

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DINÁMICA POBLACIONAL Y PATOGENICIDAD DE *PRATYLENCHUS*  
*BRACHYURUS* EN EL CULTIVO DE LA PIÑA (*ANANAS COMOSUS*) VARIEDAD  
MD-2, EN TRES FINCAS CON DIFERENTE HISTORIAL DE PRODUCCIÓN  
AGRÍCOLA, EN LA REGIÓN BRUNCA DE COSTA RICA

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en  
Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales para optar al grado y título de Maestría  
Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Protección de  
Cultivos

MARIANA ROMÁN CASTRO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2023

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente, dar las gracias a Dios por su guía y permitirme finalizar esta maestría.

A PINDECO por brindarme el apoyo y la confianza para realizar la maestría en Protección de Cultivos y darme el espacio para realizar el trabajo de investigación en sus instalaciones.

A todos los compañeros de la Sección de Protección de Cultivos del Departamento de Investigaciones de PINDECO por darme soporte en la ejecución de este trabajo, todo su apoyo ha sido muy valioso en este proceso.

A Danny Humphreys, mi director de tesis, quien ha sido un gran apoyo y me ha brindado su orientación durante este tiempo.

A Mario Ulate y Lorena Flores por sus valiosos aportes en la revisión de este documento.

A mi familia, en especial a mi madre y hermanos por su apoyo incondicional y ejemplo de amor y perseverancia.

A mis amigos y seres queridos por siempre estar presentes.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Protección de Cultivos.”

---

Dr. Adam Karremans Lok  
Representante de la Decana  
Sistema de Estudios de Posgrado

---

Ph.D. Danny Humphreys Pereira  
Director de Tesis

---

MSc. Lorena Flores Chaves  
Asesora

---

MSc. Mario Ulate Sánchez  
Asesor

---

Dra. Catalina Salas Durán  
Directora  
Programa de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales

---

Mariana Román Castro  
Candidata

## TABLA DE CONTENIDO

|  |      |
|--|------|
| AGRADECIMIENTOS -----  | ii   |
| TABLA DE CONTENIDO -----   | iv   |
| RESUMEN -----  | vii  |
| ABSTRACT-----  | viii |
| LISTA DE CUADROS -----   | ix   |
| INDICE DE FIGURAS -----  | x    |
| CAPITULO I. INTRODUCCIÓN -----   | 1    |
| A.    Objetivo general -----   | 3    |
| B.    Objetivos específicos -----  | 3    |
| CAPITULO II. REVISIÓN DE LITERATURA -----                                  | 4    |
| A.    Generalidades del cultivo de la piña ( <i>Ananas comosus</i> ) ----- | 4    |
| I.    Origen -----   | 4    |
| II.   Botánica -----   | 4    |
| III.  Requerimientos agroecológicos -----                                  | 5    |
| B.    Importancia económica del cultivo -----                              | 6    |
| C.    Nematodos fitoparásitos: generalidades e importancia -----           | 6    |
| D.    Nematodo lesionador en piña ( <i>Pratylenchus brachyurus</i> ) ----- | 8    |
| E.    Patogenicidad -----  | 10   |

|   |  |    |
|---|--|----|
| F.  | Tasa de reproducción-----  | 11 |
| G.  | Dinámica poblacional-----  | 11 |
| H.  | Interacción de nematodos con otros organismos patógenos -----  | 12 |
| I.  | Métodos de control-----  | 13 |
| <br>CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS----- |  | 15 |
| A.  | Ubicación-----   | 15 |
| B.  | Características agroecológicas -----   | 16 |
| C.  | Estudio de patogenicidad de <i>P. brachyurus</i> en piña MD-2 en condiciones semi-controladas de invernadero -----   | 16 |
| I.  | Identificación molecular-----  | 16 |
| II.   | Tasa de reproducción y daño de <i>P. brachyurus</i> en plantas de piña variedad MD-2 -----   | 18 |
| D.  | Dinámica poblacional de <i>P. brachyurus</i> durante la etapa de desarrollo de la plantación de piña variedad MD-2 en tres fincas en la Región Brunca----- | 23 |
| I.  | Selección del área de muestreo en campo -----  | 23 |
| E.  | Análisis estadístico -----   | 25 |
| <br>CAPITULO IV. RESULTADOS -----           |  | 26 |
| A.  | Estudio de patogenicidad de <i>P. brachyurus</i> en piña MD-2 en condiciones semi-controladas de invernadero -----   | 26 |
| I.  | Identificación molecular-----  | 26 |
| II.   | Tasa de reproducción y daño de <i>P. brachyurus</i> en plantas de piña variedad MD-2 -----   | 26 |

|   |    |
|---|----|
| B. Dinámica poblacional de <i>P. brachyurus</i> durante la etapa de desarrollo de la plantación de piña variedad MD-2 en tres fincas en la Región Brunca----- | 34 |
| C. Discusión-----   | 41 |
| D. Conclusiones-----  | 47 |
| LITERATURA CITADA -----   | 48 |
| ANEXOS -----  | 58 |

## RESUMEN

Los nematodos fitoparásitos representan uno de los mayores desafíos en la agricultura. En el cultivo de piña, *P. brachyurus* se reporta como una de las especies de mayor importancia. La presente investigación evaluó la patogenicidad de este nematodo, así como la dinámica poblacional en el cultivo de piña variedad MD-2 en tres fincas de la Región Brunca. Se determinó la tasa de reproducción (TR) y el daño en variables de crecimiento del cultivo bajo condiciones semi-controladas. Así mismo, la dinámica poblacional se estudió mensualmente en tres fincas de la región Brunca, desde un mes antes de la siembra del cultivo, hasta la inducción a floración, alrededor de los 10 meses posterior a la siembra. Las fincas fueron seleccionadas de acuerdo con el antecedente productivo (piña, pasto, forestales). La tasa de reproducción obtenida ( $TR > 2$ ), indica que la planta de piña presenta las condiciones favorables para la reproducción y establecimiento de *P. brachyurus*, al mismo tiempo que se determinó la afectación del sistema radical a nivel visual con los daños evidentes en la raíz, así como la afectación en peso y calidad de esta al estar expuesta a la presencia de este nematodo. A nivel de variables de desarrollo de crecimiento foliar se obtuvo un comportamiento contrario a lo esperado, en donde las plantas inoculadas con *P. brachyurus* presentaron mayor peso de planta que el tratamiento control sin inoculación, es decir, no se evidenció una afectación negativa en estas variables ante la presencia del nematodo. El estudio de dinámica poblacional efectuado en las tres fincas seleccionadas no mostró diferencias en el comportamiento de la población de *P. brachyurus*, entre las fincas evaluadas, así como variables de clima y variables edáficas. No obstante, mostró un incremento poblacional de *P. brachyurus* bien definido, posterior a los 5 meses de desarrollo vegetativo. Se determinó la presencia de otros géneros de nematodos como *Helicotylenchus* sp., *Paratylenchus* sp. y *Meloidogyne* sp., lo cuales han sido poco estudiados en este cultivo. Esta información da sustento para la realización de estudios posteriores en donde se evalúe la afectación de *P. brachyurus* en edades más avanzadas del cultivo y su efecto en la productividad.

## ABSTRACT

Plant parasitic nematodes represent one of the biggest challenges in agriculture. In pineapple cultivation, *P. brachyurus* is reported as one of the most important species. The present investigation evaluated the pathogenicity of this nematode, and the population dynamics in the cultivation of pineapple variety MD-2 in three farms of the Brunca Region. The reproduction rate (TR) and the damage in crop growth variables were determined under semi-controlled conditions. Likewise, the population dynamics was studied monthly in three farms in the Brunca Region, from one month before the crop's planting, until the flowering induction, around 10 months after planting. The farms were selected according to the productive history (pineapple, pasture, forestry). The reproduction rate obtained ( $TR > 2$ ) indicates that the pineapple plant presents favorable conditions for the reproduction and establishment of *P. brachyurus*, at the same time that the affectation of the root system was determined at a visual level with the evident damage in the root, as well as the affectation in weight and quality of the same when exposed to the presence of this nematode. The affectation of the foliar growth development variables was not clearly identifiable, since a behavior contrary to what was expected was obtained, where the plants inoculated with *P. brachyurus* presented greater plant weight than the control treatment without inoculation. The study of population dynamics carried out in the three selected farms did not show differences in the behavior of the *P. brachyurus* population, between the farms evaluated, as well as climate variables and edaphic variables. However, it showed a well-defined population increase of *P. brachyurus*, after 5 months of vegetative development. The presence of other genera of nematodes such as *Helicotylenchus* sp., *Paratylenchus* sp., and *Meloidogyne* sp., which has been little studied in this crop were detected. This information supports the performance of subsequent studies where the affectation of *P. brachyurus* is evaluated at more advanced ages of the crop and its effect on productivity.



## LISTA DE CUADROS

|   |    |
|---|----|
| Cuadro 1. Descripción de las fincas y lotes seleccionados para el monitoreo de dinámica poblacional de <i>P. brachyurus</i> . Se incluye el antecedente productivo, referido al cultivo anterior a piña y años destinados al cultivo actual de la piña, así como la edad a la cual se realizó el forzamiento o inducción floral de las áreas bajo estudio, meses después de la siembra (mds). ----- | 24 |
| Cuadro 2. Promedio de la población y tasa de reproducción obtenida para <i>P. brachyurus</i> en plantas de piña, 2 meses después de la inoculación (mdi) en condiciones semi-controladas de invernadero. -----  | 27 |
| Cuadro 3. Promedio de peso fresco de raíz e índice de calidad radical obtenido 2 meses después de la inoculación de nematodos en plantas de piña MD-2. -----  | 28 |
| Cuadro 4. Promedio de ganancia de peso de planta, largo y ancho de hoja D obtenido 2 meses después de la inoculación de nematodos en plantas de piña MD-2. -----  | 28 |
| Cuadro 5. Promedio de la población y tasa de reproducción obtenida para <i>P. brachyurus</i> en plantas de piña, 4 meses después de la inoculación (mdi) en condiciones semi-controladas de invernadero. -----  | 30 |
| Cuadro 6. Distribución porcentual de la población de <i>P. brachyurus</i> en las muestras procesadas durante los ensayos de tasa de reproducción. -----   | 30 |
| Cuadro 7. Promedio de peso fresco de raíz, índice de calidad radical, ganancia de peso de planta, largo y ancho de hoja D obtenido 4 meses después de la inoculación de nematodos en plantas de piña MD-2. -----  | 32 |
| Cuadro 8. Caracterización física del suelo pertenecientes a las áreas para el estudio de dinámica poblacional de <i>P. brachyurus</i> . -----   | 39 |
| Cuadro 9. Caracterización química del suelo pertenecientes a las áreas para el estudio de dinámica poblacional de <i>P. brachyurus</i> . -----  | 40 |

## INDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Adulto y huevos de <i>P. brachyurus</i> , tomado de muestras de raíz de piña MD-2, en el Laboratorio de Protección de Cultivos de PINDECO. -----  | 9  |
| Figura 2. Ciclo de vida de <i>Pratylenchus</i> sp. Adaptado (Pethybridge <i>et al.</i> 2008).-----  | 10 |
| Figura 3. Localización de las fincas productoras de piña para el estudio de dinámica poblacional de <i>P. brachyurus</i> en la Región Brunca de Costa Rica. -----   | 15 |
| Figura 4. Cría masiva en zanahoria de <i>P. brachyurus</i> a través de la metodología de Boisseau y Sarah (2008).-----  | 17 |
| Figura 5. Inoculación de <i>P. brachyurus</i> en plantas de piña MD-2 sembradas en potes. ----  | 19 |
| Figura 6. Escala de evaluación para determinar el índice de calidad radical en raíces de plantas de piña variedad MD-2. -----   | 22 |
| Figura 7. Raíz de piña MD-2. A. Daño en una raíz de planta de piña MD-2 inoculada con <i>P. brachyurus</i> , visto al estereoscopio. B. Raíz de planta de piña MD-2 sana sin presencia del nematodo, visto al estereoscopio. C. <i>P. brachyurus</i> dentro de raíz de piña, visto al microscopio. D. <i>P. brachyurus</i> ingresando a una raíz de piña, visto al microscopio. ----- | 33 |
| Figura 8. Dinámica poblacional de juveniles y adultos de <i>P. brachyurus</i> presente en las áreas de muestreo ubicadas en tres fincas de la Región Brunca, durante el periodo de crecimiento vegetativo hasta la inducción floral (10 mds) de la plantación. Intervalos de confianza del 95%. -----   | 35 |
| Figura 9. Dinámica poblacional de juveniles y adultos A <i>Helicotylenchus</i> sp, B. <i>Meloidogyne</i> sp. C. <i>Paratylenchus</i> sp. presente en las áreas de muestreo ubicadas en tres fincas de la Región Brunca, durante el periodo de crecimiento vegetativo hasta la inducción floral de la plantación (10 mds). Intervalos de confianza del 95%. -----                      | 36 |
| Figura 10. Precipitación acumulada registrada durante el desarrollo del estudio de dinámica poblacional de <i>P. brachyurus</i> , en tres fincas de la Región Brunca. -----   | 37 |

Figura 11. Temperatura (A) y Humedad relativa (B) registrada durante el desarrollo del estudio de dinámica poblacional de *P. brachyurus*, en tres fincas de la Región Brunca. --- 38

## CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

La producción de piña representa una de las actividades agrícolas más importantes del país. Costa Rica es considerado uno de los principales productores a nivel mundial, siendo Estados Unidos y Europa los mayores socios comerciales. Durante el 2021 la exportación de piña alcanzó cerca de 1.014 millones de dólares, con lo cual fue el segundo producto agrícola de mayor exportación para el país (PROCOMER 2022).

La producción de piña genera alrededor de 32 mil fuentes de empleo directo y 120 mil puestos indirectos, gracias a la contratación y compra de bienes y servicios de acuerdo con lo reportado por la Escuela de Negocios del INCAE (CANAPEP 2017).

La piña, al igual que la mayoría de los cultivos, es susceptible a diversas plagas y enfermedades, las cuales pueden llegar a limitar la productividad. Entre las plagas asociadas al cultivo, se encuentran los nematodos fitoparásitos (Sipes y Pires 2018). En este cultivo se han identificado más de 100 especies de nematodos, entre los géneros que destacan, están *Pratylenchus*, *Helicotylenchus*, *Meloidogyne* y *Rotylenchulus* (Carvajal 2009, Daramola *et al.* 2013, Vera *et al.* 2017, Sipes y Chinnasri 2018, Sipes y Pires 2018).

Algunos estudios reportan la susceptibilidad del cultivo de la piña hacia los nematodos; sin embargo, la mayoría de estos estudios reportan esta condición para variedades como Champaka o Cayena Lisa (León 2007), las cuales hasta la década de los 80's e inicios de los 90's eran las principales variedades producidas. No obstante, con la introducción y expansión del híbrido MD-2 después de los 90's, son escasos los estudios que se han realizado sobre el tema (Rabie 2017). En Costa Rica, se han realizado pocos estudios de dinámica poblacional de nematodos en el cultivo de piña, los cuales se han centrado en la Región Norte del país. Así mismo, en la revisión de literatura, no se encuentran publicaciones sobre estudios de la patogenicidad de los nematodos en el cultivo de la piña (Carvajal 2009, León 2007).

Dentro de los nematodos fitoparásitos, el género *Pratylenchus* predomina en frecuencia y densidad poblacional en los estudios de dinámica de población que se han realizado en el

país para el cultivo de la piña (León 2007, Carvajal 2009, Guzmán *et al.* 2014a, Guzman *et al.* 2014b). *Pratylenchus* sp. es conocido como el nematodo lesionador, es un nematodo endoparásito migratorio, el cual se aloja en el interior de las raíces, desplazándose intracelularmente mientras se alimenta y reproduce (Duancan y Moens 2006). Dentro de este género, *Pratylenchus brachyurus* es la especie de mayor asociación reportada en el cultivo de la piña (Rabie 2017).

Los estudios de dinámica poblacional y de patogenicidad, permiten profundizar en el conocimiento de la biología y ecología de *P. brachyurus*, lo que a su vez resulta fundamental a fin de establecer las estrategias de manejo más efectivas en el cultivo. Uno de los indicadores más utilizados para describir la patogenicidad y susceptibilidad entre el nematodo y el huésped, es la tasa o factor de reproducción (Anwar y McKenry 2010). Así mismo, dentro de los factores que tienen un efecto sobre la dinámica de las poblaciones de nematodos, se mencionan los factores ambientales y las practicas agronómicas, en donde los sistemas de monocultivos pueden favorecer el desarrollo y mantenimiento de las poblaciones a través del tiempo (Tixier *et al.* 2006, Martínez *et al.* 2015, Grabau y Chen 2016).

El presente trabajo busca determinar la patogenicidad, mediante la obtención de la tasa de reproducción (TR) y descripción del daño provocado por *P. brachyurus* en el crecimiento de la planta de piña, así como determinar la dinámica poblacional de *P. brachyurus* asociada a la fase vegetativa de cultivo de la piña variedad MD-2, en tres fincas pertenecientes a la Región Brunca con diferente historial productivo.

### **A. Objetivo general**

Determinar la dinámica poblacional y la patogenicidad de *Pratylenchus brachyurus* en la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr. (1917)) variedad MD-2, en tres fincas con diferente historial de producción agrícola, en la Región Brunca de Costa Rica.

