

## Caracterización morfométrica y molecular de poblaciones de *Radopholus similis* [(Cobb) Thorne (Rhabditida: Pratylenchidae)] en Colombia

Ángela María Chaves-Velasquez<sup>1</sup>, Óscar Adrián Guzmán-Piedrahita<sup>2</sup>, Arnubio Valencia-Jiménez<sup>3</sup> y Bernardo Villegas-Estrada<sup>4</sup>

### Resumen

**Objetivo:** Estudiar la variabilidad intraespecífica en diferentes poblaciones de *Radopholus similis*. **Alcance:** Poblaciones de *R. similis* provenientes principalmente del Bajo Occidente de Caldas, Colombia. **Metodología:** Se midieron 19 caracteres morfométricos y alométricos en hembras y machos de *R. similis* recolectados en los municipios de Anserma, Belalcázar, Carepa y Palestina, los cuales fueron analizados mediante componentes principales y de conglomerados jerárquicos. Igualmente, se amplificó por PCR y se secuenció la región parcial ITS1-5.8S-ITS2 y el gen 18S del ARN ribosomal correspondiente a las poblaciones de *R. similis* antes mencionadas. Con estas secuencias, y 61 secuencias adicionales obtenidas de la base de datos del NCBI, se construyó una red haplotípica para detectar la variación genética de la especie. **Resultados principales:** La caracterización morfométrica mostró que las hembras de *R. similis* procedentes de Anserma y Belalcázar presentaron un esófago más alargado y las recolectadas de Palestina fueron más robustas en la región anterior al nivel de la base del estilete, con cuerpos y esófagos más alargados. El análisis molecular de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ARN ribosomal no mostró variabilidad intraespecífica entre las poblaciones de *R. similis* estudiadas. Sin embargo, la red haplotípica construida en este estudio, junto con la recolectada de la base de datos del NCBI, reveló variabilidad intraespecífica entre las poblaciones de *R. similis* provenientes de África y del Sudeste Asiático. **Conclusiones:** No fue posible detectar variabilidad molecular entre las poblaciones de *R. similis* estudiadas. Sin embargo, sí se encontró variabilidad morfométrica entre las poblaciones de *R. similis* procedentes de Anserma, Belalcázar, Carepa y Palestina, Colombia.

**Palabras clave:** nematodo barrenador, variabilidad intraespecífica, morfometría, alometría, haplotipos, *Musa*.

\*FR: 14 II 2023. FA: 15 III 2023.

<sup>1</sup> Analista, Subgerencia de Análisis y Diagnóstico Agrícola, Instituto Colombiano Agropecuario – ICA. E-mail: angela.chaves@ica.gov.co, M.Sc.

<sup>2</sup> Profesor Titular, Departamento de Producción Agropecuaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Manizales, Caldas, Colombia. E-mail: oscar.guzman@ucaldas.edu.co, Ph.D.

<sup>3</sup> Profesor Titular, Departamento de Producción Agropecuaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Manizales, Caldas, Colombia. E-mail: arnubio.valencia@ucaldas.edu.co, Ph.D.

<sup>4</sup> Profesor Titular, Departamento de Producción Agropecuaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Manizales, Caldas, Colombia. E-mail: bernardo.villegas@ucaldas.edu.co, Ph.D.



### CÓMO CITAR:

Chaves-Velásquez, A. M., Guzmán-Piedrahita, Ó. A., Valencia-Jiménez, A. y Villegas-Estrada, B. (2023). Caracterización morfométrica y molecular de poblaciones de *Radopholus similis* [(Cobb) Thorne (Rhabditida: Pratylenchidae)] en Colombia. *Bol. Cient. Mus. Hist. Nat. Univ. Caldas*, 27(2), 97-116. <https://doi.org/10.17151/bccm.2023.27.2.6>



## Morphometric and molecular characterization of populations of *Radopholus similis* (Cobb) Thorne (Rhabditida: Pratylenchidae) in Colombia

### Abstract

**Objective:** To study the intraspecific variability in different populations of *Radopholus similis*. **Scope:** *R. similis* populations coming mainly from the Southwest of Caldas-Colombia. **Methodology:** Nineteen morphometric and allometric characters were measured in females and males of *R. similis* collected in the municipalities of Anserma, Belalcázar, Carepa and Palestina, which were analyzed using principal components and hierarchical clusters. Likewise, the partial ITS1-5.8S-ITS2 and the 18S gene of the rRNA ribosomal corresponding to the populations of *R. similis* were amplified by PCR and sequenced. With these sequences, and 61 additional sequences obtained from the NCBI database, a haplotype network was built to detect the genetic variation of the species. **Main Results:** The morphometric characterization showed that *R. similis* females from the municipalities of Anserma and Belalcázar had a more elongated esophagus, and those from the municipality of Palestina were more robust in the region above the level of the base of the stylet, with more elongated bodies and esophagus. Molecular analyzes of the ITS1-5.8S-ITS2 region of the rRNA did not show intraspecific variability among the of *R. similis* populations studied. However, the haplotypic network built in this study, together with that collected from the NCBI database, revealed intraspecific variability among *R. similis* populations of Africa and Southeast Asia. **Conclusions:** It was not possible to detect molecular variability among the *R. similis* populations studied. However, morphometric variability was found among *R. similis* populations from the municipalities of Anserma, Belalcázar, Carepa, and Palestina, Colombia.

**Key words:** Borer nematode, intraspecific variability, morphometry, allometry, haplotypes, *Musa*

### Introducción

Los cultivos de plátano y banano son importantes en Colombia debido principalmente a su aporte a la seguridad alimentaria, y alto valor económico y nutricional (FAO, 2004; CIAT, 2013; MADR, 2017; Cenibanano, 2018).

Para el año 2020, en Colombia se sembraron 426.904 ha de plátano y 99.612 ha de banano, con rendimientos de 10 y 24 t/ha, respectivamente; siendo el departamento de Caldas el séptimo productor de plátano con 23.333 ha sembradas y un rendimiento de 11,9 t/ha; y el décimo cuarto productor de banano con 686 ha sembradas y un rendimiento de 11 t/ha (Agronet, 2022).

