

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE NEMATODOS DE LA  
SUBFAMILIA HETERODERINAE (FAMILIA HOPLALAIMIDAE),  
PATOGENICIDAD Y CICLO DE VIDA DE DOS POBLACIONES  
DE *HETERODERA*

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

LESTER NÚÑEZ RODRÍGUEZ

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2021

## **Agradecimientos**

Mis más sinceros agradecimientos a las siguientes personas:

Al Dr. Danny Humphreys Pereira y a la M.Sc. Lorena Flores Chaves por guiarme en el desarrollo de este trabajo de tesis, sus consejos, apoyo y enseñanzas. Al Dr. Douglas Marín por las recomendaciones en la redacción del documento.

A las personas que me permitieron ingresar a sus fincas para la recolección de las muestras, les agradezco la amistad y amabilidad.

A la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por el apoyo económico brindado para el desarrollo de este trabajo final de graduación que se encuentra dentro del proyecto de investigación B8609, al Sistema de Estudios de Posgrado por el aporte económico otorgado, y al Laboratorio de Nematología por prestar los equipos y colaborar económicamente para la conclusión de esta tesis.

A Walter Solano, asistente del Laboratorio de Nematología por el apoyo en la recolección y procesamiento de muestras.

A Jacqueline Abarca, Ricardo Brenes, Iris Castro y Joaquín Méndez por toda la ayuda brindada en actividades de invernadero y la obtención de nematodos para el desarrollo la tesis.

Al Laboratorio de Técnicas Moleculares del CIPROC por brindar el equipo permitir el uso de su equipo para la obtención de productos de PCR necesarios para la caracterización molecular de los nematodos.

"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. Robin Gómez Gómez  
**Representante del Decano  
Sistema de Estudios de Posgrado**



---

Dr. Danny Humphreys Pereira  
**Profesor guía**



---

M. Sc. Lorena Flores Chaves  
**Lectora**



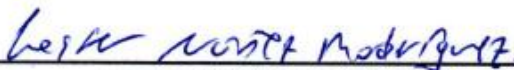
---

Dr. Douglas Marín Vargas  
**Lector**



---

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



---

Lester Núñez Rodríguez  
**Sustentante**

## Contenido general

Agradecimientos .....	ii
Hoja de aprobación.....	iii
Resumen .....	vi
Abstract .....	vii
I. Introducción.....	1
I.A. Objetivo General .....	3
I.B. Objetivos específicos .....	3
II. Revisión de literatura.....	4
II.A. Generalidades de nematodos fitoparásitos.....	4
II.B. Nematodos formadores de quistes .....	5
II.B.1. Generalidades.....	5
II.B.2. Importancia económica .....	5
II.C. Identificación morfológica y molecular de nematodos formadores de quistes .....	6
II.D. Ciclo de vida de nematodos formadores de quistes .....	9
II.E. Patogenicidad .....	11
III. Materiales y métodos .....	12
III.A. Establecimiento de poblaciones de <i>Heterodera</i> sp. ....	12
III.B. Identificación morfológica de dos poblaciones de <i>Heterodera</i> sp. ....	14
III.C. Caracterización molecular: extracción de ADN, PCR y secuenciación .....	16
III.D. Prueba de patogenicidad de <i>Heterodera</i> sp. ....	19
III.E. Evaluación del ciclo de vida <i>Heterodera</i> sp. ....	23
IV- Resultados .....	25
IV.A. Descripción morfológica .....	25
IV.B. Caracterización molecular y análisis filogenético .....	32

IV.C. Patogenicidad .....	44
IV.D. Ciclo de vida .....	45
V. Discusión .....	47
V.A. Descripción morfológica .....	48
V.B. Caracterización molecular .....	50
V.C. Patogenicidad .....	51
V.D. Ciclo de vida .....	52
VI. Conclusiones .....	54
VII. Recomendaciones .....	55
VIII. Literatura citada .....	56

## Resumen

A nivel mundial, uno de los grupos de nematodos fitoparásitos más importantes son los formadores de quistes, y entre las razones están su capacidad de sobrevivir por más de 20 años en ausencia de un hospedero, y su efecto negativo en el desarrollo del cultivo y reducción en los rendimientos. Hasta este estudio, en Costa Rica se había descrito morfológica y molecularmente solamente una especie de formadora de quistes, *Globodera pallida*. Por lo anteriormente descrito y aunado con las malas experiencias que han tenido los productores nacionales de papa con *G. pallida*, se desarrolló este trabajo, con el fin de caracterizar morfológica y molecularmente nematodos de la subfamilia Heteroderinae (familia: Haplolaimidae), y evaluar la patogenicidad y ciclo de vida de dos poblaciones de *Heterodera* sp. de la provincia de Cartago. Se caracterizaron por métodos morfológicos tres poblaciones de *Heterodera* sp. y cinco por métodos moleculares con el uso de tres regiones distintas del ADN (la región ITS y los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S ambos del ADN ribosomal, y el gen parcial *cox1* del ADN mitocondrial). Las secuencias de ADN se analizaron por los métodos de Inferencia Bayesiana y de Máxima Verosimilitud. En lo correspondiente a la patogenicidad, se evaluó el factor de reproducción de dos poblaciones de *Heterodera* sp. en las malezas *Rumex obtusifolius* y *Trifolium repens* y en el cultivo de cultivo hortícola de la remolacha (*Beta vulgaris* var. Boro). Por último, se evaluó el ciclo de vida del nematodo, para esto se realizó un ensayo en el que se utilizó el hospedero en el que fue identificada cada población. Durante el estudio no se observaron especímenes machos de ninguna de las poblaciones descritas. Los caracteres morfométricos longitud promedio del cuerpo ( $531,1\mu\text{m}$ - $552,2\mu\text{m}$ ) y estilete ( $27,4\mu\text{m}$ - $28,4\mu\text{m}$ ) permitieron determinar que las poblaciones correspondían a la especie *H. trifolii*. Este resultado fue respaldado con lo obtenido en la descripción molecular. De los tres marcadores moleculares utilizados (ITS, D2-D3 y *cox1*), el *cox1* fue el que generó una mejor resolución entre especies, esto agrupando secuencias de *H. betae* y *H. trifolii* en un clado (valor de probabilidad posterior de 100% y valor de bootstrap de 97). En lo correspondiente a la patogenicidad, se observó que la población asociada a *R. obtusifolius* se reprodujo de forma satisfactoria (FR mayor a 1) en este hospedero y en *T. repens*, mientras que la población asociada a *T. repens* se reprodujo satisfactoriamente en este hospedero (FR>1), pero no así en *R. obtusifolius* (FR=0,75), mientras que la remolacha no fue hospedero (FR=0 en ambos casos). Por último, *H. trifolii* completó su ciclo de vida en 35 y 43 días posteriores a su inoculación, en *R. obtusifolius* y *T. repens*, respectivamente.

**Palabras clave:** *Heterodera trifolii*, Inferencia Bayesiana, Máxima Verosimilitud, quistes, *Rumex obtusifolius*, *Trifolium repens*.

## Abstract

Cyst-forming nematodes are one of the most important plant-parasitic nematodes worldwide, due to its ability to survive more than 20 years without a host and the negative effect on plant grow and yield losses. Before this study, there was only one species of cyst forming nematodes (*Globodera pallida*) described morphologically and molecularly in the country. The lack of more studies on this group of nematodes motivated us to characterize morphologically and molecularly cyst forming nematodes from the subfamily Heteroderinae (family: Hoplolaimidae), and assess the pathogenicity and the life-cycle of two *Heterodera* sp. populations from the province of Cartago. Three *Heterodera* sp. were morphologically characterized, and five populations were molecularly characterized by using three different regions of the DNA (the *ITS* region and the D2-D3 expansion segments of the 28S, both from the ribosomal DNA, and the partial *cox1* gene from the mitochondrial). DNA sequences were analyzed with the Bayesian Inference and the Maximum Likelihood methods. For pathogenicity, the reproduction factor of two *Heterodera* sp. populations was evaluated on the weed species *Rumex obtusifolius* and *Trifolium repens*, and the beetroot (*Beta vulgaris* var. Boro). Finally, the life-cycle of two populations was assessed, a greenhouse essay was carried out using the plants where each population was found. In our study, no males were found. The morphometric characters body length average (531,1 $\mu$ m-552,2 $\mu$ m) and stylet (27,4 $\mu$ m-28,4 $\mu$ m) allowed to determine the species as *H. trifolii*. This result was in agreement with the molecular characterization. From the three molecular markers used in this study (*ITS*, 28S and *cox1*), the *cox1* showed a better resolution between species, grouping sequences of *H. betae* in a clade with sequences of *H. trifolii* (posterior probability value of 100% and a boobstrap value of 97). Regarding the pathogenicity assays, it was observed that the population associated with *R. obtusifolius* reproduced satisfactory (RF more than 1) on this host and *T. repens*, whereas the population associated with *T. repens* reproduced satisfactory on this host (RF>1), but not on *R. obtusifolius* (RF= 0,75). Beetroot was not a host (RF=0) in both cases. Finally, *H. trifolii* completed its life-cycle on 35 and 43 after inoculation on *R. obtusifolius* y *T. repens*, respectively.

**Key words:** *Heterodera trifolii*, Bayesian Inference, Maximum likelihood, cysts, *Rumex obtusifolius*, *Trifolium repens*.

## Índice de cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Poblaciones de <i>Heterodera</i> sp. según planta hospedante y localidad ... donde se recolectaron.....	13
<b>Cuadro 2.</b> Caracterización morfométrica de quistes de dos poblaciones de <i>Heterodera trifolii</i> identificadas en <i>R. obtusifolius</i> (HR) y <i>T. repens</i> (HT). Medidas se presentan en micras ( $\mu\text{m}$ ).....	28
<b>Cuadro 3.</b> Caracterización morfométrica de nematodos en segundo estado juvenil de tres poblaciones de <i>Heterodera trifolii</i> . Medidas se presentan en micras ( $\mu\text{m}$ ) y en formato de: promedio $\pm$ desviación estándar (mínimo - máximo).....	29
<b>Cuadro 4.</b> Poblaciones de <i>Heterodera trifolii</i> caracterizadas por medio de tres ..... marcadores moleculares.....	34
<b>Cuadro 5.</b> Población final (Pf) y factor de reproducción (FR) de dos poblaciones de <i>Heterodera trifolii</i> en tres hospederos. San José, Costa Rica. 2019-2020.....	45



## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Ensayo de patogenicidad de <i>Heterodera</i> sp. en plantas de <i>R. obtusifolius</i> (plantas del lado izquierdo) y <i>B. vulgaris</i> (plantas del lado derecho). .....	21
<b>Figura 2.</b> <i>Heterodera trifolii</i> , A) cuerpo entero de nematodo J2, B) estilete (s) y ..... estructura cefálica (ec), C) nódulos (n), D) metacarpus (m), E) cola, F) cono vulval (c), G) puente vulval bifurcado (p) y H) fenestración (f). Escalas: A y F= 100 $\mu$ m, B-E y G-H= 10 $\mu$ m .....	27
<b>Figura 3.</b> Amplificación de producto de PCR; A) región ITS, B) segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S y gen parcial <i>cox1</i> . N= control negativo. M= marcador de peso molecular 100 pb (Thermo Scientific). .....	32
<b>Figura 4.</b> Análisis filogenético entre especies de <i>Heterodera</i> de la región ITS, utilizando el método de Inferencia Bayesiana y el modelo GTR + I + G como el mejor modelo evolutivo. ....	36
<b>Figura 5.</b> Análisis filogenético entre especies de <i>Heterodera</i> de la región ITS, utilizando el método de Máxima Verosimilitud y el modelo GTR + I + G como el mejor modelo evolutivo. ....	37
<b>Figura 6.</b> Análisis filogenético entre especies de <i>Heterodera</i> de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S, utilizando el método de Inferencia Bayesiana y el modelo GTR + I + G como el mejor modelo evolutivo.....	39
<b>Figura 7.</b> Análisis filogenético entre especies de <i>Heterodera</i> de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S, utilizando el método de Máxima Verosimilitud y el modelo GTR + I + G como el mejor modelo evolutivo.....	40
<b>Figura 8.</b> Análisis filogenético entre especies de <i>Heterodera</i> del gen <i>cox1</i> , utilizando el método de Inferencia Bayesiana y el modelo GTR + I + G como el mejor modelo evolutivo. ....	42
<b>Figura 9.</b> Análisis filogenético entre especies de <i>Heterodera</i> del gen <i>cox1</i> , utilizando el método de Máxima Verosimilitud y el modelo GTR + I + G como el mejor modelo evolutivo. ....	43
<b>Figura 10.</b> Descripción del ciclo de vida de <i>Heterodera trifolii</i> , en <i>R. obtusifolius</i> A) nematodo J2, B y C) nematodo J3, D) hembra inmadura, E) hembra viva sobre la raíz y F) quiste. Escalas 100 $\mu$ m. ....	46

**Figura 11.** Descripción del ciclo de vida de *Heterodera trifolii* en *T. repens* A) nematodo J2, B y C) nematodo J3, D) nematodo J4, E) hembra viva y F) quiste. Escalas 100  $\mu$ m. ....47



UNIVERSIDAD DE  
COSTA RICA

SEP Sistema de  
Estudios de Posgrado

**Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.**

Yo, Lester Núñez Rodríguez, con cédula de identidad 800990424, en mi condición de autor del TFG titulado Identificación morfológica y molecular de nematodos de la subfamilia Heteroderinae (familia Hoplolaimidae), patogenicidad y ciclo de vida de dos poblaciones de Heterodera

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI  NO \*

\*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: 2 año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

**INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:**

Nombre Completo: Lester Núñez Rodríguez

Número de Carné: B04537 Número de cédula: 800990424

Correo Electrónico: lesnr92@gmail.com

Fecha: 25-05-2021 Número de teléfono: 86370979

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Danny Humphreys Pereira

  
FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

## I. Introducción

Los nematodos fitoparásitos son parásitos obligados y comprenden una de las plagas más importantes en diversos cultivos a nivel mundial ya que pueden afectar en forma significativa la producción agrícola (Abd-Elgawad 2013). Se estima que estos organismos pueden disminuir el rendimiento en aproximadamente un 12,3%, lo cual representa pérdidas económicas superiores a \$150 billones (Ali *et al.* 2014; Singh *et al.* 2015). Los nematodos de mayor importancia económica a nivel mundial son el nematodo formador de agallas (*Meloidogyne* spp.), los nematodos formadores de quistes (*Globodera* spp. y *Heterodera* spp.) y el nematodo lesionador (*Pratylenchus* spp.) (Jones *et al.* 2013).

Los nematodos formadores de quistes pertenecen a la familia Hoplolaimidae y a la subfamilia Heteroderinae. Entre los géneros de esta subfamilia asociados a diversos cultivos están *Heterodera*, *Globodera*, *Punctodera* y *Cactodera* (Dracaemer y Hunt 2013). En Costa Rica, el estudio de nematodos formadores de quistes se ha enfocado principalmente al género *Globodera*. Entre los años 1972 y 1974 se reportó la presencia de *G. rostochiensis* en diferentes fincas de la provincia de Cartago. Sin embargo, un estudio realizado en la misma zona entre el período 1975-1977 no pudo determinar su presencia. En el mismo, se realizaron dos ensayos de invernadero para evaluar la patogenicidad de *G. rostochiensis* en los cultivares de papa “Atzimba” y “Red Pontiac”, esto debido a la susceptibilidad al nematodo, sin embargo, resultaron negativas (Ramírez 1979).

A principios del año 2005, el Laboratorio de Nematología de la Universidad de Costa Rica diagnosticó por medio un análisis morfológico la presencia de *Globodera pallida* en muestras procedentes de la provincia de Cartago (Salazar *et al.* 2005), posteriormente, por medio de técnicas moleculares, empleando PCR, se corroboró la especie *G. pallida* (García *et al.* 2009). Recientemente, Sandoval *et al.* (2020) determinaron la presencia de un único haplotipo de *G. pallida* basado en dos marcadores moleculares (cytb y ITS) y concluyeron que posiblemente este nematodo tuvo un único sitio de entrada y luego se distribuyó al resto del país.

En Costa Rica, aparte de *G. pallida*, se carece de información sobre otros nematodos formadores quistes, que podrían ser un problema fitosanitario en potencia. Estos nematodos se pueden dispersar con facilidad a otros campos de producción mediante esorrentía, suelo adherido a la maquinaria o a los tubérculos (Marshall 1993). A eso se le suma la capacidad de sobrevivencia que pueden tener aún en ausencia de un hospedero (Jones *et al.* 2009; Weayenberge *et al.* 2009; Eves-van den Akker *et al.* 2016). Debido a eso, y con la ayuda de la información registrada por el laboratorio de Nematología, fue importante realizar un estudio para determinar la presencia de otra (s) especie (s) de nematodo formador de quistes, así como la patogenicidad y ciclo de vida en el hospedero.

### I.A. Objetivo General

Identificar morfológica y molecularmente nematodos de la subfamilia Heteroderinae (familia Hoplolaimidae), determinar la patogenicidad y describir el ciclo de vida de dos poblaciones de *Heterodera* sp. de la zona Norte de Cartago.

### I.B. Objetivos específicos

1. Identificar especies de nematodos de la subfamilia Heteroderinae (familia Hoplolaimidae) por medio caracteres morfológicos.
2. Utilizar técnicas moleculares para convalidar las especies de nematodos de la subfamilia Heteroderinae identificadas por medio de caracteres morfológicos.
3. Determinar la patogenicidad de dos poblaciones de *Heterodera* sp.
4. Describir el ciclo de vida de dos poblaciones de *Heterodera* sp.

## II. Revisión de literatura

### II.A. Generalidades de nematodos fitoparásitos

Los nematodos son organismos translúcidos, no presentan segmentaciones internas, son pseudocelomados, lo que indica que tienen un espacio ocupado por líquidos entre la pared del cuerpo y el tubo digestivo. En el caso de los nematodos fitoparásitos uno de los aspectos que los identifica es que cuentan con una estructura denominada estilete, que tiene la capacidad de extenderse hacia afuera, es hueca (Rivera 2007). Esta estructura es utilizada para penetrar las células de las plantas y así extraer el contenido celular (Lagunes y Zavaleta 2016; Jones *et al.* 2013).

Los nematodos fitoparásitos son clasificados según el tipo de parasitismo, como ectoparásitos, es decir, aquellos que permanecen en la superficie de las raíces e insertan su estilete para alimentarse, ejemplo de estos son los géneros *Tylenchorhynchus*, *Trichodorus*, *Paratrichodorus*, *Xiphinema*, *Longidorus*, *Paratylenchus*, *Hemicycliophora*, entre otros (Bridge y Starr 2007). Otro grupo lo conforman nematodos que penetran en forma parcial o catalogados semi-endoparásitos como *Rotylenchulus* (Robinson *et al.* 1997). Por otro lado, están los endoparásitos, ya que logran penetrar la raíz y completar la mayoría de su ciclo de vida dentro de ellas. A su vez, estos se pueden clasificar de dos formas, endoparásitos sedentarios como *Meloidogyne* y los formadores de quistes como *Globodera* y *Heterodera*, y los endoparásitos migratorios como *Pratylenchus* (Guzmán *et al.* 2012; Wale *et al.* 2008).

## **II.B. Nematodos formadores de quistes**

### II.B.1. Generalidades

Los nematodos formadores de quistes pueden sobrevivir por más de 20 años en el suelo en ausencia de su hospedero (Eves-van den Akker *et al.* 2016; Jones *et al.* 2009; Weayenberge *et al.* 2009). La razón es debido a que los huevos se encuentran dentro del quiste, estructura que se forma por el endurecimiento de la cutícula de la hembra después que ha muerto y que brinda protección ante condiciones adversas (Franco 1986).