### **B. Objetivos específicos**

1. Determinar la dinámica poblacional de *Pratylenchus brachyurus* durante la etapa de desarrollo de plantación de piña variedad MD-2 en tres fincas de la Región Brunca.
2. Determinar la patogenicidad de *Pratylenchus brachyurus* mediante la obtención de la tasa de reproducción y caracterización del daño en la piña variedad MD-2 bajo condiciones controladas de invernadero.
3. Comparar el efecto del historial productivo de la plantación de piña sobre la dinámica poblacional de *Pratylenchus brachyurus*.

## CAPITULO II. REVISIÓN DE LITERATURA

### A. Generalidades del cultivo de la piña (*Ananas comosus*)

#### I. Origen

El cultivo de la piña tiene sus orígenes en el continente americano, propiamente en la región suramericana del continente. Diversos autores señalan la región de Brasil, Argentina y Paraguay como su centro de origen (Carvajal 2009, Helí 2015, Treviño 2018).

La producción de piña se distribuye alrededor del 50% en Asia, principalmente en países como Tailandia y Filipinas, mientras que alrededor del 20% se produce en América Central, México, Caribe y Sur América y un 10% aproximadamente de la producción se encuentra en África (Carvajal 2009).

#### II. Botánica

La planta de piña pertenece a la familia Bromeliaceae, la cual está compuesta por más de 50 géneros y reporta más de 3 100 especies. Es una planta herbácea, monocotiledónea, perenne, perteneciente al género *Ananas*. Posee una inflorescencia terminal que da origen a un fruto múltiple (Coppens y Leal 2018). La planta de piña es alógama auto incompatible por lo cual su reproducción se da principalmente por la vía asexual a través de semilla vegetativa, principalmente por rebrotes de la planta o por la corona de la fruta, con lo cual se considera que tiene una tasa de reproducción baja en comparación con otros cultivos (Villegas *et al.* 2007, Medina *et al.* 2014).

Durante la fase de crecimiento vegetativo y de acuerdo con las condiciones ambientales, la planta requiere de aproximadamente 12 a 14 meses antes de poder realizar la primera cosecha (Bartholomew 2018). De este período, al menos ocho meses corresponden a la etapa de crecimiento y desarrollo vegetativo, posterior a esto se da la inducción floral a través del uso de un regulador de crecimiento con el fin de sincronizar la floración y con esto permitir a gran escala la producción comercial del cultivo. La formación y desarrollo del fruto, tiene una duración aproximada de cinco meses (León 2007, Bartholomew 2108).

La planta de piña presenta un sistema radical compacto provisto de raíces fuertes, poco ramificadas que sirven de anclaje, está provisto de una buena cantidad de pelos radicales (Bartholomew 2018). La raíz de la piña se concentra en los primeros 15-30 cm del suelo. Sin embargo, puede alcanzar profundidades de hasta 60 cm. La emisión de raíces posterior a la siembra de la semilla vegetativa se inicia en los primeros 20 días (Arrieta y Treminio 2021).

### III. **Requerimientos agroecológicos**

Dentro de los principales factores que inciden directamente en la producción de la piña, están los factores agroclimáticos. La temperatura es un factor que afecta el desarrollo del cultivo. Mendez (2010) señala que el crecimiento de raíces y hojas puede llegar a detenerse con temperaturas menores a los 21°C y mayores a 35°C. Con un crecimiento óptimo a temperaturas anuales de 24°C y 27°C. Mientras que la luminosidad se señala como una variable que tiene un efecto marcado en el rendimiento del cultivo, ligado a la floración de la planta y aprovechamiento de nitrógeno y síntesis de carbono en tejidos.

Por otro lado, la precipitación entre 1 200 y 2 000 mm por ciclo de cultivo se considera como la óptima, en donde es esencial la distribución de esta a lo largo del ciclo, se considera que este cultivo presenta una morfología que permite un mejor aprovechamiento de este recurso y por tanto no es muy exigente del mismo (Mendez 2010).

En cuanto a las características de suelo, la planta de piña puede crecer un amplio rango de tipos de suelo. Suelo con un buen contenido de materia orgánica y buen drenaje suelen ser los óptimos (Vásquez *et al.* 2018). Reyes (1999) citado por Mendez (2010), señala que un suelo permeable con un adecuado drenaje y un pH que se encuentre entre 5-6 presenta las condiciones ideales para desarrollar el cultivo de la piña.

En cuanto al contenido nutricional, elementos como calcio suelen ser de esencial manejo dado las características de acidez que suelen presentar los suelos en donde se lleva a cabo la producción de piña (Vásquez *et al.* 2018).



## **B. Importancia económica del cultivo**

La variedad MD-2 fue desarrollada en Costa Rica por la compañía Del Monte a mediados de los 90's. Actualmente esta variedad se comercializa en Estados Unidos, Europa, Asia y otros países. El híbrido MD-2 fue desarrollado a partir de la "Cayena Lisa", presenta un alto rendimiento en comparación con otras variedades, presenta un sabor más dulce, lo que le ha permitido posicionarse en el mercado internacional (Carvajal 2009).

En Costa Rica, la exportación de piña ha alcanzado ingresos cercanos a los 1 000 millones de dólares en los últimos años (PROCOMER 2022). Datos publicados por CANAPEP (2017) señalan al sector como uno de los más importantes en la economía del sector agrícola, en donde ha alcanzado una representación del 31% en el PIB agrícola. Así mismo, la generación de empleo producto de la actividad agrícola de este sector en las zonas rurales donde se concentra la producción, ha permitido la disminución de la pobreza y los índices de desempleo. Por otra parte, el crecimiento de la producción de piña ha generado un crecimiento industrial de subproductos de piña fresca, tales como concentrados y el comercio de piña congelada, convirtiendo al sector en un motor económico y social para el país.

## **C. Nematodos fitoparásitos: generalidades e importancia**

Los nematodos constituyen uno de los filos más grandes del Reino Animal, los cuales están presentes prácticamente todos los ecosistemas. Son organismos multicelulares caracterizados por poseer un cuerpo cilíndrico o vermiforme. No presentan segmentación de su cuerpo y carecen de estructuras de locomoción para desplazarse (Van den Berg *et al.* 2017). Los nematodos son clasificados como organismos pseudocelomados, es decir poseen líquido en el espacio entre los órganos internos y la pared del cuerpo (Núñez 2017).

Los nematodos pueden ser de vida libre, bacteriófagos, depredadores de nematodos, parásitos del hombre, depredadores de insectos o parásito de plantas (fitoparásitos). Los nematodos fitoparásitos son dependientes de la humedad o partículas de agua para movilizarse (Bridge y Starr 2007). Así mismo, los autores mencionan que la mayoría de los nematodos fitoparásitos cumplen una parte de su ciclo de vida en el suelo.

Los nematodos parásitos de plantas se caracterizan por poseer un estilete, el cual es una estructura que permite perforar el tejido vegetal y tomar los nutrientes dentro de este. De acuerdo con el proceso de alimentación, pueden ser clasificados como endoparásitos, ectoparásitos y semi-endoparasitos. Los endoparásitos hacen referencia cuando el nematodo ingresa en el interior del tejido vegetal para alimentarse y completar su ciclo de vida dentro del tejido vegetal, algunos géneros dentro de esta clasificación de importancia agrícola son *Pratylenchus* y *Radopholus*. Por otro lado, los nematodos ectoparásitos son aquellos en donde el nematodo se alimenta sin ingresar a la planta (Carvajal 2009); dentro de esta clasificación, se pueden mencionar géneros como *Trichodorus*, *Xiphinema*, entre otros. Los nematodos que se clasifican como semi-endoparásito son aquellos que parcialmente penetran los tejidos y parte del cuerpo queda fuera de las raíces para alimentarse, como *Tylenchulus* y *Rotylenchulus* (Guzmán *et al.* 2012).

El ciclo de vida de los nematodos fitoparásitos puede durar alrededor de cuatro semanas, dependiendo de las condiciones ambientales como temperatura y humedad (León 2007). El ciclo de vida de estos organismos está compuesto por la etapa de huevo, la etapa de juveniles que a su vez se segmenta en 4 estados y la etapa adulta (Bridge y Starr 2007) Algunos géneros de nematodos presentan dimorfismo sexual, lo cual indica que la hembra y el macho presentan diferencias morfológicas, como por ejemplo los nematodos formadores de agallas, entre los cuales destacan los géneros de *Meloidogyne* y *Globodera*.

Los nematodos fitoparásitos son de gran importancia para la agricultura debido al impacto negativo que pueden ocasionar sobre el rendimiento de un cultivo; Guzmán *et al.* (2012) menciona que estas pérdidas pueden llegar a representar entre 11 y 14% anual. En Costa Rica se reportan algunos géneros de importancia económica entre los cuales destacan como *Tylenchus*, *Globodera*, *Radopholus*, *Xiphinema*, *Apelenchoides*, *Meloidogyne* y *Pratylenchus* (Gamboa 2019).

El cultivo de la piña se considera como un cultivo susceptible al ataque de nematodos, por lo cual es considerado como un factor limitante de producción (Hernández s.f. y Gandarilla *et al.* 2014).

#### **D. Nematodo lesionador en piña (*Pratylenchus brachyurus*)**

En el cultivo de la piña se han reportado alrededor de 100 especies de nematodos fitoparásitos (Sipes *et al.* 2018). Dentro de los géneros se reportan con mayor frecuencia *Pratylenchus*, *Rotylenchulus*, *Meloidogyne* y *Helicotylenchus* (Carvajal 2009).

El género *Pratylenchus* pertenece a la familia Pratylenchidae (Bucki *et al.* 2020). Este género está compuesto por alrededor de 80 especies, de las cuales según menciona Perrine (2019), al menos 11 son de importancia económica pues están asociados a algún cultivo. En piña, la especie que se reporta con mayor frecuencia es *P. brachyurus*. Los primeros reportes de *P. brachyurus* en el cultivo de piña fueron realizados en Hawaii alrededor de 1929 (Guerout 1975). Ferreira *et al.* (2014), mencionan que las pérdidas en piña pueden variar de un 47% a un 80%. En otros cultivos como soya Olivera *et al.* (2015) menciona que este nematodo puede llegar a ocasionar la pérdida de un 10-30 % de la producción potencial. Así mismo, Fontana *et al.* (2018) señalan que, en algunas zonas de la región central-oeste de Brasil, se ha documentado la afectación de hasta el 50 % de la producción de soya a causa de este nematodo.

*P. brachyurus* conocido como el nematodo lesionador, es un nematodo endoparásito migratorio, penetra a través de la epidermis y se aloja en el interior de la raíz desplazándose entre las células radiculares. Según lo mencionan Gandarilla *et al.* (2014), produce la separación de la corteza del cilindro central lo que ocasiona lesiones necróticas en las raíces. Las heridas producidas por *P. brachyurus* pueden facilitar el ingreso de patógenos secundarios como *Fusarium* y *Phytophthora*, entre otros (Olivera *et al.* 2015). La sintomatología asociada a este género puede confundirse con deficiencias nutricionales, ataque de otros patógenos o estrés hídrico.

*P. brachyurus* se caracteriza por poseer un estilete corto y fuerte, tanto machos como hembras son vermiformes o cilíndricos, es decir, no presenta dimorfismo sexual. Tiene una longitud aproximada de 340 a 800  $\mu\text{m}$ . posee un traslape ventral del esófago. La posición de la vulva se ubica entre un 70 y 80% del largo del cuerpo (Figura 1).

Las hembras tienen un mayor tamaño que los machos (Gamboa 2019). *P. brachyurus* tiene una reproducción principalmente por partenogénesis (Perrine 2019).



Figura 1. Adulto y huevos de *P. brachyurus*, tomado de muestras de raíz de piña MD-2, en el Laboratorio de Protección de Cultivos de PINDECO.

El ciclo de vida de *P. brachyurus* puede ser completado en cinco o seis semanas, a temperaturas entre los 18 y los 30 °C (Gamboa 2019, López *et al.* 2021). Está compuesto por seis estados, empezando por huevo, cuatro estados larvales o juveniles hasta llegar a adultos (Castillo y Volvas 2007a).

El estadio juvenil J1 lo completa dentro del huevo, al mudar a J2, este sale del huevo (Figura 2). Los estados juveniles J2, J3 y J4, así como los adultos son sumamente móviles y pueden llegar a infectar raíces (Mokrini 2018). Las hembras pueden colocar los huevos dentro o cerca de la raíz de la planta o en el suelo, de manera individual o en grupos pequeños. Los individuos de *Pratylenchus* sp. pueden sobrevivir en restos vegetales (Bucki *et al.* 2020, Gamboa 2019, Pethybridge *et al.* 2008).

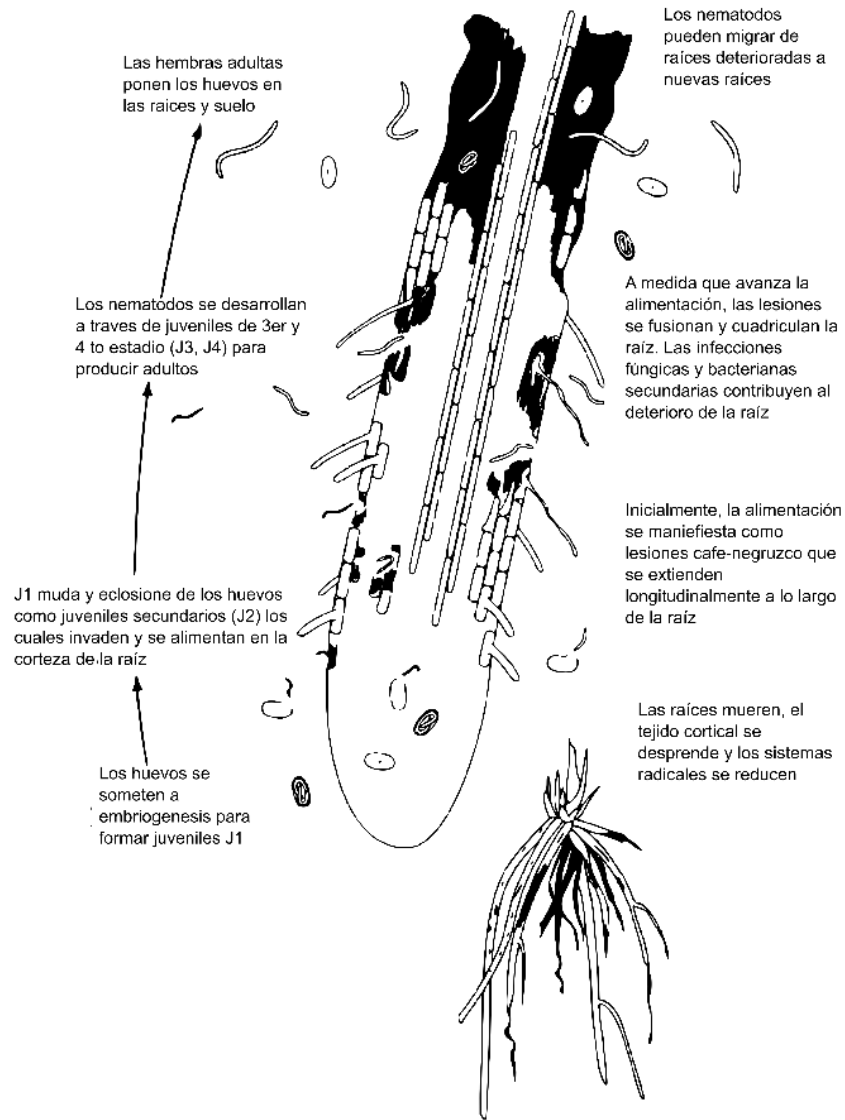


Figura 2. Ciclo de vida de *Pratylenchus* sp. Adaptado (Pethybridge *et al.* 2008).

### E. Patogenicidad

La patogenicidad se refiere a la capacidad que tiene un organismo para generar enfermedad o provocar daño al hospedero en presencia del patógeno. Sin embargo, este término es utilizado en el ámbito nematológico de forma ambivalente, según lo mencionan Castillo y Volvas (2007a), debido a que por una parte describe la capacidad del patógeno para establecer una relación con el huésped (capacidad del nematodo para reproducirse en la

planta) y, por otro lado, trata de cuantificar la expresión del daño que causa esa relación hacia al huésped (capacidad de reducir el desarrollo y crecimiento de la planta).

### **F. Tasa de reproducción**

El parámetro que se utiliza para medir la capacidad reproductiva de un nematodo se le conoce como índice de reproducción, factor o tasa de reproducción (FR o TR), el cual se obtiene a partir del cociente de la población final entre la población inicial del nematodo en el huésped (Anwar y McKenry 2010). Un FR menor a 1 indica que la planta no es susceptible al nematodo, entre 1 y 1,5 se considera como un huésped pobre, cuando el FR es superior a 1,5 se refiere a que hay susceptibilidad hacia el nematodo (Nico 2002). No obstante, el factor de reproducción no indica el grado de susceptibilidad o agresividad que puede darse en la relación huésped-patógenos; ya que la susceptibilidad de una planta y la capacidad de reproducción del nematodo va a depender de varios factores como el tipo de suelo, condiciones de humedad y temperatura, así como la condición nutricional de la planta. De acuerdo con lo mencionado por Castillo y Volvas (2007a), la fertilización tiene un efecto positivo sobre el huésped y uno negativo sobre la población de nematodos.