En Colombia, los cultivos de musáceas son afectados por numerosos e importantes problemas fitosanitarios que limitan su producción; dentro de los cuales se destaca el nematodo barrenador, *Radopholus similis* (Cobb) Thorne, (Múnera, 2008; Jaraba y

Lozano, 2008; Múnera *et al.*, 2009; Guzmán, 2011; Guzmán y Castaño, 2020). Este nematodo se caracteriza por ser un endoparásito migratorio del sistema radical y el cormo de las musáceas donde ocasiona síntomas primarios como lesiones de color rojo oscuro en el córtex de la raíz, no así en el cilindro vascular, las cuales pueden coalescer y tornarse de color negro, y síntomas secundarios como disminución en la capacidad de absorción de agua y nutrientes por deterioro del sistema radical, lo cual se ve reflejado en la prolongación del ciclo vegetativo del cultivo, reducción del peso del racimo y se genera volcamiento de las plantas (Sarah *et al.*, 1996; Gowen *et al.*, 2005; Guzmán, 2011).

Fogain (2000) reportó pérdidas en el rendimiento de *Musa* AAB 'French Sombre' durante la primera y segunda cosecha en 60 y 52%, respectivamente. Sarah *et al.* (1996) y Araya (1995) manifestaron que las reducciones en el rendimiento de banano pueden alcanzar entre 75% y 80%, dependiendo de las condiciones agroecológicas. Guzmán (2011) afirmó haber observado en Caldas, pérdidas del 70% en el primer ciclo de producción en plantas *Musa* AAB 'Dominico Hartón', principalmente debido a su volcamiento.

En Colombia, los estudios relacionados con *R. similis* se han enfocado principalmente en su prevalencia, densidad poblacional y en estrategias de manejo bajo condiciones *in vitro* e *in vivo* (Guzmán y Castaño, 2004; González *et al.*, 2007; Arboleda *et al.*, 2012; Castillo-Russi *et al.*, 2010; Guzmán, 2011; Valencia *et al.*, 2014). Sin embargo, los estudios relacionados con la variabilidad intraespecífica del nematodo han sido escasos. Múnera *et al.* (2010) realizaron aportes a la taxonomía del nematodo desde el punto de vista morfométrico, morfológico y filogenético.

Siddiqi (2000) menciona que, al estudiar la variabilidad intraespecífica, o al efectuar la descripción de una nueva especie de nematodo, resulta importante conocer la variabilidad de un carácter morfométrico, morfológico o alométrico en particular, debido a que estos caracteres tienden a variar bajo la influencia de condiciones ecológicas y geográficas; lo cual origina poblaciones ecotípicas y específicas a un hospedante. Sin embargo, se recomienda complementar los estudios morfométricos y morfológicos con estudios moleculares mediante técnicas como polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, por su sigla en inglés), amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD, por su sigla en inglés) o secuenciación. Al respecto, Mgonja *et al.* (2020) realizaron una identificación molecular, morfológica y morfométrica de cuatro poblaciones de *R. similis* de Tanzania, encontrando que las mediciones de todos los caracteres morfométricos se ajustaron a los valores estándares de diagnóstico (Ryss y Wouts, 1997; Elbadri *et al.*, 1999), excepto la medición del estilete, posiblemente a variaciones en condiciones ambientales que conducen a adaptaciones morfológicas; y con respecto al estudio filogenético, mediante el uso de los genes 28S, 18S y de la región ITS1 e ITS2 del ARN ribosomal demostraron que los iniciadores usados fueron útiles para separar a *R. similis* de otras especies (Mgonja *et al.*, 2020). Por tales motivos, Gowen *et al.* (2005), Plowright *et al.* (2013) y Sikora *et al.* (2018), mencionan

que diferencias en agresividad, preferencia de hospedante, capacidad reproductiva y morfología de *R. similis* sugieren la existencia de razas o biotipos.

Teniendo en cuenta la relevancia de los cultivos de plátano y banano en los ámbitos nacional e internacional, la importancia económica de *R. similis*, y la escasez de estudios relacionados con su diversidad, se hace necesario ampliar el conocimiento de la variabilidad intraespecífica de este nematodo en Colombia. La presente investigación se realizó con el objetivo de aportar a la caracterización morfométrica y molecular de *R. similis*, con el fin de determinar si existe variabilidad intraespecífica, y así contribuir al desarrollo de nuevas estrategias que faciliten su manejo en condiciones de campo.

## **Materiales y métodos**

### **Obtención y extracción de nematodos**

Las muestras de siete poblaciones de *R. similis* se recolectaron de raíces de plantas de *Musa* AAB (subgrupo plátano) ‘Dominico Hartón’ y ‘Dominico’ y de *Musa* AA (Subgrupo Sucrier) ‘Bananito’ atacadas por este nematodo, provenientes de cinco municipios de Caldas (Tabla 1). De manera complementaria, se obtuvieron muestras de raíces de *Musa* AAB ‘Dominico Hartón’ y de *Musa* AAA (subgrupo Cavendish) ‘Gran enano’ de los departamentos de Antioquia y Quindío (Tabla 1). Posteriormente, las muestras de raíces se introdujeron en bolsas plásticas debidamente rotuladas, y luego se trasladaron al Laboratorio de Nematología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Caldas para su procesamiento y análisis. La extracción de los nematodos se realizó con base en el principio de flotación en azúcar, con algunas modificaciones, según Jenkins (1964) y Meredith (1973).

**Tabla 1.** Poblaciones de *Radopholus similis* (Rs) recolectadas en diferentes materiales de musáceas en los departamentos de Caldas, Antioquia y Quindío, Colombia, y su ubicación geográfica.

Ubicación geográfica							
Departamento	Municipio	Población	Coordenadas	T (°C)*	PP (mm)*	Altitud (m.s.n.m)	Hospedante
Caldas	Palestina (P)	RsP	5°04'22,29"N 75°40'21,38"O	24,2	1.792,4	1024	<i>Musa</i> AA 'Bananito'
	San José (S)	RsS	5°03'50,9"N 75°48'44,3" O	19	3.017	1494	( <i>Musa</i> AAB) 'Dominico'
	Risaralda (R)	RsR	5°08'12,1"N 75°46'44,9"O	22	3.586	1735	
	Belalcázar (B)	RsB	5°00'32,9"N 75°49'13,1"O	21	2.279	1244	<i>Musa</i> AAB 'Dominico Hartón'
	Anserma (A)	RsA	5°11'14,1"N 75°47'02,8"O	20	2.022	1489	
Quindío	Quimbaya (Q)	RsQ	4°38'15,32" N 75°44'33,21" O	20	2.323	1339	
Antioquia	Carepa (C)	RsC	7°46'47,1"N 76°40'24,2"O	26,8	2.892	27	<i>Musa</i> AAA 'Gran enano'

**Abreviaturas:** T= Temperatura; PP= Precipitación. m.s.n.m: metros sobre el nivel del mar.

\*Fuente: Cenicafé (2016).

