

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA Y MOLECULAR DE *Meloidogyne incognita* EN HIGUERA (*Ficus carica* L.) EN COSTA RICA¹

Walter Peraza-Padilla², Johaner Rosales-Flores³, Alejandro Esquivel-Hernández², Irena Hilje-Rodríguez³, Ramón Molina-Bravo³, Pablo Castillo-Castillo⁴

RESUMEN

Identificación morfológica, morfométrica y molecular de *Meloidogyne incognita* en higuera (*Ficus carica* L.) en Costa Rica. El objetivo de este estudio fue identificar la especie de *Meloidogyne* asociada a dos plantaciones de higuera en Costa Rica. En marzo de 2012, en el distrito de Pacayas, provincia de Cartago, se detectaron agallas en los sistemas radicales de plantas de higuera (*Ficus carica* L.) de dos fincas. De las raíces agalladas se extrajeron hembras, masas de huevos y juveniles (J2) de *Meloidogyne* sp. Se examinaron los patrones perineales de las hembras y los segundos estadios infectivos se analizaron morfológica y molecularmente mediante PCR-RFLP. Se amplificó la región intergénica (IGS) del genoma mitocondrial, delimitada por el gen de la subunidad II de la citocromo oxidasa (COII) y el gen ribosomal 16S. La población de nematodos se identificó como *M. incognita*. El tamaño de los productos de PCR generados con los imprimadores C2F3 y 1108 fue de 1,7 kb. Al tratar los productos de PCR con enzimas de restricción, se generaron cuatro fragmentos de 850, 450, 250 y 150 pb con la enzima *AluI* y dos fragmentos de 1300 y 400 pb con la enzima *Hinfi*.

Palabras clave: nematodo agallador, patrones perineales, taxonomía de nematodo.

ABSTRACT

Morphological, morphometrical and molecular identification of *Meloidogyne incognita* in fig (*Ficus carica* L.) in Costa Rica. The objective of this study was to identify species of *Meloidogyne* associated with two fig plantations in Costa Rica. On March 2012 in Pacayas, Cartago province, root-galls were found in two fig plantations of *Ficus carica* L. Females, egg-masses and juveniles (J2) of *Meloidogyne* sp. were extracted from the galled roots. Female perineal patterns were examined and second infective stages were analyzed morphometrically and molecularly by PCR-RFLP. The mitochondrial intergenic region (IGS) flanked by the cytochrome oxidase subunit II gene (COII) and the 16S ribosomal gene was amplified. The population was identified morphologically, morphometrically and molecularly as *M. incognita*. The PCR product obtained with primers C2F3 and 1108 were 1.7 kb in size. When PCR products were treated with restriction enzymes they generated four fragments of 850, 450, 250 and 150 bp with *AluI* and two fragments of 1300 and 400 bp with *Hinfi*.

Keywords: root-knot nematode, perineal patterns, taxonomy nematode.

¹ Recibido: 8 de junio, 2012. Aceptado: 28 de octubre, 2013. Esta investigación forma parte del proyecto “Diagnóstico y caracterización bioquímica y molecular de nematodos noduladores (*Meloidogyne* spp.) en cultivos tropicales y hortícolas de Costa Rica” financiado por la Fundación CRUSA-CSIC.

² Laboratorio de Nematología, Escuela de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica. 86-3000. wperaza@una.ac.cr, aesquive@una.ac.cr

³ Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Células Vegetales, y Laboratorio de Biología Molecular. Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica. 86-3000. johngarden@gmail.com, ihilje@una.ac.cr, rmolin@una.ac.cr

⁴ Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Apdo. 4084, 14080 Córdoba, España. pcastillo@ias.csic.es



INTRODUCCIÓN

La higuera (*Ficus carica* L.) y su fruto comestible, el higo, es una de las frutas más antiguas conocidas por el hombre. Es originario de la región mediterránea y se consume como fruto seco en un 90% y enlatado o como conserva en un 10% (Bolin y King 1980). Actualmente, se cultiva en más de 20 países siendo Egipto, Turquía y Argelia los principales productores en toneladas a nivel mundial con 304 000, 205 000 y 79 000 respectivamente. En América sobresale Brasil con una producción de 25 727 toneladas al año (FAOSTAT 2010). Según datos del 2009, Costa Rica produjo más de 7000 kg de higo, de los cuales el 94% se comercializó como fruto fresco. Se estima que en la zona de Cartago (Tierra Blanca, Llano Grande) existen alrededor de 47 productores (Miranda 2009); sin embargo, esta cifra podría ser mayor ya que en la zona de Prusia, Tobosi de Cartago y Pérez Zeledón existen productores que iniciaron recientemente la producción de higo (Barboza 2007).

Los nematodos del género *Meloidogyne* (Nemata:Heteroderidae) constituyen una de las principales plagas agrícolas en una gran variedad de cultivos anuales y perennes (Goeldi 1892). Se estima que estos patógenos pueden causar pérdidas económicas de hasta un 20% en una amplia gama de plantas hospederas (Padgham *et al.* 2004). Sherb (1993), menciona que dentro de los problemas fitosanitarios de la higuera se encuentra *Meloidogyne*, considerado una plaga limitante del rendimiento y la producción junto con la roya (*Cerotelium fici*). Se han documentado numerosos casos de daños por nematodos agalladores en la cuenca Mediterránea, en el norte y sur de América, y en el sur de África. En Costa Rica, López (1980) reportó por primera vez este nematodo asociado a este cultivo en fincas localizadas en Llano Grande de Cartago. En un estudio posterior, se confirmó la presencia en plantaciones de higuera en San Rafael de Escazú, San José (López *et al.* 1991).