En el caso del cultivo de la piña, algunos autores reportan la condición de susceptibilidad de ésta a la presencia de nematodos (Gandarilla *et al.* 2014). Según Carvajal (2009), en piña se puede encontrar afectación de raíces y la disminución en el desarrollo vegetativo a partir de 1 000 *Pratylenchus* en 10 g de raíz; no obstante, esto contrasta con lo mencionado por Rabie (2017) quien reporta el hallazgo poblaciones elevadas de *Pratylenchus* en plantas de piña variedad MD-2 sin aparente afectación en el desarrollo del cultivo, sugiriendo cierto nivel de tolerancia de esta variedad de piña hacia *Pratylenchus*.

### **G. Dinámica poblacional**

La dinámica poblacional comprende el estudio de las variaciones (aumento o reducción) de las poblaciones, así como de aquellos factores que producen los cambios (Schomaker y Been 2013).

Las variaciones en la población de nematodos pueden darse por la interacción con otros factores tales como suelo (contenido de materia orgánica y textura), temperatura y disponibilidad de humedad (Tixier *et al.* 2006). Por otra parte, Vera *et al.* (2017) mencionan que la fluctuación en la población de nematodos está influenciada de acuerdo con el manejo agronómico como tipo de labranza y permanencia de un mismo cultivo.

Estudios de distribución de nematodos y su relación con factores edáficos, señalan que *P. brachyurus* se desarrolla de manera favorable en suelos con pH más ácidos, los cuales son característicos de zonas dedicadas a la producción del cultivo de piña (Sarah *et al.* 1991, Kawanobe *et al.* 2020).

Estudios realizados en piña sugieren que hay una fluctuación en las densidades poblaciones a lo largo del ciclo del cultivo; sin embargo, estas variaciones han sido poco estudiadas y no son muy claras.

#### **H. Interacción de nematodos con otros organismos patógenos**

La interacción de nematodos con otros organismos presentes en el suelo ha sido ampliamente reportada. La presencia de nematodos fitopatógenos en la rizosfera de la planta puede a menudo llevar a la asociación y afectación de otros patógenos de raíz, como hongo y bacterias fitopatógenas.

El género *Pratylenchus* ha sido reportado en asociación con otros patógenos como *Fusarium* y *Phytophthora* en cultivos de importancia como café. El daño inicial producido por *P. brachyurus* puede hacer más susceptible a la raíz al ataque de otros microorganismos (Perrine 2019).

Otro fenómeno que ha sido analizado por diversos autores, indica que la presencia de nematodos fitoparásitos, tienen relación con el rompimiento de la resistencia en algunos cultivos, es decir, cultivos que pueden tener resistencia a ciertos fitopatógenos, pierden esta característica de resistencia ante la presencia de nematodos (Zavaleta 2002).

## I. Métodos de control

El manejo integrado de las poblaciones de nematodos en el cultivo de piña se basa principalmente en el uso combinado de diversos de métodos como control cultural, control biológico y control químico. Castillo y Volvas (2007b) señalan que una vez presente *Pratylenchus* dentro de un área de producción, su control es dificultoso y deben emplearse múltiples esfuerzos para reducir su efecto en el cultivo.

### Control Cultural

Dentro de los métodos culturales que tienen un mayor aporte en el manejo integrado de nematodos, se menciona el tiempo de barbecho, el cual es efectivo pero debido a la necesidad de aprovechamiento del área muchas veces no es viable. La rotación con cultivos no hospederos es otra táctica efectiva, sin embargo, *P. brachyurus* tiene un amplio rango de hospederos alternos, lo que puede limitar su uso (Talavera 2003). No obstante, estudios realizados en México han sido llevados a cabo con gran éxito, empleando esta técnica a través de la rotación de maíz, algodón y soya (Castillo y Volvas 2007b).

La solarización a través del uso de mulch de plástico es otro método utilizado; en este la temperatura provoca la mortalidad de las poblaciones de nematodos en el suelo (Aballay 2005). Temperaturas superiores a los 53°C se reportan que pueden causar la muerte de estados juveniles de *Meloidogyne* y *Pratylenchus* (Guerout 1975).

El uso de material de propagación resistente o tolerante ha sido menos explorado en el cultivo de la piña. Este método ha sido utilizado en pocos cultivos como papa y algunos forrajes (Castillo y Volvas 2007b, Desaegeer *et al.* 2022).

El uso de labranza profunda durante la preparación del suelo para la siembra ha sido reportado como beneficioso para el manejo de plagas de suelo incluidos el control de los nematodos (Sipes y Pires 2018).



### Control biológico

El uso de controladores biológicos como *Paecilomyces* sp., *Bacillus* sp., *Pausteria* sp. entre otros han sido reportados en el manejo de nematodos junto con la adición de materia orgánica con el fin de promover el incremento de microorganismos antagonistas. Así mismo, se reporta el uso de micorrizas como organismos que favorecen el crecimiento radical y con efecto protector al ataque de nematodos.

Otros reportes señalan hongos como *Pleurotus ostreatus* el cual libera compuestos con efecto nematocida. Algunas especies de *Bacillus thuringiensis* y *B. subtilis* que pueden actuar por competencia por recursos y favorecer la inducción de resistencia en las plantas y por antibiosis (Valencia *et al.* 2014, Florez 2021).

### Control químico

Es el método de control más utilizado, se basa principalmente la aplicación de nematicidas sintéticos y fumigantes de suelo. Dentro de los fumigantes de uso más común y que cuentan con registro en el país para el cultivo de piña, se destaca la dicloropropeno, metam sodio y la cloropicrina, aunque esta última molécula tiene efecto fungicida y no nematicida (Castillo y Volvas 2007b).

Los productos no fumigantes más ampliamente utilizados en Costa Rica y que cuentan con registro en el cultivo de piña son moléculas pertenecientes al grupo de organofosforados y carbamatos tales como oxamil, etoprofos, fenamifos, cadusafos y benfuracarb. Estos productos en su mayoría son banda roja y amarilla, lo cual indica que tienen un grado de toxicidad alto y múltiples cuestionamientos por los riesgos ambientales y a la salud humana (Desaeger *et al.* 2022). Según menciona Rabie (2017), las aplicaciones de productos sintéticos posteriores a la siembra no reducen la población de nematodos; el efecto de las aplicaciones va dirigido a retrasar el incremento en la población de la plaga al momento de la aplicación, dado las limitaciones que pueden tener estos productos para alcanzar a la plaga, al tener un efecto principalmente de contacto y dada la biología del nematodo *P. brachyurus* (endoparásito) el cual permanece en el interior de las raíces.

## CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Ubicación

La presente investigación se llevó a cabo en la Región Brunca de Costa Rica. Los ensayos de patogenicidad se efectuaron en Buenos Aires de Puntarenas, en las instalaciones del Departamento de Investigaciones de la compañía de producción de piña PINDECO ubicadas en la zona Sur del país (Figura 3). Se utilizó un invernadero como área parcialmente controlada para la permanencia de los experimentos en donde se determinó la tasa de reproducción y descripción del daño.

El estudio de dinámica poblacional se desarrolló en tres fincas comerciales de piña de la compañía, ubicadas en Buenos Aires de Puntarenas y en Pérez Zeledón de San José. En el caso de las fincas localizadas en el cantón de Buenos Aires de Puntarenas, fueron identificadas como Finca Buenos Aires y Finca Los Ángeles, mientras que la finca ubicada en Pérez Zeledón se identificó como Finca Santa Fe.

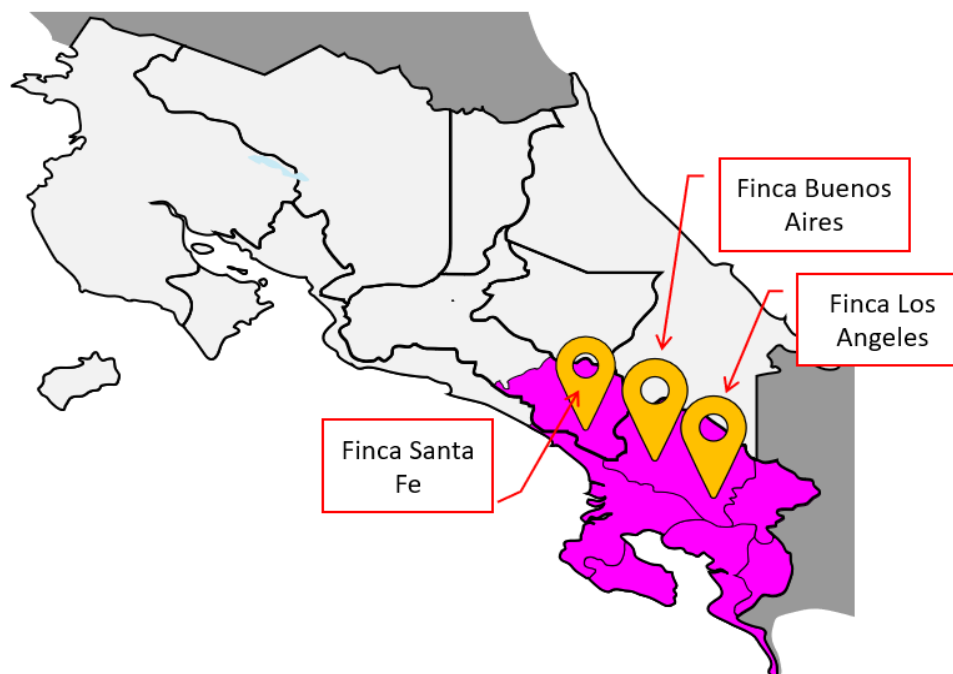


Figura 3. Localización de las fincas productoras de piña para el estudio de dinámica poblacional de *P. brachyurus* en la Región Brunca de Costa Rica.

## **B. Características agroecológicas**

El cantón de Buenos Aires presenta un clima tropical húmedo-seco, en donde se da la alternancia de masas de aires seco con masas de aire húmedo. Presenta un promedio de precipitación anual que ronda los 3 700 mm, la temperatura promedio es de 26,5°C (Amador *et al.* 2011). El cantón de Pérez Zeledón presenta una temperatura promedio anual de 23,3°C con una precipitación promedio anual de 2 950 mm. La humedad relativa de la región varía entre el 80 y 90% (Municipalidad Pérez Zeledón, 2020).

## **C. Estudio de patogenicidad de *P. brachyurus* en piña MD-2 en condiciones semi-controladas de invernadero**

### **I. Identificación molecular**

Para el establecimiento de los ensayos de patogenicidad se realizó la reproducción masiva de *P. brachyurus* a través de la metodología de cría masiva en zanahoria (Boisseau y Sarah 2008), como fuente de inoculación. Previamente se llevó a cabo la identificación molecular de los nematodos, para lo cual se tomaron muestras de raíz proveniente de un área en producción de piña en Finca Buenos Aires con presencia de nematodos. Se extrajeron juveniles y adultos utilizando el método de extracción por Centrifugación con Solución Azucarada (Cavenness y Jensen, 1955), identificados morfológicamente como *Pratylenchus* sp. en el Laboratorio de Protección de Cultivos de PINDECO y se enviaron al Laboratorio de Nematología de la Universidad de Costa Rica para la respectiva identificación molecular, la cual se realizó a través de la extracción de ADN, amplificación y secuenciación de la región 28S, y comparados con las secuencias del GenBank.

#### Preparación de inóculo de *P. brachyurus*

Para el desarrollo de los ensayos de patogenicidad se realizó el aislamiento y multiplicación de *P. brachyurus* en el Laboratorio de Protección de Cultivos de PINDECO, utilizando la metodología modificada de cría masiva en zanahoria de nematodos Pratylenchidae utilizada por Boisseau y Sarah (2008). Para esto, en la cámara de flujo laminar, la zanahoria se desinfectó con alcohol al 95% y se pasó por la llama de un quemador Bunsen rápidamente.

Posteriormente y siempre dentro de la cámara de flujo laminar se tomaron las zanahorias a las cuales se les descartó los bordes. Luego de esto se cortaron discos de un grosor de 5 mm aproximadamente. Los discos obtenidos se colocaron en platos Petri estériles de 100 mm de diámetro (aproximadamente de cuatro a cinco discos por plato según el tamaño de cada disco de zanahoria).

A cada disco se le inocularon alrededor de 25 individuos de *P. brachyurus*; los cuales fueron previamente desinfectados con 0,5 ml de sulfato de estreptomicina con una concentración de 6 000 partes por millón del compuesto, 24 horas posterior a la desinfección con la estreptomicina, los nematodos fueron lavados con agua destilada estéril en tres ocasiones. Los platos Petri con la zanahoria inoculada con los nematodos se almacenaron en una incubadora en oscuridad a una temperatura aproximada de 25-27 °C durante dos meses y medio. Posterior a este tiempo, se extrajeron los individuos de *P. brachyurus* que se habían multiplicado en los trozos de zanahoria para las posteriores inoculaciones, para lo cual se tomaron los discos de zanahoria y se picaron finamente, esto se colocó en un beaker con 0,5 L de agua destilada, se llevó a agitación por 1 hora, posteriormente el contenido del beaker se filtró en cribas de 100, 400 y 500 mesh; lo obtenido en las cribas de 500 se colectó en un beaker y se aforó a 500 ml, de aquí se tomó una alícuota de un mililitro y se contabiliza la cantidad de nematodos presente, este proceso de cuantificación se repitió en cinco ocasiones (Figura 4).

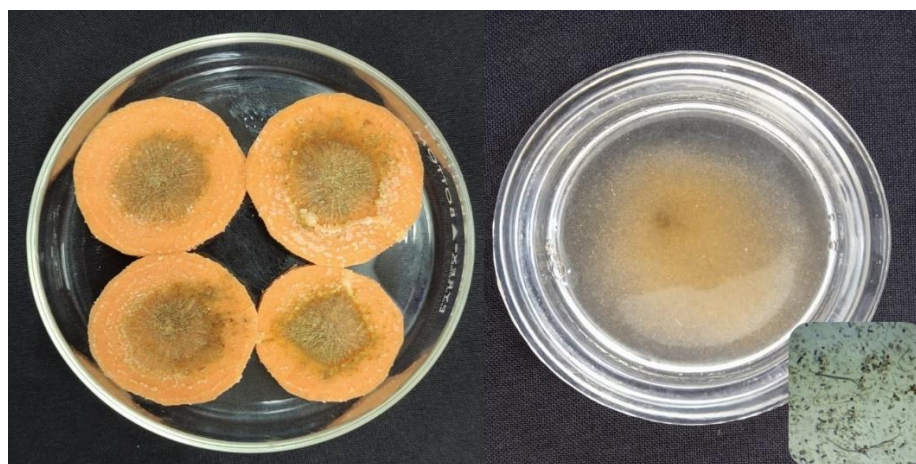


Figura 4. Cría masiva en zanahoria de *P. brachyurus* a través de la metodología de Boisseau y Sarah (2008).

Para determinar la tasa de reproducción y el daño ocasionado por *P. brachyurus* en piña, se estableció un ensayo preliminar, en el cual se evaluó el efecto de la inoculación de nematodos en plantas de piña con tres semanas de desarrollo desde la siembra, sembradas en potes de 20 L, en dos condiciones ambientales diferentes, la primera condición en invernadero y la segunda en ambiente natural. A partir de este ensayo, se determinó la población de *P. brachyurus* que se utilizó para la inoculación de dos ensayos posteriores de tasa de reproducción y daño, así como el número de repeticiones y la condición del ambiente en el cual fueron desarrollados estos dos ensayos.

## **II. Tasa de reproducción y daño de *P. brachyurus* en plantas de piña variedad MD-2**

### Parte I: Estudio preliminar de tasa de reproducción y daño de *P. brachyurus* en plantas de piña MD-2

Para determinar la tasa de reproducción o factor de reproducción (TR o FR) de *P. brachyurus* en el cultivo de piña, se estableció un primer ensayo, en el cual se evaluaron dos factores, el primer factor fue con y sin inoculación de 5 000 nematodos por planta, mientras que el segundo factor fue el sitio de establecimiento, en ambiente parcialmente controlado y en ambiente natural. Para el ambiente protegido o semi-controlado, se utilizó el invernadero del área experimental de la sección de Protección de Cultivos ubicada en finca Buenos Aires, el cual consistió en un invernadero con una estructura metálica, con el techo cubierto con plástico transparente, así como dos terceras partes de la altura de las, la otra tercera parte de las paredes con sarán para una mejor circulación del aire; esto permitió mantener controlada la condición de precipitación; mientras que los tratamientos expuestos al ambiente natural se establecieron fuera de dicho invernadero dentro de la misma área experimental.

Se utilizaron potes con una capacidad de 20 L aproximadamente, con una mezcla de suelo con arena como sustrato estéril en una relación 3:1. Para la esterilización del suelo y la arena se utilizó una autoclave marca Gemmy TC409. Una vez esterilizado el material, se procedió a realizar la mezcla del sustrato y al llenado de potes. Estos se colocaron sobre tarimas recubiertas con plástico color negro con el fin de evitar el contacto directo de los potes con el suelo y con esto reducir el riesgo de contaminación cruzada.