### Observación morfológica y caracterización morfométrica

Las poblaciones de hembras y machos de *R. similis* se identificaron utilizando un microscopio óptico LEICA DM500-ICC50 HD® (LEICA Microsystem, Wetzlar, Alemania), y posteriormente comparadas con las claves taxonómicas de Thorne (1961), Sher (1968) y Ryss y Wouts (1997). Se realizaron mediciones de 19 caracteres morfométricos y alométricos sugeridos por Thorne (1961), Siddiqi (2000) y Perry y Moens (2013), mediante el uso del software Leica Application Suite (LAS) EZ 2.0®.

Los códigos asignados a los caracteres evaluados de *R. similis* fueron los siguientes: L= Longitud del cuerpo; E= Longitud del estilete; DCE= Diámetro del cuerpo en la base del estilete; DMC= Diámetro máximo del cuerpo; LES= Longitud del esófago; LGE= Longitud desde la región anterior (cabeza) hasta la región posterior de la glándula esofágica; LC= Longitud de la cola; DCA= Diámetro del cuerpo en el ano; DEGO= Orificio de la glándula esofágica dorsal; V= (Distancia desde la región anterior (cabeza) hasta la vulva/Longitud del cuerpo) x 100; PE= Distancia desde la

región anterior (cabeza) hasta el poro excretor; H= Longitud de la región hialina de la cola; a= L/DMC; b= L/LES; b'= L/LGE; c= L/LC; c'= LC/DCA. En la evaluación de estos caracteres se tomaron 30 hembras y 20 machos de *R. similis* por cada población estudiada, y los valores resultantes se compararon con las descripciones realizadas por Sher (1968), Taylor (1969), Ryss y Wouts (1997) y Múnera (2008).

### **Análisis estadístico**

A los valores de los caracteres obtenidos de las poblaciones de *R. similis* se les calculó el promedio, desviación estándar, valores mínimos y máximos. Adicionalmente, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para reducir la dimensionalidad de los datos, y para identificar las variables de mayor importancia en las siete poblaciones de hembras del nematodo, teniendo en cuenta la matriz de correlaciones e identificando los autovalores y autovectores. Posteriormente, se realizó un análisis de conglomerados jerárquicos (ACJ) aplicando el método de Ward (1963) a los resultados del ACP. Los análisis se realizaron con el programa estadístico SPAD® versión 8.0.

### **Caracterización molecular**

#### **Diseño de iniciadores**

Se seleccionaron secuencias nucleotídicas asociadas a la región ITS1-5.8S-ITS2 (ITS), y al gen 18S (18S) ambos del ARN ribosomal de la especie *R. similis*, disponibles en la base de datos del banco de genes del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Por cada gen o región se realizaron los alineamientos correspondientes usando el programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalo>), con el fin de identificar regiones conservadas. Posteriormente, se diseñaron iniciadores (cebadores) utilizando el programa Oligoperfect Designer Program (<https://www.themofisher.com>) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Iniciadores diseñados para amplificar la región parcial ITS1-5.8S-ITS2 y gen 18S del ARNr de *Radopholus similis* (Rs).

Iniciador	Gen/Región	Secuencia (5'→3')	Amplicón (pb)	Temperatura de anillamiento (°C)
RsITS4F	ITS1-5.8S-ITS2	ATTGGCGAAACCCATCAAA	525	52,8
RsITS4R		TGCACAATGAACATACGTGAATT		53,4
Rs18S3F	18S	ACCGTAAACGATGCCAACTC	606	55,4
Rs18S3R		GGGCAGGGACGTAATCAAC		55,9

### Extracción de ADN

Un total de 20 individuos de cada una de las siete poblaciones de *R. similis*, descritas en la Tabla 1, fueron depositados dentro de tubos Eppendorf de 2mL, conteniendo 20 µL de solución amortiguadora de lisis, componente del kit de extracción de ADN, PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher, Austin, TX); con ayuda de un pistilo, los nematodos fueron macerados y sometidos a temperatura de ebullición por 5 min en baño maría. El extracto con el ADN del nematodo se utilizó inmediatamente para realizar PCR directa.

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación

La PCR se realizó en un volumen final de 30 µL, conteniendo 3 µL de agua libre de nucleasas, 24 µL de PCR SuperMix 1X (Thermo Fisher, Austin, TX), 0,75 µL de cada iniciador (10 µM), y 1,5 µL del extracto de ADN preparado previamente. La amplificación se realizó usando un termociclador C1000 Touch (Bio-Rad, Hercules, CA), con la siguiente programación: una desnaturalización inicial a 95°C por 5 min; 40 ciclos de 95°C por 30 s, 53°C por 40 s para ITS1-5.8S-ITS2 y 56°C por 30 s para 18S, 72°C por 1 min; y un paso final de extensión a 72°C por 10 min. El producto de amplificación resultante se separó en un gel de agarosa al 1% mediante electroforesis horizontal a 110 voltios por 45 min. Los geles fueron teñidos usando una solución de GelRed y las bandas se visualizaron empleando un foto-documentador (Geldoc Imager, Bio-Rad, Hercules, CA). Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit PureLink Quick PCR Purification kit (Thermofisher, Austin, TX), y posteriormente enviados a secuenciación unidireccional a MacroGen, Inc. (Corea del Sur).

## BLASTn

Las secuencias estudiadas de ADN de las poblaciones de *R. similis* fueron visualizadas y ajustadas usando el programa Sequencher 5.4 (Genes code corp., Ann Arbor, MI). Posteriormente, dichas secuencias se compararon con las del NCBI usando la herramienta BLASTn. Las secuencias nucleotídicas de la base de datos con similitud más alta a las secuencias sometidas a evaluación (ITS y 18S) fueron las que se tuvieron en cuenta para confirmar el género y especie de cada población, previamente identificada morfológicamente.