En Alemania, en el año de 1859, el botánico Hermann Schacht descubrió el primer nematodo formador de quiste, asociado a plantas de remolacha azucarera. En los años siguientes fue identificado como una de las principales plagas en la producción de remolacha en diferentes países europeos. Sin embargo, hasta el año de 1871 Adolf Schmidt le asignó género y especie, *Heterodera schachtii*, nombre que se brindó en honor a su descubridor (Hallmann *et al.* 2009). Actualmente, los nematodos formadores de quistes se encuentran clasificados dentro de la subfamilia Heteroderinae y se reconocen ocho géneros: *Heterodera*, *Globodera*, *Cactodera*, *Dolichodera*, *Paradolichodera*, *Betulodera*, *Punctodera* y *Vittatidera* (Subottin *et al.* 2010a, b).

### II.B.2. Importancia económica

Dentro de este grupo, los géneros de mayor importancia a nivel mundial son *Globodera* y *Heterodera* (Jones *et al.* 2013). En Estados Unidos, el cultivo de soja (*Glycine max*) se ve afectado principalmente por el nematodo formador de quistes



*Heterodera glycines*. Este nematodo genera pérdidas económicas anuales superiores a un billón de dólares (Acharya 2016; Jones *et al.* 2013). En Italia, se ha reportado pérdidas de rendimiento entre 20 a 90% en el cultivo de zanahoria (*Daucus carota*) ocasionado por *Heterodera carotae* (Greco *et al.* 1993), el cultivo de remolacha azucarera (*Beta vulgaris* spp. *vulgaris*) es afectado principalmente por *Heterodera schachtii*, que ocasiona pérdidas de rendimiento de 80% o superiores (Curto 2008), esta especie también se ha reportado asociado a remolacha de mesa (*Beta vulgaris* var. *conditiva*) y brocoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) (Escobar *et al.* 2019).

En México se reporta a *Cactodera torreyanae* parasitando al cultivo de romerito (*Suaeda torreyana*) (Cid Del Prado y Subbotin 2014). Por otro lado, *G. rostochiensis* y *G. pallida* se reportan asociados al cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) y se estima que a nivel mundial ocasionan pérdidas en el rendimiento entre 10 y 12% (Norshie *et al.* 2016).

## **II.C. Identificación morfológica y molecular de nematodos formadores de quistes**

La identificación de las especies de nematodos es un aspecto de gran importancia para establecer las estrategias de combate o medidas cuarentenarias. Para esto se pueden emplear estudios que incluyen caracteres morfológicos y morfométricos, así como el empleo de técnicas moleculares (Lafi *et al.* 2016; Dawabah *et al.* 2012; Abdollahi 2008).

El estudio de los caracteres morfológicos y morfométricos está precedido por una serie de pasos, en los que incluyen montajes temporales y permanentes de los nematodos a analizar. Así, los nematodos, se observan en el microscopio de luz con ayuda de una cámara digital adaptada, la cual hace posible la toma de fotografías y mediciones del espécimen (Sekimoto *et al.* 2017a, 2017b; Maafi *et al.* 2007). En este sentido, la forma del quiste es un carácter morfológico que permite separar algunos géneros, por ejemplo, la hembra de *Globodera* al madurar obtiene una forma de globo, lo cual le da origen a su nombre (Handoo *et al.* 2012; Skantar *et al.* 2011; Franco 1986), dentro de este género *G. pallida* se puede diferenciar de *G. rostochiensis*, ya que esta última presenta un estado en el que su coloración es dorado o amarillo (OEPP/EPPO 2013), mientras *Heterodera* presenta forma de limón (Subbotin *et al.* 2010a,b).

La presencia de cono vulval en quistes es otro carácter empleado en la diferenciación a nivel de género, *Heterodera* presenta un cono vulval prominente, mientras que *Cactodera* posee un cono pequeño, en tanto, *Globodera*, *Dolichodera* y *Paradolichodera* no tienen esta protuberancia (Moens *et al.* 2018). En quistes maduros, el tipo de fenestra (área de las paredes delgadas en el cono vulval o área perineal) es otro carácter morfológico utilizado en la identificación, de este modo se pueden diferenciar tres tipos de fenestra; circunfenestra, ambifenestra o bifenestra (Turner y Subbotin 2013). En *Heterodera* spp., basados en caracteres morfológicos, entre ellos el tipo de fenestra y complementados con datos moleculares, la mayoría de especies se han dividido en ocho grupos; *Afenestrata*, *Avenae*, *Bifenestra*,

*Cardiolata*, *Cyperi*, *Goettingiana*, *Humili*, *Sacchari* y *Schachtii* (Handoo y Subbotin 2018).

El grupo *Schachtii* posee 16 especies válidas entre las que se pueden citar a *Heterodera betae*, *H. daverti*, *H. glycines*, *H. schachtii* y *H. trifolii*, (Singh *et al.* 2020) especies que se encuentran estrechamente relacionadas y que pueden diferenciarse mediante técnicas moleculares en complemento con caracteres morfométricos (Amiri *et al.* 2002; Subbotin *et al.* 2010b; Vovlas *et al.* 2015; Sekimoto *et al.* 2017a).

La descripción morfológica también puede incluir el análisis morfométrico, lo cual comprende la medición y determinación de proporciones entre diferentes partes del individuo (quistes, hembras, machos, segundo estado juvenil y huevos) (Haidar *et al.* 2016; Dracaemer y Hunt 2013). La identificación morfológica y morfométrica de nematodos presenta la desventaja que requiere personal especializado para realizar dicha labor, requiere de mayor tiempo para brindar un diagnóstico y muchos de los caracteres empleados en la identificación traslapan en forma parcial entre géneros y especies (Mundo-Ocampo *et al.* 2008).

Desde esa perspectiva, el empleo de técnicas moleculares para la identificación de nematodos fitoparásitos brinda un complemento a los estudios morfológicos y morfométricos (Subbotin *et al.* 2000), además, confiere la ventaja de brindar un resultado más preciso y el tiempo requerido para emitir el diagnóstico es menor (Szalanski *et al.* 1997). Para la identificación de especies de formadores de quistes se han empleado técnicas moleculares como reacción en cadena de la polimerasa

(PCR, por sus siglas en inglés), PCR-RFLP, PCR-imprimadores específicos, PCR en tiempo real (Ye 2012; Weayenberge *et al.* 2009; Mundo-Ocampo *et al.* 2008).

En este sentido, el PCR ha sido un método ampliamente utilizado para el diagnóstico de nematodos (Subbotin *et al.* 2001; Szalanski *et al.* 1997), para esto, se requiere un fragmento de ADN el cual contiene la región que será amplificada, dos imprimadores o cebadores (oligonucleótidos) flanqueantes y complementarios a esa región, ADN polimerasa, desoxirribonucleótidos trifosfatos mezclados en un buffer que contiene iones magnesio (Subbotin *et al.* 2010a). El proceso de PCR permite obtener múltiples copias del fragmento de ADN, esto se realiza en un termociclador y consiste en tres etapas determinadas por condiciones de temperatura: desnaturalización, alineamiento y extensión de la cadena ADN (Derycke *et al.* 2005).

Para la identificación de especies de formadores de quistes se ha utilizado ADN mitocondrial *cox1* (*cox1*) y ADN ribosomal, como los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S (28S) y la región espaciadora transcrita interna (*ITS*, por sus siglas en inglés) (Skantar *et al.* 2012; Bernard *et al.* 2010; Mundo-Ocampo *et al.* 2008; Madani *et al.* 2004), localizada entre el gen ADNr 18S y 5.8S para ITS1 (Subbotin *et al.* 2010a).

#### **II.D. Ciclo de vida de nematodos formadores de quistes**

El ciclo de vida de los nematodos comprende la etapa de huevo, cuatro estadios juveniles y finalmente el adulto. En diferentes géneros de formadores de quistes, los huevos son retenidos principalmente en el interior del cuerpo de la hembra muerta,

puediendo encontrarse algunos en el matriz gelatinoso que emiten algunos géneros como *Heterodera*. El primer estado juvenil está dentro del huevo, posteriormente, se genera la primera muda y el nematodo en segundo estado juvenil (J2) adquiere el estilete y con ayuda de este, rompe la cutícula del huevo y emerge, este evento está influenciado por diversos factores, entre ellos los exudados que producen las raíces de las plantas, como sucede con *Globodera pallida*, *G. rostochiensis* y *Heterodera carotae*, entre otros (Subbotin *et al.* 2010a).

Otro factor que incide sobre la eclosión de los nematodos es la temperatura, la cual varía entre especies, por ejemplo, la temperatura óptima de *G. pallida* es de 16°C mientras que para *G. rostochiensis* es de 20°C, mientras que para *Heterodera zaeae* es de 30°C y para *H. glycines* está comprendida entre 23-28°C. El segundo estadio juvenil (J2) representa el estado infectivo de estos nematodos, los cuales salen por las aberturas naturales presentes en el quiste (región de la fenestra y el cuello) (Turner y Subbotin 2013).

El nematodo J2 penetra la raíz de la planta y se establece cerca del cilindro vascular en donde con el estilete penetra una célula e induce la formación del sitio de alimentación denominado sincitio (OEPP/EPPO 2013; Haegeman *et al.* 2012; Escobar y Fenoll 2008, Núñez *et al.* 2003). El sincitio es una estructura multinucleada que se origina por la degradación de la pared celular de las células vecinas y la fusión de sus protoplastos (Williamson y Hussey 1996). El sitio de alimentación se convierte en la fuente de alimento de los estadios juveniles tres y cuatro, para la formación de un adulto, hembra o macho (Siddiqi *et al.* 1986)

## II.E. Patogenicidad

La patogenicidad puede ser definida como la capacidad de reproducción de una especie de nematodo en una planta (Shaner *et al.* 1992), de este modo, se puede determinar el grado de susceptibilidad de la planta (Smiley y Marshall 2016). La capacidad de reproducción es determinada por medio del factor de reproducción, para esto se realiza la inoculación de plantas con una densidad poblacional conocida y transcurrido el tiempo para la evaluación se realiza la extracción y conteo de la población final de nematodos, el resultado de la división de la población final entre la población inicial permite determinar el factor de reproducción y con esto asignar el grado de susceptibilidad de las plantas (Poromarto *et al.* 2011).

En nematodos formadores de quistes el rango de hospederos puede variar según el grupo. Dentro del género *Globodera*, *G. pallida* y *G. rostochiensis* son las principales especies y parasitan principalmente especies de plantas pertenecientes a la familia de las solanáceas, como lo es el cultivo de papa (Sullivan *et al.* 2007), mientras que *G. tabacum* afecta el cultivo de tabaco, pero no así plantaciones de papa (Alenda *et al.* 2014).

En lo que respecta a especies pertenecientes al género *Heterodera*, hay especies con un rango de hospederos estrecho como *H. betae*, nematodo que afecta principalmente plantas de remolacha (Wouts *et al.* 2001; Subbotin *et al.* 2010b) y *H. daveri* especie que afecta principalmente plantas de la familia Leguminosae como trébol, y plantas ornamentales de la familia Caryophyllaceae como clavel (Nordmeyer y Sikora, 1983; Subbotin *et al.* 2010b).

Sin embargo, dentro del mismo género *Heterodera*, existen especies que pueden afectar una mayor cantidad de especies de plantas, como el nematodo del trébol, el cual puede parasitar cultivos de diferentes familias, entre estas Amaranthaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae y Leguminosae (Wang y Riggs 1999; Wang *et al.* 2001; Subbotin *et al.* 2010b), el nematodo del quiste de la soya, *H. glycines*, especie con más de 300 hospederos, dentro de los cuales, el cultivo de soya es el de mayor importancia (Li *et al.* 2014) y el nematodo del quiste de la remolacha, *H. schachtii*, nematodo que puede parasitar más de 200 especies de plantas (Kim *et al.* 2019).

### **III. Materiales y métodos**

#### III.A. Establecimiento de poblaciones de *Heterodera* sp.

Las poblaciones se ubicaron con ayuda de la base de datos del Laboratorio de Nematología del Centro de Investigación en Protección de Cultivos de la Universidad de Costa Rica (CIPROC-UCR). Por cada población (cuadro 1) se recolectó una muestra compuesta de raíces y suelo.

**Cuadro 1.** Poblaciones de *Heterodera* sp. según planta hospedante y localidad donde se recolectaron.

<b>Población</b>	<b>Hospedante</b>	<b>Localidad</b>
CR1	<i>Rumex obtusifolius</i>	Llano Grande, Cartago
CR2	<i>Trifolium repens</i>	La Angelina, Cartago
CR3	<i>T. repens</i>	San Gerardo de Dota, San José
CR4	<i>T. repens</i>	San Juan de Chicua, Cartago
CR5	<i>R. obtusifolius</i>	Zarcerero, Alajuela

Las raíces se lavaron con agua del tubo, se pesaron y se cortaron en trozos de aproximadamente 1 cm, se homogenizó y se pesó una submuestra de 10 g. Posteriormente, se procesó mediante el método de maceración y centrifugación propuesto por Caveness y Jensen (1955) modificado por el Laboratorio de Nematología (UCR). La muestra se maceró por 15-30 segundos con una licuadora según dureza de las raíces. El macerado se pasó a través de cribas superpuestas de 100 sobre 500 mesh; el material de la criba superior se lavó con abundante agua y luego se descartó.

El contenido de la criba de 500 mesh se transfirió a un tubo falcon de 50 ml y se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 3 minutos. Posteriormente, el supernatante se eliminó y se agregó una solución azucarada, con densidad específica de 1,18 (471



g de sacarosa/L de agua), esta mezcla se agitó y se volvió a centrifugar durante 3 minutos a 3000 r.p.m. Seguidamente, el supernatante se colocó en la criba de 500 mesh, se lavó con abundante agua y se transfirió a un platillo contador, con el objetivo de cuantificar e identificar las formas móviles de los géneros presentes en las muestras por medio de un microscopio invertido (Leica CMS GmbH).

Mientras que las muestras de suelo se procesaron por medio del método Fenwick (Shepherd 1986), el cual consta de un embudo donde se agregaron 200 ml de suelo y se aplicó agua a presión, posteriormente se recolectó el material que salió por flotación con ayuda de una criba de 100 mesh. El material presente en el tamiz se transfirió a una placa petri que tenía papel filtro en el fondo, se observó al estereoscopio (Nikon SMZ745T) y se realizó extracción de quistes.

Las poblaciones CR1, CR2, CR4 y CR5 se establecieron en el invernadero de nematología con el objetivo de obtener el material de nematodos necesarios para las siguientes etapas de la investigación. Para cada población, se recolectaron tanto plantas hospederas (cuadro 1) como el suelo de las fincas donde se detectó *Heterodera* sp. Para la obtención de los nematodos, se esperó un tiempo aproximado de cuatro meses.

### III.B. Identificación morfológica de dos poblaciones de *Heterodera* sp.

Para la descripción morfológica, se utilizaron las poblaciones CR1 y CR4, que se habían establecido bajo condiciones de invernadero. Se procesaron muestras de suelo (200 g) por medio del método de Fenwick (descrito previamente), se extrajeron quistes de las muestras y se colocaron en placas contadoras de 54 mm.

Posteriormente, se realizaron montajes temporales de quistes enteros (en total 10 por población), conos vulvales (para esto, se cortaron quistes transversalmente, y se utilizaron un total 10 por población) y de nematodos J2 (en total 30 J2 por población). Los quistes y conos vulvales se limpiaron antes de realizar el montaje. Posteriormente, se colocó un quiste o un cono vulval por portaobjeto, al cual se le había agregado una gota de glicerol.

En lo correspondiente al montaje de nematodos J2, con ayuda de un bisturí se cortaron los quistes, esto con el fin de liberar los nematodos J2 y de cada quiste se utilizaron cinco especímenes, estos se colocaron en un portaobjeto, al cual se le había agregado una gota de agua previamente. Posteriormente, se colocó el cubre objetos y se selló con esmalte transparente para uñas (marca LAIS). El montaje temporal de los especímenes se realizó con ayuda de un estereoscopio (Nikon SMZ745T). Por último, cada uno de los montajes se observaron y se fotografiaron con ayuda de un microscopio Olympus (modelo BH-2), al cual se le había adaptado una cámara digital EUROMEX (modelo DC 5000-WIFI), para realizar las mediciones morfométricas con base a descripciones de nematodos formadores de quistes efectuadas por diferentes investigadores (Subbotin y Sturhan 2004; Maafi *et al.* 2007; Abdollahi 2008; De Luca *et al.* 2013; Cid Del Prado y Subbotin 2014; Sekimoto *et al.* 2017a, 2017b).

Para el caso de nematodos J2 se midieron los caracteres: longitud del cuerpo (L), longitud del estilete (S), altura y diámetro de nódulos del estilete, cono y columna del estilete, altura y diámetro de la región labial, Orificio de la Glándula Dorsal Esofágica, longitud desde la parte anterior hasta el poro excretor y hasta el aparato

valvular, diámetro a mitad del cuerpo (W) y a nivel de ano (Da), región hialina (H), longitud de la cola, diámetro y longitud del metacarpus, índices como: a (L/W), c (L/Lc), c' (Lc/Da), H/S, Lc/H. En quistes se midió la longitud de quiste (excluyendo el cuello), diámetro del quiste, ancho de la semifenestra, longitud de la fenestra, longitud y ancho de la vulva, longitud y ancho del puente vulvar.

Las mediciones se tabularon en una hoja de Excel (Microsoft office 2016) y por cada carácter medido se determinó promedio, desviación, máximo y mínimo con el software InfoStat versión 2008.

### III.C. Caracterización molecular: extracción de ADN, PCR y secuenciación

El ADN utilizado para amplificar la región *ITS* del ADNr se extrajo mediante el Kit de extracción QIAamp® DNA Micro Kit (marca: QIAGEN), para esto, se procesaron dos muestras por población, en cada una, se utilizaron cinco nematodos J2 por quiste (en total 20 quistes) y se empleó el procedimiento indicado por el fabricante del kit utilizado.

En lo que respecta al ADN utilizado para amplificar el *cox1* y 28S ADNr se realizó según el método del Laboratorio de Nematología de la UCR, para lo cual se preparó una solución extractora; por cada reacción de extracción se utilizó 10 µl de agua, 10 µl de buffer Dream Taq (10x) y 1,5 µl de Proteinasa K (20mg/ml), esto se multiplicó por el total de reacciones más una extra por error de pipeteo y se mezcló en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Los tubos de PCR de 0,2 ml se rotularon y se agregó 21,5 µl de la mezcla en cada tubo. En cada tubo de PCR se colocó un juvenil, se tapó y se colocó en el termociclador a 57°C durante 16 h (960 min) y 95°C por 20 min.

Transcurrido este tiempo, los tubos se sacaron para ser utilizados o almacenarlos a -20°C hasta su uso.