Como material de siembra se utilizó semilla vegetativa de piña con un peso aproximado de 200 g, directamente de plantación para evitar el contacto de la semilla con el suelo. Las semillas fueron lavadas con abundante agua y jabón con el fin de retirar cualquier contaminante superficial o partícula de suelo. Previo a la siembra, se pesó cada semilla con ayuda de una romana de precisión marca A&D Engineering, Inc (Modelo EJ 3 000). Se utilizaron un total de 10 repeticiones, donde cada repetición constó de un pote con sustrato con su respectiva planta de piña. Se dejaron dos plantas adicionales para monitorear el crecimiento radical y determinar el momento oportuno para realizar las inoculaciones, estas plantas no fueron contempladas como parte del ensayo. El manejo de la fertilización fue el comercial, con la aplicación de un primer ciclo granular y posteriormente aplicaciones foliares cada 15 días.

Las plantas fueron inoculadas con 5 000 individuos de *P. brachyurus* tres semanas después de la siembra, cuando estas presentaron emisión de raíces. Como fuente de inóculo, se utilizaron los nematodos criados en el laboratorio. La inoculación fue realizada en horas de la tarde, con el fin de tener condiciones más frescas durante la inoculación y posterior a esta. La inoculación se realizó dirigida a la base de la planta, a una profundidad aproximada de 1,5 pulgadas de la superficie del sustrato con el fin de favorecer el contacto del inóculo con las raíces de las plantas (Figura 5).



Figura 5. Inoculación de *P. brachyurus* en plantas de piña MD-2 sembradas en potes.

Las plantas inoculadas permanecieron sobre tarimas de madera cubiertas con plástico negro para evitar el contacto directo con el suelo a lo largo de la duración del ensayo. Se colocó riego por goteo, el cual se manejó a capacidad de campo para el experimento ubicado dentro del invernadero.

Cuando las plantas cumplieron 2 meses después de la inoculación (mdi), se procedió a realizar la evaluación de cada repetición, para lo cual se siguió el método de extracción de Centrifugación con Solución Azucarada (Cavenness y Jensen, 1955). Para cada planta se extrajo la totalidad de raíz, la cual fue pesada en su totalidad. Se removió de manera cuidadosa el exceso de suelo, del cual se apartaron 100 ml para la respectiva extracción de nematodos en suelo.

Para la extracción de los nematodos presentes en raíz se lavaron las raíces cuidadosamente, se cortaron en trozos de aproximadamente uno y dos centímetros y se homogenizaron en un recipiente plástico. Posterior a esto, cada muestra de raíz de cada repetición o planta, se tomaron tres sub-muestras de 10 g para proceder con la extracción de los nematodos. Las submuestras de raíz se maceraron de manera individual por 20-30 segundos en una licuadora a velocidad media marca Waring (modelo 7011S).

El macerado se pasó a través de un juego de dos cribas superpuestas, la primera de 500 mesh y sobre esta una segunda criba de 100 mesh; el material de la criba superior fue lavado con abundante agua, el material más grueso que quedó en la criba de 100 mesh fue descartado posterior al lavado, mientras que el material retenido por la criba de 500 mesh fue depositado en un tubo de centrífuga de 50 ml con ayuda de una piseta con agua potable.

Adicionalmente, la muestra de suelo debió ser homogenizada, de esta se tomaron 100 ml y se colocaron en un balde de aproximadamente dos litros. Se agregó agua a presión y se dejó reposar por 30 segundos, luego se pasó por las cribas de 100 y 500 mesh. El procedimiento se repitió dos veces. El material de la criba superior fue lavado con abundante agua, el material más grueso que quedó en la criba de 100 mesh fue descartado posterior al lavado, mientras que el material retenido por la criba de 500 mesh fue depositado en un tubo de centrífuga de 50 ml con ayuda de una piseta con agua potable.

Los tubos de 50 ml con el contenido de la muestra tanto de raíz como de suelo se centrifugaron durante tres minutos a una velocidad de 3 000 rpm en una centrifuga Eppendorf 5810. Posteriormente con cuidado de no perturbar el precipitado, se eliminó el sobrenadante (agua) y se agregó al tubo la solución azucarada previamente preparada (471 g de azúcar en un litro de agua de potable). Se agitó manualmente y se centrifugó nuevamente por 3 minutos a 3 000 rpm.

Transcurrido el tiempo de centrifugado, el sobrenadante que contiene los nematodos, se transfirió a la criba de 500 mesh, evitando que el precipitado en el fondo del tubo se pase al líquido (que es el que contiene los nematodos). Con una piseta con agua se lavó el material retenido en la criba de 500 mesh para eliminar la solución azucarada y posterior a esto se recolectó la muestra en un plato petri contador para observar al estereoscopio y de esta forma se procedió con el conteo de las poblaciones de *P. brachyurus*.

La tasa de reproducción se calculó mediante la aplicación de la formula  $FR = Pf/Pi$ , en donde Pf corresponde a la población final de *P. brachyurus* encontrada tanto en el volumen total de suelo como en el volumen total de la raíz de la planta y Pi= corresponde a la población inicial de *P. brachyurus* inoculada (5 000 unidades de inóculo). En este conteo se contemplaron adultos, juveniles y huevos.

Para la descripción del daño, para cada repetición o planta se procedió la medición de variables de crecimiento como el largo y ancho de hoja D, la cual es la hoja adulta más joven y que fisiológicamente es activa (Ebel *et al.* 2016); ganancia de peso de planta, peso fresco de raíz y calidad radical, esta última variable se obtuvo mediante la escala de evaluación mostrada en la figura 6, en donde la escala 0 representa una raíz en buenas condiciones y la escala 4 representa una raíz pobre y posteriormente mediante la obtención del índice de los datos.





Figura 6. Escala de evaluación para determinar el índice de calidad radical en raíces de plantas de piña variedad MD-2.

## Parte II: Ensayos de reproducción y daño de *P. brachyurus* en plantas de piña variedad MD-2

Posterior al ensayo preliminar, se establecieron dos experimentos adicionales distanciados una semana entre el establecimiento de cada uno, en donde se consideraron algunas modificaciones a partir de los resultados obtenidos en el trabajo preliminar.

Los cambios contemplaron el aumento a cuatro semanas la edad de las plantas posterior a la siembra para la inoculación, cuando se evidenció, a través de un muestreo aleatorio, que las plantas presentaban suficiente raíz. Además, los dos experimentos se establecieron en condiciones de invernadero en el área experimental de Protección de Cultivos en Finca Buenos Aires, incrementando el número de repeticiones de 10 a 15. Se utilizó como inóculo inicial una población de 2 000 individuos de *P. brachyurus* por planta, se extendió la edad de evaluación a cuatro meses después de la inoculación (mdi). La metodología de establecimiento en cuanto la capacidad de los potes, sustrato, tipo, peso de semilla y fertilización, se siguió sin variaciones de acuerdo con lo descrito en el establecimiento del ensayo preliminar.

Cuando las plantas cumplieron cuatro mdi, se procedió a realizar la evaluación de cada repetición, para lo cual se siguió el método de extracción de Centrifugación con Solución Azucarada descrito en el apartado anterior.

La tasa de reproducción y descripción de daño para ambos ensayos fue estimada a partir del procedimiento indicado para el ensayo preliminar.

#### **D. Dinámica poblacional de *P. brachyurus* durante la etapa de desarrollo de la plantación de piña variedad MD-2 en tres fincas en la Región Brunca**

##### **I. Selección del área de muestreo en campo**

Se seleccionaron tres áreas de producción para dar seguimiento a la población de *P. brachyurus*, en diferentes fincas, dos ubicadas en el cantón de Buenos Aires de Puntarenas (Finca Buenos Aires y Los Angeles) y una tercera (Finca Santa Fe) en el cantón de Pérez Zeledón. La selección de las fincas para el muestreo se basó en las diferencias en el antecedente o historial de producción (Cuadro 1).

Las áreas seleccionadas fueron sembradas durante el mes de febrero y marzo del 2021, durante la estación seca de la Región Brunca.

Cuadro 1. Descripción de las fincas y lotes seleccionados para el monitoreo de dinámica poblacional de *P. brachyurus*. Se incluye el antecedente productivo, referido al cultivo anterior a piña y años destinados al cultivo actual de la piña, así como la edad a la cual se realizó el forzamiento o inducción floral de las áreas bajo estudio, meses después de la siembra (mds).

| <b>Finca</b> | <b>Antecedente de producción</b>  | <b>N° Ciclos previos de cultivo de piña</b> | <b>Mes de siembra</b>  | <b>Edad forzamiento (mds)</b> |
|--------------|---|---|------------------------|-------------------------------|
| Buenos Aires | Producción de piña por aproximadamente 35 años.   | 8-10  | 15 de febrero del 2021 | 9,8                           |
| Los Ángeles  | Finca de reciente producción, con 6 años dedicados al cultivo de la piña, anteriormente dedicado a la producción de melina. | 2   | 13 de febrero 2021     | 10,5                          |
| Santa Fe     | Finca con antecedente de pastos para ganado, 12 años en producción de piña.   | 4   | 5 de marzo 2021        | 10,8                          |

Para cada finca o área de monitoreo, se seleccionaron 6 secciones contiguas, cada sección correspondió a una repetición, las cuales se seleccionaron basadas en la homogeneidad del área y de la plantación en cuanto al peso de la semilla utilizada (250 y 360 g) y tipo de material de siembra, para lo cual se seleccionó semilla de tipo pedúnculo. En cada finca, se realizó un muestreo de suelo cinco días antes de la siembra con el fin de determinar la población de nematodos inicial en estas áreas. El paquete fitosanitario de los tres sitios se mantuvo bajo el manejo comercial de la compañía PINDECO.

Para cada repetición se tomó una muestra compuesta por 15 sub-muestras, las cuales fueron homogenizadas en campo y cuarteadas para la conformación de la muestra final de

aproximadamente 1 000 g entre suelo y raíces. Las submuestras se tomaron al azar, en los primeros 20 cm de profundidad. Para la toma de la muestra, se descartaron los bordes de plantación y los puntos de muestreo se alejaron al menos dos metros de distancia de los canales y/o drenajes. Las muestras extraídas fueron trasladadas de manera inmediata al Laboratorio de Protección de Cultivos de PINDECO para la extracción de nematodos y conteo de poblaciones mediante el método de extracción de Centrifugación con Solución Azucarada (Cavenness y Jensen, 1955), para esta extracción se contabilizaron todos los géneros presentes en la muestra.

Todas las áreas seleccionadas fueron muestreadas de manera mensual desde un mes después de la siembra hasta la edad a forzamiento, lo cual ocurrió a una edad promedio de los 10 meses después de siembra (Cuadro 1).

Se realizó la recolección de información de manejo agronómico, caracterización del suelo y la toma de datos de clima a lo largo del desarrollo de este trabajo, en donde se consideraron variables de precipitación, temperatura y humedad relativa.

### **E. Análisis estadístico**

Para la determinación de la población de *P. brachyurus* y la tasa de reproducción, se utilizó el promedio de los datos con la respectiva desviación estándar. Para las variables biométricas, se utilizó la comparación de medias mediante la prueba de *t-student* con un valor de  $p < 0,05$ , utilizando el programa estadístico INFOSTAT. En el caso de la dinámica poblacional, se utilizó la representación gráfica del promedio de las poblaciones, utilizando un intervalo de confianza del 95%.

## CAPITULO IV. RESULTADOS

### A. Estudio de patogenicidad de *P. brachyurus* en piña MD-2 en condiciones semi-controladas de invernadero

#### I. Identificación molecular

La identificación molecular de los nematodos enviados al Laboratorio de Nematología, mostraron un porcentaje de similitud del 99% con la especie *P. brachyurus*, basado en el marcador molecular la región D2 del gen 28S.

#### II. Tasa de reproducción y daño de *P. brachyurus* en plantas de piña variedad MD-2

##### Parte I: Estudio preliminar de tasa de reproducción y daño de *P. brachyurus* en plantas de piña MD-2

De acuerdo con los resultados obtenidos en el ensayo preliminar realizado en condiciones de invernadero y ambiente natural, para determinar la tasa de reproducción (TR) de *P. brachyurus* sobre plantas de piña de la variedad MD-2, se obtuvo el dato poblacional final para determinar la tasa de reproducción de *P. brachyurus*, a los dos meses después de la inoculación de las plantas.

*P. brachyurus* en condiciones de invernadero, mostró una población final promedio de 1 151 individuos totales (huevos, juveniles y adultos), con un valor de TR de 0,23. Mientras que, para el tratamiento ubicado en ambiente natural, se obtuvo una población final de 3 555,9 individuos totales, con un TR de 0,71 (Cuadro 2). Todos los tratamientos inoculados se mantuvieron con un valor de TR inferior a uno.

Los tratamientos ubicados en el invernadero no mostraron presencia de *P. brachyurus* en el tratamiento testigo. Sin embargo, en los tratamientos ubicados en condición de ambiente natural, se presentó detección de *P. brachyurus* en el testigo sin inoculación. Lo que demuestra que se presentó contaminación cruzada entre tratamientos.

Cuadro 2. Promedio de la población final y tasa de reproducción obtenida para *P. brachyurus* en plantas de piña, 2 meses después de la inoculación (mdi) en condiciones semi-controladas de invernadero y ambiente natural.

| Condición        | Tratamiento  | Población final de <i>P. brachyurus</i> (Promedio $\pm$ SD) | Tasa de reproducción (Promedio $\pm$ SD) |
|------------------|--------------|---|--|
| Invernadero      | Inoculado    | 1 151,0 ( $\pm$ 1179,40)                                    | 0,23 ( $\pm$ 0,24)                       |
|                  | Sin inocular | 0   | NA                                       |
| Ambiente natural | Inoculado    | 3 555,9 ( $\pm$ 3577,80)                                    | 0,71 ( $\pm$ 0,72)                       |
|                  | Sin inocular | 3   | NA                                       |

NA: no aplica

En relación con las variables de crecimiento, en el ensayo preliminar se encontraron diferencias significativas entre condición de la ubicación de las plantas inoculadas. Sin embargo, no se encuentran diferencias significativas entre los tratamientos inoculados y los tratamientos no inoculados que se mantienen en una misma condición, ya sea de invernadero o ambiente natural. No obstante, entre tipo de condición si se encuentra una diferencia significativa a favor del ambiente natural. Los tratamientos inoculados mostraron menor peso fresco de raíz en ambas condiciones de invernadero o ambiente natural, 20,57g y 26,20 g comparado con los tratamientos sin inoculación con 22, 07 g y 30,91g respectivamente. En el caso del índice de calidad radical, la tendencia fue similar, en donde los tratamientos inoculados obtuvieron una menor calidad de raíz, aunque sin diferencias estadísticas (Cuadro 3).

Las variables de crecimiento vegetal como ganancia de peso, largo y ancho de hoja “D”, no mostraron diferencias claras entre los tratamientos (Cuadro 4).

Cuadro 3. Promedio de peso fresco de raíz e índice de calidad radical obtenido 2 meses después de la inoculación de nematodos en plantas de piña MD-2.

| Condición        | Tratamiento  | Peso fresco de raíz (g)<br>(Promedio $\pm$ SD) | Índice de calidad radical<br>(Promedio $\pm$ SD) |
|------------------|--------------|--|--|
| Invernadero      | Inoculado    | 20,57 ( $\pm$ 6,29) a                          | 0,455 ( $\pm$ 0,06) a                            |
|                  | Sin inocular | 22,07 ( $\pm$ 7,91) a                          | 0,472 ( $\pm$ 0,11) a                            |
| Ambiente natural | Inoculado    | 26,20 ( $\pm$ 8,33) b                          | 0,407 ( $\pm$ 0,08) b                            |
|                  | Sin inocular | 30,91 ( $\pm$ 5,06) b                          | 0,453 ( $\pm$ 0,07) a                            |

Letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamiento. Prueba *t-student* ( $p < 0,05$ ).

Cuadro 4. Promedio de ganancia de peso de planta, largo y ancho de hoja D obtenido 2 meses después de la inoculación de nematodos en plantas de piña MD-2.

| Ubicación        | Condición    | Ganancia de peso<br>(g) (Promedio<br>$\pm$ SD) | Largo de hoja D<br>(cm) (Promedio<br>$\pm$ SD) | Ancho de hoja D<br>(cm) (Promedio<br>$\pm$ SD) |
|------------------|--------------|--|--|--|
| Invernadero      | Inoculado    | 152,32 ( $\pm$ 49,76) a                        | 48,03 ( $\pm$ 6,45) a                          | 3,88 ( $\pm$ 0,58) a                           |
|                  | Sin inocular | 167,67 ( $\pm$ 80,60) a                        | 47,86 ( $\pm$ 3,86) a                          | 3,94 ( $\pm$ 0,69) a                           |
| Ambiente natural | Inoculado    | 205,57 ( $\pm$ 71,08) b                        | 57,49 ( $\pm$ 2,23) b                          | 4,45 ( $\pm$ 0,44) b                           |
|                  | Sin inocular | 184,02 ( $\pm$ 28,65) b                        | 55,86 ( $\pm$ 2,79) b                          | 4,62 ( $\pm$ 0,27) b                           |

Letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamiento. Prueba *t-student* ( $p < 0,05$ ).