### Alineamiento de secuencias

Se seleccionaron secuencias nucleotídicas del NCBI de la especie *R. similis* asociadas a *Musa*. El alineamiento se realizó usando el programa Muscle v3.8.425 (Edgar, 2004) y un bloque conservado se seleccionó utilizando el programa Gblocks v0.91b (Castresana, 2000). El alineamiento final se visualizó mediante el programa AliView (Larsson *et al.*, 2014).

### Variabilidad genética de *R. similis*

La identificación de haplotipos en el alineamiento de secuencias nucleotídicas se realizó con el programa DNAsp v5.10.1 (Rozas *et al.*, 2010). Igualmente, se hizo una matriz de distancias genéticas con el modelo Kimura 2-parametros (Kimura, 1980) usando el programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018), y finalmente se construyó una red haplotípica con el método de uniones promediadas (MJ, por sus siglas en inglés) utilizando el programa PopART (Leigh *et al.*, 2015).

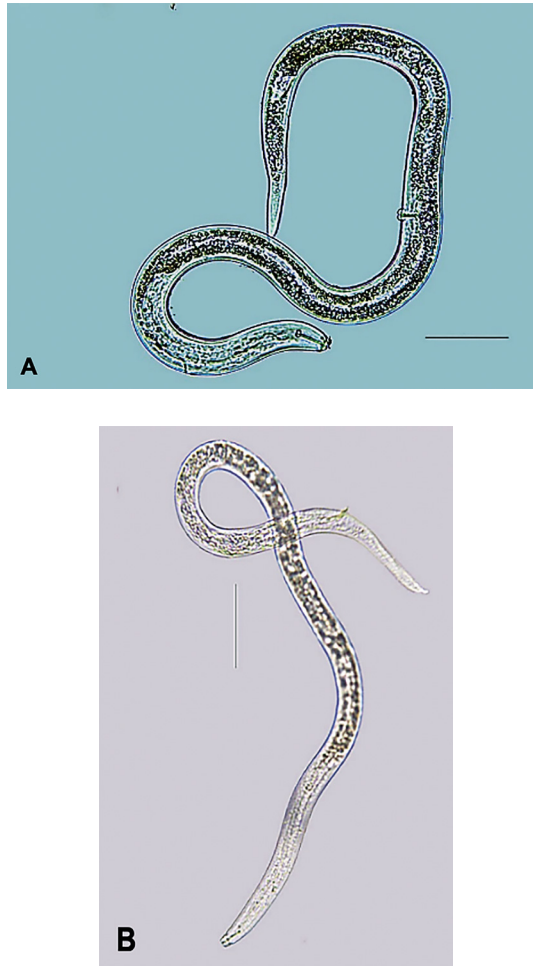
## Resultados y discusión

### Observación morfológica y morfométrica

Las características morfológicas de las siete poblaciones de *R. similis* estudiadas concuerdan con la descripción para esta especie, según Thorne (1961), Sher (1969), Ryss y Wouts (1997) y Múnera *et al.* (2010) (Figura 1).

Los valores promedio de todos los caracteres morfométricos y alométricos de las hembras de *R. similis* estudiadas, en las siete poblaciones, se ajustaron a los rangos de los promedios reportados por Sher (1968), Taylor (1969), Ryss y Wouts (1997), Elbadri *et al.* (1999) y Múnera (2010), para la especie *R. similis* (Tabla 3). Adicionalmente, debido a que no se encontraron diferencias en los datos obtenidos de los machos estudiados, estos no se muestran.





**Figura 1.** Hembra (A) y macho (B) de *Radopholus similis*. Dentro de la figura, la escala de barra=50  $\mu$ m.  
Fuente: Autores.

Sin embargo, en las hembras de *R. similis* se encontró una diferencia entre las poblaciones estudiadas, específicamente en la longitud del esófago; cuyo valor máximo superó los valores obtenidos por Elbadri *et al.* (1999) y Múnica *et al.* (2010) (Tabla 3).

De acuerdo con Ryss (2003), el desarrollo de las glándulas esofágicas en el género *Radopholus* está relacionado con la alimentación parasítica sobre las células de las raíces de la planta, destacándose un mayor tamaño de las glándulas en parásitos especializados; por lo tanto, el tamaño del esófago podría relacionarse con la agresividad encontrada en la población de Belalcázar.

**Tabla 3.** Comparación de caracteres morfométricos y alométricos de diferentes poblaciones de hembras de *Radopholus similis* (mediciones en  $\mu\text{m}$ ).

Población	Este estudio	Sher (1968)	Taylor (1969)	Ryss y Wouts (1997)	Elbadri <i>et al.</i> (1999)	Múnera (2010)
	Hembras					
Hospedante	<i>Musa</i> AAB; <i>Musa</i> AA (N=7)	<i>Musa</i> AAA (N=1)	<i>Musa</i> AAA (N=1)	—	<i>Musa</i> AAA (N=4)	<i>Musa</i> AAB (N=2)
Carácter	Pm – Pmx					
L	682,69 - 723,91	520 - 880	610 - 745	554 - 792	510 - 860	504 - 722
LE	19,98 - 21,11	17 - 20	18 - 18	16,5 - 20	15 - 23	15,9 - 21,5
DMC	23,13 - 30,49	-----	26 - 33	18 - 40	14 - 34	15,3 - 33,7
LES	102,62 - 126,67	-----	-----	73 - 132	67 - 120	41 - 107
LGE	139,04 - 166,91	-----	-----	-----	115 - 207	112 - 168
PE	94,77 - 104,39	-----	-----	86 - 100	59 - 116	73 - 99
LC	72,52 - 82,12	-----	52 - 74	50 - 100	40 - 104	54 - 84
DCA	16,93 - 23,26	-----	-----	12,0 - 28,0	12,5 - 26	10,4 - 20,9
DEGO	4,34 - 4,97	-----	-----	2 - 5,5	2 - 8,5	2,5 - 3,7
V	53,76 - 57,03	55 - 61	52 - 57	53 - 88	51 - 68	51 - 62
H	10,09 - 13,44	9,0 - 16	11,0 - 16,0	7,5 - 23	-----	6,1 - 13,5
<i>A</i>	24,31 - 29,65	22 - 30	-----	17,8 - 36	20,2 - 47,5	20 - 37
<i>B</i>	5,47 - 6,67	4,7 - 7,4	-----	6,0 - 9,3	6,2 - 9,6	7,4 - 9,8
<i>b'</i>	4,13 - 4,93	5,5 - 5,2	-----	3,2 - 5,2	3,3 - 5,9	3,1 - 5,4
<i>C</i>	8,75 - 9,61	8,0 - 13	-----	6,8 - 11,7	6,4 - 16,4	7 - 10,3
<i>c'</i>	3,64 - 4,42	2,9 - 4	-----	2,4 - 6,3	2,3 - 6,2	3,3 - 5,8