Para amplificar el ADN se utilizó el termociclador Mastercycler pro (Eppendorf). Cada reacción de PCR contenía 0,4 µM de cada primer, 1X de buffer de HF (Phusion High Fidelity, Thermo Scientific), 0,02 U Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Scientific), 1 µl of 20 mg/ml BSA (Thermo Scientific), 1 mM MgCl<sub>2</sub> (Thermo Scientific), 0,2 mM dNTP mix (New England Biolabs), 2 µl de ADN para *cox1* y D2-D3, y 5 µl para *ITS*, por último, se ajustó el volumen final a 25 µl con agua ultrapura autoclavada. Se utilizaron los imprimadores TW81 (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') / AB28 (5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3') (Subbotin *et al.* 2000) para amplificar la región *ITS*, D2A (5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3') / D3B (5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3') para los segmentos de expansión D2-D3 (De Ley *et al.* 1999) y JB3 (5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3') / JB4(5'-AGCACCTAAACTTAAAACATAATGAAAATG-3') (Derycke *et al.* 2005) para el *cox1*. Sin embargo, debido a problemas en la amplificación y secuenciación del *cox1*, se diseñaron los imprimadores HTcoxIF2 (5'-GCT-TCT-GAT-CTT-TCC-TTT-CCA-CGT-A-3') y el Int-HTcoxIF2 (5'-GATAGTACTGGTGGAGGAAACCC-3'). De este modo, para el *cox1* se amplificó con los imprimadores HTcoxIF2 y JB4, mientras que para la secuenciación se usaron estos dos imprimadores más el imprimador Int-HTcoxIF2.

Las condiciones utilizadas para realizar las amplificaciones fueron de: pre-desnaturalización (30 s a 98°C), 37 ciclos para: desnaturalización (98°C por 3

segundos), anillamiento 58°C por 30 s para *ITS* y el *cox1*, y de 55°C por 30 s para D2-D3, seguido de una extensión (72°C por 40 s). Por último, extensión final (72°C por 1 min) (Derycke *et al.* 2005).

Posteriormente, se mezcló 3  $\mu$ l del producto de PCR con 3  $\mu$ l de tinte de carga Loading Dye 6X (Thermo Scientific) (solución previamente mezclada con 2  $\mu$ l de Gel Red), se cargó en un gel de agarosa al 1 %, y se corrió por 45 min a 110 V. El gel se colocó en un transiluminador UV BioDoc-it2® 315 Imaging System (modelo: LMS-26 Transilluminator) para fotografiar, de este modo se comparó el tamaño de las bandas con el marcador de peso molecular Gen Ruler 100 pb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

Los imprimadores diseñados para amplificar el *cox1* se validaron mediante clonación, para esto se extrajo ADN de un total de 300 nematodos y se amplificó utilizando los imprimadores HTcoxIF2/JB4, se envió un total de 100  $\mu$ l de producto de PCR a la empresa Macrogen Inc. para clonación con el vector TOPO-Blunt y secuenciación en forma bidireccional de la población CR4. En lo correspondiente al método de secuenciación directo, el producto de PCR generado del *cox1* y de la región D2-D3 se purificó utilizando el kit QIAquick PCR Purification kit (Qiagen) y se secuenció bidireccionalmente. En lo que respecta a la región *ITS*, el producto se purificó como se mencionó anteriormente, se clonó y se secuenció como en el *cox1*, todo esto con el servicio de la empresa Macrogen Inc. (Seoul, Korea).

Las secuencias generadas en este estudio se editaron con el programa bioinformático Bioedit 7.0.9 (Hall 1999) y se alinearon con otras secuencias descargadas del GenBank utilizando el algoritmo ClustalW (Thompson *et al.* 1994)

con los parámetros establecidos en el programa. Las relaciones filogenéticas de las secuencias de *Heterodera* spp. se determinaron mediante el análisis Bayesiano y el análisis de Máxima Verosimilitud.

El método de Inferencia Bayesiana se realizó con el programa MrBayes 3.2 (Ronquist *et al.* 2012) en el cual se configuró para utilizar cuatro cadenas MCMC usando  $1.0 \times 10^5$  generaciones y un muestreo cada 100 generaciones. Mientras que el método de Máxima Verosimilitud se generó con el software RAxML 7.2.8 Black Box (Stamatakis 2006; Stamatakis *et al.* 2008) en el portal CIPRES Science Gateway (Miller *et al.* 2010) y la configuración utilizada fue la establecida por el programa a excepción del valor de Bootstrap que fue de 1000 réplicas y el modelo.

El mejor modelo evolutivo para los genes en estudio y los métodos de análisis utilizados fue el modelo GTR + I + G el cual se determinó con el programa jModelTest 2.1.10 basado en el Criterio de Información Bayesiana (Darriba *et al.* 2012). Los árboles filogenéticos se visualizaron mediante el programa FigTree v1.4.1 (Rambaut y Drummond, 2012). En cada uno de los árboles se muestran los datos de probabilidad posterior (PP) en la base de cada grupo y el valor de “Bootstrap” (VB), que corresponden a los métodos de Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud, respectivamente.

#### III.D. Prueba de patogenicidad de *Heterodera* sp.

En el invernadero del Laboratorio de Nematología de la Universidad de Costa Rica, en San Pedro, San José, se establecieron dos bioensayos para evaluar la patogenicidad de las poblaciones CR1 y CR4 en plantas de *R. obtusifolius* (nombre

común ruibarbo), *T. repens* (nombre común trébol blanco) y remolacha de mesa (*Beta vulgaris* var. Boro, variedad más cultivada en Costa Rica) (figura 1); la disponibilidad de inóculo a utilizar para las pruebas de patogenicidad fue lo que determinó la selección de las poblaciones.

En el caso de *R. obtusifolius*, se recolectaron semillas en Llano Grande de Cartago para establecer el almácigo. Las semillas traídas de campo fueron sembradas en macetas de 3 L de capacidad y no fue necesario utilizar algún método para ayudar con la germinación de las mismas. A los 15 días después de emergencia de las plántulas (DDE) se realizó una fertilización con 100 ml de solución que contenía 5 g de fertilizante 20-20-20. El trasplante se realizó a los 22DDE en macetas de 2 L de capacidad, una planta por maceta. Ocho días después del trasplante (DDT) se realizó otra fertilización (descrita anteriormente).

El almácigo de *T. repens*, inició con el establecimiento de plantas madres, las cuales se obtuvieron a partir de la siembra de semilla sexual. A los 22 DDE se realizó una fertilización con 100 ml de solución que contenía 5 g de fertilizante 20-20-20. Posteriormente, a los 37 DDE se realizó el trasplante a cinco macetas de 2 L de capacidad, cinco plantas por maceta. A los 8 DDT se realizó una fertilización (descrito anteriormente). Al cumplir 22 DDT, se cosecharon de las plantas madres los esquejes que servirían para la prueba de patogenicidad.

El material vegetal de *T. repens* con un tamaño aproximado de 8 cm se sometió a un proceso de lavado con una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 2 min, seguido por tres lavados con agua destilada. Seguidamente se sembraron tres esquejes por maceta (capacidad 2 L de suelo). Estas se fertilizaron (descrita anteriormente) a los 15 días después de la propagación (DDP).



**Figura 1.** Ensayo de patogenicidad de *Heterodera* sp. en plantas de *R. obtusifolius* (plantas del lado izquierdo) y *B. vulgaris* (plantas del lado derecho).

En lo correspondiente a las plantas de remolacha, se compró almácigo a la empresa Almatropic y se llevó al invernadero. El medio utilizado en todos los bioensayos consistió en una mezcla (relación 1:1) de suelo (50% arena, 33% limo y 17% arcilla) con sustrato Jiffy® TPS y la inoculación de las plantas se realizó el mismo día. Las plantas de *R. obtusifolius*, remolacha y *T. repens* tenían 22 DDT, 8 DDT y 45 DDP, respectivamente; la diferencia en las edades de las plantas fue debido principalmente al crecimiento de las plántulas, y con ello la emisión de las



raíces. El riego por goteo se instaló en las macetas 48 h después de la inoculación, con el fin de evitar lavado de los nematodos por causa del riego.

Las pruebas de patogenicidad se realizaron para evaluar las poblaciones CR1 procedentes de Llano Grande, Cartago (de marzo a junio de 2019) y CR4 de San Juan de Chicua, Cartago (de mayo a julio de 2020). Cada población se inoculó en los tres hospederos y se utilizaron 10 repeticiones por hospedero, las cuales se inocularon con 1000 unidades infectivas (UI) (huevos más nematodos J2). El inóculo empleado se obtuvo de las poblaciones CR1 y CR4 que se habían establecido en el invernadero. Para obtener el inóculo de cada población, se procesaron muestras de suelo por medio del método de Fenwick (descrito previamente), los quistes extraídos se colocaron en una placa contadora. Posteriormente, los quistes de cada población se rompieron para liberar los huevos y juveniles, la suspensión con nematodos se concentró mediante tamizado (criba de 100 sobre criba de 500 mesh) y se contaron tres alícuotas de la suspensión concentrada, los conteos se promediaron y se determinó el volumen requerido para inocular las UI mencionadas anteriormente. El inóculo se aplicó alrededor de cada planta. La fertilización se realizó a los 22 y 40 días después de su inoculación (DDI) con 100ml de solución que contenía 20 g de fertilizante 20-20-20. Las plantas permanecieron en el invernadero y el ensayo se evaluó a los 75 DDI.

De cada maceta se procedió a extraer el suelo y las raíces. Las raíces se lavaron con agua del tubo, se pesaron y se cortaron en trozos de aproximadamente 1 cm, y se procesó todo el sistema radical por el método de maceración y centrifugación en solución azucarada descrito previamente. El suelo de la maceta se homogenizó y

de cada repetición se procesó una muestra de 100 cc y otra de 200 cc por los métodos de centrifugación en solución azucarada y Fenwick, respectivamente (citados previamente), para cuantificación de nematodos (juveniles y quistes). Los resultados obtenidos de cada una de las muestras se extrapolaron al volumen total de la maceta, esto con el objetivo de determinar la densidad poblacional presente en el volumen total de suelo, a estos resultados se sumó el conteo obtenido de las muestras radicales, con el fin de determinar la población final en cada repetición. Por último, se calculó el factor de reproducción (FR) (Seifi *et al.* 2013),

$$\text{FR} = \text{población final} / \text{población inicial}$$

### III.E. Evaluación del ciclo de vida *Heterodera* sp.

Para la evaluación del ciclo de vida de las poblaciones CR1 y CR4 se desarrollaron plántulas (proceso descrito previamente) de cada uno de los hospederos (*R. obtusifolius* y *T. repens*). La inoculación se realizó con 2000 UI por planta (proceso descrito previamente). Transcurridos 8 DDI se realizó la primera evaluación y se continuó evaluando cada 8 días hasta completar el ciclo de vida del nematodo (hasta formación de quistes).

En cada evaluación se realizó tinción del sistema radical de al menos dos plantas las cuales se procesaron por separado siguiendo la metodología propuesta por Byrd *et al.* (1983) con algunas modificaciones. Las raíces se lavaron y se cortaron en trozos de aproximadamente 1 cm, se colocaron en un erlenmeyer de 500 ml, se agregó solución de hipoclorito de sodio al 10% de concentración hasta que las raíces quedaran totalmente sumergidas y se dejó por 4 min (se agitó

ocasionalmente). Posteriormente, las raíces se lavaron con abundante agua, se colocaron en un beaker, se agregó agua y se dejó por un período de 20 min (se agitó ocasionalmente). Después se removió el agua y se agregó nuevamente un volumen de 60 ml. Seguidamente, el beaker se colocó en una plantilla calentadora, en el beaker se agregó 1,5 ml de solución de tinción (1,5 g de fucsina ácida diluida en 100 ml de agua) y 1,5 ml de ácido glacial acético, se agitó y se esperó hasta que iniciará a hervir, a partir de este punto se cronometraron 45 s para retirar el beaker de la plantilla y se dejó enfriar a temperatura ambiental. Posteriormente, las raíces se lavaron para eliminar el exceso de tinte y se colocaron en un beaker que contenía solución aclarante (mezcla de glicerol, ácido acético y agua en proporciones de 1:1:1) para su revisión.

Las raíces teñidas se observaron al estereoscopio, los nematodos presentes se clasificaron según el estado de desarrollo, los segmentos radicales se cortaron y colaron en un portaobjetos cóncavo para su observación y fotografía al microscopio.

El volumen de raíz utilizado para la tinción varió según el hospedero, para *T. repens* se tiñó la totalidad de la raíz debido a que el volumen no superaba los 10 g, para *R. obtusifolius* se procesó todo el sistema radical, siempre y cuando este fuese menor o igual a 10 g, en caso contrario, se tomó una muestra de 10 g para realizar la tinción. Durante el período de ensayo se registró la temperatura ambiental y de suelo con el dispositivo Hobo data logger (PENDANT MX Temp) a un intervalo de 9 minutos entre registro.

## **IV- Resultados**

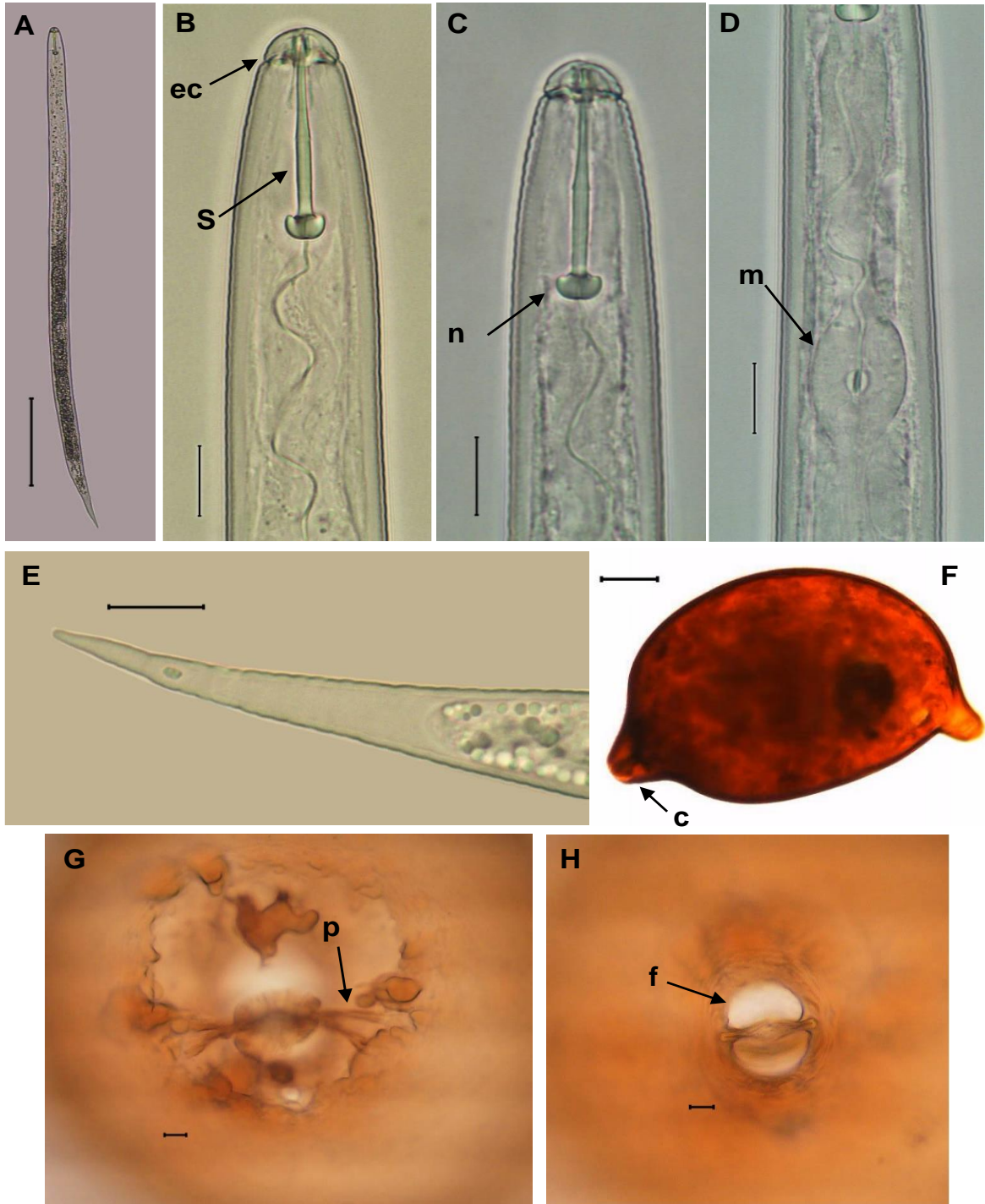
Se realizó la descripción morfológica de tres poblaciones, sin embargo, de la población con código CR5, se realizó una descripción de sólo juveniles, debido principalmente a que la cantidad de quistes recuperada fue baja. La caracterización molecular se realizó de las cinco poblaciones.

### **IV.A. Descripción morfológica**

La longitud promedio de los quistes fue variable (entre 728,5 y 760,1  $\mu\text{m}$ ), su coloración fue de café claro a café oscuro, con forma de ovalada y presencia de un cono vulval prominente en su parte posterior. El tipo de fenestra presente en el cono vulval fue ambifenestrado, con longitud promedio de vulva entre 50,9  $\mu\text{m}$  y 52  $\mu\text{m}$ , La longitud y el ancho promedio de fenestra osciló entre 49,9  $\mu\text{m}$  a 51,5  $\mu\text{m}$  y 34,6  $\mu\text{m}$  a 37,7 $\mu\text{m}$ , respectivamente (cuadro 2). El cono vulval presentaba un puente bien desarrollado y bifurcado al final (figura 2).

El segundo estado juvenil presentaba forma cilíndrica, con extremos disminuidos con respecto al resto del cuerpo. La longitud promedio del cuerpo presentó un rango entre 517,4  $\mu\text{m}$  y 551,2  $\mu\text{m}$ . La parte anterior o estructura cefálica es fuerte y se puede observar separada del resto del cuerpo. El estilete es fuerte (esclerotizado) de longitud promedio de 27,4  $\mu\text{m}$  a 28,4  $\mu\text{m}$ , con nódulos orientados hacia la parte anterior, la altura y diámetro promedio de los nódulos varió de 3,1  $\mu\text{m}$  a 3,4  $\mu\text{m}$  y de 5,3  $\mu\text{m}$  a 5,5  $\mu\text{m}$ , respectivamente. El esófago presenta un metacarpus y aparato valvular ovalado bien definidos, el lóbulo basal es largo y traslapa al intestino de forma ventral. La cola presentó una forma aguzada, de extremo muy delgado (figura

- 2), con longitud de la región hialina o translúcida entre 34,7  $\mu\text{m}$  y 38,9  $\mu\text{m}$  (cuadro 3). En ninguna de las muestras analizadas se detectaron especímenes machos de *Heterodera* sp.



**Figura 2.** *Heterodera trifolii*, A) cuerpo entero de nematodo J2, B) estilete (s) y estructura cefálica (ec), C) nódulos (n), D) metacarpus (m), E) cola, F) cono vulval (c), G) puente vulval bifurcado (p) y H) fenestración (f). Escalas: A y F= 100  $\mu\text{m}$ , B-E y G-H= 10  $\mu\text{m}$

**Cuadro 2.** Caracterización morfométrica de quistes de dos poblaciones de *Heterodera trifolii* identificadas en *R. obtusifolius* (HR) y *T. repens* (HT). Medidas se presentan en micras ( $\mu\text{m}$ ).