Basados en estos resultados, se decide incrementar el tiempo entre la inoculación de los nematodos y la evaluación, pasando de dos meses a cuatro meses, así mismo, se decide disminuir la cantidad de nematodos inoculados por planta de 5 000 a 2 000 individuos. Esto debido a que la tasa obtenida en este ensayo preliminar fue baja y se presentó alta variabilidad en la recuperación de *P. brachyurus*.

## Parte II: Ensayos de reproducción y daño de *P. brachyurus* en plantas de piña variedad MD-2

De acuerdo con los resultados obtenidos en los dos ensayos en potes en el invernadero, para determinar la tasa de reproducción (TR) de *P. brachyurus* sobre plantas de piña de la variedad MD-2, se obtuvieron los datos poblacionales con los que posteriormente se determinó la tasa de reproducción de *P. brachyurus*, a los cuatro meses después de la inoculación de las plantas.

La tasa de reproducción de *P. brachyurus*, el primer ensayo, obtuvo una población final promedio de *P. brachyurus* de 3 907 individuos totales (huevos, juveniles y adultos), con un valor de TR de 2,00. Mientras que para el ensayo dos, se obtuvo una población final de 10 979,70 individuos totales, con un TR de 5,49 (Cuadro 5). La ausencia de nematodos en el tratamiento testigo mostró que no se presentó contaminación cruzada en las plantas evaluadas.

El mayor porcentaje de la población contabilizada correspondió a nematodos en estados juveniles y adultos, localizados en la raíz de la planta y una menor fracción correspondió a huevos, los cuales en su totalidad fueron recuperados en las muestras de raíz (Cuadro 6).



Cuadro 5. Promedio de la población final y tasa de reproducción obtenida para *P. brachyurus* en plantas de piña, 4 meses después de la inoculación (mdi) en condiciones semi-controladas de invernadero.

| Ensayo | Tratamiento  | Población final de <i>P. brachyurus</i> (Promedio $\pm$ SD) | Tasa reproducción (Promedio $\pm$ SD) |
|--------|--------------|---|---------------------------------------|
| 1      | Inoculado    | 3 907,80 ( $\pm$ 1 756,00)                                  | 2,00 ( $\pm$ 0,88)                    |
|        | Sin inocular | 0,00  | NA                                    |
| 2      | Inoculado    | 10 979,70 ( $\pm$ 3 508,72)                                 | 5,49 ( $\pm$ 1,75)                    |
|        | Sin inocular | 0,00  | NA                                    |

NA: no aplica

Cuadro 6. Distribución porcentual de la población de *P. brachyurus* en las muestras de raíces y suelo en los ensayos de tasa de reproducción bajo condiciones semi-controladas de invernadero.

| Ensayo | Distribución de estados de vida de la población de <i>P. brachyurus</i> (%) |                              |             |               |
|--------|---|------------------------------|-------------|---------------|
|        | Juveniles y adultos en raíz   | Juveniles y adultos en suelo | Huevos raíz | Huevos suelos |
| 1      | 97,71   | 0,95                         | 1,34        | 0,00          |
| 2      | 88,17   | 0,00                         | 11,83       | 0,00          |

En relación con las variables de crecimiento, para el primer ensayo se encontraron diferencias significativas para las variables evaluadas. En el caso del peso de raíz, se evidencia una disminución importante en la cantidad de raíz producida en el tratamiento inoculado comparado con el tratamiento sin inocular. Este comportamiento se ve reflejado en la disminución en el índice de calidad radical obtenido para las muestras inoculadas (Cuadro 7).

Para la variable de ganancia de peso, se encontró que el tratamiento inoculado mostró una mayor ganancia de peso comparado con las plantas sin inocular, se alcanzó una diferencia promedio de 180 g ( $p < 0,05$ ) a favor del tratamiento inoculado. En cuanto a las variables de largo y ancho de hoja D se muestra una tendencia similar, en donde el largo y ancho fue más favorable para el tratamiento inoculado (Cuadro 7).

Para el segundo ensayo, no se encontraron diferencias significativas para la variable de peso de raíz. Sin embargo, se encontraron diferencias para la variable de calidad radical ( $p < 0,05$ ). Del mismo modo que en el experimento uno, en este se obtiene una ganancia de peso a favor del tratamiento inoculado, con una diferencia positiva de alrededor de 90 g ( $p < 0,05$ ), mientras que el largo y ancho de hoja D obtenido, muestran mayor crecimiento en el tratamiento inoculado (Cuadro 7).

Por otra parte, el daño producido por *P. brachyurus* en las raíces de piña muestra como las raíces tienen perforaciones en su interior y muestran un oscurecimiento en el tejido con respecto a las raíces provenientes de las plantas libres de este nematodo, las cuales al estereoscopio se observan blancas y sin perforaciones en su interior (Figura 7A).

Cuadro 7. Promedio de peso fresco de raíz, índice de calidad radical, ganancia de peso de planta, largo y ancho de hoja D obtenido 4 meses después de la inoculación de nematodos en plantas de piña MD-2 bajo condiciones semi-controladas.

| <b>Ensayo</b> | <b>Condición</b> | <b>Peso fresco de raíz (g)</b> | <b>Índice de calidad radical</b> | <b>Ganancia de peso (g)</b> | <b>Largo de "HD" (cm)</b> | <b>Ancho de "HD" (cm)</b> |
|---------------|------------------|--------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1             | Inoculado        | 66,09 a                        | 0,358 a                          | 582,37 a                    | 81,17 a                   | 4,76 a                    |
|               | Sin inocular     | 97,66 b                        | 0,597 b                          | 400,57 b                    | 77,04 b                   | 4,29 b                    |
| 2             | Inoculado        | 64,75 a                        | 0,407 a                          | 504,50 a                    | 83,15 a                   | 4,95 a                    |
|               | Sin inocular     | 66,75 a                        | 0,534 b                          | 414,35 b                    | 79,11 b                   | 4,42 b                    |

Letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamiento. Prueba *t-student* ( $p < 0,05$ ).

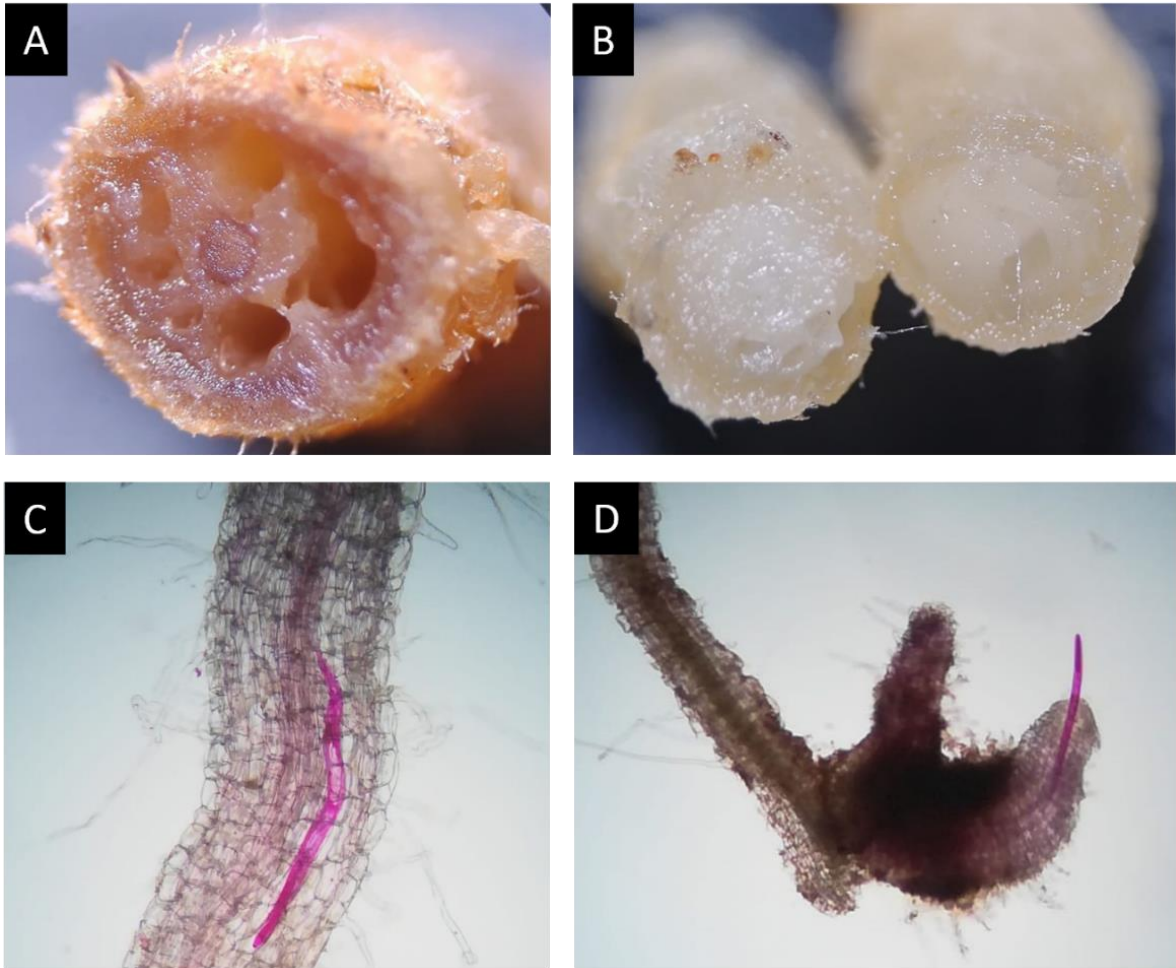


Figura 7. Raíz de piña MD-2. A. Daño en una raíz de planta de piña MD-2 inoculada con *P. brachyurus*, visto al estereoscopio. B. Raíz de planta de piña MD-2 sana sin presencia del nematodo, visto al estereoscopio. C. *P. brachyurus* dentro de raíz de piña, visto al microscopio. D. *P. brachyurus* ingresando a una raíz de piña, visto al microscopio.

## **B. Dinámica poblacional de *P. brachyurus* durante la etapa de desarrollo de la plantación de piña variedad MD-2 en tres fincas en la Región Brunca**

En todas las áreas muestreadas, la población inicial antes de la siembra fue prácticamente nula. Al observar el comportamiento de las distintas áreas, se evidencia una tendencia similar en la mayoría de las fincas, en donde se muestra que de la siembra hasta los cuatro meses después de la siembra (mds), las poblaciones de *P. brachyurus* se mantuvieron por debajo de los 10 000 individuos en una muestra de 100 g de raíz (Figura 8).

En todas las fincas evaluadas, se observa un incremento gradual en la población de *P. brachyurus* a partir de los 5 meses después de siembra, siendo la finca Los Angeles y Santa Fe las que presentan un valor superior a los 10 000 individuos en 100 g de raíz, para esta edad, mientras que finca Buenos Aires se mantuvo por debajo de este valor. Posterior a los 6 mds, se observan poblaciones de 29 200 y 16 622 *P. brachyurus* en 100 g de raíz en Finca Los Angeles y Finca Buenos Aires respectivamente, mientras que Finca Santa Fe se mantuvo con poblaciones cercanas a 10 000 individuos en 100 g de raíz. Todas las fincas mostraron una población de *P. brachyurus* muy cercana a los 50 000 nematodos en 100 g de raíz, al alcanzar la edad de 10 mds (forzamiento) (Figura 8).

Durante los muestreos se encontraron otros géneros de nematodos como *Helicotylenchus* sp. (Figura 9A) y *Paratylenchus* sp. (Figura 9B) y en algunas muestras con presencia de *Meloidogyne* sp. (Figura 9C). En términos generales, se encontró una población menor para estos géneros en comparación con *P. brachyurus*.

A partir de los cuatro meses después de la siembra se da un incremento general de *Helicotylenchus* sp. en las tres fincas con poblaciones superiores a los 350 individuos de este nematodo por 100 g de raíz. Finca Santa Fe mostró las mayores poblaciones a la edad de forzamiento (10 mds aproximadamente) con alrededor de los 2 000 individuos en 100 g de raíz, seguido por Buenos Aires que alcanzó poblaciones máximas de 1 500 *Helicotylenchus* sp. en 100 g de raíz, mientras que Finca Los Ángeles tuvo poblaciones más bajas a lo largo de todo el desarrollo vegetativo, con una población máxima de 500 individuos en 100 g de raíz a la edad de forzamiento (Figura 9A). En cuanto al género *Meloidogyne* sp., Finca Los Ángeles presentó la mayor población a los 6 mds con 2 500 individuos en 100 g de raíz,

seguido por Finca Buenos Aires, la cual tuvo la mayor población a la edad de forzamiento con 1 000 individuos de *Meloidogyne* sp. en 100 g de raíz. En el caso de finca Santa Fe, las poblaciones fueron muy bajas durante todo el periodo de monitoreo, presentando poblaciones máximas a los 7 mds de 500 individuos en 100 g de raíz. Para el género *Paratylenchus* sp. las poblaciones en finca Los Ángeles fueron de 10 000 mil individuos en 100 g de raíz, a edad de forzamiento, mientras que finca Buenos Aires y Santa Fe mostraron poblaciones muy bajas de este nematodo a lo largo de todo el periodo de seguimiento, a excepción de la edad de 7 mds en Santa Fe y al forzamiento en Finca Los Ángeles, donde se reportaron poblaciones superiores a los 6 000 individuos en 100 g de raíz.

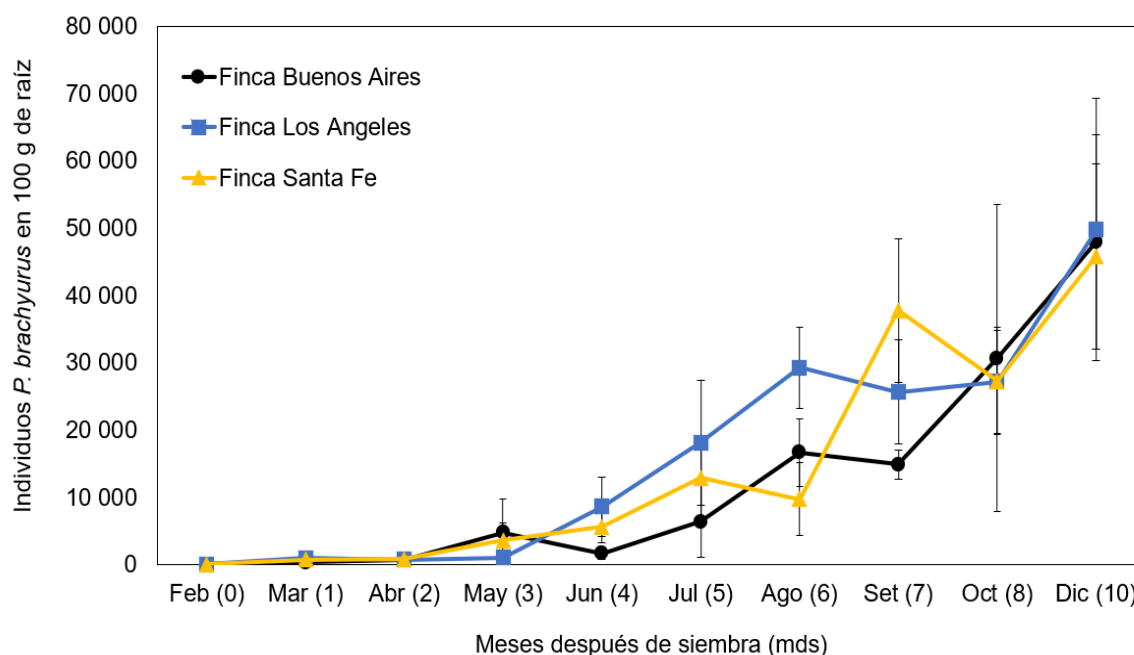


Figura 8. Dinámica poblacional de juveniles y adultos de *P. brachyurus* presente en las áreas de muestreo ubicadas en tres fincas de la Región Brunca, durante el periodo de crecimiento vegetativo hasta la inducción floral (10 mds) de la plantación. Intervalos de confianza del 95%.