Abreviaciones. Pm=Valor mínimo de promedio; Pmx= Valor máximo de promedio; N= Número de poblaciones evaluadas; L= Longitud del cuerpo; E= Estilete; DCE= Diámetro del cuerpo en la base del estilete; DMC= Diámetro máximo del cuerpo; LES= Longitud del esófago; LGE= Longitud desde la región anterior de la cabeza hasta la región posterior de la glándula esofágica; LC= Longitud de la cola; DCA= Diámetro del cuerpo en el ano; DEGO= Orificio de la glándula esofágica dorsal; V= (Distancia desde la región anterior de la cabeza hasta la vulva / Longitud del cuerpo) x 100; PE= Distancia desde la región anterior de la cabeza hasta el poro excretor; H= Longitud de la región hialina de la cola;  $a = L/DMC$ ;  $b = L/LES$ ;  $b' = L/LGE$ ;  $c = L/LC$ ;  $c' = LC/DCA$ .

Fuente: Autores.

**Análisis de componentes principales (ACP) y conglomerados jerárquicos (ACJ)**

El ACP realizado con los caracteres de las hembras de *R. similis* permitió evidenciar dos componentes principales (CP) indicados como CP1 y CP2, los cuales presentaron las varianzas más altas en comparación con el resto de los componentes, representando un 48,8% de la varianza acumulada (Tabla 4).

Se presentaron correlaciones positivas fuertes en CP1 para los caracteres L ( $r=0,858$ ), DCE ( $r=0,728$ ), DMC ( $0,886$ ) y DCA ( $r=0,838$ ); y en CP2 para los caracteres LES ( $r=0,873$ ) y LGE ( $r=0,867$ ). También, se presentaron correlaciones negativas fuertes en el CP2 con los caracteres *b* y *b'* (Tabla 4).

De los 17 caracteres evaluados solamente sobresalieron ocho; los cuales brindaron una mejor información morfométrica, debido a que estaban mejor representados en los componentes y a que mostraron una alta correlación con CP1 o CP2. En este sentido, CP1 se caracterizó por incluir variables relacionadas con el largo y diámetro del cuerpo, mientras que CP2 se caracterizó por incluir variables relacionadas con el esófago (Tabla 4).

Con el fin de conformar grupos más homogéneos, pero más heterogéneos entre sí con base en los caracteres morfométricos y alométricos de las hembras de las siete poblaciones de *R. similis*, se realizó el ACJ con los resultados del ACP, mostrando la conformación de tres grupos (Tabla 5 y Figura 2).

**Tabla 4.** Auto-vectores y correlación entre caracteres y componentes principales (CP1 y CP2), y autovalores de CP1 y CP2, derivados de los caracteres evaluados en hembras de siete poblaciones de *Radopholus similis*.

Carácter	Hembras			
	Autovector*		Correlación (r)**	
	CP1	CP2	CP1	CP2
<b>L</b>	<b>0,37</b>	0,066	<b>0,858</b>	0,122
<b>LE</b>	0,18	0,028	0,417	0,051
<b>DCE</b>	<b>0,313</b>	-0,097	<b>0,728</b>	-0,18
<b>DEGO</b>	0,061	0,065	0,142	0,12
<b>PE</b>	0,207	0,21	0,48	0,387
<b>LES</b>	0,19	<b>0,473</b>	0,441	<b>0,873</b>
<b>LGE</b>	0,197	<b>0,47</b>	0,456	<b>0,867</b>

<b>DMC</b>	<b>0,382</b>	-0,067	<b>0,886</b>	-0,124
<b>V</b>	-0,028	0,165	-0,064	0,304
<b>DCA</b>	<b>0,361</b>	-0,123	<b>0,838</b>	-0,227
<b>LC</b>	0,257	-0,058	0,596	-0,108
<b>H</b>	0,106	-0,004	0,246	-0,008
<b>A</b>	-0,196	0,161	-0,455	0,298
<b>B</b>	0,084	<b>-0,454</b>	0,196	<b>-0,838</b>
<b>b'</b>	0,106	<b>-0,436</b>	0,245	<b>-0,804</b>
<b>C</b>	0,128	0,095	0,296	0,175
<b>c'</b>	-0,249	0,107	-0,579	0,197
<b>Autovalor</b>	5,389	3,408		
<b>Varianza (%)</b>	29,9	18,9		
<b>Varianza acumulada (%)</b>	29,9	48,8		

\*Autovectores derivados de los 19 caracteres evaluados en las 210 hembras (30 hembras por cada población) de *Radopholus similis*; los valores de los caracteres que sobresalen en cada componente están resaltados en rojo. \*\* Valores de coeficientes de correlación; los valores con una buena correlación con un componente principal están resaltados en rojo. Abreviaciones= L= Longitud del cuerpo; E= Estilete; DCE= Diámetro del cuerpo en la base del estilete; DMC= Diámetro máximo del cuerpo; LES= Longitud del esófago; LGE= Longitud desde la región anterior de la cabeza hasta la región posterior de la glándula esofágica; LC= Longitud de la cola; DCA= Diámetro del cuerpo en el ano; DEGO= Orificio de la glándula esofágica dorsal; V= (Distancia desde la región anterior de la cabeza hasta la vulva / Longitud del cuerpo) x 100; PE= Distancia desde la región anterior de la cabeza hasta el poro excretor; H= Longitud de la región hialina de la cola;  $a = L/DMC$ ;  $b = L/LES$ ;  $b' = L/LGE$ ;  $c = L/LC$ ;  $c' = LC/DCA$ .

Fuente: Autores.

El grupo 1 se conformó por las poblaciones de Belalcázar (RsB) y Anserma (RsA) (Caldas), las cuales sobresalieron por los valores promedios más altos en los caracteres  $c'$ , a, %V y LES, mientras que el grupo 2 solamente se conformó por la población de Carepa (RsC) (Antioquia), con valores promedios más altos en los caracteres  $b'$  y b; y finalmente el grupo 3 se conformó por la población de Palestina (RsP) (Caldas), por los valores promedios más altos en los caracteres: DMC, DCA, L DCE, LES, LGE, LC, PE, c, DEGO y LE (Tabla 5 y Figura 2).