Entre las especies asociadas a este cultivo en el mundo se encuentran *M. arenaria*, *M. javanica* y *M. incognita* (McSorley 1981), esta última en mayor frecuencia. La infección de plantaciones comerciales de higuera por *M. incognita* fue previamente registrada en Colombia (Volcy 1986, Tamayo y Becerra 2002), Japón (Hosomi y Uchiyama 1998) y Brasil (Rossi 2002, Medina *et al.* 2006, Dias-Ariera *et al.* 2008,

Bauer *et al.* 2009, Formentini, 2009). La presencia de este nematodo en el cultivo afectó en el pasado la producción comercial en Estados Unidos (Knight Jr 1980), Francia (Scotto La Massèse *et al.* 1984) y Brasil (Ferraz *et al.* 1982, Campos 1997), países con las mayores producciones por hectárea del mundo. En Costa Rica, este nematodo está asociado a una gran variedad de cultivos de importancia agrícola y ornamental, pero no existe en la mayoría de los casos, datos que relacionen daños a las plantas con la presencia de *Meloidogyne* sp. El cultivo de la higuera en Costa Rica ha crecido en área cultivada y recientes prospecciones detectaron plantaciones con síntomas de este nematodo fitopatógeno.

En la actualidad, el género *Meloidogyne* incluye más de 90 especies (Siddiqi 2000, de Waele y Elsen 2007). De acuerdo con Vovlas *et al.* (2005), la identificación correcta de este nematodo facilita la implementación de medidas de combate, como el uso de cultivares resistentes y de medidas cuarentenarias. Comúnmente, la identificación a nivel de especie se realiza mediante la observación de caracteres morfológicos y morfométricos (Taylor y Netscher 1974, Esser *et al.* 1976, Taylor y Sasser 1978); sin embargo, estos procedimientos requieren mucho tiempo y un amplio conocimiento sobre taxonomía de nematodos. Además, la plasticidad fenotípica, variabilidad intra-específica y similitudes morfológicas entre especies dificulta su identificación (Poinar 1990, Pamjav *et al.* 1999). Usualmente la identificación morfológica se realiza mediante el estudio del patrón perineal, región que se encuentra en la parte posterior de la hembra y consiste en líneas laterales o pliegues cuticulares que son propios para cada especie (Taylor y Netscher 1974). No obstante, las frecuentes variaciones intra-específicas de los patrones perineales los hace poco confiables para la identificación a nivel de especie (Xu *et al.* 2004).

Otros métodos de identificación complementan los procedimientos tradicionales y permiten una caracterización rápida y precisa. El empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) (Mullis *et al.* 1986) y la técnica RFLP (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción) facilitan el análisis de regiones del genoma de los organismos (Louws *et al.* 1999) y permiten la identificación molecular de los nematodos mediante el análisis de su ADN (Hussey 1990, Powers

2004). El método de PCR-RFLP primero genera un producto de PCR específico a varias especies y posteriormente, las con un tamaño de producto similar son diferenciadas por los patrones o fragmentos que se generan con enzimas de restricción. La combinación de estos dos métodos le facilita a los científicos distinguir entre las diferentes especies de *Meloidogyne* de manera rápida y a bajo costo. Una de las regiones que se utiliza con mayor frecuencia para diferenciar especies es la región intergénica (IGS) entre los genes mitocondriales, específicamente entre la subunidad II de la citocromo oxidasa (COII) y la subunidad grande (16S) del ADN ribosomal (Powers y Harris 1993). Esta región mitocondrial contiene secuencias altamente variables entre especies y está delimitada por genes muy conservados, lo cual crea una situación ideal para análisis y diagnóstico molecular. En el presente estudio se integraron métodos morfológicos, morfométricos y moleculares para determinar la especie de *Meloidogyne* responsable de producir agallas en el sistema radical de plantas de higuera provenientes de dos fincas productoras de la localidad de Pacayas, Cartago, Costa Rica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolecta de material vegetal. Se recolectaron raíces de higuera (*F. carica* L.) durante los meses de febrero y marzo del 2012, en dos fincas productoras de la localidad de Pacayas, Cartago. El primer sistema de producción se localizó a los 09° 55'41,50"N y 083°48'33,01"O y el segundo a los 09° 55'47,49"N y 083°48'44,09"O. Ambas plantaciones se establecieron hace aproximadamente tres años. En cada una de las fincas, se tomaron cinco muestras de raíces noduladas o agalladas. Dichas raíces se llevaron al Laboratorio de Nematología y los nematodos al Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Costa Rica para su análisis.

Extracción e identificación morfológica y morfométrica. Se extrajeron hembras y masas de huevos de *Meloidogyne* sp. a partir de raíces con agallas con ayuda de una aguja de disección y bajo un estereoscopio a 45X. Se prepararon patrones perineales de 10 a 15 hembras de acuerdo con el método descrito por Hartman y Sasser (1985). La caracterización morfométrica de juveniles de segundo estadio (J_2) se llevó

a cabo mediante la observación de doce especímenes. Las observaciones y mediciones se realizaron con ayuda de un microscopio compuesto a 100X. Se comparó la morfología de los diseños con descripciones e ilustraciones de varios autores (Esser *et al.* 1976, López y Dickson 1977, Taylor y Sasser 1978, Whitehead 1968). Se tomaron fotografías bajo el microscopio con una cámara digital integrada a 100X.