Caracter	HR		HT	
	Media $\pm$ DE*	Mín. – Máx.**	Media $\pm$ DE	Mín. – Máx.**
Número de muestras	10		10	
Longitud del quiste (excluyendo el cuello)	760,1 $\pm$ 66,4	656,6 – 837,4	728,5,5 $\pm$ 55,3	648,5 – 777,8
Diámetro del quiste	515,3 $\pm$ 67,7	445,5 – 621,1	476,5 $\pm$ 48,1	421,9 – 546,4
Ancho de la semifenestra	37,7 $\pm$ 4,2	32,3 – 45,7	34,6 $\pm$ 6,5	24,1 – 44,7
Longitud de la fenestra	49,9 $\pm$ 4,6	42,6 – 57,6	51,5 $\pm$ 8,0	40,3 – 61,3
Ancho vulvar	5,4 $\pm$ 0,4	5,0 – 6,4	5,8 $\pm$ 0,5	5,2 – 6,4
Longitud de la vulva	50,9 $\pm$ 3,5	44,0 – 56,1	52,0 $\pm$ 5,0	41,3 – 60,7
Longitud del puente vulvar	110,3 $\pm$ 13,7	85,5 – 137,2	103,3 $\pm$ 5,9	93,8 – 110,5
Ancho del puente vulvar	28,3 $\pm$ 5,9	21,6 – 35,4	29,4 $\pm$ 3,3	25,3 – 35,5

\*DE= Desviación estándar

\*\* Mín. – Máx.= Mínimo-Máximo

**Cuadro 3.** Caracterización morfométrica de nematodos en segundo estado juvenil de tres poblaciones de

*Heterodera trifolii*. Medidas se presentan en micras ( $\mu\text{m}$ ) y en formato de: promedio  $\pm$  desviación estándar (mínimo - máximo).

<b>Caracter</b>	<b>CR1</b>	<b>CR2</b>	<b>CR4</b>
Número de muestras	30	30	30
Longitud del cuerpo (L)	551,2 $\pm$ 28,8 (498 - 604,9)	517,4 $\pm$ 14,9 (492,8 - 545,6)	531,1 $\pm$ 17,2 (492,5 - 564,2)
Longitud del estilete (S)	28,4 $\pm$ 0,8 (26,6 - 29,5)	27,5 $\pm$ 0,8 (26,5 - 29,6)	27,4 $\pm$ 0,7 (26,2 - 29,6)
Altura de nódulos del estilete	3,4 $\pm$ 0,2 (3 - 3,7)	3,1 $\pm$ 0,2 (2,7 - 3,4)	3,3 $\pm$ 0,2 (2,8 - 3,6)
Diámetro de nódulos del estilete	5,5 $\pm$ 0,3 (5 - 6,2)	5,4 $\pm$ 0,2 (5 - 5,8)	5,3 $\pm$ 0,2 (1,8 - 5,6)
Cono del estilete	13,6 $\pm$ 0,7 (11,7 - 14,5)	13,2 $\pm$ 0,7 (11,7 - 15,8)	13,1 $\pm$ 0,8 (11,1 - 14,9)
Columna del estilete	11,4 $\pm$ 0,4 (10,4 - 12,2)	11 $\pm$ 0,5 (10,2 - 11,8)	11,2 $\pm$ 0,4 (10,4 - 12,2)
Altura región labial	4,6 $\pm$ 0,3 (4,1 - 5,2)	4,4 $\pm$ 0,2 (4 - 4,8)	4,7 $\pm$ 0,2 (4,2 - 5,1)



**Continuación (Cuadro 3).**

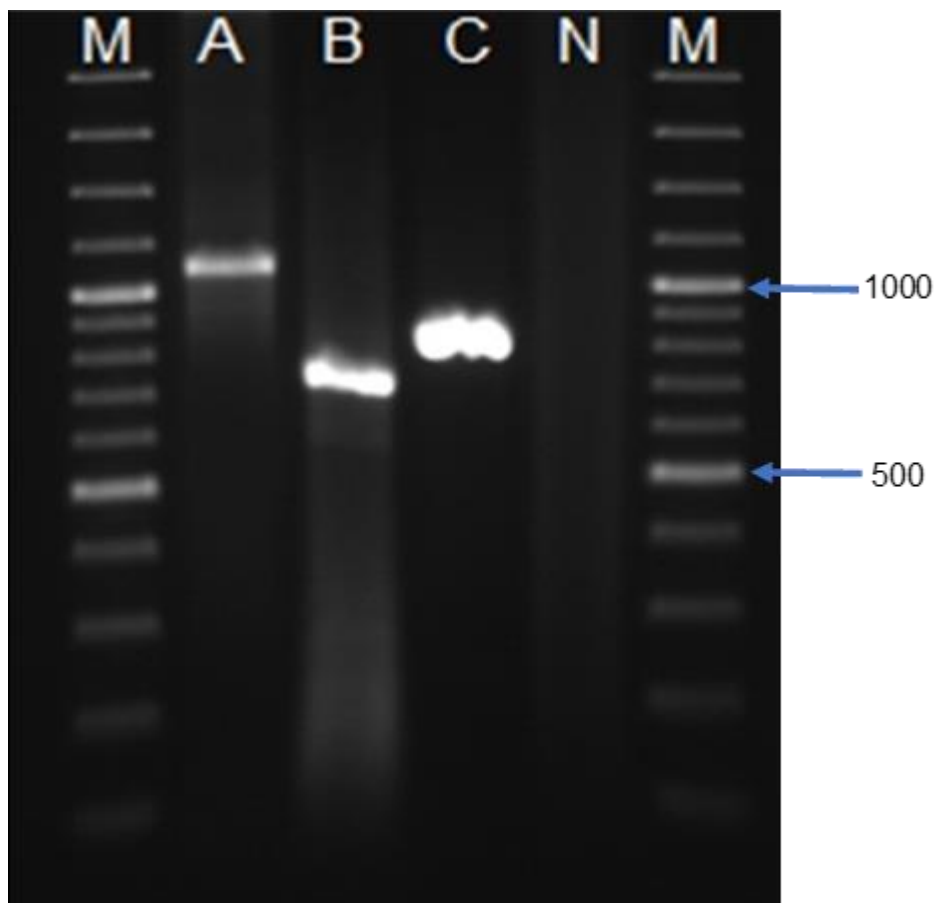
<b>Caracter</b>	<b>CR1</b>	<b>CR2</b>	<b>CR4</b>
Diámetro región labial	9,5 ± 0,3 (8,9 - 10,2)	8,8 ± 0,3 (8,3 - 9,5)	9,3 ± 0,4 (8,5 - 10,4)
Orificio de la Glándula Dorsal Esofágica	5,9 ± 0,4 (5,2 - 6,8)	6,1 ± 0,6 (4,8 - 7,2)	5,9 ± 0,7 (5 - 7,3)
Parte anterior hasta poro excretor	120,7 ± 6,3 (111,9 - 133,6)	116,4 ± 3,9 (109,1 - 125)	121,4 ± 6,6 (106,4 - 142,5)
Parte anterior hasta aparato valvular	81,7 ± 4,6 (74,4 - 91,5)	77,4 ± 4,7 (62,2 - 84,1)	80,3 ± 5,2 (67,3 - 89,8)
Diámetro a mitad del cuerpo (W)	24,1 ± 1,6 (21,7 - 27,3)	20,7 ± 0,5 (19,9 - 21,7)	21,7 ± 0,6 (20,5 - 23,2)
Diámetro a nivel de ano (Da)	14,9 ± 0,5 (13,8-15,7)	14 ± 0,7 (11,5 - 15,1)	14,6 ± 0,5 (13,3 - 15,5)
Región hialina (H)	38,9 ± 2,7 (35,1 - 44,5)	34,7 ± 2,4 (28,7 - 39,4)	35,3 ± 3,6 (27,7 - 42,3)
Longitud de la cola (Lc)	69,6 ± 4,1 (61,9 - 76,8)	62,6 ± 3,4 (54 - 68,4)	63,3 ± 2,9 (55,9 - 68,3)
Diámetro metacarpus	14,8 ± 1,5 (13,1 - 19,6)	11,5 ± 0,5 (10,5 -12,6)	13,9 ± 1,1 (11,9 - 16,7)
Longitud Metacarpus	18,9 ± 1,3 (16,6 - 21,5)	18,5 ± 1,5 (16 - 21,8)	17,4 ± 1,7 (14,8 - 21,7)

**Continuación (Cuadro 3).**

<b>Caracter</b>	<b>CR1</b>	<b>CR2</b>	<b>CR4</b>
a (L/W)	23 ± 1,4 (19,7 - 26)	25 ± 0,7 (23,6 - 26,9)	24,5 ± 1 (23,1 - 26,7)
c (L/Lc)	7,9 ± 0,7 (6,6 - 9,1)	8,3 ± 0,5 (7,4 - 9,5)	8,4 ± ,5 (7,2 - 9,6)
c' (Lc/Da)	4,6 ± 0,3 (3,8 - 5,1)	4,5 ± 0,23 (4 - 5,1)	4,4 ± 0,2 (3,9 - 4,7)
H/S	1,4 ± 0,1 (1,2 - 1,6)	1,3 ± 0,1 (1,1 - 1,5)	1,3 ± 0,1 (1 - 1,5)
Lc/H	1,8 ± 0,2 (1,5 - 2,2)	1,81 ± 0,1 (1,5-2)	1,8 ± 0,3 (1,3 - 2,4)

#### IV.B. Caracterización molecular y análisis filogenético

La amplificación de la región *ITS* ADNr, segmentos de expansión D2-D3 del gen *28S* ADNr y del gen *cox1* generaron una sola banda de aproximadamente 1000, 750 y 900 pb, respectivamente (figura 3).



**Figura 3.** Amplificación de producto de PCR; A) región *ITS*, B) segmentos de expansión D2-D3 del gen *28S* y gen parcial *cox1*. N= control negativo. M= marcador de peso molecular 100 pb (Thermo Scientific).

#### IV.B.1. Región ITS

El total de secuencias generadas por población fueron de 14 secuencias para las poblaciones CR1 y CR4, 11 secuencias para CR2, 10 secuencias para CR3 y 12 secuencias para CR5 (cuadro 4). En el caso de las secuencias de las poblaciones CR1 y CR4, se obtuvo un total de 10 haplotipos; las secuencias códigos CR1.10 y CR4.10, cada una representan cinco secuencias que correspondían a un mismo haplotipo. Mientras que para la población CR2, se obtuvieron seis haplotipos; la secuencia código CR2.1 representa cinco secuencias y CR2.5 representa dos secuencias. En tanto para la población CR3 se presentaron 3 haplotipos, donde CR3.1 representa ocho secuencias, y CR3.2 y CR3.3 una secuencia cada una. En el caso de CR5, se presentaron tres haplotipos; CR5.1 representa seis secuencias, y CR5.2 y CR5.3 representan tres secuencias cada una.

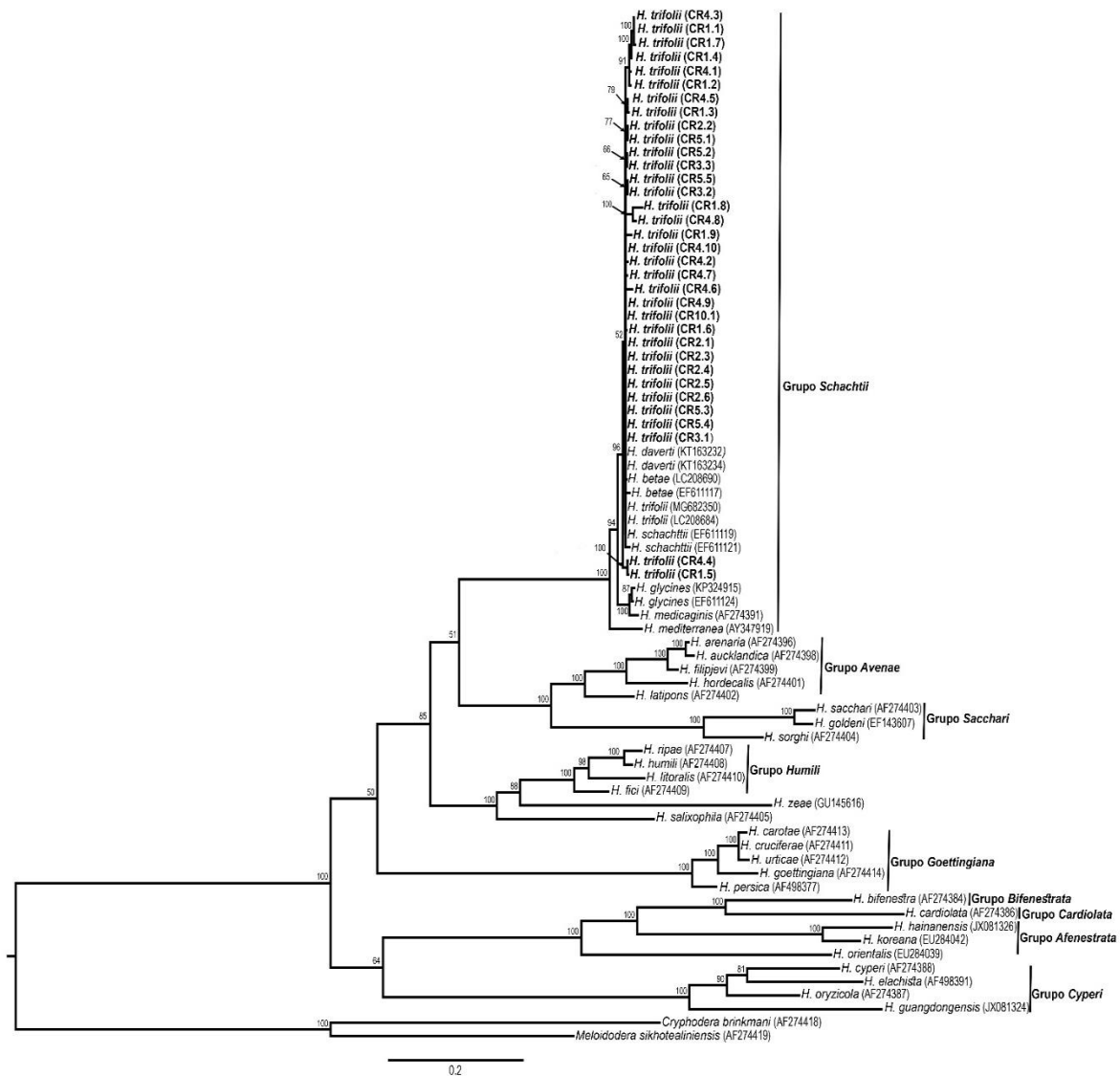
**Cuadro 4.** Número de secuencias por población de *Heterodera trifolii* caracterizada por medio de tres marcadores moleculares.

Población	Morfología	Región caracterizada		
		<i>ITS</i>	<i>28S</i>	<i>cox1</i>
CR1	✓	14	10	11
CR2	✓	11	12	18
CR3	X	10	11	13
CR4	✓	14	13	10
CR5	X	12	11	12

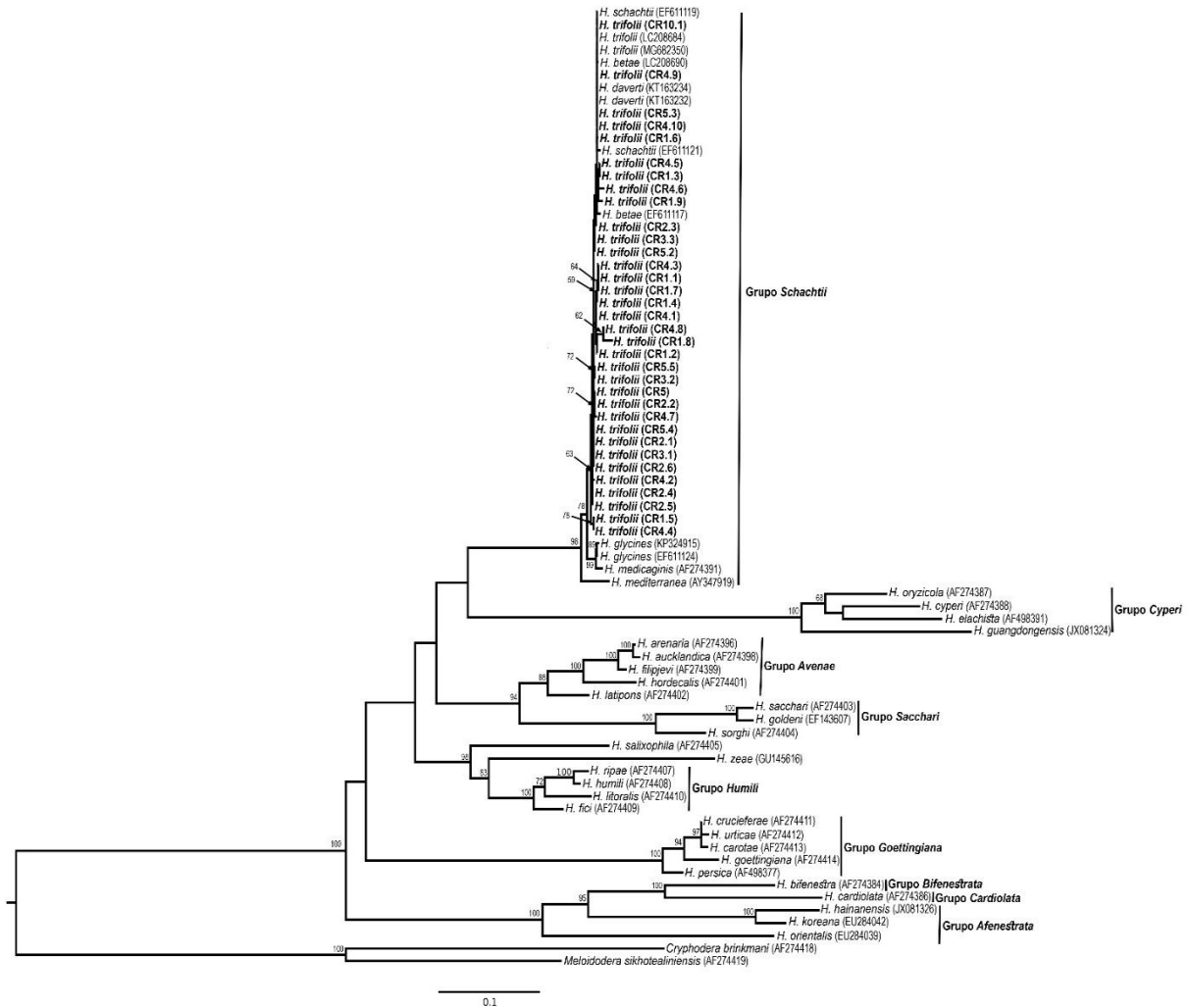
✓ = descrito, X =no descrito

El alineamiento de secuencias de la región *ITS* albergó un total de 76 secuencias, entre estas, una secuencia de *Cryphodera brinkmani* y *Meloidodera sikhotealiniensis*, utilizadas como grupo externo (Sekimoto *et al.* 2017a y 2017b). La variabilidad intraespecífica de *H. trifolii* de las generadas en esta investigación estuvo entre de 0 % a 2% (0 a 19 pb). Mientras que la variabilidad interespecífica entre *H. trifolii* y *H. betae* estuvo en un rango de 0,1% a 2% (1 a 19 pb), entre *H. trifolii* y *H. daverti* osciló entre 1% y 1,6% (1 a 16 pb), entre *H. trifolii* y *H. glycines* fue de 1,4% a 2,4% (13 a 23 pb) y *H. trifolii* y *H. schachtii* estuvo entre 0,1% a 1,9% (1 a 18 pb).

Tanto el análisis de Inferencia Bayesiana como el de Máxima Verosimilitud agruparon las secuencias generadas en este estudio dentro del complejo *Schachtii* con un valor de PP y VB de 100 en los dos casos. Sin embargo, el análisis filogenético no presentó buena resolución para separar entre las especies del grupo *Schachtii* (figura 4 y 5).