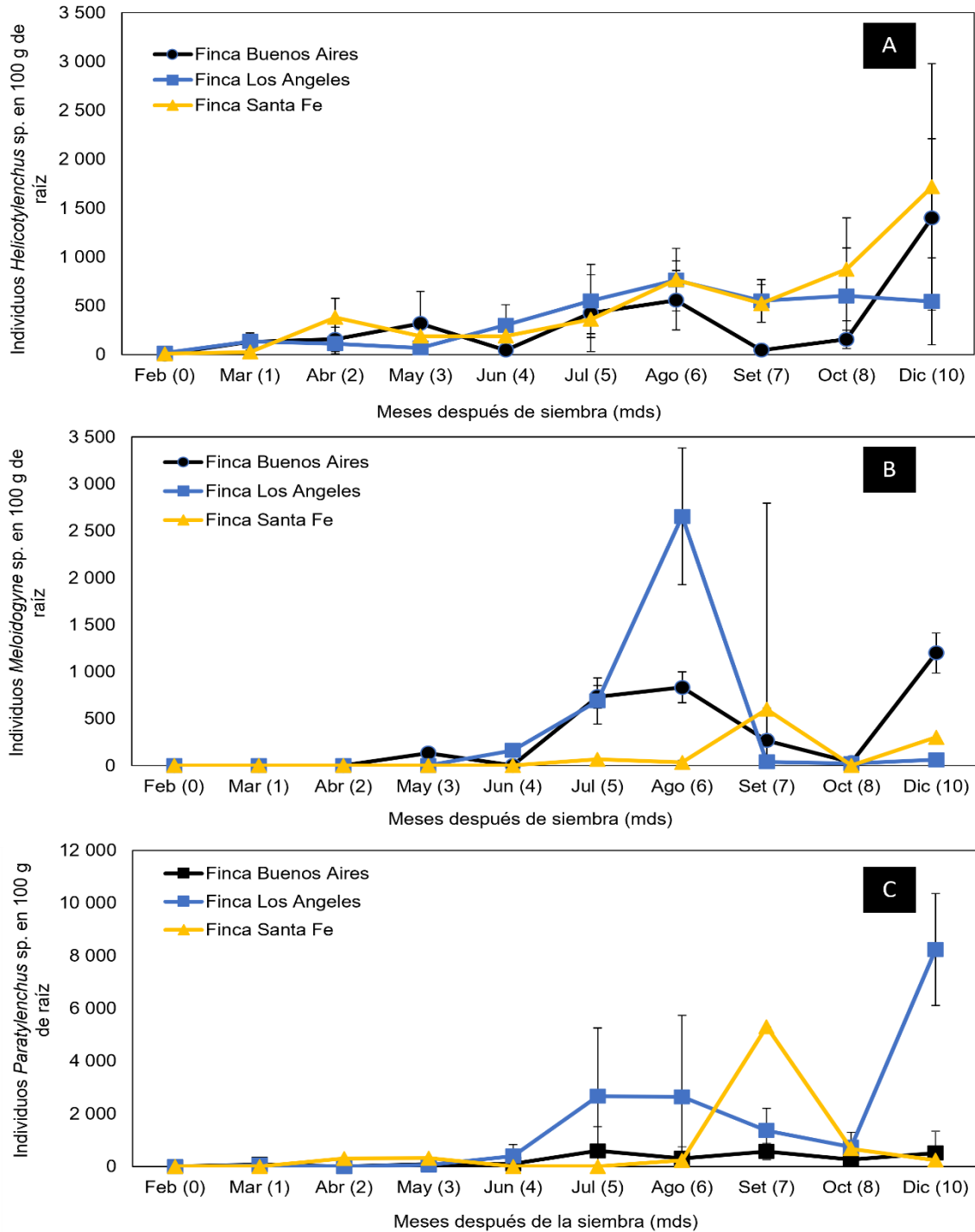


Figura 9. Dinámica poblacional de juveniles y adultos A *Helicotylenchus* sp, B. *Meloidogyne* sp. C. *Paratylenchus* sp. presente en las áreas de muestreo ubicadas en tres fincas de la Región Brunca, durante el periodo de crecimiento vegetativo hasta la inducción floral de la plantación (10 mds). Intervalos de confianza del 95%.

Las áreas fueron sembradas durante la estación seca, la cual comprende los meses de enero a marzo y parte de abril. Para Finca Los Ángeles y Santa Fe mostraron durante los primeros meses de cultivo (febrero y marzo) una precipitación acumulada menor a los 50 milímetros, mientras que en el caso de Finca Buenos Aires presentó un incremento en la precipitación en el mes de marzo, alcanzando un acumulado por encima de los 174 milímetros (Figura 10).

Para el mes de julio, se observó una baja generalizada en la precipitación para todas las fincas asociadas al “veranillo de San Juan”, el cual es un periodo que se caracteriza por la disminución de las lluvias y un incremento en la temperatura, en medio de la estación lluviosa, generalmente a finales de junio o durante el mes de julio (Alfaro e Hidalgo 2017). Los meses de setiembre y octubre fueron los meses más lluviosos, Finca Buenos Aires mantiene a nivel general una precipitación mayor que las otras fincas durante todo el desarrollo de cultivo. Se muestra una baja sostenida para el inicio nuevamente de la época seca (Figura 10). Por otra parte, los registros de temperatura muestran valores promedio cercanos a 24°C para Finca Santa Fe y Buenos Aires, mientras que Finca Los Ángeles muestra un grado por debajo (Figura 11A). La humedad relativa fue menor en Finca Buenos Aires en comparación con Santa Fe y Los Ángeles (Figura 11B).

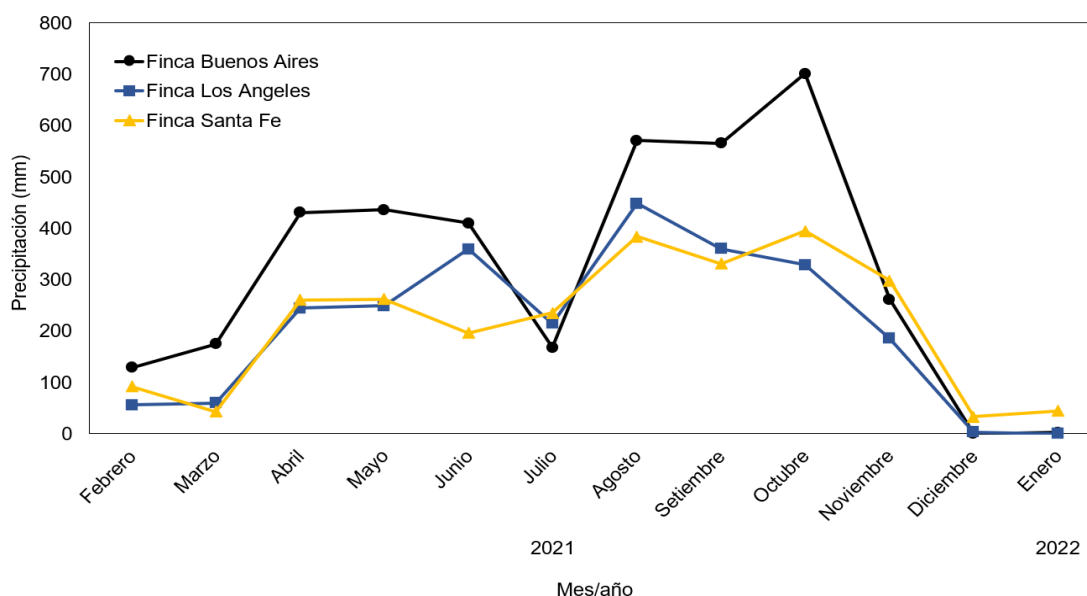


Figura 10. Precipitación acumulada registrada durante el desarrollo del estudio de dinámica poblacional de *P. brachyurus*, en tres fincas de la Región Brunca.



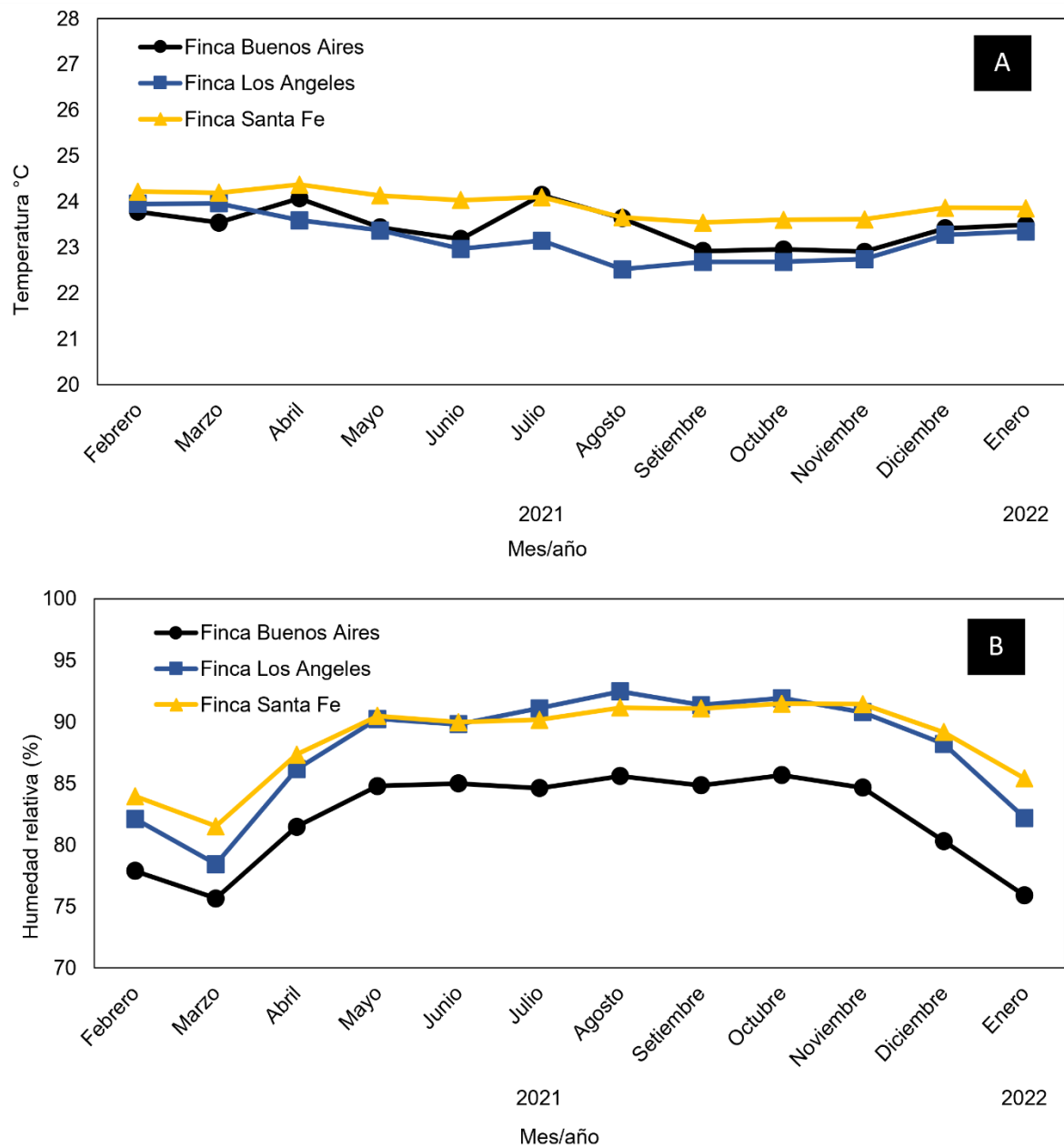


Figura 11. Temperatura (A) y Humedad relativa (B) registrada durante el desarrollo del estudio de dinámica poblacional de *P. brachyurus*, en tres fincas de la Región Brunca.

De acuerdo con los análisis fisicoquímicos realizados en cada una de las fincas en estudio, se determinó que las tres fincas se clasifican como suelos del orden Ultisol, con textura arcillosa. Finca Buenos Aires presentó un contenido de arena de 17,53% contrastante con el 34,95% de Finca Santa Fe, en el caso de otros contenidos como de limo y arena, no se encuentran diferencias importantes entre fincas (Cuadro 8).

Cuadro 8. Caracterización física del suelo pertenecientes a las áreas para el estudio de dinámica poblacional de *P. brachyurus*.

| Finca        | Orden   | Contenido (%) |          |         | Textura |
|--------------|---------|---------------|----------|---------|---------|
|              |         | Arena         | Limo     | Arcilla |         |
| Buenos Aires | Ultisol | 17,53 a       | 14,84 ab | 67,69 a | Arcilla |
| Los Angeles  | Ultisol | 25,13 ab      | 14,48 ab | 60,50 a | Arcilla |
| Santa Fe     | Ultisol | 34,95 b       | 7,95 a   | 57,15 a | Arcilla |

Letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamiento. Prueba *t-student* ( $p < 0,05$ ).

En cuanto a las características químicas, los tres suelos presentan un pH cercano a 4. El parámetro de acidez es similar entre las tres áreas, por encima del 75%. No se observan diferencias importantes en el contenido de algunos elementos como Ca, Magnesio y Potasio. Sin embargo, se observa un menor contenido de fósforo en Finca Los Ángeles. Se muestran contenidos altos de hierro, en especial en Finca Santa Fe (Cuadro 9).

Cuadro 9. Caracterización química del suelo pertenecientes a las áreas para el estudio de dinámica poblacional de *P. brachyurus*.

| Finca        | pH     | %SA      | cmol(+)/L |        |        |         |       | mg/L      |         |         |        |
|--------------|--------|----------|-----------|--------|--------|---------|-------|-----------|---------|---------|--------|
|              |        |          | Acidez    | Ca     | Mg     | K       | P     | Fe        | Cu      | Mn      | Zn     |
| Buenos Aires | 4,29 a | 75,58 a  | 2,01 a    | 0,27 a | 0,10 a | 0,29 b  | 8,0 a | 232,75 ab | 6,75 a  | 2,25 ab | 3,0 a  |
| Los Ángeles  | 4,31 a | 82,12 ab | 2,06 a    | 0,17 a | 0,11 a | 0,17 ab | 3,0 a | 127,75 a  | 17,00 b | 4,75 b  | 3,50 a |
| Santa Fe     | 4,16 a | 85,77 b  | 2,03 a    | 0,13 a | 0,08 a | 0,13 a  | 9,5 a | 396,00 b  | 6,00 a  | 2,20 ab | 8,00 b |

Letras distintas muestran diferencias significativas entre tratamiento. Prueba *t-student* ( $p < 0,05$ ).

### C. Discusión

La presente investigación estudió la patogenicidad de *P. brachyurus*, mediante la obtención de la tasa de reproducción y la descripción del daño causado por este nematodo en etapas tempranas de desarrollo de cultivo de la piña MD-2 en condiciones semi-controladas. Así mismo, se determinó la dinámica poblacional de *P. brachyurus* en tres fincas de la Región Brunca, durante todo el desarrollo vegetativo del cultivo de piña, es decir, desde la siembra hasta la inducción floral, aproximadamente durante 10 meses.

La tasa de reproducción (TR) ha sido uno de los métodos más comunes y utilizados para determinar la capacidad de parasitismo de los nematodos hacia una posible planta huésped. De acuerdo con lo citado por Hajihassani *et al.* (2016), una TR menor a uno indica que el nematodo puede ingresar a la planta, pero la reproducción del nematodo no ocurre, mientras que una TR igual a uno, indica que se da la sobrevivencia del nematodo, pero la reproducción de la población del nematodo es muy baja o limitada; una TR superior a uno indica un incremento en la idoneidad del hospedero para que se dé la reproducción y sobrevivencia del nematodo en la planta.

Los ensayos preliminares desarrollados en esta investigación mostraron valores de la TR de *P. brachyurus* menores a uno, luego de dos meses de inoculado el nematodo, por lo cual fue necesario realizar modificaciones metodológicas documentadas en otros estudios de patogenicidad de nematodos del género *Pratylenchus*. Por ejemplo, tiempos de exposición de *P. zae* a malezas como *Bracharia decumbes*, *Digitaria insularis*, *D. horizontalis* y *B. brizantha* entre otras, fueron superiores a tres meses para la determinación de la TR (Belle *et al.* 2016); estudios sobre tasas de reproducción de *P. brachyurus* sobre plantas de cobertura como *Crotalaria juncea*, *C. spectabilis*, *Mucuna deeringiana* fueron evaluadas posterior a los tres meses después de inoculadas (Santana *et al.* 2019); en el cultivo de guisantes el tiempo de exposición a *P. nanus* se mantuvo superior a las 12 semanas (Upadhaya *et al.* 2019). Otro reporte para la determinación de la TR en el cultivo de Eucalipto señala un tiempo de exposición de 240 días (Belle *et al.* 2018). En el caso del presente estudios con *P. brachyurus*, se incrementó el tiempo de duración de los ensayos de dos a cuatro meses, para permitirle al nematodo un mayor periodo de tiempo para reproducirse. Así mismo, el

exponer los tratamientos a condiciones de campo o ambiente natural, influyó en una contaminación cruzada de nematodos con el tratamiento testigo, posiblemente con el salpique de agua de lluvia. Este resultado incidió en la necesidad de mantener los ensayos en condiciones de precipitación controlada.

Los estudios posteriores de patogenicidad y daño luego de las modificaciones mostraron valores de TR superiores a uno (cuadro 5), lo que indica que la planta de piña tiene una condición favorable para la reproducción de *P. brachyurus*. Estos resultados, respaldan la necesidad de considerar medidas de manejo en el cultivo de piña para el control de las poblaciones de *P. brachyurus*, que al ser un endoparásito migratorio y producir lesiones pueden comprometer la función radical (Kiringa *et al.* 2021) y a su vez podrían tener impacto en el rendimiento y calidad de la fruta. La prueba de patogenicidad evidenció el daño ocasionado por *P. brachyurus* al sistema radical de la piña durante los primeros cuatro meses de desarrollo, con daño a la epidermis y el cilindro central (Figura 7). Estas lesiones se traducen en una necrosis, característico del nematodo y coincide con lo reportado por Ferreira *et al.* (2014) en el cultivo de piña variedad “Victoria” en donde se evidenció una reducción en el peso fresco de raíz y necrosis del tejido radicular.

El análisis de las variables de crecimiento del cultivo en el ensayo uno, en donde se mostró disminución en el peso y calidad de la raíz en las plantas expuestas a *P. brachyurus* y la reducción de 2 g en raíz y afectación de calidad radical en el tratamiento inoculado del ensayo dos, era esperable al observar las lesiones presentes en la raíz; esto coincide con observaciones realizadas en el cultivo soya, en donde se determinó la afectación radical a causa de la exposición de las plantas a *P. brachyurus* (Miamoto *et al.* 2017), así como en el cultivo de arroz cuando se expusieron plantas a *Pratylenchus zea* (Nzogela *et al.* 2020). En el caso de piña y de acuerdo con la revisión de literatura, no existen en el país datos publicados sobre la afectación radical por lo cual este estudio contribuye en la generación de información para la variedad MD-2.