Identificación molecular

Extracción de ADN. Se extrajo el ADN de juveniles infectivos (J_2) mediante la técnica de maceración directa del nematodo (Powers y Harris 1993). Se colocó un nematodo en 15 μ l de agua ultrapura sobre un cubre objetos y se maceró a presión con una punta de micropipeta estéril bajo un microscopio. Posteriormente, dicha solución con el ADN se transfirió a un tubo de microcentrifuga y se conservó a -20°C para su posterior procesamiento y análisis.

Amplificación de ADN (PCR). Para el análisis molecular se utilizaron los imprimadores diseñados por Powers y Harris (1993), C2F3 (5'-GGTCAATGTT-CAGAAATTTGTGG-3') y 1108 (5'-TACCTTTGAC-CAATCACGCT-3'), los cuales amplifican una región del ADN mitocondrial entre los genes COII y 16S. La reacción se colocó en un tubo de 0,2 ml para PCR a un volumen total de 25 μ l que incluyó buffer de la Taq polimerasa 1X, dNTPs 0,08 mM, MgCl₂ 1,0 mM, imprimadores a 0,8 μ M cada uno, 0,8 U de Taq polimerasa y 15 μ l del ADN. El perfil de temperaturas consistió en un primer paso de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 10 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de alineamiento a 48°C, 2 minutos de extensión a 68°C y una fase de extensión final a 72°C durante 2 minutos. La reacción se llevó a cabo en un termociclador de 96 pozos.

Tratamiento enzimático de los fragmentos amplificados (RFLP). Los productos de PCR se trataron posteriormente con las enzimas de restricción *AluI* y *HinfI* en forma independiente, según las indicaciones del fabricante. Las reacciones se realizaron en un volumen total de 15 μ l (5 μ l de producto de PCR, 1 μ l de enzima, 1,5 μ l del buffer de reacción de la enzima a 1X, 7,5 μ l de agua ultrapura) y se incubaron durante una hora a 37°C en un termociclador de 96 pozos.

Electroforesis. Los fragmentos de PCR y RFLP se separaron por medio de electroforesis en geles de

agarosa de 1,5 y 2% respectivamente y preparados con TBE 1X. Los geles se corrieron dentro de una cámara de electroforesis a 90V durante 1 hora y 30 minutos. Los fragmentos de ADN se visualizaron y se digitalizaron en un foto-documentador con un transiluminador de luz UV después de teñir los geles con GelRed® (Biotium) a 3X. El tamaño de las bandas se calculó con un programa de análisis de datos electroforéticos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las raíces recolectadas en ambas parcelas mostraron síntomas severos de nodulación radical, tanto en zonas apicales como en zonas intermedias (Figura 1). En el interior de dichas agallas se encontraron varias hembras de *Meloidogyne* que se extrajeron mediante disección directa para su identificación.

Identificación morfológica

Patrones perineales. Se estudiaron y analizaron al menos diez cortes perineales de hembras ovígeras. Los patrones perineales se caracterizaron por presentar en su mayoría, un arco dorsal alto y ligeramente achatado; sin embargo, se observaron algunas variaciones intraespecíficas en las poblaciones estudiadas. La posición del poro excretor de las hembras coincidió con el de *M. incognita* (Figura 2).

La morfología de los juveniles aislados en el cultivo de higuera fue muy similar entre sí pero con algunas diferencias con respecto a la descripción original. Algunos de los caracteres morfológicos de importancia diagnóstica (Esser *et al.* 1976, Jepson 1987, Taylor 1978), tales como longitud del cuerpo, longitud del estilete, longitud de la cola y porción hialina de la cola mostraron en ambas poblaciones estudiadas, rangos de valores superiores que los observados en la descripción realizada por Kofoid y White (1919), Chitwood (1949), Orton-Williams (1973) y Jepson (1987) de *M. incognita* (Figura 3).

Identificación morfométrica

El análisis morfométrico de doce juveniles o J₂ de *M. incognita* junto con la descripción original de *M. incognita* realizada por Orton-Williams (1973) se describe en el Cuadro 1. Los valores promedio de la longitud del cuerpo de las dos poblaciones (429,2 μm para la Finca 1 y 416,2 μm para la Finca 2) fueron mayores que el promedio reportado (Cuadro 1) el cual fue de 371,0 μm . Por otra parte, los valores medios de la longitud de la cola (48,7 μm) y la porción hialina de la cola (8,9 μm) descritos por Jepson (1987) para *M. incognita* son menores a los encontrados en este estudio (51,3 y 10,6 μm para la Finca 1) y (51,8 μm y 2,2 μm para la Finca 2). Existe la posibilidad de encontrar variabilidad en los parámetros