**Figura 4.** Análisis filogenético entre especies de *Heterodera* de la región ITS, utilizando el método de Inferencia Bayesiana y el modelo GTR + I + G como el mejor modelo evolutivo. Las probabilidades posteriores superiores al 50% son considerados como grupos apropiados. Las secuencias generadas en este estudio se presentan en letra negra.



**Figura 5.** Análisis filogenético entre especies de *Heterodera* de la región ITS, utilizando el método de Máxima Verosimilitud y el modelo GTR + I + G como el mejor modelo evolutivo. La ausencia de un valor manifiesta la ausencia de ese nodo, o valores “Bootstrap” menores de 50 en un enfoque de construcción de árbol en particular. Las secuencias generadas en este estudio se presentan en letra negra.

#### IV.B.2. Región D2-D3 del gen 28S

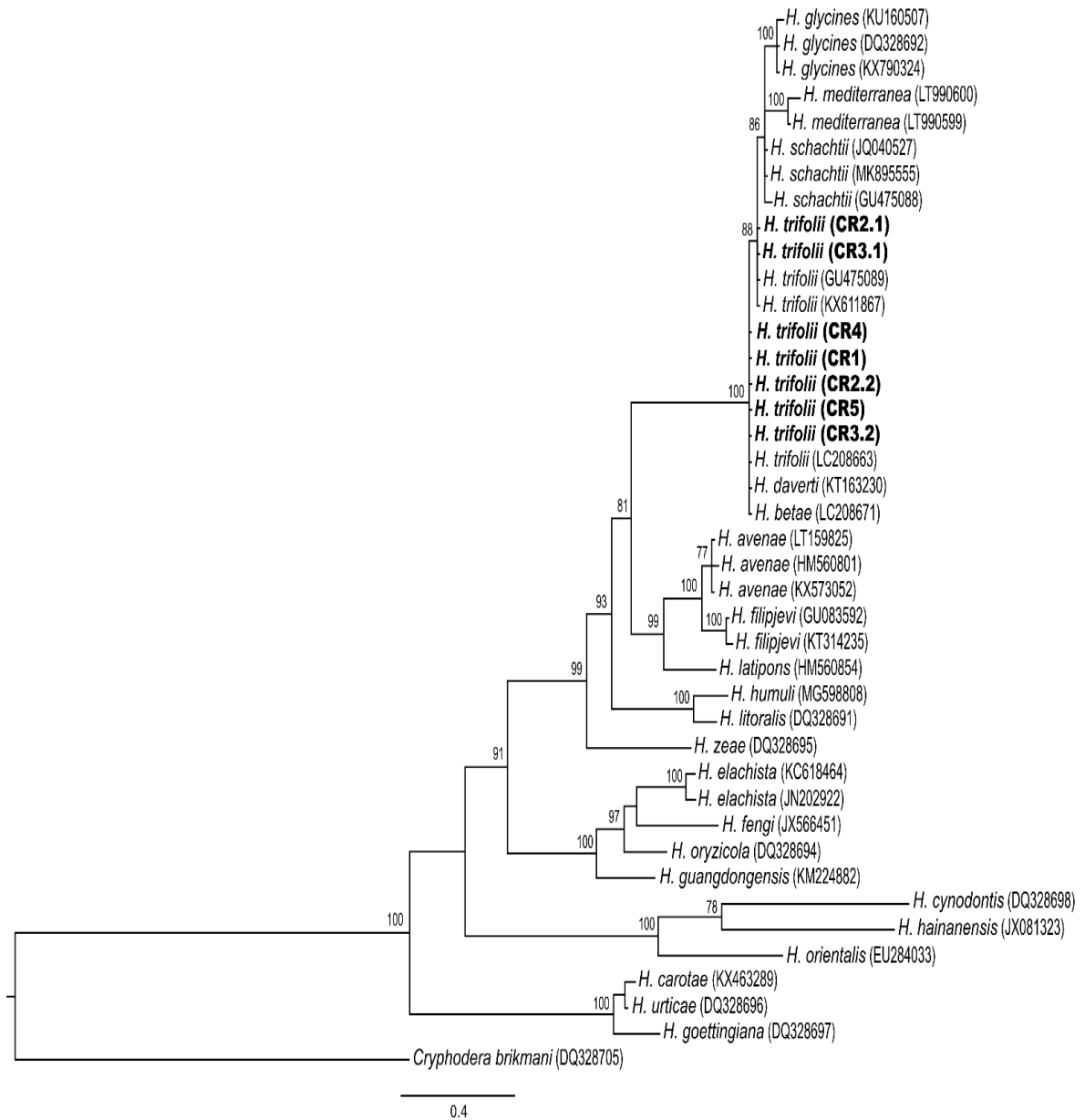
Se generaron un total de 57 secuencias de la región D2-D3 del gen 28S; 10, 12, 11, 13 y 11 para las poblaciones CR1, CR2, CR3, CR4 y CR5 respectivamente



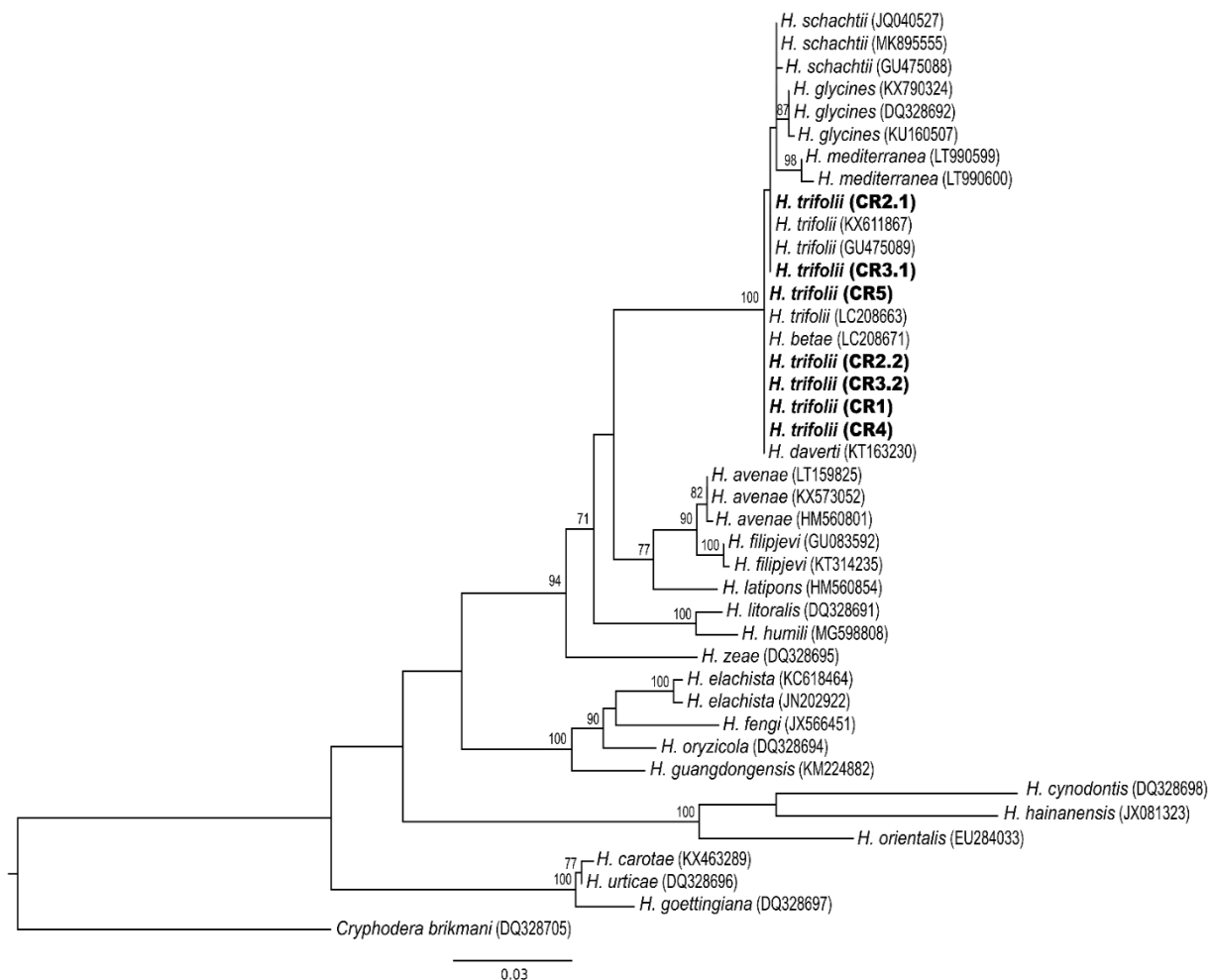
(cuadro 4). Las secuencias generadas en este estudio presentaron un tamaño comprendido entre 720 y 731 pb, estas se cortaron a un tamaño de 632 pb para analizarlas con las secuencias de *Heterodera* spp. descargadas del GenBank. Las secuencias de las poblaciones CR1, CR4 y CR5 no presentaron diferencias entre sí. En lo que corresponde a las secuencias de la población CR2, se presentaron dos haplotipos, la secuencia CR2.1 representa nueve secuencias, y CR2.2 representa tres secuencias. Las secuencias de la población CR3 presentaron dos haplotipos, donde las secuencias códigos CR3.1 y CR3.2 representan siete y cuatro secuencias, respectivamente. Adicionalmente, las secuencias código CR2.2 y CR3.2 son idénticas a las secuencias de las poblaciones CR1, CR4 y CR5.

La variabilidad intraespecífica de las secuencias obtenidas en este estudio y otras secuencias de *H. trifolii* descargadas del GenBank fue de 0,2% (1 pb). La variación interespecífica entre *H. trifolii* y *H. betae* fue de 0,2% (1 pb), entre *H. trifolii* y *H. daverti* fue de 0,2% (1 pb), entre *H. trifolii* y *H. glycines* fue de 0,46% a 0,76% (3 a 5 pb) y *H. trifolii* y *H. schachtii* fue de 0,15% y 0,5% (1 a 3 pb).

El análisis filogenético tanto con el método Bayesiano como el de Máxima Verosimilitud se utilizó el grupo externo *Cryphodera brikmani* (Sekimoto *et al.* 2017a y 2017b). Las secuencias de este estudio se agruparon dentro del complejo *Schachtii*, con un valor de PP y de VB de 100 en ambos casos. Además, el análisis de las secuencias del 28S permitió separar entre algunas especies pertenecientes a dicho complejo, como ejemplo se pueden citar *H. glycines* y *H. schachtii*. No obstante, *H. trifolii* no fue posible separar de especies como *H. betae* y *H. daverti* (figuras 6 y 7).



**Figura 6.** Análisis filogenético entre especies de *Heterodera* de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S, utilizando el método de Inferencia Bayesiana y el modelo GTR + I + G como el mejor modelo evolutivo. Las probabilidades posteriores superiores al 50% son considerados como grupos apropiados. Las secuencias generadas en este estudio se presentan en letra negra.



**Figura 7.** Análisis filogenético entre especies de *Heterodera* de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S, utilizando el método de Máxima Verosimilitud y el modelo GTR + I + G como el mejor modelo evolutivo. La ausencia de un valor manifiesta la ausencia de ese nodo, o valores “Bootstrap” menores de 50 en un enfoque de construcción de árbol en particular. Las secuencias generadas en este estudio se presentan en letra negra.

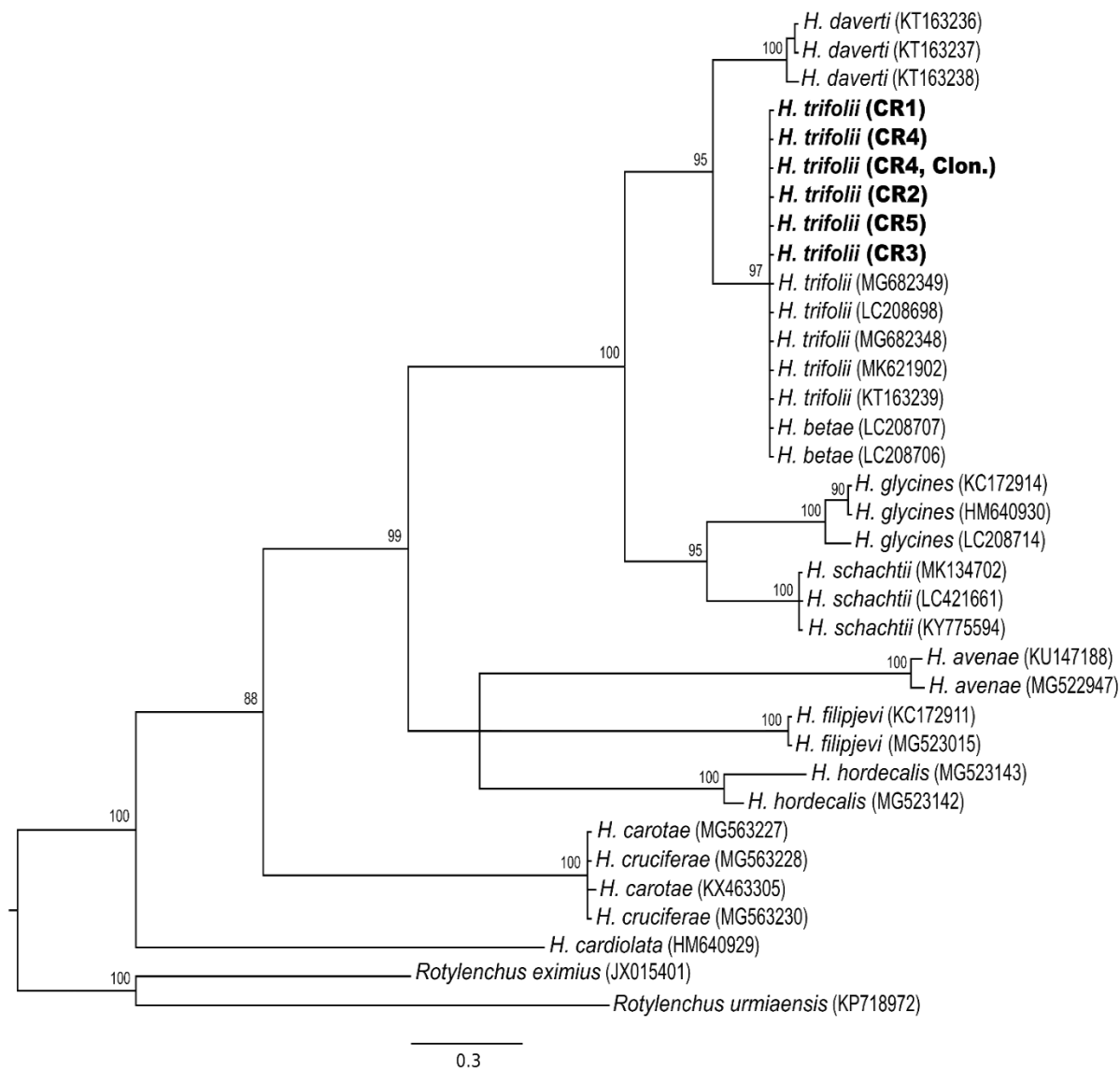
#### IV.B.3. Porción del gen *cox1* del ADNmt

El electroferograma de las secuencias obtenidas de la clonación (en total 18) presentaron picos bien definidos. Las secuencias tenían un tamaño de 833 pb (excluyendo los imprimadores) y representaron un solo haplotipo (codificado como CR4. Clon.). El análisis Blast de esta secuencia generó un 100% de identidad con *H. trifolii* (accesiones MK093157, MK093158, MK093173 y MK093174), todo esto permitió corroborar la validez de los imprimadores diseñados en este estudio.

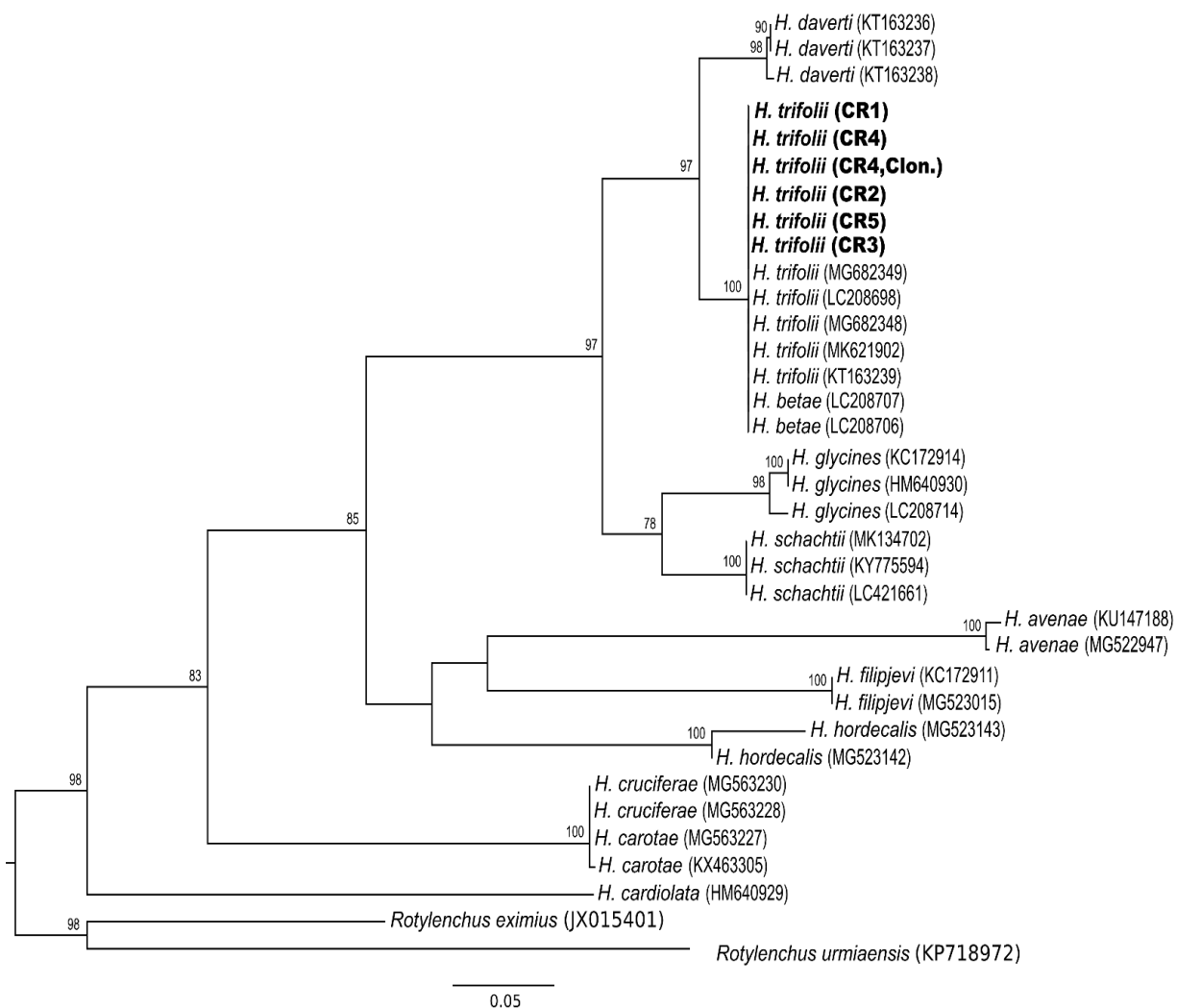
Mediante secuenciación directa se obtuvieron 11, 18, 13, 10 y 12 secuencias de las poblaciones codificadas como CR1, CR2, CR3, CR4 y CR5, respectivamente. En general, las secuencias obtenidas mediante clonación y de forma directa fueron más grandes, esto en comparación con la mayoría de las secuencias que se encuentran disponibles GenBank, razón por la cual se procedió a cortar a un tamaño de 391 pb. Las secuencias CR1, CR2, CR3, CR4, CR4. Clon. y CR5 no presentaron diferencias entre ellas, es decir, representaron un solo haplotipo. De este modo, el análisis Blast de estas secuencias, arrojó un porcentaje de cobertura e identidad de 100% con *H. trifolii* (accesiones KT163239, MG682348, MG682349, MK621902, MK324904 y LC208698)

El análisis filogenético con el método bayesiano y de Máxima Verosimilitud agruparon las secuencias generadas en este estudio dentro del complejo *Schachtii* con un valor PP y de VP de 100 y 97, respectivamente. Además, permitió separar con mayor claridad entre especies emparentadas dentro del mismo complejo, esto a excepción de *H. betae*, especie que se agrupó dentro del mismo clado de *H. trifolii* (figuras 8 y 9). La variabilidad interespecífica entre *H. trifolii* y *H. daverti* fue de 4,6%

(18 pb), entre *H. trifolii* y *H. glycines* estuvo entre 8,9 a 9,5% (35 a 37 bp) y entre *H. trifolii* y *H. schachtii* fue de 8,9% (35 pb).