Otras variables vegetativas analizadas como la ganancia de peso, el largo y ancho de hoja D, mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) a favor del tratamiento inoculado, es decir, no se encontró una afectación negativa directa en estas variables por la presencia de *P.*

*brachyurus*. Esto podría ser contradictorio a lo esperado, dada que la afectación a nivel de raíces se puede asociar a una menor absorción de nutrientes y por ende llevar a una afectación en el crecimiento de la planta. Sin embargo, hallazgos similares fueron reportados en el crecimiento vegetativo del cultivo del arroz cuando se sometieron diferentes variedades de este cultivo a la presencia de *Pratylenchus zae*, pese a que se encontró afectación en el crecimiento radical no se pudo determinar afectación en el crecimiento de la planta (Nzogela *et al.* 2020). Estudios realizados en soya con *P. brachyurus* mostraron un comportamiento que refuerza lo reportado en este estudio, en donde al inocular diferentes niveles del nematodo en plantas de soya, se encontró un mayor desarrollo vegetativo en aquellas plantas expuestas al nematodo que en las plantas control sin inoculación (Marcondes *et al.* 2020). Otros estudios realizados utilizando la metodología de crecimiento de plantas en microparcels en piña para caracterizar el daño de diferentes patógenos, entre estos *P. brachyurus*, no encontraron diferencias significativas en variables de ancho y largo de hoja D, mientras que reportan una diferencia negativa en peso fresco de raíz, dado por la presencia del nematodo y determinado a ocho meses después de la siembra (Ferreira *et al.* 2014).

Revisiones en la literatura sobre la interacción de los nematodos fitoparásitos y la planta, mencionan diferentes niveles de respuesta al ataque de estos patógenos. Guzman *et al.* (2020) señalan casos en donde plantas con reportes de cierto nivel de tolerancia, como respuesta al ataque de nematodos, pueden incrementar la tasa fotosintética, lo que explica que no se logre observar una respuesta negativa en variables de crecimiento vegetativo, compensando así la afectación a nivel radical y en la absorción de nutrientes, mientras que en otros cultivos tolerantes puede que no se muestre alteración en la tasa fotosintética, con lo cual la respuesta de un cultivo a la presencia de patógenos como nematodos, puede diferir acorde a la relación nematodo-huésped. Aunado a esto, la aplicación de nutrientes a nivel foliar en el cultivo, dado la alta capacidad de absorción nutricional por vía aérea (Demarco *et al.* 2020), pudo contribuir a no tener un efecto negativo en las variables desarrollo foliar pese a la afectación del sistema radical durante el periodo de evaluación.

Con lo anterior, se evidencia la necesidad de profundizar en las interacciones que se pueden dar entre *P. brachyurus* y la planta de piña y otros factores abióticos, a fin de determinar el real impacto de este nematodo posterior a los cuatro meses de desarrollo del cultivo, el

comportamiento de estas variables de crecimiento vegetativo e incluso la necesidad de considerar otras variables como la afectación en el rendimiento (peso y calidad de fruta), por la presencia de *P. brachyurus* las cuales no fueron sujeto de estudio en esta investigación.

En cuanto al estudio de dinámica poblacional de *P. brachyurus* realizado en las tres fincas de la Región Brunca, las áreas monitoreadas mostraron una tendencia similar en el comportamiento de la población de este nematodo, indiferentemente del antecedente productivo del área. Entre los factores que pueden modular el comportamiento de las poblaciones de nematodos son los cultivos asociados a las áreas dado la interacción entre los cultivos establecidos y la población de microorganismos (Schumacher *et al.* 2022). En todas las áreas monitoreadas se observó un crecimiento sostenido en la población de *P. brachyurus* con un mayor incremento posterior a los cinco meses después de la siembra. Este comportamiento coincide con lo reportado por otros estudios de dinámica poblacional de nematodos en piña (León 2007, Carvajal 2009, Herrera *et al.* 2022). Así mismo, los datos obtenidos muestran que los mayores niveles de población de *P. brachyurus* se alcanzaron al llegar a la edad de forzamiento, entre los 9,8 y 10,8 mds, lo cual podría responder a la densidad poblacional baja con la cual inició el monitoreo de las áreas. El nematodo *P. brachyurus* tiene un ciclo de vida que puede variar entre los 4-5 semanas o incluso podría extenderse un poco más, por lo que es de esperar que las poblaciones mostraran un incremento conforme se da el desarrollo del cultivo, esto también se ve favorecido por tratarse de un monocultivo de ciclo prolongado como es la piña. Así mismo, puede verse influenciado por el manejo comercial de las áreas, en donde se utiliza insecticida – nematicida a las tres o cuatro semanas de haber completado la siembra y posteriormente dos ciclos durante el desarrollo de cultivo, antes de los 6 meses después de siembra. No obstante, estudios realizados en piña comparando modelos de producción convencional con producción orgánica, no encontraron diferencias en la dinámica de la población de un sistema a otro, en donde se mantiene una tendencia similar a lo reportado en este estudio en cuanto al incremento de las poblaciones en edades posteriores a los cinco o seis mds (Guzman *et al.* 2014a).

Diferencias en factores edáficos también puede influir en la abundancia, diversidad, patogenicidad y distribución de los nematodos en campo. Reportes realizados en el cultivo

de arroz, indican mayor afectación por presencia de *Meloidogyne* sp. cuando el cultivo se desarrolla en suelos con mayor proporción de arcilla. Otros estudios indican una relación positiva entre el mayor contenido de arena y la abundancia de nematodos del género *Pratylenchus* sp. (Namu *et al.* 2018). En este estudio de dinámica poblacional, los tres tipos de suelo se caracterizaron por tener una proporción de arcilla superior al 50% sin mostrar diferencias en la clasificación textural del suelo entre fincas evaluadas.

Variables de química del suelo tampoco mostraron diferencias importantes entre fincas como el caso del pH, el cual presentó valores cercanos a cuatro. Este valor de pH con tendencia ácida ha sido reportado como un factor adecuado para el desarrollo de *P. brachyurus* en el suelo, contrario a lo reportados por diversos estudios que señalan afectación en las poblaciones de otros géneros de nematodos a menor pH. Este factor podría ayudar a comprender en parte la fuerte asociación de *P. brachyurus* y el cultivo de piña, la cual constantemente está caracteriza por desarrollarse en suelos ligeramente ácidos (Sarah *et al.* 1991). Sin embargo, las variables físicas y químicas de suelo sin diferencias importantes entre áreas de muestreo podrían explicar que no se identificara un patrón claro en la relación de estas y la modulación poblacional de *P. brachyurus* y los principales géneros de nematodos reportados en este estudio.

Por otra parte, las variables climatológicas constituyen factores ambientales relacionados con la diversidad de nematodos en el suelo (Un Nisa *et al.* 2021). En el caso de las variables de clima que se presentaron a lo largo de este estudio, no se observaron diferencias sustanciales. No obstante, el régimen de precipitación a nivel general tiende a disminuir posterior al mes de octubre, lo que coincide con el periodo de mayor incremento de las poblaciones de nematodos y en especial de *P. brachyurus*. Esto puede relacionarse con lo mencionado por diversos autores, en donde se señala que una mayor humedad en el suelo puede afectar el movimiento de los nematodos con posible impacto en la reproducción de los mismos, por lo cual, al disminuir los regímenes de lluvia, se favorece el desarrollo de las poblaciones de nematodos, dado que se favorece la oxigenación del suelo. Por otro lado, Xiao *et al.* 2021, indican que dentro de factores ambientales en estudios recientes muestran una mayor abundancia de nematodos a mayor altitud con respecto a zonas de menor altitud, esto podría relacionarse con la ligera mayor población de nematodo reportada en Finca Los Ángeles y



Santa Fe que se encuentran a mayor elevación que Finca Buenos Aires. Es necesario profundizar en la influencia de factores ambientales y reenfoque a nivel del ecosistema del suelo.

Es importante poder determinar en futuras investigaciones, el impacto que puede llegar a tener *P. brachyurus* en el rendimiento del cultivo, mediante el establecimiento de umbrales de acción con el fin de ajustar las medidas de manejo. Las medidas de control, en este caso deben enfocarse en el manejo preventivo, de *P. brachyurus*, que al ser un endoparásito migratorio dificulta el control por métodos convencionales como el químico (Kiringa *et al.* 2021).

Otros nematodos encontrados en el estudio de dinámica poblacional como *Helicotylenchus* sp. y *Paratylenchus* sp. han sido poco estudiados en piña y se desconoce su impacto directo sobre este cultivo, así como la interacción que puedan tener estos géneros con *P. brachyurus* pese que son nematodos ampliamente reportados a nivel mundial en este cultivo (Damarola *et al.* 2013, Gandarilla *et al.* 2014, Vera *et al.* 2017).

En soya, hay estudios que muestran una importante interacción e interferencia en el desarrollo de las poblaciones de *P. brachyurus* en presencia de géneros como por ejemplo *M. javanica*, en donde este último puede llegar a suprimir las poblaciones de *P. brachyurus*, con esto se documenta la agresividad que pueden tener algunos géneros de nematodos sobre el desarrollo de otros (Fontana *et al.* 2018). Dado lo anterior, resulta de importancia en futuros proyectos de investigación, estudiar las interacciones entre poblaciones de nematodos e incluso la interacción con otros patógenos y su efecto sobre el desarrollo del cultivo de piña, dado que estos eventualmente podrían utilizar las lesiones ocasionadas por *P. brachyurus* y otros nematodos para ingresar a la planta e impactar de manera negativa el desarrollo y rendimiento del cultivo.

## D. Conclusiones

La tasa de reproducción es un indicador adecuado para describir la capacidad reproductiva de *P. brachyurus* en el cultivo de piña y su potencial patogénico para la variedad MD-2. Se determinó que la planta de piña tiene características favorables para el desarrollo de *P. brachyurus*. Sin embargo, es necesario determinar el impacto que pueden tener las poblaciones de este nematodo en edades posteriores y en el rendimiento del cultivo, a fin de establecer umbrales económicos claros que permitan la toma de decisiones de manejo adecuadas, partiendo de la necesidad de tener alternativas de prevención y durante el desarrollo del cultivo.

La dinámica poblacional de *P. brachyurus* mostró un comportamiento similar en el desarrollo vegetativo del cultivo, independientemente del antecedente de producción de las fincas monitoreadas y que concuerda con lo reportado en este cultivo en otras regiones geográficas. Este comportamiento en la población puede estar relacionado a lo prolongado que es el ciclo de cultivo de la piña de alrededor de tres años. No obstante, es necesario continuar con los estudios de dinámica poblacional en etapas posteriores del cultivo, es decir, posterior a la inducción a floración y con esto poder determinar la relación que puede tener una población determinada de *P. brachyurus* con el rendimiento del cultivo.

Otros géneros de nematodos están presentes en el cultivo en menor densidad poblacional. Sin embargo, se requiere profundizar en el impacto de estos otros nematodos reportados en este y otros estudios en piña, dado que no se tiene mucha información pese a que la frecuencia en los reportes es constante, como el caso particular del ectoparásito *Helicotylenchus* sp. el cual fue identificado en todas las muestras analizadas provenientes de campo.

Las variables edáficas y climatológicas han sido reportadas con un papel importante en la modulación de las poblaciones. No obstante, en este estudio, no se presentaron diferencias consistentes entre las zonas y antecedentes productivos evaluados para los periodos de desarrollo del cultivo reportado.

**LITERATURA CITADA**

- Aballay, E. 2005. Uso de solarización para el control de nematodos fitoparásitos en cultivos. Universidad de Chile. 108 p.
- Alfaro, E; Hidalgo, Hugo. 2017. Propuesta metodológica para la predicción climática estacional del veranillo en la cuenca del río Tempisque en el Pacífico Norte de Costa Rica. *Tópicos Meteorológicos y Oceanográficos*. 16. 62-74
- Amador, M; Sánchez, J; Arguedas, M; Araya, R; Guevara, F; Maroto, D; Sánchez, J; Vargas, F. 2011. Estudio regional sobre el desarrollo local de los cantones (trans) fronterizos del Pacífico Sur de Costa Rica. Universidad Nacional a Distancia. 432 p.
- Anwar, S.A; Mckenry, M. 2010. Incidence and Reproductions of *Meloidogyne incognita* on Vegetable Crop Genotypes. *Pakistan Journal of Zoology*. 42 (2): 135-141.
- Arrieta, C; Treminio, K. 2021. Efecto del acolchado plástico y de la aplicación de acondicionadores de suelo y bioestimulantes radiculares sobre la biomasa de piña (*Ananas comosus*) a la etapa de inducción floral en Guatuso de Alajuela, Costa Rica. Tesis Maestría. Guanacaste, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 73 p.
- Bartholomew, D. 2018. Crop environment planta growth and physiology. In Sanewski, G.; Bartholomew, D; Paull, R. (ed) *The Pineapple*, 2<sup>nd</sup> edition: Botany, productions and uses. CABI. 355 p.
- Bellé, C; Kaspary, T.E; Kuhn, P.R; Schmitt, J; Lima-Medina, I. 2016. Reproduction of *Pratylenchus zea* on weeds. *Sociedad Brasileña de Ciencias das Plantas Daninhas*. Vol 35. Doi: 10.1590/S0100-83582017350100006.
- Boisseau, M; Sarah, J. 2008. In vitro rearing of Pratylenchidae nematodes on carrot discs. *Fruits* 63: 307-310.

- Bridge, J; Starr, James. 2007. Plant Nematode Biology and Parasitism. *In* Plant Nematodes of Agricultural Importance: A colour handbook. CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC.
- Bucki, P; Qing, X; Castillo, P; Gamliel, A; Dobrinin, S; Alon, T; Braun, S. 2020. The Genus *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae) in Israel: From Taxonomy to Control Practices. *Plants* (9). 18 p. Doi: <https://doi.org/10.3390/plants9111475>.
- CANAPEP (Cámara Nacional de Productores y Exportadores de Piña). 2017. Estudio “Impacto económico, social y ambiental de la piña en Costa Rica” (en línea) CANAPEP, San José, Costa Rica; 17 may. Consultado 14 de nov. 2019. Disponible en <https://canapep.com/estudio-impacto-economico-social-ambiental-pina-costa-rica-incae/>
- Carvajal, D. 2009. Comparación de la dinámica poblacional de nematodos en el cultivo de la piña (*Ananas comosus*) (L) Merr. Híbrido MD-2 bajo técnicas de producción convencional y orgánica. Tesis Lic. San Carlos, Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 134 p.
- Castillo, P; Vovlas, N. 2007a. Biology and Ecology of *Pratylenchus*. *In* Hunt, D.; Perry, R. *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae): Diagnosis, Biology, Pathogenicity and Management (6): 305-324.
- Castillo, P; Vovlas, N. 2007b. Management strategies of *Pratylenchus* species. *In* Hunt, D.; Perry, R. *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae): Diagnosis, Biology, Pathogenicity and Management (6): 305-324.
- Caveness, F, Jensen, H. 1955. Modification of the centrifugal-flotation technique for the isolation and concentration of nematodes and their eggs from soil and plant tissue. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*. 22 (2): 87-89.
- Coppens, G; Leal, F. 2018. Morphology, Anatomy and Taxonomy. *In* Sanewski, G; Bartholomew, D; Paull, R. (Eds) *The Pineapple*, 2<sup>nd</sup> edition: Botany, productions and uses. CABI. 355 p.

- Daramola, F; Afolami, S; Idowu, A; Nwanguma, E. 2013. Studies on the Occurrence and Distribution of Plant-Parasitic Nematodes in Some Pineapple-Producing States in Nigeria. *Asian Journal of Crop Science*. 5 (2): 190-199.
- Demarco, P; Gómez, M; González, A; Alayón, P. 2020. Effects of foliar versus soil water application on ecophysiology, leaf anatomy and growth of pineapple. *Fruits*. 75 (1): 44-51.
- Desaeger, J; Sikora, R; Molendijk, L. 2022. Outlook: A vision of the future of integrated nematode management. *In* Sikora, R; Desaeger, J; Molendijk, L. *Nematode Management: State of the art and Visions for the future*. CAB International, 475-483.
- Duncan, L. Moens, M. 2006. Migratory endoparasitic nematodes. *In* Perry, R. and Moens, M. (Eds). *Plant Nematology 2nd edition*. CAB International, 145-178. 565p.
- Ferreira, T; Souza, R; Silva, W; Dos Santos, K; Torres, P. 2014. Interactions of *Pratylenchus brachyurus* and *Helicotylenchus* sp. with mealybug wilt of pineapple in microplots. *Nematropica* (44): 181-189.
- Florez, J. 2021. Control Biológico de Nematodos Fitoparásitos en Cultivos de Tomate (*Solanum lycopersicum*) con Micelio de Hongos Del Género *Pleurotus* y Hongos Micorrízicos. Tesis Bach. Bogotá, Colombia. Universidad El Bosque. 56 p.
- Fontana, L; Días, C; Dias, V; Severino, J; De Oliveira, J; Farias, R. 2018. Interference of *Meloidogyne javanica* in the reproduction of *Pratylenchus brachyurus* in soybean cultivar BRS/MT pintado. *Summa Phytopathologica*, vol 44 (2): 143-147.
- Gamboa E. 2019. Identificación taxonómica y molecular de especies del nematodo lesionador de la raíz *Pratylenchus* spp. (Nematoda: Pratylenchidae) asociado a cuatro cultivos de Costa Rica. Tesis Lic. Heredia, Costa Rica. Universidad Nacional. 93 p.
- Gandarilla, H; Rivas, E; Fernández, E. 2014. Fitonematodos asociados a los cultivos de frutos tropicales. *Fitosanidad* 18(3): 187-197.