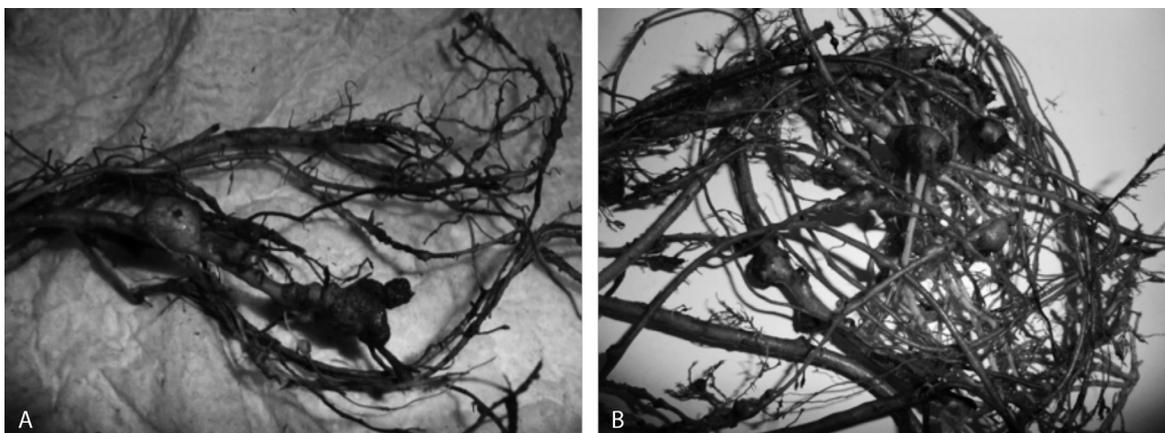


Figura 1. Síntomas de agallas producidas por *M. incognita* en raíces de higuera (*F. carica* L.) de dos fincas productoras. A. Finca 1. B. Finca 2. Pacayas, Cartago, Costa Rica. 2012.

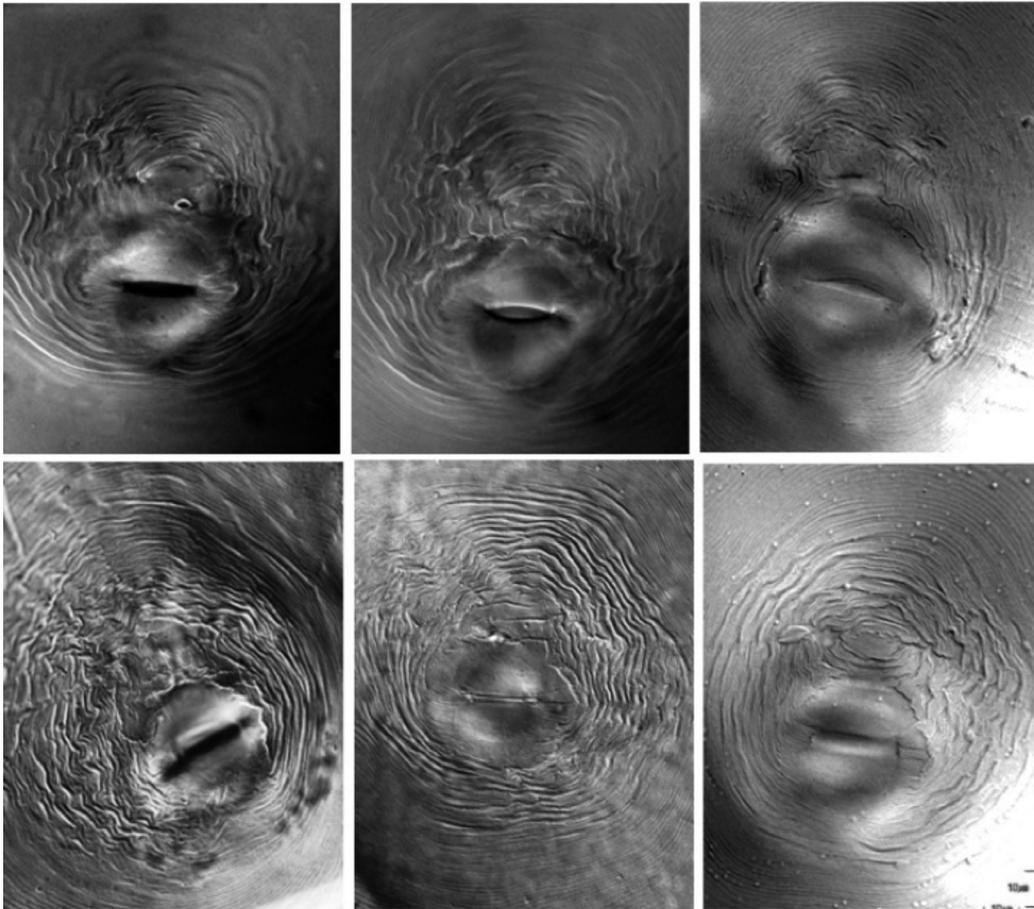


Figura 2. Fotomicrografías del patrón perineal de hembras de *M. incognita* provenientes de plantaciones de higuera (*F. carica* L.). Pacayas, Cartago, Costa Rica. 2012.

morfométricos dentro de una misma especie, es decir, superposición en algunas medidas. Los promedios de las medidas obtenidas en este estudio están dentro del rango establecido para la especie (Kofoid y White 1919, Chitwood 1949). Estas diferencias en los caracteres morfológicos de J_2 entre poblaciones de *M. incognita* de Costa Rica, pueden estar ligadas a factores ambientales que influyen directamente con el desarrollo de los estados juveniles.

Identificación molecular

La amplificación (PCR) de la región mitocondrial COII/16S con los imprimadores C2F3/1108 generó un

fragmento de 1,7 kb (Figura 4) en todas las muestras analizadas lo que concuerda con otros estudios de *M. incognita* (Powers y Harris 1993, Williamson *et al.* 1994, Han *et al.* 2004). Los fragmentos obtenidos con las enzimas de restricción fueron de 850, 450, 250 y 150 pb con la enzima *AluI* y de 1300 kb y 400 pb con la enzima *HinfI* (Figura 5). Estos fragmentos coinciden con los obtenidos por Han *et al.* (2004) y Oriu (1998) en sus investigaciones al cortar con ambas enzimas de restricción. Sin embargo, Powers y Harris (1993), reportaron que el producto de PCR de *M. incognita* tratado con la enzima de restricción *HinfI* generó tres fragmentos de 1000, 400 y 300 pb, mientras que Williamson *et al.* (1994) en Estados Unidos, Oriu (1998)

Cuadro 1. Comparación morfométrica de juveniles de segundo estadio de dos poblaciones de *M. incognita* provenientes de plantaciones de higuera (*F. carica* L.). Pacayas, Cartago, Costa Rica. 2012.