**Figura 8.** Análisis filogenético entre especies de *Heterodera* del gen *cox1*, utilizando el método de Inferencia Bayesiana y el modelo GTR + I + G como el mejor modelo evolutivo. Probabilidades posteriores superiores al 70% son considerados como grupos apropiados. Las secuencias generadas en este estudio se presentan en letra negra.



**Figura 9.** Análisis filogenético entre especies de *Heterodera* del gen *cox1*, utilizando el método de Máxima Verosimilitud y el modelo GTR + I + G como el mejor modelo evolutivo. La ausencia de un valor manifiesta la ausencia de ese nodo, o valores “Bootstrap” menores de 50 en un enfoque de construcción de árbol en particular. Las secuencias generadas en este estudio se presentan en letra negra.

#### **IV.C. Patogenicidad**

Se realizaron dos ensayos para evaluar la patogenicidad de las poblaciones CR1 y CR4 (una población por ensayo), en los que se utilizó *R. obtusifolius*, *T. repens* y remolacha como hospederos, y se utilizaron 10 repeticiones por hospedero. El sistema radical de las plantas de *R. obtusifolius* y *T. repens* presentaban hembras adheridas, situación que contrastó con las plantas de remolacha, ya que en estas no se observaron. Este hecho se presentó de igual forma en cada evaluación de patogenicidad.

Las plantas de remolacha no fueron parasitadas (FR=0) por *H. trifolii*. Mientras que el factor de reproducción de las dos poblaciones inoculadas en los hospederos *R. obtusifolius* y *T. repens* varió. La población CR1 parasitó de forma satisfactoria a *R. obtusifolius* (FR=17,4), sin embargo, su capacidad de reproducción en *T. repens* fue 5,5 veces menor. Mientras que la población CR4 presentó un factor de reproducción mayor a 1 en *T. repens* (FR=4,8), pero aproximadamente 6,4 veces menor en *R. obtusifolius* (cuadro 5).

**Cuadro 5.** Población final (Pf) y factor de reproducción (FR) de dos poblaciones de *Heterodera trifolii* en tres hospederos. San José, Costa Rica. 2019-2020.

Población	Remolacha		<i>T. repens</i>		<i>R. obtusifolius</i>	
	Pf	FR	Pf	FR	Pf	FR
CR1	0	0	3.147	3,14	17.452	17,4
CR4	0	0	4.801	4,8	753	0,75

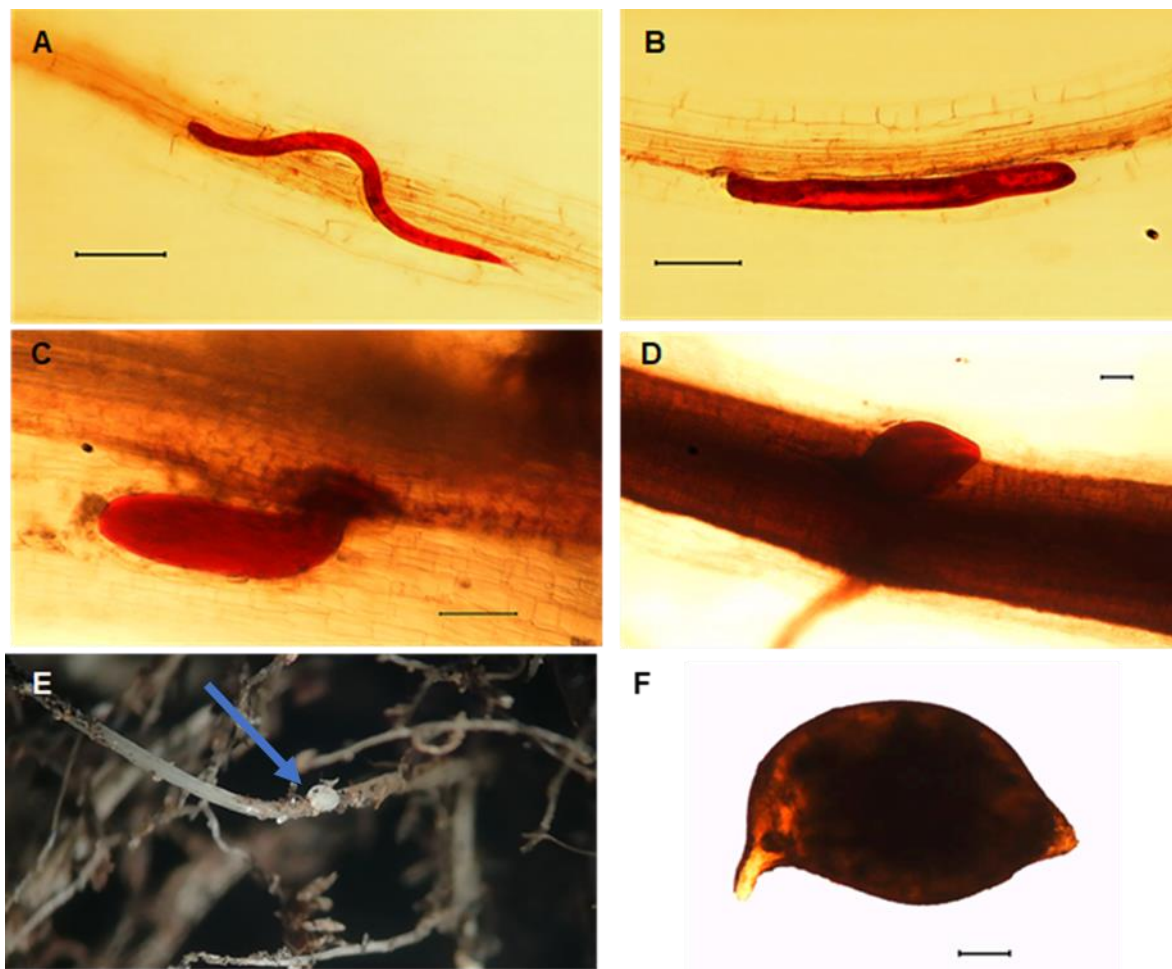
Población inicial de 1000 unidades infectivas.

#### **IV.D. Ciclo de vida**

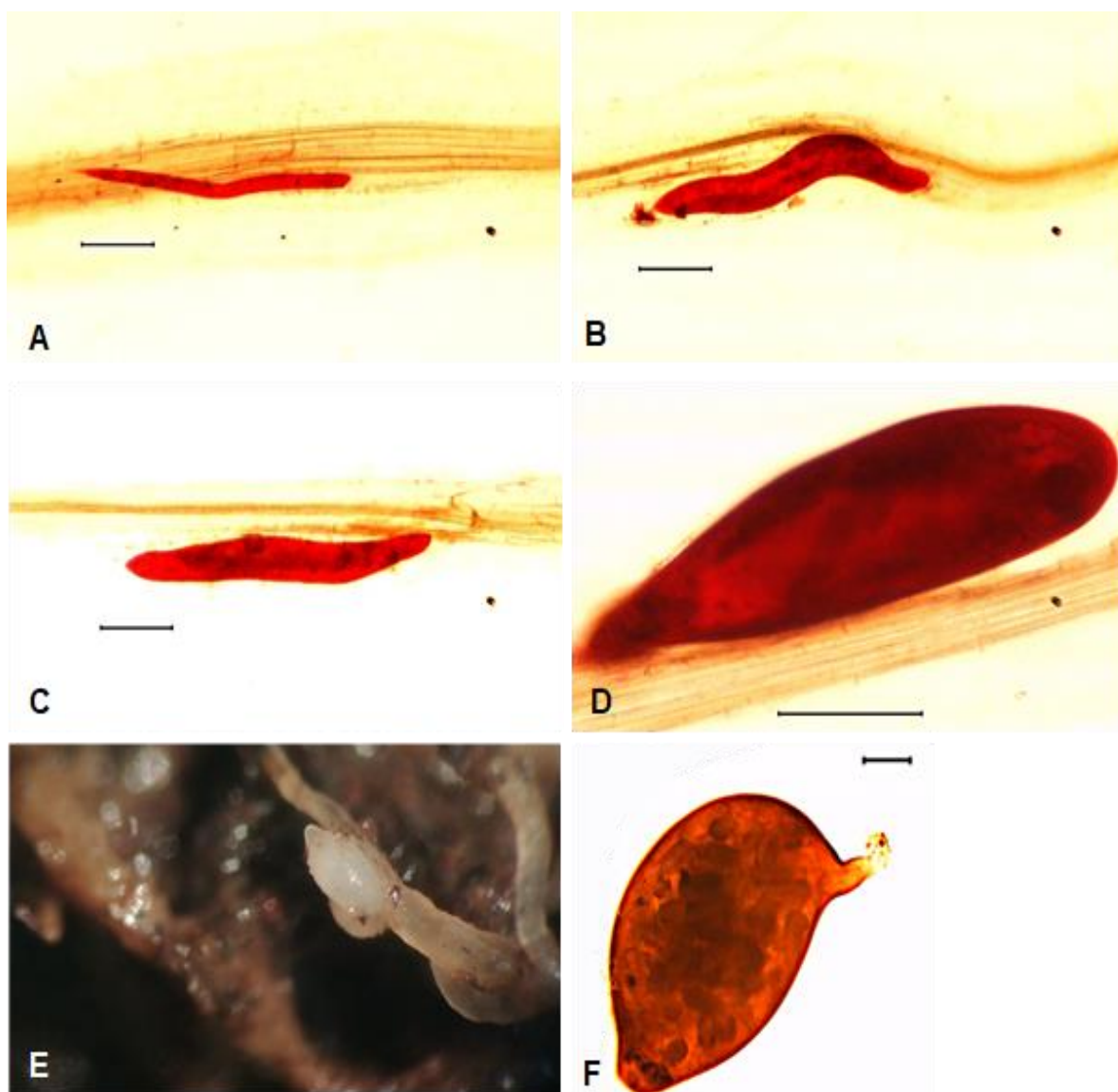
Se utilizaron las poblaciones CR1 y CR4 para estudiar el ciclo de vida en los hospederos *R. obtusifolius* y *T. repens*, respectivamente. En la primera evaluación a los 8 DDI, tanto para CR1 como para CR4 se observaron nematodos en segundo estado juvenil (J2) y nematodos en tercer estado juvenil (J3), en este período la temperatura promedio fue de 20,7°C y 21,1°C, respectivamente. El estado de desarrollo del cuarto estado juvenil (J4) en ambas poblaciones se detectó a los 15 DDI, en la misma evaluación también se observaron nematodos J2 y J3, la temperatura promedio para este tiempo fue de 21,4°C para CR1 y de 20,7°C para CR4. A los 21DDI se observó la primera hembra viva expuesta sobre la raíz, al mismo tiempo se observaron nematodos J2 y J3, en ese la temperatura promedio fue de 21,3°C para CR1 y de 20,5°C para CR4. En la población CR1 se observó el primer quiste (figura 10) a los 35DDI, con temperatura promedio de 21,1°C, mientras



que en CR1, el quiste (figura 11) se observó a los 43 DDI, con temperatura promedio de 20,8°C, en ambos casos, también se observaron nematodos J2, J3 y J4.



**Figura 10.** Descripción del ciclo de vida de *Heterodera trifolii*, en *R. obtusifolius* A) nematodo J2 (8 DDI), B) nematodo J3 (8 DDI), C) nematodo J4 (15 DDI), D) hembra inmadura (21 DDI), E) hembra viva sobre la raíz (21 DDI) y F) quiste (35 DDI). Escalas 100  $\mu$ m.



**Figura 11.** Descripción del ciclo de vida de *Heterodera trifolii* en *T. repens* A) nematodo J2 (8 DDI), B y C) nematodo J3 (8 DDI), D) nematodo J4 (15 DDI), E) hembra viva (21DDI ) y F) quiste (43 DDI). Escalas 100  $\mu$ m.

## V. Discusión

### V.A. Descripción morfológica

Los caracteres morfológicos y morfométricos de quistes y J2 de las dos poblaciones de *H. trifolii* estuvieron dentro de los rangos reportados para *H. trifolii* en USA y UK (Hirschmann y Triantaphyllou 1979), Holanda (Wouts y Sturhan 1978, Maas *et al.* 1982), Japón (Sekimoto *et al.* 2017a) y China (Mwamula *et al.* 2018). El tipo de fenestración que presentó el cono vulval de *H. trifolii* fue ambifenestrado, aspecto que caracteriza a las especies que pertenecen al complejo *Schachtii* (Mulvey y Golden 1983) y que permite separar entre especies de otros complejos, como ejemplo de esto se pueden citar el complejo *Afenestrata*, el cual se caracteriza por un cono sin fenestra y por la ausencia de un puente vulval (Baldwing y Bell 1985) o en ocasiones presente, pero en forma débil (Subbotin *et al.* 2010a), el complejo *Avenae*, cuyos quistes se caracterizan por un cono vulval bifenestrado (Subbotin *et al.* 2018), el complejo *Goettingiana*, donde las especies pueden presentar dos tipos de fenestras; circunfenestra o bifenestra (Mulvey y Golden 1983), el complejo *Humili*, donde la mayoría de especies presentan un cono vulval bifenestrado, además, presentan un puente vulval muy débil (Subbotin *et al.* 1997) y el complejo *Sacchari*, en el cual, el cono vulval presenta una proyección en forma de dedo (Maafi *et al.* 2007).

Dentro del complejo *Schachtii*, un aspecto que permite separar entre especies, es la presencia o ausencia de machos. En esta investigación no se detectaron machos de *H. trifolii*, los resultados coinciden con los reportados por Mulvey y Golden (1983), Sekimoto *et al.* (2017a) y Mwamula *et al.* (2018). El nematodo *H. trifolii* es una especie que se reproduce por partenogénesis, característica que

explica la ausencia de especímenes machos (Mulvey 1958; Triantaphyllou y Hirschmann 1978), dicha condición permite separar de otras especies estrechamente relacionadas y que pertenecen al mismo complejo tales como *H. glycines*, *H. daverti* y *H. schachtii* ya que estas presentan machos (Mulvey 1958; Ambrogioni y Irdani 2001; Amiri *et al.* 2002; Vovlas *et al.* 2015). A nivel de segundos estados juveniles (J2), las especies citadas anteriormente presentan un número de caracteres reducidos que permiten diferenciarlas, entre estos se pueden mencionar la longitud del cuerpo, del estilete, de la cola y de la región hialina (Steele y Whitehand 1984; Ambrogioni y Irdani 2001).

Las poblaciones de *H. trifolii* caracterizadas en esta investigación se pueden diferenciar de *H. betae* porque presenta una menor longitud promedio de cuerpo (531,1  $\mu\text{m}$  - 551,2  $\mu\text{m}$  vs 584  $\mu\text{m}$  - 607  $\mu\text{m}$ ), estilete (27,4  $\mu\text{m}$  - 28,4  $\mu\text{m}$  vs 29,6  $\mu\text{m}$  - 31  $\mu\text{m}$ ), región hialina (35,3  $\mu\text{m}$  - 38,9  $\mu\text{m}$  vs 39  $\mu\text{m}$  - 42  $\mu\text{m}$ ) y cola (63,3  $\mu\text{m}$  - 69,6  $\mu\text{m}$  vs 71  $\mu\text{m}$  - 74  $\mu\text{m}$ ) (Subbotin *et al.* 2010b), de *H. daverti*, por una mayor longitud promedio de cuerpo (531,1  $\mu\text{m}$  - 552,2  $\mu\text{m}$  vs 457  $\mu\text{m}$  - 477  $\mu\text{m}$ ), estilete (27,4  $\mu\text{m}$  - 28,4  $\mu\text{m}$  vs 25  $\mu\text{m}$  - 26  $\mu\text{m}$ ) y cola (63,3  $\mu\text{m}$  - 69,6  $\mu\text{m}$  vs 54  $\mu\text{m}$  - 57  $\mu\text{m}$ ) (Subbotin *et al.* 2010b).

Los segundos estados juveniles de *H. trifolii* se diferencian de *H. glycines*, por una mayor longitud promedio de cuerpo (531,1  $\mu\text{m}$  - 552,2  $\mu\text{m}$  vs 385  $\mu\text{m}$  - 471  $\mu\text{m}$ ), estilete (27,4  $\mu\text{m}$  - 28,4  $\mu\text{m}$  vs 21,4  $\mu\text{m}$  - 24,5  $\mu\text{m}$ ) y región hialina (35,3  $\mu\text{m}$  - 38,9  $\mu\text{m}$  vs 22  $\mu\text{m}$  - 30  $\mu\text{m}$ ) (Subbotin *et al.* 2010b), y de *H. schachtii*, por una mayor longitud promedio de cuerpo (531,1  $\mu\text{m}$  - 552,2  $\mu\text{m}$  vs 436  $\mu\text{m}$  - 468  $\mu\text{m}$ ), estilete (27,4  $\mu\text{m}$  - 28,4  $\mu\text{m}$  vs 25,3  $\mu\text{m}$  - 26,3  $\mu\text{m}$ ) y región hialina (35,3  $\mu\text{m}$  - 38,9  $\mu\text{m}$  vs 24  $\mu\text{m}$  - 27  $\mu\text{m}$ ) (Subbotin *et al.* 2010b).

## V.B. Caracterización molecular

Como complemento al método morfológico, el análisis molecular es esencial para la descripción de especies con el fin de brindar una conclusión más precisa (Vovlas *et al.* 2015; Zamora *et al.* 2016). En nuestro estudio se presentó heterogeneidad en las secuencias *ITS* o presencia de varios haplotipos, esto se ha reportado en otros estudios de nematodos formadores de quistes como *H. schachtii* (Subbotin *et al.* 2000; Amiri *et al.* 2002), *H. zaeae* (Szalanski *et al.* 1997; Skantar *et al.* 2012), *G. pallida* y *G. rostochiensis* (Thiery *et al.* 1996) e incluso en otros géneros de nematodos fitoparásitos como *Meloidogyne* (Zijlstra *et al.* 1995, 1997) y *Belonolaimus* (Cherry *et al.* 1997). Una posible explicación de la heterogeneidad puede ser por la presencia múltiples copias distintas en su genoma (Powers *et al.* 1997; Madani *et al.* 2007).