Por otro lado, las hembras de *R. similis* de los municipios de Quimbaya (Quindío), al igual que San José y Risaralda (Caldas) no se conglomeraron en ningún grupo, dado que no sobresalieron en ningún carácter morfométrico o alométrico.

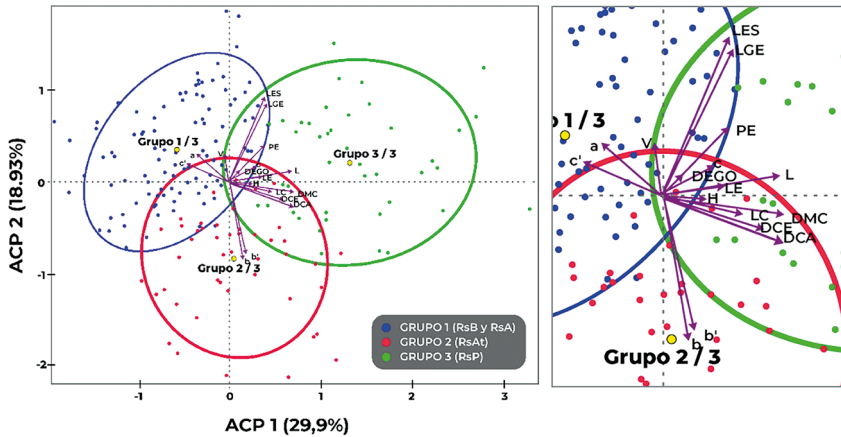
Según Bird *et al.* (2012), muchos caracteres morfométricos no siempre son útiles como caracteres taxonómicos; por lo tanto, una manera para determinar la idoneidad de estos es mediante el análisis de las medidas de dispersión; las cuales permiten analizar el grado de variabilidad de un carácter de un taxón específico, teniendo en cuenta que, entre mayor grado de variación del carácter, menos útil es. Al respecto, Kaur y Attri (2013) mencionan que un carácter con un coeficiente de variación menor de 12% es poco variable, si se encuentra entre 12 y 20% es moderadamente variable, y si es mayor a 20% es altamente variable.

De acuerdo con los resultados del ACP y del ACJ se seleccionaron aquellos caracteres morfométricos o alométricos que más distinguían a cada grupo con base en la varianza, el grado de correlación del carácter con el componente principal ( $r > \pm 0,8$ ), y el coeficiente de variación del carácter evaluado ( $C.V < 13$ ), lo cual indicó que el carácter morfométrico, además de estar bien representado en el plano de componentes principales, es poco a moderadamente variable.

**Tabla 5.** Caracteres morfométricos y alométricos que distinguen a las hembras adultas de las poblaciones de *Radopholus similis*, conglomerados en los grupos 1, 2 y 3.

Grupo	Carácter	Promedio del grupo	Promedio general	DS del grupo	CV del grupo*	Valores test	Probabilidad
Grupo 1 (RsB y RsA)	c'	3,845	3,581	0,49	12,744	6,618	0
	A	27,846	26,376	3,273	11,754	5,442	0
	%V	55,764	55,11	2,572	4,612	3,334	0
Grupo 2 (RsC)	LES	135,536	132,557	17,587	12,976	2,064	0,02
	B	5,836	4,833	0,681	11,669	9,86	0
	b'	4,909	4,133	0,581	11,835	9,668	0
Grupo 3 (RsP)	DMC	34,667	26,329	5,095	14,697	11,043	0
	DCA	23,378	18,705	4,133	17,679	9,154	0
	L	794,089	700,338	66,887	8,423	8,633	0
	DCE	19,333	17,381	1,476	7,635	7,952	0
	LES	151,244	132,557	18,356	12,137	6,447	0
	LGE	172,844	153,652	18,811	10,883	6,444	0
	LC	81,2	75,448	10,406	12,815	5,226	0
	PE	108,622	98,676	16,985	15,637	5,22	0
	c	9,333	8,61	1,247	13,361	3,637	0
	DEGO	4,333	4,152	0,471	10,870	3,015	0,001
LE	20,289	19,895	1,025	5,052	2,782	0,003	

\* Caracteres menos variables (CV < 12%), caracteres moderadamente variables (CV = 12-20%), caracteres altamente variables (CV = >20%) (Kaur y Attri, 2013). Caracteres resaltados en rojo están bien representados en los componentes principales y tienen un CV bajo. Abreviaciones: DS= desviación estándar; CV= coeficiente de variación; L= Longitud del cuerpo; E= Estilete; DCE= Diámetro del cuerpo en la base del estilete; DMC= Diámetro máximo del cuerpo; LES= Longitud del esófago; LGE= Longitud desde la región anterior de la cabeza hasta la región posterior de la glándula esofágica; LC= Longitud de la cola; DCA= Diámetro del cuerpo en el ano; DEGO= Orificio de la glándula esofágica dorsal; PE= Distancia desde la región anterior de la cabeza hasta el poro excretor; H= Longitud de la región hialina de la cola; GB= Longitud del gobernáculo; ESP= Longitud de la espícula;  $a = L/DMC$ ;  $b = L/LES$ ;  $b' = L/LGE$ ;  $c = L/LC$ ;  $c' = LC/DCA$ .  
Fuente: Autores.



**Figura 2.** Plano factorial y agrupamiento de individuos (hembras) de las poblaciones de *Radopholus similis* (Rs) (izquierda), y acercamiento de los vectores (derecha). **Abreviaciones=** RsB de Belalcázar, RsA de Anserma, RsAt de Antioquia (Carepa), RsP de Palestina.  
Fuente: Autores.

En este sentido, las hembras de *R. similis* recolectadas de Belalcázar y Anserma (Caldas), las cuales conforman el grupo 1, se caracterizaron solamente por el carácter morfológico longitud del esófago (LES), debido a que el valor promedio de este carácter en el grupo fue mayor al valor promedio general, el cual además de tener una alta correlación con el CP2 es un carácter moderadamente variable (Tablas 4 y 5). Lambert y Bekal (2002) mencionan que los músculos del esófago le permiten al nematodo extraer alimento a través del estilete y también expulsar secreciones de las glándulas hacia el interior de las células de las raíces de la planta. Por otro lado, Ryss (2003) menciona que el tamaño de las glándulas esofágicas en el género *Radopholus* está relacionado con la alimentación del nematodo en las raíces de las plantas, en especial teniendo en cuenta que el tamaño de las glándulas es mayor en parásitos especializados. En este sentido, es posible que exista una relación entre el tamaño del esófago del nematodo y el grado de parasitismo.