Medidas y relaciones (μm)	Finca 1 <i>M. incognita</i> (n=12)	Finca 2 <i>M. incognita</i> (n=12)	<i>M. incognita</i> (Kofoid y White 1919, Chitwood 1949)
Longitud del cuerpo (L)	429,2 \pm 26,8 (405,0-480,0) ^a	416,2 \pm 27,2 (372,0-462,0)	371,0 (337,0-403,0)*
Ancho máximo del cuerpo (MBW)	18,1 \pm 1,6 (15,0-20,0)	18,1 \pm 1,4 (14,0-20,0)	-**
Ancho del cuerpo a nivel del ano (ABW)	10,8 \pm 1,2 (8,0-12,0)	11,0 \pm 1,0 (10,0-13,0)	9,0***
Longitud del estilete (E)	14,4 \pm 0,8 (13,0-15,0)	14,5 \pm 0,5 (14,0-15,0)	10,5 (9,6-11,7)
Ancho de región labial (LRW)	5,3 \pm 0,5 (5,0-6,0)	5,3 \pm 0,5 (5,0-6,0)	-
Desembocadura de la glándula faríngea dorsal desde la base del estilete (DGO)	3,2 \pm 0,4 (3,0-4,0)	3,0 \pm 0,0 (3,0)	-
Distancia desde la cabeza hasta el poro excretor	85,3 \pm 3,6 (82-90)	76,1 \pm 5,8 (73,0-85,0)	-
Longitud del esófago (Le)	96,0 \pm 8,1 (84,0-103,0)	103,3 \pm 11,0 (98,0-125,0)	-
Longitud de la cola (Lc)	51,3 \pm 3,6 (48,0-58,0)	51,8 \pm 2,2 (48,0-53,0)	48,7 (45,0-52,0)
Porción hialina	10,6 \pm 1,4 (9,0-14,0)	11,0 \pm 2,0 (6,0-14,0)	8,9 (6,3-13,5)
a (L/MBW)	23,9 \pm 2,4 (19,3-27,6)	23,2 \pm 2,4 (21,3-29,5)	28,3 (24,9-31,5)
b (L/Le)	4,7 \pm 0,5 (3,3-4,7)	4,2 \pm 0,6 (4,2-5,3)	2,36 (2,0-3,1)
c (L/Lc)	8,4 \pm 0,7 (6,8-9,4)	8,1 \pm 0,7 (7,0-9,6)	8,1 (6,9-10,6)
c' (Lc/ABW)	4,6 \pm 0,4 (4,0-5,4)	4,7 \pm 0,4 (4,0-5,5)	5,4***

^a Promedio \pm desviación estándar (rango); n= número de especímenes analizados.

*Medidas tomadas de Jepson (1987).

**Medidas no disponibles en la descripción original de la especie.

***Medidas estimadas a partir de la figura de Orton-Williams (1973).

en Japón, Han *et al.* (2004) en Corea y Maleita *et al.* 2012 en Portugal al igual que en este estudio en Costa Rica, mostraron sólo dos bandas de 1300 y 400 pb con dicha enzima de restricción. Aunque los nematodos presentaron una morfología muy similar, esas variaciones en el tamaño de los fragmentos que se generan con las enzimas de restricción supone variantes genéticas o polimorfismos dentro de una misma especie o población que puede deberse a mutaciones en el sitio de corte de las enzimas de restricción.

La cantidad de especies de *Meloidogyne* conocidas hoy día, hace cada vez más difícil su identificación morfológica, aún para expertos taxónomos. El diagnóstico integral empleando técnicas morfológicas, morfométricas y moleculares permite una mejor determinación de las especies. La biología molecular

constituye una herramienta útil en la identificación de organismos ya que con ella, se pueden detectar los polimorfismos presentes en el genoma de las diferentes especies; de ahí la importancia de ser utilizada en la caracterización de fitonematodos.

Tradicionalmente la identificación de especies de *Meloidogyne* se fundamenta en la morfología de hembras adultas o en la obtención y análisis de ADN a partir de un pool de hembras (Flores 2008, Humphreys *et al.* 2012). Este es el primer estudio que logra la amplificación y corte de ADN a partir de un solo juvenil de *Meloidogyne*. Además es el primer estudio en donde se identifica molecularmente a la especie *M. incognita* infectando plantas de higuera en Costa Rica. El diagnóstico molecular de las especies a partir de un solo juvenil ofrece ventajas comparativas con los métodos antes