El análisis de las secuencias *ITS* ADNr permitió separar entre los diferentes complejos, sin embargo, no permitió separar con claridad entre especies pertenecientes al complejo *Schachtii*, donde se encuentra *H. trifolii*, resultados reportados en otras investigaciones (Maafi *et al.* 2003; Vovlas *et al.* 2015; Cui *et al.* 2016; Sekimoto *et al.* 2017a). Además, los haplotipos se agruparon en diferentes clados, resultados similares se han encontrado en el caso de *H. schachtii* (Madani *et al.* 2007). De forma similar, en las secuencias del gen *28S*, donde se ha reportado variabilidad intraespecífica en formadores de quistes como *H. koreana* (Sekimoto *et al.* 2017b) y la incapacidad de separar con claridad entre especies cercanas (Madani *et al.* 2017; Sekimoto *et al.* 2017).

Los resultados del análisis de las secuencias *ITS* y región D2-D3 del gen *28S* no permitieron separar con claridad entre especies estrechamente relacionadas del grupo *Schachtii*, esto debido a su baja variabilidad (Sekimoto *et al.* 2017a; Mwamula *et al.* 2018). Se ha reportado que la región *ITS* es muy conservada y que su uso no es apropiado para separar poblaciones que pertenecen al mismo género. Mientras que las secuencias analizadas del gen *cox1* permitieron diferenciar con mayor claridad a *H. trifolii* de especies emparentadas, lo cual se debe a que los genes mitocondriales evolucionan más rápido que los genes ribosomales como el *ITS* (Subbotin *et al.* 2018). Sin embargo, no fue posible separar de *H. betae*, resultado que coincide con lo reportado por Sekimoto *et al.* (2017a). Esto demuestra la importancia de realizar una descripción taxonómica polifásica (Vovlas *et al.* 2015).

En nuestro estudio se pudo observar que el nematodo se encuentra presente en tres provincias del país, Alajuela, Cartago y San José, en particular en zonas donde la temperatura tiende a ser baja y, donde se siembran hortalizas y frutales de altura como lo es el cultivo de manzana.

#### V.C. Patogenicidad

En lo correspondiente a la prueba de patogenicidad, los resultados mostraron que las dos poblaciones de *H. trifolii* (CR1 y CR4) no se reprodujeron en las plantas de remolacha (FR=0), resultado que coincide con lo reportado por Mulvey (1959b). Mientras que en *R. obtusifolius* y *T. repens* se reprodujo, plantas que se han reportado como hospederos de este nematodo formador de quistes (Treonis *et al.* 2007; Subbotin *et al.* 2010b). Adicionalmente, la población CR1 se reprodujo 5,5

veces más en *R. obtusifolius* que en *T. repens*, mientras que la población CR4 se reprodujo 5,1 veces más en *T. repens* que en *R. obtusifolius*. Según lo indicado por Wang y Riggs (1999), estas diferencias en la capacidad reproductiva pueden ser debido a que los nematodos son capaces de adaptarse al hospedero y con ello, su capacidad de parasitar otros hospederos puede verse reducida.

No obstante, en Cartago, la presencia de *R. obtusifolius* o *T. repens* en zonas que se dedican a la producción de ornamentales como clavel (*Dianthus carhyophyllus*) puede representar un riesgo potencial como fuente de inóculo de *H. trifolii*, especie de nematodo que se reporta como una de las de mayor importancia para este cultivo, ocasionando retraso en el crecimiento y la floración, y amarillamiento del follaje (Marroquín y Arbelaez, 1991; Wolcan *et al.* 2018).

#### **V.D. Ciclo de vida**

En el ciclo de vida de las poblaciones CR1 y CR4, se observaron nematodos en diferentes estados de desarrollo en una misma muestra, resultados que se han reportado en otros estudios sobre el ciclo de vida de nematodos formadores de quistes como *G. rostochiensis* (Greco *et al.* 1988), *H. trifolii* (Mercer 1990), *G. pallida* (Ebrahimi *et al.* 2014) y *G. ellingtonae* (Phillips *et al.* 2017). Esto se debe a que el inóculo utilizado contenía mezcla de huevos y nematodos J2, ya que un quiste puede contener huevos en diferentes estados de desarrollo dependiendo de la edad del mismo (Tylka *et al.* 1993), de aquí que los estados vermiformes (J2) tenían la capacidad de iniciar el proceso de búsqueda de las raíces posterior a la inoculación, mientras que los huevos tenían que completar su desarrollo hasta nematodo J2, el

cual con ayuda de su estilete emerge del huevo e inicia a localizar las raíces para su posterior penetración (Mulvey 1959a).

Tanto en CR1 como en CR4, se observaron nematodos J2 y J3 a los 8DDI, en este tiempo la temperatura promedio del suelo fue de 20,7°C y 21,1°C, respectivamente. Ese período de tiempo es similar a lo reportado por Mulvey (1959a) en Canadá, donde a los 5-6 días después de la penetración se inició la segunda muda, la cual da origen al tercer estado larval, esto a una temperatura promedio de suelo de 15,5°C. También es similar a lo reportado por Mankau y Lindford (1960) en Nueva Zelanda, quienes observaron nematodos J3 entre los 4 y 6 días posteriores a la penetración, con una temperatura dentro del invernadero comprendida entre 21 y 27°C.

El estado J4 se observó a los 15 días después de la inoculación, tiempo en el que la temperatura promedio del suelo fue de 21,4°C y de 20,7°C para CR1 y CR4, respectivamente. Este resultado es similar con lo reportado por Mulvey (1959a) y Mankau y Lindford (1960), donde observaron nematodos J4 a los 13 y 14 días después de la penetración, respectivamente. La primera hembra sobre la raíz se observó a los 21 días después de la inoculación, con una temperatura promedio de 21,3°C para CR1 y de 20,5°C para CR4. Este resultado es similar a lo descrito por Mercer (1990), quién observó la primera hembra a los 19 días después de la penetración, con una temperatura promedio comprendida entre 18°C y 25°C.

El primer quiste se detectó a los 35 DDI en CR1 y 43 DDI en CR4, con temperatura promedio de suelo de 21,1°C y 20,8°C, respectivamente. Este



resultado difiere con lo reportado por Mercer (1990), quien observó presencia de quistes a los 26 días después de la penetración. También difiere con lo reportado por Mulvey (1959a), quien notó la presencia de quistes a los 64 días después de la penetración, con una temperatura promedio del suelo de 15,5°C. Este autor atribuyó a las condiciones de temperaturas bajas el hecho de que el ciclo de vida se alargara.

La temperatura es un factor importante en el desarrollo de los nematodos, ya que puede afectar parte o todo el ciclo de vida (Thomason y Fife 1962; Jones 1975). Además, la duración del ciclo puede variar entre diferentes sitios ya que los nematodos se pueden adaptar a las condiciones de temperatura locales que inciden en los procesos involucrados en su desarrollo dentro del hospedante, así como su capacidad de sobrevivir (Fournet *et al.* 2018).

## **VI. Conclusiones**

En este trabajo se reporta por primera vez la presencia de *H. trifolii* en las provincias de Alajuela, Cartago y San José, asociado a *R. obtusifolius* y *T. repens*, malezas que se encontraron en fincas donde se cultivan hortalizas como papa, repollo y otras, y árboles de frutales como manzana.

Se comprobó que *H. trifolii* no es un nematodo fitoparásito del cultivo de remolacha. Además, se corroboró la capacidad que tiene este nematodo de reproducirse en *R. obtusifolius* y *T. repens*.

Esta investigación generó un nuevo imprimador para la amplificación del gen parcial *cox1* del ADN mitocondrial que permite obtener mejores resultados del

nematodo *H. trifolii* y que, a su vez genera un tamaño de secuencia del doble (833 pb) en comparación a las secuencias para este mismo nematodo que se encuentran depositadas en el GenBank (391 pb).

Se corroboró la importancia de utilizar el enfoque morfológico de forma complementaria con el enfoque molecular en el proceso de descripción de especies que se encuentran estrechamente relacionadas.

## **VII. Recomendaciones**

Se recomienda evaluar la patogenicidad de *H. trifolii* incluyendo otros cultivos de importancia económica que se siembran en las zonas donde encontró el nematodo, como hortalizas como brócoli, coliflor, y plantas ornamentales como el cultivo de clavel (*Dianthus caryophyllus*), esto con el fin de ampliar la información sobre rango de hospederos en Costa Rica, y con ello determinar las medidas a seguir para esta especie de nematodo.

Se recomienda a los productores de papa el conteo e identificación de quistes en muestras de suelo, esto con el fin de contar con un mejor criterio para la toma de decisiones relacionadas con el manejo del cultivo, ya que en campo pueden presentarse otros nematodos formadores de quistes como lo es *H. trifolii*, especie que no afecta al cultivo de papa y cuyos nematodos J2 no pueden diferenciarse de *G. pallida* (principal nematodo que afecta el cultivo de papa) en caso que se solicite análisis de formas móviles en muestras de suelo.

En el diagnóstico de laboratorio para la identificación de especies del género *Heterodera*, se recomienda utilizar el marcador molecular del gen parcial *cox1*, ya que es un marcador que permite obtener una separación entre especies con un alto grado de precisión.

Considerando la presencia de *H. trifolii* en las provincias de Alajuela, Cartago y San José y con el objetivo de evitar experiencias como la de *G. pallida* en Costa Rica, se recomienda continuar con el muestreo de nematodos y ampliarlo a otras partes de Costa Rica, de modo tal que permita aumentar la información concerniente a especies dentro de este grupo de nematodos y evaluar las variabilidades que se puedan presentar entre las mismas.

### **VIII. Literatura citada**

Abd-Elgawad, M. 2013. Phytonematodes damage, economic threshold and management with special reference to Egypt. Egyptian Journal of Agronomy 12: 159-176.

- Abdollahi, M. 2008. Morphology and morphometrics of *Heterodera filipjevi* (Madzhidov, 1981) Steller, 1984 from Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad Province, Iran. Pakistan Journal of Biological Sciences 11(14): 1684-1687.
- Acharya, K. 2016. Distribution and characterization of the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines* (HG) types in South Dakota. Thesis for Master of Science, South Dakota State University, USA.
- Ahmadi A., Tanha, Z. 2014. Incidence of cereal cyst nematodes (*Heterodera avenae* type B and *H. filipjevi*) in southwestern Iran. Journal of Crop Protection 3: 75-88.
- Alenda, C., Montarry, J., Grenier, E. 2014. Human influence on the dispersal and genetic structure of French *Globodera tabacum* populations. Infection, Genetics and Evolution 27: 309-317.
- Ali M.A., Wieczorek K., Kreil D.P., Bohlmann H. 2014. The beet cyst nematode *Heterodera schachtii* modulates the expression of WRKY transcription factors in syncytia to favour its development in Arabidopsis Roots. PLoS ONE 9(7): 1-17.
- Ambrogioni, L., Irdani, T. 2001. Identification of *Heterodera schachtii* group species in Italy by morphometrics and RAPD-PCR. Nematología Mediterranea 29: 159-168.

- Amiri, S., Subbotin, S., Moens, M. 2002. Identification of the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* by PCR. *European Journal of Plant Pathology* 108: 497-506.
- Bazinet, A., Zwickl, D., Cummings, M. 2014. A gateway for phylogenetic analysis powered by grid computing featuring GARLI 2.0. *Systematic Biology* 63(5): 812–818.
- Baldwin, J., Bell, A. 1985. *Cactodera eremica* n. sp., *Afenestrata africana* (Luc *et al.*, 1973) n. gen., n. comb., and an emended diagnosis of *Sarisodera* Wouts and Sher, 1971 (Heteroderidae). *Journal of Nematology* 17: 187–201.
- Bernard, E., Handoo, Z., Powers, T., Donald, P., Heinz, R. 2010. *Vittatidera zeapahila* (Nematoda: Hoplolaimidae), a new genus and species of cyst nematode parasitic on corn (*Zea mays*). *Journal of Nematology* 42(2): 139-150.
- Bridge, J., Starr, L. 2007. *Plant nematodes of agricultural importance: a color handbook*. Manson Publishing, London, UK.
- Byrd, D., Kirkpatrick, T., Barker, K. 1983. An improve technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology* 15: 142-143.
- Caveness, F., Jensen, H. 1955. Modification of the centrifugal flotation for the isolation and concentration of nematodes and their eggs from soil plant tissue. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 22: 87-89.

- Cid Del Prado, I., Subbotin, S. 2014. A new cyst nematode, *Cactodera torreyanae* sp. n. (Tylenchida: Hoplolaimidae), parasiting romerito, *Suaeda torreyana*, in Texcoco, Mexico. *Nematology* 16: 163-174.
- Cherry, T., Szalanski, A., Todd, T., Powers, T. 1997. The internal transcribed spacer region of *Belonolaimus* (Nemata: Belonolaimidae). *Journal of Nematology* 29:23-29.
- Cui, J., Erginbas, G., Peng, H., Huang, W., Liu, S., Qiao, F., Elekcioglu, I., Imren, M., Dababat, A., Peng, D. 2016. First report of sugar beet nematode, *Heterodera schachtii* Schmidt, 1871 (Nemata: Heteroderidae) in sugar beet growing areas of Sanliurfa, Turkey. *Turkish Journal of Entomology* 40 (3): 303-314.
- Curto, G. 2008. Sustainable methods for management of cyst nematodes. *In: Ciancio, A., Mukerji, K (eds.). Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes.* Springer, Berlin, pp. 221–237.
- Darriba, D; Taboada, GL; Doallo, R; Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8):772-772
- Dawabah, A., Al-Hazmi, A., Al-Rehiayani, S., Abdel-Mawgood, A., Motawei, M., Al-Otayk, S., Sadder, M., Elgorban, A., Migdadi, H., Moustafa, K., Al-Doss, A. 2012. Morphological and molecular characterization of cereal cyst nematode (*Heterodera avenae*) populations form arid environments. *Australian Journal of Crop Sciense* 6(6): 970-979.
- De Ley, P., Félix, M., Frisse, L., Nadler, S., Sternberg, P., Thomas, W. 1999. Molecular and morphological characterisation of two reproductively isolated

- species with mirror-image anatomy (Nematode: Cephalobidae). *Nematology* 1(6): 591-612.
- De Luca, F., Vovlas, N., Lucarelli, G., Troccoli, A., Radicci, V., Fanelli, E., Cantalapiedra, C., Palomares, J., Castillo, P. 2013. *Heterodera elachista* the Japanese cyst nematode parasiting corn in Northern Italy: integrative diagnosis and bionomics. *European Journal of Plant Pathology* 136: 857-872
- Derycke, S., Remerie, T., Vierstraete, A., Backeljau, T., Vanfleteren, J., Vincx, M., Moens, T. 2005. Mitochondrial DNA variation and cryptic speciation within the free-living marine nematode *Pellioiditis marina*. *Marine Ecology Progress Series* 300: 91-103.
- Dracaemer, W., Hunt, D. 2013. Structure and classification. *In: Plant nematology*. Perry, R; Moens, M. (eds). 2<sup>nd</sup> Ed. CAB International, Wallingford, UK, pp. 3-39.
- Ebrahimi, N., Viaene, N., Demeulemeester, K., Moens, M. Observations on the life cycle of potato cyst nematodes, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*, on early potato cultivars. *Nematology* 16: 937-952.
- Escobar-Avila, I.M., Cruz-Alvarado, Y., Tovar-Soto, A., Subbotin, S.A. 2019. First report of sugar beet cyst nematode, *Heterodera schachtii* on beetroot and broccoli in Mexico. *Plant Disease*: 103, 1434.
- Escobar, C., Fenoll, C. 2008. Cambios en la expresión génica como resultado de la interacción planta-nematodo: métodos de estudio. In Moen, V., Escobra, C.,

- Palenzuela, P., Marcos, J (eds). Herramientas biotecnológicas en fitopatología. Madrid, España. Ediciones Mundi-Prensa, pp 41-58.
- Eves-Van den Akker, S., Laetsch, D., Thorpe, P., Lilley, J., Danchin, E., Da Rocha, M., Rancurel, C., Holroyd, N., Cotton, J., Zsitenberg, A., Grenier, E., Montarry, J., Mimee, B., Duceppe, M., Boyes, I., Marvin, J., Jones, L., Yusup, H., Lafond, J., Esquibet, M., Sabeh, M., Rott, M., Overmars, H., Finkers, A., Smant, G., Koutsovoulos, G., Blok, V., Mantelin, S., Cock, P., Phillips, W., Henrissat, B., Urwin, P., Blaxter, M., Jones, J. 2016. The genome of the yellow potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, reveals insights into the basis of parasitism and virulence. *Genome Biology* 17: 1-124.
- Fournet, S., Pellan, L., Porte, C., Pirou, C., Grenier, E., Montarry, J. 2018. Populations of the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* exhibit strong differences in their life-history traits across changing thermal conditions. *Frontiers in Microbiology* 9: 2801.
- Franco, J. 1986. Nematodos del quiste de la papa *Globodera* spp. Boletín de Información Técnica 9. Lima, Perú, Centro Internacional de la Papa.
- García, D., García, C., Montero, Z., Salazar, L., Brenes, A., Gómez, L. 2009. Morphological and molecular identification of potato cyst-forming nematode *Globodera pallida* in soil samples from Costa Rica. *Revista Latinoamericana de la Papa* 15: 38-45.



- Greco, N., D'Addabbo, T., Brandonisio, A., Elia F. 1993. Damage to Italian crops caused by cyst-forming nematodes. *Journal of Nematology* 25 (4S): 836-842.
- Greco, N., Inserra, R., Brandonisio, A., Turró, A., de Marinis, G. 1988. Life cycle of *Globodera rostochiensis* on potato in Italy. *Nematología Mediterránea* 16: 69-73.
- Guzmán, O., Castaño, J., Villegas, B. 2012. Principales nematodos fitoparásitos y síntomas ocasionados en cultivos de importancia económica. *Agronomía* 20: 38-50.
- Haegeman, A., Mantelin, S., Jones, J., Gheysen, G. 2012. Review: functional roles of effectors of plant-parasitic nematodes. *Gene* 492: 19-31.
- Haidar, A., Al-Assas, K., y Dawabah, A. 2016. Prevalence, distribution and intrafestic variation of *Heterodera schachtii* populations from semiarid environment. *Saudi Journal of Biological Sciences* 23: 293-299.
- Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium* 41, 95-98.
- Halmann, J., Daub, M., Grundler, F., y Westphal, A. 2009. 150 Jahre *Heterodera schachtii*: ein überblick der frühen arbeiten. *Journal Für Kulturpflanzen*, 61 (12). S. 429–439.
- Handoo, Z., Carta, L., Skantar, M., y Chitwood, D. 2012. Description of *Globodera ellingtonae* n. sp. (Nematoda: Heteroderidae) from Oregon. *Journal of Nematology* 44: 40-57.

- Handoo, Z. A; Subbotin, S. A. 2018. Taxonomy, identification and principal species. *In: Roland, P.N., Moens, M. y Jones, J.T. (eds). Cyst nematodes.* CAB International, Wallingford, UK, pp. 365-398.
- Hirschmann, H., Triantaphyllou, A. 1979. Morphological comparison of members of the *Heterodera trifolii* species complex. *Nematologica* 25(4): 458-481.
- Jones, F. 1975. Accumulated temperature and rainfall as measures of nematode development and activity. *Nematologica* 21, 62–70
- Jones, J., Haegeman, A., Danchin, E., Gaur, H., Helder, J., Jones, M., Kikuchi, T., Manzanilla, R., Palomares, J., Wesemael, W., Perry, N. 2013. Review: Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 14(9): 946-961.
- Jones, J., Kumar, A., Pylypenko, L., Thirugnanasambandam, A., Castelli, L., Chapman, S., Cock, P., Grenier, E., Lilley, C., Phillips, M., Block, V. 2009. Identification and functional characterization of effectors in expressed sequence tags from various life cycle stages of the potato cyst nematode *Globodera pallida*. *Molecular Plant Pathology* 10(6): 815-828.
- Kang, H., Eun, G., Ha, J., Kim, Y., Park, N., Kim, D., Chpi, I. 2016. New cyst nematode, *Heterodera sojae* n. sp. (Nematoda: Heteroderidae) from soybean in Korea. *Journal of Nematology* 48(4): 280-289.