En las hembras de *R. similis* de Carepa (Antioquia), las cuales conforman el grupo 2, se encontró que sobresalen por los caracteres alométricos  $b$  y  $b'$ , debido a que los valores promedio de estos fueron superiores a los valores generales promedio, que además de estar altamente correlacionados con CP2, son caracteres poco variables (Tablas 4 y 5). Según Ryss (2003), en nematodos pertenecientes a la familia Pratylenchidae, el valor del carácter alométrico  $b$  se incrementa durante el crecimiento postembrionario, debido a la elongación del cuerpo. En este sentido, Roy *et al.* (2018) encontraron variabilidad en el carácter alométrico  $b$  en diferentes poblaciones de *R. similis* de la India, lo cual contrasta con los altos valores en estos caracteres para la población de Carepa, posiblemente debido a las condiciones específicas de ambiente y hospedante en esta región; los cuales pueden influir en el fenotipo resultante para esta población.

Finalmente, las hembras de *R. similis* de Palestina, las cuales conforman el grupo 3, sobresalieron por los caracteres morfométricos: longitud del cuerpo (L), diámetro del cuerpo en la base del estilete (DCE), longitud del esófago (LES) y longitud desde la región anterior (cabeza) hasta la región posterior de la glándula esofágica (LGE); debido a que los valores promedio de estos fueron superiores a los valores generales, los cuales además de estar altamente correlacionados con CP1 o CP2 son caracteres poco variables (Tablas 4 y 5). En el mismo sentido, Koshy *et al.* (1991), al estudiar la variabilidad morfométrica de diferentes poblaciones de hembras de *R. similis*, consideraron a los caracteres morfométricos L y LES poco estables debido a que estos oscilaron entre 4 y 10%, resultados que concuerdan con los obtenidos en este estudio (Tabla 5).

### **Variabilidad genética de *R. similis***

Para la secuenciación se seleccionaron los productos de PCR obtenidos con las parejas de iniciadores: RsITS4F / RsITS4R para la región ITS y las parejas Rs18S3F / Rs183R para la región 18S, correspondientes a las siete poblaciones de *R. similis*, para un total de 14 secuencias nucleotídicas (siete secuencias por cada región conservada). Sin embargo, solamente se analizaron 11 secuencias, debido a que tres de éstas, correspondientes a la región ITS de las poblaciones de Anserma y Belalcázar (Caldas) y Carepa (Antioquia) al analizarlas con el programa Sequencher 5.4 (Genes code corp., Ann Arbor, MI) resultaron con baja calidad de secuenciación, motivo por el cual se eliminaron del estudio.

### **Región ITS1-5.8S-ITS2**

El producto de PCR obtenido en las amplificaciones de la región ITS, para las siete poblaciones de *R. similis*, fue del tamaño esperado (Tabla 2). Al comparar las secuencias obtenidas en este estudio con las secuencias del banco de genes del NCBI, utilizando la herramienta BLASTn, se obtuvo un porcentaje de similitud del 99,7%

con la secuencia nucleotídica de la especie *R. similis*, proveniente de Costa Rica, código de acceso: HM212650.

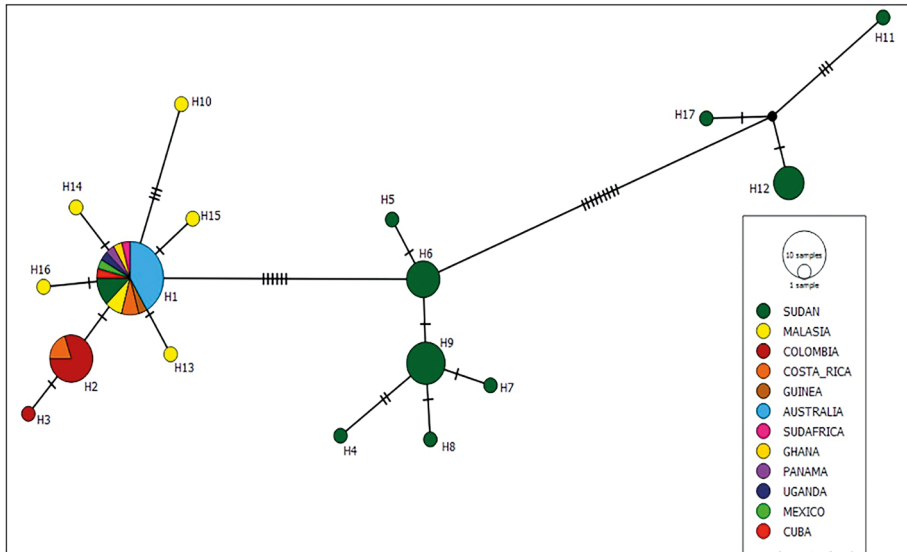
El análisis conjunto de las secuencias nucleotídicas (cuatro secuencias generadas en este estudio y 61 secuencias obtenidas del NCBI de la región ITS) mostró variabilidad intraespecífica en la especie *R. similis*. La construcción de la red haplotípica de la región ITS1-5.8S-ITS2 permitió identificar 17 haplotipos con una diversidad de  $H_d = 0,8202$ . La matriz de distancias entre haplotipos permitió establecer los porcentajes de diferenciación entre ellos, donde el valor más alto alcanzó 4,2% entre los haplotipos H10 y H11 (Figura 3).

Este resultado fue similar a reportado por Tan *et al.* (2010), el cual fue de 4,6% usando la misma región genómica. De igual manera, Múnera *et al.* (2010) al estudiar la relación filogenética de *R. similis* con las especies *R. arabocoffeae* y *R. duriophilus*, también encontraron variabilidad intraespecífica de *R. similis*, con un porcentaje máximo de diferenciación de 5,6% en secuencias nucleotídicas pertenecientes a la región ITS1 de diferentes poblaciones del nematodo, provenientes de varias regiones alrededor del mundo. En el mismo sentido, Elbadri *et al.* (2002) al estudiar la variabilidad de *R. similis* de aislamientos provenientes de Centroamérica, el Caribe, África y Europa, usando la región ITS, reportaron una diferencia genética máxima de 4%. Igualmente, Costa *et al.* (2008) también encontraron variabilidad intraespecífica de diferentes poblaciones de *R. similis* provenientes de Brasil, Australia, Cuba y Costa Rica, reportando una distancia genética máxima de 4,5%.