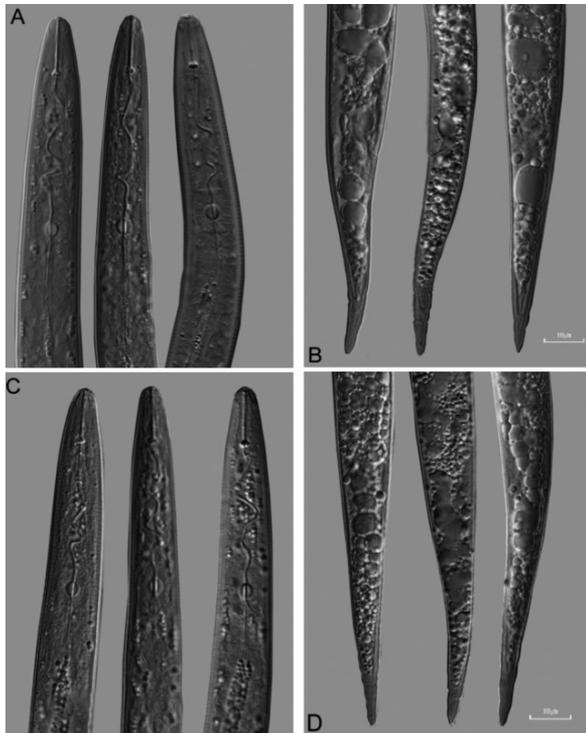


Figura 3. Fotomicrografías de segundos estados juveniles de *M. incognita* proveniente de plantaciones de higuera (*F. carica* L.). A y B (Finca 1), C y D. (Finca 2). Parte anterior (A y C) y posterior (B y D). Pacayas, Cartago, Costa Rica. 2012.

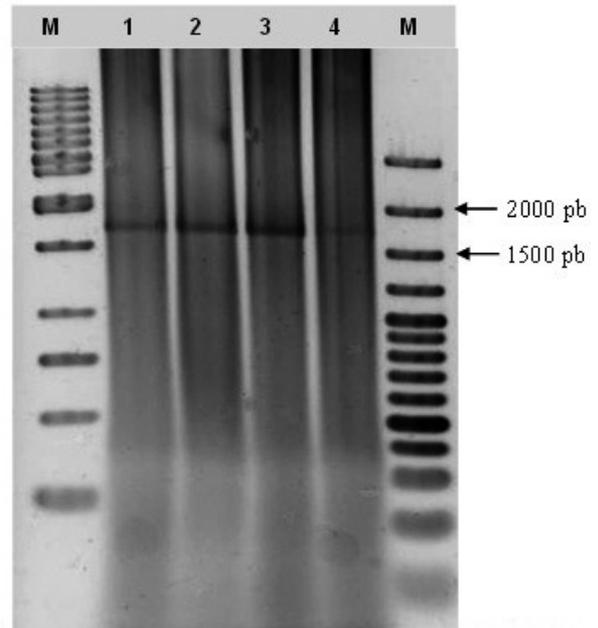


Figura 4. Resultado de electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la amplificación (PCR) de la región mitocondrial COII/16S con los imprimadores C2F3/1108 (Powers y Harris 1993). M: marcadores de peso molecular de 1 kb y 100 pb respectivamente. Carriles 1 y 2: juveniles de *Meloidogyne* sp. de la Finca 1, Carriles 3 y 4: juveniles de *Meloidogyne* sp. de la Finca 2. Pacayas, Cartago, Costa Rica. 2012.

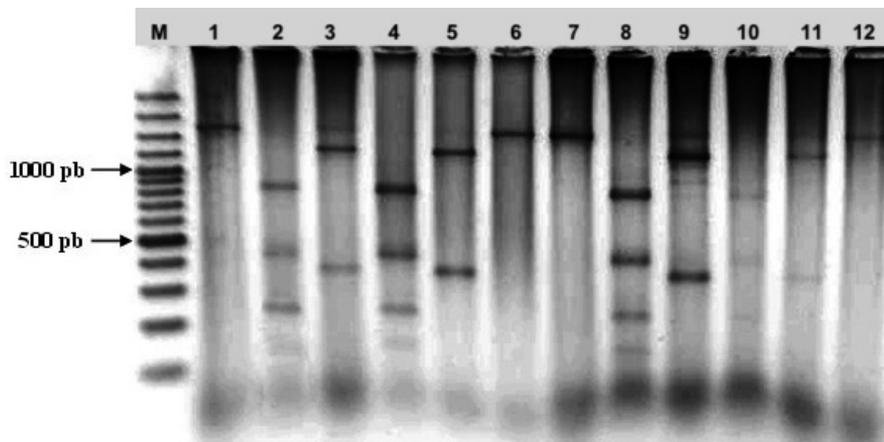


Figura 5. Patrones generados con las enzimas de restricción *AluI* y *HinfI* mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Carriles 1, 6, 7 y 12: Productos de PCR sin cortar con enzimas de restricción; Carriles 2, 4, 8 y 10: fragmentos generados con la enzima *AluI*; Carriles 3, 5, 9 y 11: fragmentos generados con la enzima *HinfI*. M: marcador de peso molecular 100pb. Pacayas, Cartago, Costa Rica. 2012.

descritos, por la facilidad de aislar de muestras de suelo o raíz los estados infectivos (J_2), lo que efectivamente simplifica y agiliza el proceso de reconocimiento. La identificación correcta de las especies de *Meloidogyne* asociadas a cultivos en nuestro país es esencial para conocer su distribución y propagación e implementar estrategias de manejo. Así mismo, existe hoy día la apertura de mercados internacionales para el comercio de cultivos y ornamentales, que puede favorecer la introducción y diseminación de especies de *Meloidogyne* no autóctonas. Se desconoce la extensión del problema de *Meloidogyne* en el cultivo de higuera en Costa Rica, por lo que es necesario realizar prospecciones fitone-matológicas en otras áreas productoras para determinar la magnitud del daño y si la especie de *Meloidogyne* asociada es la misma en todas las zonas. Finalmente, es necesario estar alerta a la infección de este nematodo para evitar su diseminación en otros sitios donde se produce este fruto.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Fundación CRUSA-CSIC por el financiamiento y apoyo al proyecto “Diagnóstico y caracterización bioquímica y molecular de nematodos noduladores (*Meloidogyne* spp.) en cultivos tropicales y hortícolas de Costa Rica”. Al proyecto “Aplicación de tecnologías innovadoras para contribuir con el desarrollo sostenible del cultivo del higo y mora en Costa Rica” financiado por la Comisión Nacional de Rectores (CONARE).