- Kim, J., Ni, G., Kim, T., Chun, J., Kern, E., Park, J. 2019. Phylogeography of the highly invasive sugar beet nematode, *Heterodera schachtii* (Schmidt, 1871), based on microsatellites. *Evolutionary Applications* 12: 324-336.
- Lafi, H., Al-Banna, L., Sadder, M., Migdadi, H. 2016. Morphological and morphometrical analysis of *Heterodera* spp. populations in Jordan. *Saudi Journal of Biological Sciences* 23: 108-114.
- Lagunes, E., Zavaleta, E. 2016. Función de la lignina en la estructura planta-nematodos endoparásitos sedentarios. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34: 43-63.
- Li, Y., Lawrence, G., Lu., S., Balbalian, C., Klink, V. 2014. Quantitative field testing *Heterodera glycines* from metagenomic DNA samples isolated directly from soil under agronomic production. *PLoS ONE* 9: e89887.
- Madani, M., Kyndt, T., Colpaert, N., Subbotin, S., Gheysen, G., Moens, M. 2007. Polymorphism among sugar beet cyst nematode *Heterodera schachtii* populations as inferred from AFLP and ITS rDNA gene analyses. *Russian Journal of Nematology* 15 (2): 117-128.
- Madani, M., Vovlas, N., Subbotin, S., Moens, M. 2004. Molecular characterization of cyst nematode species (*Heterodera* spp.) from the Mediterranean basin using RFLPs and sequences of ITS-rDNA. *Journal of Phytopathology* 152: 229-234.
- Madani, M., Palomares, J., Vovlas, N., Castillo, P., Tenuta, M. 2017. Integrative diagnosis of carrot cyst nematode (*Heterodera carotae*) using morphology and

several molecular markers for an accurate identification. *European Journal on Plant Pathology* 150 (4): 1023-1039.

Maafi, Z.; Sturhan, D; Handoo, Z; Mor, M; Moens, M; Subbotin, S. 2007. Morphological and molecular studies on *Heterodera sacchari*, *H. goldeni* and *H. leuceilyma* (Nematoda: Hoplolaimidae). *Nematology* 9(4): 483-497.

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

Mankau, R., Linford, M. 1960. Host-parasite relationships of the clover cyst nematode, *Heterodera trifolii* Goffart. *Bulletin of the Illinois Agricultural Experiment Station* No. 667.

Marshall, J. 1993. Detecting the presence and distribution of *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* mixed populations in New Zealand using DNA probes. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 21: 219-223.

Maas, P., Du Bois, E., Dede, J. 1982. Morphological and host range variation in the *Heterodera trifolii* complex. *Nematologica* 28: 263-270.

Marroquín, A., Arbelaez, G. 1991. Control químico del nematodo quiste *Heterodera trifolii* en clavel miniatura. *Agronomía Colombiana* 8: 248-252.

Mercer, C. 1990. Development of the nematodes *Meloidogyne hapla* Chitwood and *Heterodera trifolii* Goffart in white clover. *Nematologica* 36: 227-236.

- Mwamula, A., Ko, H., Kim, Y., Kim, Y., Lee, J., Lee, D. 2018. Morphological and molecular characterization of *Heterodera schachtii* and the newly recorded cyst nematode, *H. trifolii* associated with chinese cabbage in Korea. *The Plant Pathology Journal* 34(4):297-307.
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., Schwartz, T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 14 Nov. 2010, New Orleans, LA pp. 1–8.
- Mimee, B., Dauphinais, N., Belair, G. 2015. Life cycle of the golden cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, in Quebec, Canada. *Journal of Nematology* 47(4): 290-295.
- Moens, M., Perry, R.N., Jones, J.T. 2018. Cyst nematodes-life cycle and economic importance. *In*: Roland, P.N., Moens, M., y Jones, J.T. (eds). *Cyst nematodes*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 1-26.
- Mokrini, F., Viaene, N., Waeyenberg, L., Dababat, A., Moens, M. 2017. Characterization of cereal cyst nematodes (*Heterodera* spp.) in Morocco base on morphology, morphometrics and rDNA-ITS sequence analysis. *Journal of Plant Protection Research* 57(2): 219-227.
- Mulvey, R. 1958. Parthenogenesis in a cyst-forming nematode, *Heterodera trifolii* (Nematoda: Heteroderidae). *Canadian Journal of Zoology* 36: 91–93.

- Mulvey, R. 1959a. Investigations on the clover cyst nematode, *Heterodera trifolii* (Nematoda: Heteroderidae). *Nematologica* 4: 147-156.
- Mulvey, R. 1959b. Susceptibilities of plants to the clover cyst nematode, *Heterodera trifolii*, and the period required to complete a life cycle. *Nematropica* 4: 132-135.
- Mulvey, R., Golden, A. M. 1983. An illustrated key to the cyst-forming genera and species of Heteroderidae in the Western hemisphere with species morphometrics and distribution. *Journal of Nematology* 15: 1–59.
- Mundo-Ocampo, M., Troccoli, A., Subbotin, S., Cid, J., Baldwin, J., Inserra, R. 2008. Synonymy of *Afenestrata* with *Heterodera* supported by phylogenetics with molecular and morphological characterization of *H. koreana* comb. N. (Tylenchida: Heteroderidae). *Nematology* 10(5): 611-632.
- Niblack, T., Arelli, P., Noel, G., Opperman, C., Orf, J., Schmitt, D., Shannon, J., Tylka, G. 2002. A revised classification scheme for genetically diverse populations of *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology* 34(4): 279-288.
- Nordmeyer, D., Sikora, R. 1983. Four new hosts for *Heterodera daverti*. *Nematología Mediterranea* 11: 101-102.
- Norshie, P., Grove, I., Back, M. 2016. Field evaluation of the nematicide fluensulfone for control of the potato cyst nematode *Globodera pallida*. *Pest Management Science* 72: 2001-2007.

- Núñez, A., Carrión, G., Núñez, M., Rebolledo, O. 2003. Densidad poblacional de quistes de *Globodera rostochiensis* Woll. en el Cofre de Perote, Veracruz, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21(2): 207-213.
- OEPP/EPPO. 2013. PM 7/40 (3) *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. European and Mediterranean Plant Protection Organization 43: 119-138.
- Phillips, W., Kitner, M., Zasada, I. 2017. Developmental dynamics of *Globodera ellingtonae* in field-grown potato. *Plant Disease* 101: 1182-1187.
- Poromarto, S., Nelson, B. 2009. Reproduction of soybean cyst nematode on dry bean cultivars adapted to North Dakota and northern Minnesota. *Plant Disease* 93: 507-511.
- Poromarto, S., Nelson, H., Helms, T. 2011. Reproduction of soybean cyst nematode on dry bean cultivars over multiple generations. *Plant Disease* 95: 1239-1243.
- Powers, T., Todd, T., Burnell, A., Murray, P., Fleming, C., Szalanski, A., Adams, B., Harris, T. 1997. The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. *Journal of Nematology* 29 (4): 441-450.
- Rambaut, A., Drummond A. 2012. FigTree version 1.4. Disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>
- Ramírez, A. 1979. Muestreo poblacional del nematodo dorado (*Globodera rostochiensis*) y otros nematodos asociados al cultivo de papa (*Solanum tuberosum*). *Agronomía Costarricense* 3: 13-20.

- Rivera, G. 2007. Conceptos introductorios a la fitopatología. 1<sup>ra</sup> ed. San José, Costa Rica. EUNED.
- Robinson, A., Inserra, R., Caswell, E., Vovlas, N., Troccoli, A. 1997. *Rotylenchulus* species: identification, distribution, host ranges and crop plant resistance. *Nematropica* 27: 127-180.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, A., y Huelsenbeck, J. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology* 61(3): 539-542.
- Salazar, L., Flores, L., Montero, Z. 2005. Determinación del nematodo formador de quistes de la papa *Globodera pallida* Stone, 1973, en la principal zona productora de papa en Costa Rica. *In XLV Congreso Anual de la Sociedad Americana de Fitopatología-Divison Caribe, VI Congreso Nacional de Fitopatología, I Congreso Nacional de fotoprotección. 27 de Junio-1 de Julio, San José, CR. 2005: memoria.* eds. C. Araya, G. Rivera, F. Mora, F. Solano, M. Obregón, V. Cartín, H. Blanco, H. Aguilar, C. Rivera, X. Mata. San José, Costa Rica.
- Sandoval-Ruiz, R., Flores-Chaves, L., Humphreys-Pereira, D. 2020. Molecular characterization and distribution of *Globodera pallida* in the main potato production area of Costa Rica. *Nematropica* 50:218-228.



- Seifi, S., Karegar, A., Banihashemi, Z. 2013. The life cycle of the cereal cyst nematode, *Heterodera filipjevi*, and effect of plant hosts on its population. *World Applied Programming* 3(4): 164-168.
- Seinhorst, J. 1959. A rapid method for transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica* 4: 67-69.
- Sekimoto, S., Uehara, T., y Mizukubo, T. 2017a. Characterization of populations of *Heterodera trifolii* Goffsr, 1932 (Nematoda: Heteroderidae) in Japan and their phylogenetic relationships with closely related species. *Nematology* 19 (5): 543-558.
- Sekimoto, S., Uehara, T., y Mizukubo, T. 2017b. Morphological and molecular characterization of *Heterodera koreana* (Vovlas, Lamberti & Choo, 1992) Mundo-Ocampo, Traccoli, Subbotin, Del Cid, Baldwin & Inserra, 2008 (Nematoda: Heteroderidae) from bamboo in Japan. *Nematology* 19 (3): 333-350.
- Shaner, G; Stromberg, E; Lacy, G; Barker, K., Pirone, T. 1992. Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. *Annual Review of Phytopathology* 30:47-66.
- Shepherd, A. 1986. Extraction and estimation of cyst nematodes. *In*: Southey, J (ed). *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. London, UK, Her Majesty`s Stationery Office, pp. 31-46.

- Siddiqi, M. 1986. "Tylenchida: parasites of plants and insects,". Wallingford, UK, CAB International
- Singh, P., Karssen, G., Couvreur, M., Bert, W. 2020. Morphological and molecular characterization of *Heterodera dunensis* n.sp. (Nematoda: Heteroderidae) from Gran Canaria, Canary Islands. *Journal of Nematology* 52: 1-14.
- Singh, S., Singh, B., y Singh, A. 2015. Nematodes: a threat to sustainability of agriculture. *Procedia Environmental Sciences* 29: 215-216.
- Skantar, A., Handoo, Z., Zanakis, G., y Tzortzakakis, E. 2012. Molecular and morphological characterization of the corn cyst nematode, *Heterodera zea*, from Greece. *Journal of Nematology* 44: 58-66.
- Skantar, A., Handoo, Z., Zasada, I., Ingham, R., Carta, L., Chitwood, D. 2011. Morphological and molecular characterization of *Globodera* populations from Oregon and Idaho. *Phytopathology* 101: 480-491.
- Smiley, R., Marshall, J. 2016. Detections of dual *Heterodera avenae* resistance plus tolerance traits in spring wheat. *Plant Disease* 100: 1677-1685.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: Maximum Likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688-2690.
- Stamatakis, A., Hoover, P., Rougemont, J. 2008. A fast boot-strapping algorithm for the RAxML web-servers. *Systematic Biology* 57: 758–771.

- Steele, A., Whitehand, L. 1984. Comparative morphometrics of eggs and second-stage juveniles of *Heterodera schachtii* and a race of *H. trifolii* parasitic on sugarbeet in the Netherlands. *Journal of Nematology* 16: 171-177.
- Subbotin, S., Mundo-Ocampo, M., Baldwin J. G. 2010a. Nematology monographs and perspectives : systematics of cyst nematodes (Nematoda: Heteroderinae), Volume 8A, Leiden, The Netherlands: Brill.
- Subbotin, S., Mundo-Ocampo, M., Baldwin, J. 2010b. Systematics of cyst nematodes (Nematoda: Hoplolaimidae). *Nematology Monographs and Perspectives* 8B, Leiden, The Netherlands, Brill.
- Subbotin, S., Sturhan, D. 2004. *Heterodera circeae* sp. n. and *H. scutellariae* sp. n. (Tylenchida: Heteroderidae) from Germany, with notes on the *Goettingiana* group. *Nematology* 6(3): 343-355.
- Subbotin, S., Sturhan, D., Chizhov, V., Vovlas, N., Baldwin, J. 2006. Phylogenetic analysis of Tylenchida Thorne, 1949 as inferred from D2 and D3 expansion fragments of the 28S rRNA gene sequences. *Nematology* 8(3): 455-474.
- Subbotin, S., Sturhan, D., Waeyenberge, L., and Moens, M. 1997. *Heterodera riparia* sp. n. (Tylenchida: Heteroderidae) from common nettle, *Urtica dioica* L., and rDNA-RFLP separation of species from the *H. humuli* group. *Russian Journal of Nematology* 5: 143–157.
- Subbotin, S., Toumi, F., Elekçioğlu, I., Waeyenberge, L., Maafi, T. 2018. DNA barcoding, phylogeny and phylogeography of the cyst nematode species of the

- Avenae* group from the genus *Heterodera* (Tylenchida: Heteroderidae).  
Nematology 20: 671-702.
- Subbotin, S., Vierstraete, A., De Ley, P., Rowe, J., Waeyenberge, L., Moens, M.,  
Vanfleteren, J. 2001. Phylogenetic relationships within the cyst-forming  
nematodes (Nematoda, Heteroderidae) based on analysis of sequences from  
the ITS regions of ribosomal DNA. Molecular Phylogenetics and Evolution 21:  
1-16.
- Subbotin, S., Waeyenberge, L., Moens, M. 2000. Identification of cyst forming  
nematodes of the genus *Heterodera* (Nematoda: Heteroderidae) based on  
the ribosomal DNA-RFLP. Nematology 2(2): 153-164.
- Sullivan, M., Inserra, R., Franco, J., Moreno, I., Greco, N. 2007. Potato cyst  
nematodes: plant hosts and their regulatory impact. Nematropica 37: 193-201.
- Szalanski, A., Sui, D., Harris, T., Powers, T. 1997. Identification of cyst nematodes  
of agronomic and regulatory concern with PCR-RFLP of ITS1. Journal of  
Nematology 29(3): 255-267.
- Tanha, Z., Sturhan, D., Handoo, Z., Mor, M., Moens, M., Subbotin, S. 2007.  
Morphological and molecular studies on *Heterodera sacchari*, *H. goldeni* and *H.*  
*leuceilyma* (Nematoda: Heteroderidae). Nematology 9(4): 483-497.
- Tanha, Z., Subbotin, S., Moens, M. 2003. Molecular identification of cyst-forming  
nematodes (Heteroderidae) from Iran and a phylogeny based on ITS-rDNA  
sequences. Nematology 5: 99-111.

- Thiery, M., Mugniery, D., Fouville, D., Schots, A. 1996. Hybridations naturelles entre *Globodera rostochiensis* et *G. pallida*. *Fundamental and Applied Nematology* 19:437-442.
- Thomason, I., Fife, D. 1962. The effect of temperature on development and survival of *Heterodera schachtii* Schm. *Nematologica* 7: 139-145.
- Thompson, J., Higgins, D., Gibson, T. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids Research* 22(22): 4673-4680.
- Treonis, A., Cook., Dawson, L., Grayston, S., Mizen, T. 2007. Effects of a plant parasitic nematode (*Heterodera trifolii*) on clover roots and soil microbial communities. *Biology and Fertility of Soils* 43: 541-548.
- Triantaphyllou, A., Hirschmann, H. 1978. Cytology of the *Heterodera trifolii* parthogenetic species complex. *Nematologica* 24: 418-424.
- Turner, S., Subbotin, S. 2013. Cyst nematodes. *In*: Perry, R., Moens, M. (eds). *Plant Nematology*, 2<sup>nd</sup> edition. CAB International, Wallingford, UK, pp. 109-143 p.
- Tylka, G., Niblack, T., Walk, T., Harkins, K., Barnett, L., Baker, N. 1993. Flow cytometric analysis and sorting of *Heterodera glycines* eggs. *Journal of Nematology* 25(4): 596–602.
- Vovlas, N., Vovlas, A., Leonetti, P., Liébanas, G., Castillo, P., Subbotin, S., Palomares, J. 2015. Parasitism effects on white clover by root-knot and cyst

- nematodes and molecular separation of *Heterodera daverti* from *H. trifolii*.  
European Journal of Plant Pathology 143: 833-845.
- Wale, S., Platt, H., Cattlin, N. 2008. Diseases, pests and disorders of potatoes: a color handbook. London, UK. Manson Publishing.
- Wang, S., Riggs, R. 1999. Variations in host preference among and within populations of *Heterodera trifolii* and related species. Journal of Nematology 31: 407-417.
- Wang, S., Riggs, R., Yang, Y. 2001. Grouping of populations of *Heterodera trifolii* by host preference and AFLP pattern. Nematology 3: 667-674.
- Weayenberge, L., Viaene, N., Subbotin, S., Moens, M. 2009. Molecular identification of *Heterodera* spp., an overview of fifteen years of research. *In*: Riley, I., Nicol, J., Dababat, A. (eds). Cereal cyst nematodes: status, research and outlook. CIMMYT, Ankara, Turkey, pp. 109-114 p.
- Wolcan, S., Malbarán, I., Mourellos, C., Sisterna, M., González, M., Alippi, A., Nico, A., Lori, G. 2018. Diseases of Carnation. McGovern, R., Elmer, W (eds.). Springer Switzerland, pp. 317-378.
- Wouts, W., Rumpfenhorst, H., Sturhan, D. 2001. *Heterodera betae* sp. n., the yellow beet cyst nematode (Nematoda: Heteroderidae). Russian Journal of Nematology 9: 33-42.

- Wouts, W., Sturhan, D. 1978. The identity of *Heterodera trifolii* Goffart, 1923 and the description of *H. daverti* n. sp. (Nematoda: Tylenchida). *Nematologica* 24: 121-128.
- Williamson, V., Hussey, R. 1996. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *The Plant Cell* 8: 1735-1745.
- Ye, W. 2012. Development of prime time-real-time PCR for species identification of soybean cyst nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe, 1952) in North Carolina. *Journal of Nematology* 44(3): 284-290.
- Zamora, T., Peraza, W., Archidona, A., Cantalapiedra, C., Liébanas, G., Palomares, J., Castillo, P. 2016. *European Journal of Plant Pathology* 145: 973-998.
- Zijlstra, C., Lever, A., Uenk, B., Van Silfhout, C. 1995. Differences between ITS regions of isolates of root-knot nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. *Phytopathology* 85:1231-1237.
- Zijlstra, C., Uenk, B., Van Siffhout, C. 1997. A reliable, precise method to differentiate species of root-knot nematodes in mixtures on the basis of ITS-RFLPs. *Fundamental and Applied Nematology* 20:59- 63.