7-14.

Singh P, Nyiragatare A, Janssen T, Couvreur M, Decraemer W And Bert W. (2018). Morphological and molecular characterisation of *Pratylenchus rwandae* n. sp. (*Tylenchida: Pratylenchidae*) associated with maize in Rwanda. *Nematology 0 (2018) 1-14* brill.com/nemy

- Speijer, P., Omolara, M. & De Waele, D. (2001). Plant parasitic nematodes associated with plantain (*Musa* spp., AAB-group) in southern Nigeria and their relative importance compared to other biotic constraints. *Nematology*, 3, 423-436.
- Speijer, P.; Fogain, R. (1999). *Musa* and Ensete nematode pest status in Africa. In: Karamura EB, Gold CS (eds) Banana IPM. Proceedings of workshop, Nelspruit, South Africa, 23-26 November, 1998. INIBAP, Montpellier, France. pp. 99-118.
- Stanton, J., Mundo-Ocampo, M., Baldwin, J.G. & Kaplan, D.T. (2001). *Radopholus musicola* n. sp., a new pathogenic species from Australia (Nematoda: *Pratylenchidae*). *Nematology* 3, 689-698.
- Sarah JL, Sabatini C and Boisseau M, (1993). Differences in pathogenicity to banana (*Musa* sp., cv. Poyo) among isolates of *Radopholus similis* from different production areas of the world. *Nematropica*, 23, 75–79.
- Sarah JL, Pinochet J and Stanton J, (1996). The burrowing nematode of bananas, *Radopholus similis* Cobb, 1913. *Musa* Pest Fact Sheet No. 1. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France.
- Talavera M., Valor H., Tobar A. (1998). Viabilidad post-anhidrobiótica de *Pratylenchus thornei* y *Merlinius brevidens*. *Phytoparasitica*. 293. doi: 10.1007 / BF02981443. [[CrossRef](#)] [[Google Académico](#)].
- Thorne G, (1961). Principles of nematology. McGraw-Hill, New York, USA, 553 pp.
- Torrado, M.; Castaño, J. (2004). Manejo de nematodos fitoparásitos en plátano Dominic Hartón (*Musa* AAB Simmonds). *Fitopatol. Colomb.*, 28(1):45-48.
- Torrado, M.; Castaño, J. (2009). Incidencia de nematodos en plátano en distintos estados fenológicos. *Agron. colomb.*, 27(2), 237-244.
- Trinh, P. Q., Nguyen, C.N., Waeyenberge, L., Subbotin, S.A., Karssen, G. & Moens, M. (2004). *Radopholus arabocoffeae* sp. n. (Nematoda: *Pratylenchidae*), a nematode

pathogenic to *Coffea arabica* in Vietnam, and additional data on *R. duriophilus*. *Nematology* 6, 681-693.

Varón de Agudelo, F.; Castillo, G. P. (2001). Seminario taller sobre identificación de nematodos de importancia en agricultura. Guía Práctica. ASCOLFI, Palmira, Hmarzo 28-30 de 2001.

Villegas, C. (1989). Reconocimiento de nematodos en plátano Dominico-Hartón enano Musa AAB. En: 10 Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines. Cali (Colombia). 86 p.

Volcy C. (2011) Past and present of the nematode *Radopholus similis* (Cobb) Thorne with emphasis on *Musa*: a review

Wang H, Zhuo K, Ye and Liao J. (2015). Morphological and molecular charaterisation of *Pratylenchus parazeae* n. sp. (Nematoda: *Pratylenchidae*) parasitizing sugarcane in China. *Eur J Plant Pathol* (2015) 143:173–191.

Ye, W.; Giblin-Davis, R.; Davies, K.; Purcell, M.; Scheffer, S.; Taylor, G.; Center, T.; Morris, K.; Thomas, W. (2007). Molecular phylogenetics and the evolution of host plant associations in the nematode genus *Fergusobia* (Tylenchida: Fergusobiinae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 45: 123–141

Yu, Q.; Popovic, V.; Gu, J. (2014). *Deladenus valveus* n. sp. (Nematoda: *Neotylenchidae*) in Dunnage Wood from South Korea Intercepted in Ningbo, China. *J Nematol.*, 46(2):119–124.

Zunke U, (1991). Observations on the invasion and endoparasitic behaviour of the root lesion nematode *Pratylenchus penetrans*. *Journal of Nematology*, 22, 309–320.

Zuñiga, G.; Ortiz, R.; Varón De Agudelo, F. (1979). Nematodos asociados con el cultivo del plátano (*Musa* AAB ABB) en el Valle del Cauca. *Fitopatol. Colomb.*, 8(2):40-52.

6. Anexos

Glosario

n = número de especímenes en los cuales están basadas las mediciones.

L = longitud total del cuerpo (μm).

V = % distancia de la posición de la vulva al extremo anterior.

a = longitud del cuerpo (μm) / el diámetro máximo del cuerpo (μm).

b = longitud del cuerpo (μm) / distancia de la válvula esófago-intestino al extremo anterior del cuerpo (μm).

b' = longitud del cuerpo (μm) / distancia de la base de las glándulas esofágicas al extremo anterior del cuerpo (μm).

c = longitud del cuerpo (μm) / largo de la cola (μm).

c' = longitud de la cola (μm) / el diámetro del cuerpo a nivel del ano (μm).

M% = (longitud del cono del estilete/ longitud del estilete) \times 100.

DGO = orificio de la glándula dorsal esofágica.

Cola = longitud del ano o cloaca al extremo terminal del cuerpo.

ITS = Internal Transcribed Spacer.

COI = Citocromo oxidasa subunidad I.

Primer's = cebadores imprimadores.

Síntomas inducidos por *P. araucensis* y *R. similis*



Volcamiento.

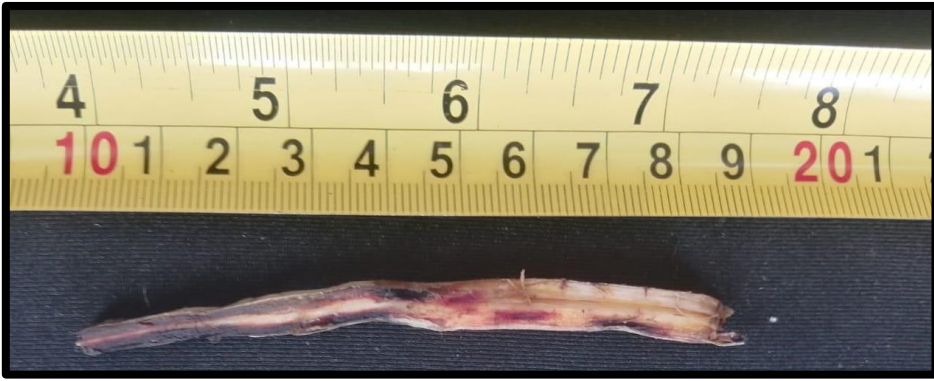


Reducción del sistema de raíces.



Enanismo inducido por fitonemátodos.





Necrosis a nivel de raíces