LITERATURA CITADA

- Bauer, C; Somavilla, L; Carneiro, RMDG; Desiré, A; da Costa, Fábila; Lima, I. 2009. Monitoramento do nematóide das galhas (*Meloidogyne* spp.) em figueira (*Ficus carica* L.) no Rio Grande do Sul, Brasil. Embrapa Clima Temperado. 18 p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento 86).
- Barboza, S. 2007. Informe final: Desarrollo del cultivo de higo (*Ficus carica*) para consumo fresco y procesado, como una alternativa de diversificación para el sector agrícola. Cartago, Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica. 30 p.
- Bolin, HR; King, AD. 1980. Figs. In Nagy, S; Shaw, PE. (eds) Tropical and Sub-tropical fruits. Composition, properties and uses. Westport, Connecticut, AVI Publishing, Inc. p. 492-505.
- Campos, VP. 1997. Nematodes of the fig crop. Informe Agropecuario Belo Horizonte 18188. Brasil. p. 33-38.
- Chitwood, BG. 1949. Root-knot nematodes, part I. A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887. Proceedings of the Helminthological Society of Washington 16:90-104.
- De Waele, D; Elsen, A. 2007. Challenges in tropical plant nematology. Annual Review of Phytopathology 45:457-485.
- Dias-Ariera, CR; Molina, RO; Costa, AT. 2008. Nematóides causadores de doenças em frutíferas. Boa Vista, Brasil (en línea). Consultado 15 may. 2012. Disponible en <http://revista.ufr.br/index.php/agroambiente/article/download/230/169>
- Esser, RP; Perry, VG; Taylor, AL. 1976. A diagnostic compendium of the genus *Meloidogyne* Nematoda: Heteroderidae. Proceedings of the Helminthological Society of Washington 43:138-150.
- FAOSTAT (Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database). 2010. Crops production (en línea). Consultado 21 abr. 2012. Disponible en <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- Ferraz, LCCB; Pereira, FM; Valente, J. 1982. Considerações sobre o use de nematocidas em viveiro visando a recuperacao demudas de *Ficus carica* ev. roxo de valinhos infestadas por *Meloidogyne incognita*. In Lordello, LGE. ed. Trabalhos apresentados a VI reunias Brasileira de nematologia. Publicacao No. 6. Sociedade Brasileira de Nematologia, Piracicaba, São Paulo, Brasil. p. 13-20.
- Flores, L. 2008. Identificación de especies de *Meloidogyne* descritas en Costa Rica con base en la variabilidad del ADN mitocondrial. Tesis de Maestría. Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 48 p.
- Formentini, E. 2009. Manipueira no control de *Meloidogyne incognita* e no rendimento da figueira (*Ficus carica* L.) cv. Roxo de Valinhos no oeste Paranaense. Dissertação de Mestrado. BR, Univerddidade Estadual do Oeste do Paraná. 60 p.
- Goeldi, EA. 1892. Relatorio sobre a molestia do cafeeiro na provincia do Rio de Janeiro. Arquivos do Museu Nacional. Rio de Janeiro, BR. 8:7-121.
- Han, H; Cho, MR; Jeon, ChY; Lim, ChK; Jang, HL. 2004. PCR-RFLP identification of three major *Meloidogyne* species in Korea. Journal of Asia-Pacific Entomology 7(2):171-175.