- Grabau, Z; Chen, S. 2016. Determining the Role of Plant-Parasitic Nematodes in the Corn-Soybean Crop Rotation Yield Effect Using Nematicide Application: I. Corn. Pest Interactions in Agronomic Systems. 108 (2): 782-793.
- Guerout, R. 1975. Nematodes of Pineapple: A review. PANS Pest Articles & News Summaries. 21 (2): 123-140. DOI: 10.1080/09670877509411384
- Guzmán, T; Durán, J; Montero, W; Vargas, H; Castro, Z; Carvajal, D; León, D. 2014a. Diagnostic of plant parasitic nematodes and its population dynamic in two pineapple cultivation systems in Costa Rica. Tecnología en Marcha. 27 (2): 58-81.
- Guzmán, J; Varela, I; Hernández, S; Durán, J; Montero, W. 2014b. Major genera of plant parasitic nematodes associated with plantains and pineapple in the Huetar Norte and Huetar Atlantica regions of Costa Rica. Tecnología en Marcha. 27 (1): 85-92.
- Guzmán, O; Castaño, J; Villegas, B. 2012 Principales nematodos fitoparásito y síntomas ocasionados en cultivos de importancia económica. Manizales, Colombia. Revista Agronomía 20(1): 38-50.
- Guzmán, O; Zamorano, C; López, H. 2020. Interacciones fisiológicas de plantas con nematodos fitoparásitos: una revisión. Boletín científico Centro de Museos Museo de Historia Natural. 24: 190-205.
- Hajihassani, A; Tenuta, M; Gulden, R. H. 2016. Host Preference and Seedborne Transmission of *Ditylenchus weischeri* and *D. dipsaci* on Select Pulse and Non-Pulse Crops Grown in the Canadian Prairies. Plant Disease. 100 (6): 1087-1092.
- Helí, P. 2015. Identificación de fitoparásitos en raíces del cultivo de Piña (*Ananas comosus* L.) var. Roja Trujillana en el Valle de Santa Catalina La Libertad. Tesis. Trujillo, Perú. Universidad Nacional de Trujillo. 103 p.
- Hernández, Raúl. S.f. Los nematodos parásitos de la piña. Opciones para su manejo. Departamento de Ecología y Manejo de Plagas. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Habana, Cuba. 30 p.

- Herrera, D; Orozco, P; Rojas, A; Cortes, O; Delgado, J; Araya, M. 2022. Population Dynamics of Phytoparasitic Nematodes in Pineapple (*Ananas comosus* cv MD-2). International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 11 (1): 274-285.
- Ebel, A; Giménez, L; Alayón, P. 2016. Morphoanatomical leaf “D” evaluation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr. var. *comosus*) in response of two cropping systems in Corrientes, Argentina. Acta Agronómica. 65 (4): 390-397.
- Kawanobe, M; Sugihara, S; Miyamaru, N; Yoshida, K. Nonomura, E; Oshiro, H; Toyota, K. 2020. Distribution of Root-Lesion and Stunt Nematodes, and Their Relationship with Soil Properties and Nematode Fauna in Sugarcane Fields in Okinawa, Japan. Agronomy. 10 (6). DOI : 10.3390/agronomy10060762
- Kiringa, A; Coyne, D; Atandi, J; Beek, N; Haukeland, S. 2021. Diversity and population densities of plant-parasitic nematodes in commercial and smallholder pineapple production in Kenya. Nematology. 23 (7) 837-850.
- León, D. 2007. Diagnóstico y dinámica poblacional de nematodos en el cultivo de la piña (*Ananas comosus*) (L) Merr. Finca Tremedal S.A. Tesis Bach. San Carlos, Costa Rica. Instituto Tecnológico de Cartago. 78 p.
- López, H; Soilán, L; Caballero, G; Grabowski, C; Maldonado, G. 2021. Manual de nematología agrícola: Bases y procedimientos. Asunción, Paraguay. 90 p.
- Marcondes, C; Gabriel, H; Iouko, E; Días, C; Vervejeira, B. 2020. *Pratylenchus brachyurus* parasitism on soybean: effects on productivity, vegetative and nematological parameters and chemical properties. Plant Pathology. 157: 651-661.
- Martínez, J; Díaz, T; Partida, L; Allende, R; Valdez, T; Carillo, J. 2015. Plant parasitic nematodes and its relation to soil factors of papaya in Colima, Mexico. Revista Mexicana de Ciencias Agrarias. 6 (1): 251-257.

- Medina M, Mosquera H, Aguilar, C. 2014. Clonal micropropagation and ex vitro rooting of three cultivates of pineapple *Ananas comosus* (L. Merr.) from Chocó, Colombia. *Revista Biodeversidad Neotropica*. 4 (2): 133-140.
- Mendez, G. 2010. Evaluación preliminar de la floración natural del cultivo de piña (*Ananas comosus*) híbrido MD-2, de acuerdo a cuatro zonas altitudinales en la Región Huetar Norte de Costa Rica. Tesis Bach. Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 134 p.
- Miamoto, A; Rodrigues, M; Días, C; Higashi, H. 2017. Alternative products for *Pratylenchus brachyurus* and *Meloidogyne javanica* management in soya bean plant. *Journal of Phytopathology*. 165 (10) 1-6.
- Mokrini, F; Viaene, N; Waeyenberger, L; Dababat, A; Moens, M. 2018. Root-lesion nematodes in cereal fields: importance, distribution, identification and management strategies. *Journal of Plant Diseases a Protection*. Germany. 11 p. Consultado 27 set. 2019. Disponible en DOI: [https://doi.org/10.1007/s41348-018-0195-z\(0123456789\(\).,-volV\)\(0123456789\(\).,-volV\)](https://doi.org/10.1007/s41348-018-0195-z(0123456789().,-volV)(0123456789().,-volV))
- Municipalidad de Pérez Zeledón. 2020. El Clima. Sitio oficial de la municipalidad de Perez Zeledón, proceso de servicios informáticos. Perez Zeledón. Consultado el 3 de marzo 2020. Disponible en: <https://www.perezzeledon.go.cr/index.php/turismo/informacion-turistica/el-clima.html>
- Namu, J; Karuri, H; Alakonya, A; Nyaga, J; Njeri, E. 2018. Distribution of parasitic nematodes in Kenya rice fields and their relation to edaphic factors, rainfall and temperature. *Tropical plant pathology*. 43:128-137.
- Nico, A. 2002. Incidencia y patogenicidad de nematodos fitopatógenos en plantones de olivo (*Olea europaea* L.) en viveros de Andalucía y estrategias para su control. Tesis PhD. España. Universidad de Córdoba. 330 p.



- Núñez, L. 2017. Identificación de nematodos fitoparásitos asociados a las principales malezas en fincas productoras de papa (*Solanum tuberosum* L.) en la provincia de Cartago. Tesis Lic. Cartago, Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 75 p.
- Nzogela, Y; Landschooth, S; Kihupi, A. L; Coyne, D; Gheysen, G. 2020. Pathogenicity of the root-lesion nematode, *Pratylenchus zaei*, on rice genotypes under different hydro-ecologies in Tazania. *Nematology* 22(2): 221-233.
- Olivera, F; Rodrigues, G; Nogueira, S; Resplandes, P; Ribeiro, V. 2015. Population dynamics of the root lesion nematode, *Pratylenchus brachyurus*, in soybean fields in Tocantins State and its effect to soybean yield. Departamento de Fitopatología, Universidade Federal do Tocantins-Campus Gurupi. Brazil. 8 p.
- Pethybridge, S; Esker, P; Gent, D; Wilson, C; Groom, T; Nutter, F. 2008. Diseases of Pyrethrum in Tasmania: Challenges and Prospects for Management. *Plant Disease*. 92 (9): 1260-1272.
- Perrine, F. 2019. Interactions of endoparasitic and ectoparasitic nematodes within the plant root system. *Functional Plant Biology* (46): 295-303.
- PROCOMER (Promotora de Comercio Exterior, Costa Rica). 2022. Anuario Estadístico de Comercio Exterior Costa Rica 2021. San José, Costa Rica. Consultado el 25 jul. 2022. Disponible en: <https://www.procomer.com/exportador/documentos/anuario-estadistico-2020/>
- Rabie, E. 2017. Nematode Pest of Pineapple. In Fourie, H., Spaul, V; Jones, R; Daneel, M; De Waele, D. (Eds). *Nematology in South Africa: A View from the 21 st Century* (395-406). Switzerland. 572 p.
- Santana-Gomes, S; Dias-Arieira, C; Antunes, J; Schwengber, R; Serrano, S. 2019. Reproduction of *Pratylenchus zaei* and *Pratylenchus brachyurus* in cover crops. *Revista Caatinga*. 32 (2): 295-301.

- Sarah, J. L; Osséni, B; Hugon, R. 1991. Effect of soil pH on development of *Pratylenchus brachyurus* populations in pineapple roots. *Nematropica* 21: 211-216.
- Schomaker, C. and Been, Thomas. 2013. Plant growth and population dynamics. In Perry, R. and Moens, M. (Eds), *Plant Nematology* 2nd edition. CAB International, 301-330. 565p.
- Sipes, B; Pires, A. 2018. Pest, diseases and weeds. In Sanewski, G; Bartholomew, D; Paull, R. (Eds) *The Pineapple*, 2<sup>nd</sup> edition: Botany, productions and uses. CABI. 355 p.
- Siepes, B; Chinnasri, B. 2018. Nematode Parasite of Pineapple. In Sikora, R; Coyne, D; Hallmann, J; Timper, P. (Eds). *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. CABI. (717-737). p. 876.
- Schumacher, L; Grabau, Z; Wright, D; Small, I; Ling Liao, H. 2022. Effects of Grass-Based Crop Rotatio, Nematicide, and Irrigation on the Nematode Community in Cotton. *Journal of Nematology*. Consultado 10 may. 2023. Disponible en DOI: 10.2478/jofnem-2022-0046
- Talavera, M. 2003. *Manual de Nematología Agrícola: Introducción al análisis y al control nematológico para agricultores y técnicos de agrupaciones de defensa vegetal*. Institut de Recerca: Formació Agrària, Conselleria D'agricultura I Pesca de Les Illes Balears. 23 p.
- Tixier, P; Risede, J; Dorel, M; Malezieux, E. 2006. Modelling population dynamics of banana plant-parasitic nematodes: A contribution to the design of sustainable cropping system. *Ecological Modelling* 198: 321-331.
- Treviño 2018. Control biológico de *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus) (Diptera: Muscidae) en rastrojos de piña, con el parasitoide *Spalangia endius* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) como parte del manejo agroecológico de plagas, en Pital de San Carlos, Costa Rica. Tesis Lic. Heredia, Costa Rica, Universidad Nacional. 75 p.

- Un Nisa, R; Yousuf, A; Kouser, N; Ahmad, K; Majeed, S; Alamri, S; Nasser, M; Wijaya, L, Asghar, A. 2021. Influence of ecological and edaphic factors on biodevirity of soil nematodes. *Saudi Journal of Biological Science*. 28: 3049-3059.
- Upadhaya, A; Yan, G; Pasche, J. 2019. Reproduction Ability and Growth Effect of Pin Nematode, *Pratylenchus nanus*, with Selected Field Pea Cultivars. *Plant Disease*. 103 (10)2520-2526.
- Valencia, R; Guzmán, O; Villegas, B; Castaño, J. 2014. Manejo Integrado de Nematodos Fitoparásitos en Almacigos de Plátano Dominico Hartón (*Musa* AAB Simmonds). *Luna Azul*. 39: 165-185.
- Vásquez, J; Sanewski, G; Haroldo, D; Bartholomew, D. 2018. Cultural System. *In* Sanewski, G; Bartholomew, D; Paull, R. (Eds) *The Pineapple*, 2<sup>nd</sup> edition: Botany, productions and uses. CABI. 355 p.
- Van den Berg, E; Marais, M; Swart, A. 2017. Nematode Morphology and Classification. *In* Fourie, H., Spaull, V., Jones, R., Daneel, M., De Waele, D. (Eds), *Nematology in South Africa: A View from the 21 st Century (50-71)*. Switzerland. 572 p.
- Vera, N; Maicelo, J; Guevara, E; Oliva, S. 2017. Plant parasitic nematodes associated with pineapple cultivation (*Ananas comosus*) in Amazonas, Peru. *Scientia Agropecuaria* 8(1): 79-84.
- Villegas, O; Vargas, F; Pérez, J; García, R; Porras, S; Meneses, D; Quesada, A; Delgado, G; Alpizar, D; Mora, B; León, R; Alfaro, D. 2007. Caracterización y Plan de Acción para el Desarrollo de la Agrocadena de Piña en la Región Huetar Norte. Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) Costa Rica. Consultado el 10 julio 2022 Disponible en: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/ac-pina-rhn-2007.pdf>
- Xiao, H; Wang, W; Xia, S; Li, Z; Gan, J; Yang, X. 2021. Distributional patterns of soil nematodes in relation to environmental variables in forest ecosystems. *Soil Ecology Letters*. 3 (2); 115-124

Zavaleta, E. 2002. Rompimiento de Resistencia a Hongos Fitopatógenos por Nematodos Fitoparásitos. Una Hipótesis. Revista Mexicana de Fitopatología. 20 (1): 118-122

## ANEXOS

Anexo 1. Población de *Pratylenchus brachyurus* en 100 gramos de raíz, contabilizada de manera mensual durante el desarrollo de la plantación de piña MD-2.

| <b>Población de <i>P. brachyurus</i> en muestra de 100 g de raíz, a diferentes edades de plantación en el cultivo de piña MD-2</b> |                           |                          |                       |
|--|---------------------------|--------------------------|-----------------------|
| <b>Edad (mds)</b>  | <b>Finca Buenos Aires</b> | <b>Finca Los Angeles</b> | <b>Finca Santa Fe</b> |
| 0  | 2                         | 15                       | 2                     |
| 1  | 300                       | 948                      | 660                   |
| 2  | 656                       | 672                      | 723                   |
| 3  | 4 667                     | 968                      | 3 567                 |
| 4  | 1 622                     | 8 544                    | 5 578                 |
| 5  | 6 362                     | 18 083                   | 12 859                |
| 6  | 16 622                    | 29 200                   | 9 633                 |
| 7  | 14 821                    | 25 600                   | 37 722                |
| 8  | 30 639                    | 27 144                   | 27 217                |
| 10   | 47 922                    | 49 744                   | 45 800                |

Anexo 2. Población de *Helicotylenchus* sp. en 100 gramos de raíz, contabilizada de manera mensual durante el desarrollo de la plantación de piña MD-2.

| <b>Población de <i>Helicotylenchus</i> sp. en muestra de 100 g de raíz, a diferentes edades de plantación en el cultivo de piña MD-2</b> |                           |                          |                       |
|--|---------------------------|--------------------------|-----------------------|
| <b>Edad (mds)</b>  | <b>Finca Buenos Aires</b> | <b>Finca Los Ángeles</b> | <b>Finca Santa Fe</b> |
| 0  | 3                         | 15                       | 7                     |
| 1  | 128                       | 133                      | 25                    |
| 2  | 156                       | 111                      | 381                   |
| 3  | 317                       | 67                       | 189                   |
| 4  | 44                        | 300                      | 189                   |
| 5  | 424                       | 550                      | 361                   |
| 6  | 556                       | 761                      | 767                   |
| 7  | 44                        | 550                      | 522                   |
| 8  | 156                       | 600                      | 872                   |
| 10   | 1 400                     | 544                      | 1 717                 |

Anexo 3. Población de *Meloidogyne* sp. en 100 gramos de raíz, contabilizada de manera mensual durante el desarrollo de la plantación de piña MD-2.

| <b>Población de <i>Meloidogyne</i> sp. en muestra de 100 g de raíz, a diferentes edades de plantación en el cultivo de piña MD-2</b> |                           |                          |                       |
|--|---------------------------|--------------------------|-----------------------|
| <b>Edad (mds)</b>  | <b>Finca Buenos Aires</b> | <b>Finca Los Ángeles</b> | <b>Finca Santa Fe</b> |
| 0  | 0                         | 0                        | 0                     |
| 1  | 0                         | 0                        | 0                     |
| 2  | 0                         | 0                        | 0                     |
| 3  | 22                        | 0                        | 0                     |
| 4  | 0                         | 161                      | 0                     |
| 5  | 122                       | 689                      | 11                    |
| 6  | 139                       | 2 656                    | 6                     |
| 7  | 44                        | 39                       | 100                   |
| 8  | 6                         | 22                       | 0                     |
| 10   | 200                       | 61                       | 50                    |