- Hartman, KM; Sasser, JN. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal patterns morphology. In Barker, KR; Carter, CC; Sasser, JN. eds. An advanced treatise on *Meloidogyne*. v2. Methodology. Raleigh, USA, North Carolina State University Graphics. p. 69-77.
- Hosomi, A; Uchiyama, T. 1998. Growth inhibiting factors in sick soil of fig orchards. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 67:44-50.
- Humphreys, DA; Williamson, V; Salazar, L; Flores-Cháves, L; Gómez-Salazar, L. 2012. Presence of *Meloidogyne enterolobii* Yang and Eisenback (= *M. mayaguensis*) in guava and acerola from Costa Rica. Nematology 14:199-207.
- Hussey, RS. 1990. Biochemical and molecular methods of identifying *Meloidogyne* species: symposium introduction. Journal of Nematology 22:8-9.
- Knight, RJ. 1980. Origin and world importance of tropical and sub-tropical fruit crops. In Nagy, S; Shaw, PE. eds. Tropical and sub-tropical fruits. Composition, properties and uses. Westport, Connecticut, USA, AVI Publishing, Inc. p. 1-120.
- Kofoed, CA; White, WA. 1919. A new nematode infection of man. Journal of the American medical Association 72:567-569.
- Jepson, SB. 1987. Identification of root-knot nematode (*Meloidogyne* species). Wallingford, UK, CAB International. 265 p.
- López R; Dickson, DW. 1977. Morfometría y respuesta de hospedantes diferenciales a tres poblaciones de *Meloidogyne incognita* y una de *Meloidogyne javanica*. Agronomía Costarricense 1:119-127.
- López, R. 1980. Cambios estacionales de la distribución espacial de nematodos de un plantío de higo. Nematologica 10(1):2.
- López, R; Salazar, L; Azofeifa, J. 1991. Observaciones sobre la morfología de *Meloidogyne incognita* con el microscopio electrónico de rastreo. Agronomía Costarricense 15:105-112.
- Louws, FJ; Rademaker, KLW; de Bruijin, FJ. 1999. The three Ds of PCR-Based Genomic Analysis of Phytopathogens: Diversity, Detection, Disease Diagnose. Annual Review Phytopathology 37:81-125.
- Maleita, CM; Simões, MJ; Egas, C; Curtis, RHC; Abrantes, IM. de O. 2012. Biometrical, biochemical, and molecular diagnosis of Portuguese *Meloidogyne hispanica* isolates. Plant Disease 96:865-874.
- McSorley, R. 1981. Plant parasitic nematodes associated with tropical and sub-tropical fruits. Bulletin 823 of Agricultural Experiment Station Institute of Food and Agricultural Science. Gainesville, Florida, USA, University of Florida. 51 p.
- Medina, IL; Bauer, GC; Rossi, C; Carneiro, RMDG. 2006. Caracterização e identificação de populações de nematóides de galhas provenientes de figueiras (*Ficus carica* L.) do Rio Grande do Sul e de São Paulo. Nematologia Brasileira 30(2):179-187.
- Miranda, D. 2009. Evaluación de alternativas frutícolas amigables con el ambiente para contribuir al desarrollo de la zona norte de Cartago. Centro Internacional de Política Económica (CINPE) de la Universidad Nacional. Costa Rica. 18 p.
- Mullis, K; Faloona, F; Scharf, S; Saiki, R; Horn, G; Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology 51:263-73.
- Orui, Y. 1998. Identification of Japanese species of the genus *Meloidogyne* (Nematoda: Meloidogynidae) by PCR-RFLP analysis. Applied Entomology and Zoology 33:43-51.
- Orton-Williams, KJ. 1973. *Meloidogyne incognita*. C.I.H. descriptions of plant parasitic nematodes. Commonwealth Institute of Helminthology, St. Albans, UK. Set 2, No. 18. 4 p.
- Padgham, JL; Mazid, MA; Duxbury, JM; Abawi, GS; Hossain, M. 2004. Yield loss caused by *Meloidogyne graminicola* on lowland rainfed rice in Bangladesh. Journal of Nematology 36:42-48.
- Pamjav, H; Triga, D; Buzas, ZT; Vellai, A; Lucska, I; Adams, A; Reid, AP; Burnell, A; Griffin, C; Glazer, I; Klein, MG; Fodor, A. 1999. Novel application of PhastSystem polyacrylamide gel electrophoresis using restriction fragment length polymorphism - internal transcribed spacer patterns of individuals for molecular identification of entomopathogenic nematodes. Electrophoresis 20:1266-1273.
- Poinar, GO. 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In Gaugler, R; Kaya, HK. eds. Entomopathogenic nematodes in biological control. Boca Raton, USA, CRC Press. p. 23-60.
- Powers, TO. 2004. Nematode molecular diagnostics: from bands to bar-codes. Annual Review of Phytopathology 42:367-383.
- Powers, TO; Harris, TS. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. Journal of Nematology 25:1-6.
- Rossi, C. 2002. Nematóides em fruteiras. VII Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico.

- Centro Experimental Central do Instituto Biológico. Laboratório de Nematologia. Brasil. 130 p.
- Sherb, CT. 1993. Flutuação populacional de *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White, 1919) Chitwood, 1949 em figueira (*Ficus carica* L.) inoculadas no campo. Tese Mestrado. ESALQ. Lavras, MG, Brasil. 150 p.
- Scotto La Massèse, C; Deportes, L; Mercier, S; Roger, J. 1984. Les principaux ennemis du figuier: les nematodes et maladies. Phytoma – Défense des Cultures 354:39-41.
- Sidiqqi, M. 2000. Tylenchida: parasites of plants and insects. 2 ed. London, UK, Biddles. 833 p.
- Tamayo, PJ; Becerra, DC. 2002. Otra enfermedad del brevo (*Ficus carica* L.) en el Departamento de Antioquia. Informa 28. Paipa, Boyacá, Colombia, ASCOLFI. p. 46-47.
- Taylor, DP; Netscher, C. 1974. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. Nematologica 20:268-269.
- Taylor, AL; Sasser, JM. 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Raleigh, North Carolina, USA, North Carolina State University Graphics. 111 p.
- Volcy, Ch. 1986. Registros de nematodos fitoparásitos para Colombia. In Resúmenes VII Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines. Paipa, Boyacá, Colombia, ASCOLFI. 39 p.
- Vovlas, N; Mifsud, D; Landa, BB; Castillo, P. 2005. Pathogenicity of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on potato. Plant Pathology 54:657-664.
- Whitehead, AG. 1968. Taxonomy of *Meloidogyne* (Nematodea: Heteroderidae) with descriptions of four new species. Transactions of the Zoological Society of London 31:263-401.
- Williamson, VM; Caswell-Chen, EP; Wu, FF; Hanson, D. 1994. PCR for nematode identification. In Lamberti, F; De Giorgi, C; Bird, DM. eds. Advances in molecular plant Nematology. New York, USA, Plenum Press. p. 119-127.
- Xu, J; Liu, P; Meng, Q; Long, H. 2004. Characterisation of *Meloidogyne* species from China using isozyme phenotypes and amplified mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism. European Journal of Plant Pathology 110:309-315.