En la red haplotípica obtenida en esta investigación se detectó que H1 fue el haplotipo más común de la especie *R. similis*, debido a que se encontró en la mayoría de los países (Sudán, Malasia, Costa Rica, Guinea, Australia, Sudáfrica, Ghana, Uganda, Panamá, Cuba y México) (Figura 3), lo cual coincide con lo reportado por Tan *et al.* (2010).

La alta variabilidad genética de *R. similis* solo se observó en Sudán (África) y Malasia (Asia) debido a que, en estos países, además de hallarse el haplotipo ancestral (H1), también se encontró un mayor número de haplotipos, 10 en Sudán y seis en Malasia (Figura 3). Estos resultados coinciden con los de Tan *et al.* (2010), quienes también encontraron variabilidad genética en África con 20 haplotipos y Asia con 10 haplotipos, en el cual se incluyeron poblaciones de *R. similis* provenientes tanto de musáceas como de especies ornamentales. En el caso de África, Tan *et al.* (2010) proponen que esta situación probablemente se debe a que en este continente se introdujeron varias poblaciones del nematodo desde el Sudeste Asiático aún no identificadas; hipótesis con la que han coincidido otros autores como Fallas *et al.* (1995) y Plowright *et al.* (2013).





**Figura 3.** Red haplotípica con 17 haplotipos detectados para la región parcial ITS1-5.8S-ITS2 de *Radopholus similis*. Los círculos representan un único haplotipo, y su tamaño es proporcional al número de secuencias que comparten un mismo haplotipo. Las líneas transversales indican eventos mutacionales y los nodos negros representan a haplotipos no muestreados (H1 - H17= Haplotipo 1 - 17). Fuente: Autores.

En el caso de Centro América y el Caribe, se sabe que la variabilidad genética de *R. similis* es baja (Tan *et al.*, 2010). De acuerdo con los resultados de la red haplotípica realizada en este estudio, se puede establecer que las poblaciones de *R. similis* provenientes de países como Panamá, Cuba, Costa Rica y México comparten el haplotipo ancestral (H1), pero dos poblaciones de Costa Rica (códigos de acceso= HM212650 - HM212651) también comparten el haplotipo (H2), el cual se caracteriza por estar distribuido también en varias regiones de Colombia (Antioquia, Arauca, Caldas) (Figura 3).

En el caso específico de Colombia, los resultados demuestran que la variabilidad genética de *R. similis* en el país es baja, probablemente porque al contrario de lo ocurrido en África, solo una población del nematodo se introdujo a Centroamérica y el Caribe y a partir de esta se derivó el haplotipo colombiano (H2) (Figura 3). Las poblaciones de *R. similis* recolectadas en Caldas, Quindío y Antioquia del presente estudio, compartieron el mismo haplotipo (H2) junto con las poblaciones colombianas de Múnera *et al.* (2010), excepto la población “Uraba4” proveniente de Carepa, Antioquia (Código de acceso: GQ281456) (Múnera *et al.*, 2010), el cual corresponde a un único haplotipo (H3) derivado del haplotipo H2 en donde

la diferenciación entre ellos solamente está marcada por un evento mutacional (sustitución) (Figura 3); resultado que también encontraron Tan *et al.* (2010).

Adicionalmente, la poca variabilidad genética encontrada en las poblaciones de *R. similis* de Colombia posiblemente se deba a que una sola población del nematodo se introdujo a este país, lo cual se puede explicar históricamente con el establecimiento de las plantaciones bananeras en el continente americano a finales del siglo XIX y siglo XX, época en la cual países como Colombia y Costa Rica importaron de Jamaica y Panamá material de siembra de *Musa* AAA ‘Gros Michel’ y ‘Gros Michel Coco’; los cuales posiblemente ya estaban contaminados con *R. similis*. En los años 60, al remplazar estos materiales por *Musa* AAA del subgrupo Cavendish ‘Gran enano’ y ‘Valery’, susceptibles a *R. similis*, los daños provocados por el nematodo comenzaron a ser notorios (Marin *et al.*, 1998).

Sin embargo, la situación anterior no es la misma para todo el continente americano, debido a que Costa *et al.* (2008) mencionan que en Brasil la variabilidad genética encontrada en diferentes poblaciones de *R. similis* se debió posiblemente a que fueron introducidas desde África, donde se ha encontrado gran variabilidad genética del nematodo (Fallas *et al.*, 1995; Plowright *et al.*, 2013).

### Gen 18S del ARNr

El producto de PCR obtenido en las amplificaciones de la región parcial del gen 18S del ARNr para las siete poblaciones de *R. similis* fue del tamaño esperado (Tabla 2).

Al comparar las secuencias obtenidas con las secuencias del banco de genes del NCBI utilizando la herramienta BLASTn, se obtuvo un porcentaje de similitud que osciló entre 99,8 y 100% con la secuencia nucleotídica de la especie *R. similis*.

De la base de datos del banco de genes del NCBI se seleccionaron siete secuencias nucleotídicas correspondientes al gen 18S de la especie *R. similis*; las cuales estaban asociadas a un origen y hospedante de *Musa* conocido. Posteriormente, se realizó el alineamiento de las siete secuencias con las secuencias obtenidas en este estudio (siete secuencias); para un total de 14 secuencias analizadas; obteniendo un fragmento de alineamiento de 398 pb.

Debido a que las secuencias del gen 18S de *R. similis* registradas en la base de datos del NCBI son escasas, solamente se logró analizar un total de 14 secuencias de Colombia, siete obtenidas en este estudio y siete disponibles en el banco de genes del NCBI, depositadas por Múnera *et al.* (2010). Mediante alineamiento múltiple de las

secuencias se determinó que no había variabilidad intraespecífica entre las poblaciones de *R. similis* de Caldas, Antioquia, Arauca y Quindío, puesto que todas las secuencias fueron idénticas entre sí, excepto la secuencia “Uraba4” obtenida por Múnera *et al.* (2010) proveniente de Carepa, Antioquia (Código de acceso: GQ281456), la cual solamente mostró discrepancia en un nucleótido con respecto a las 13 secuencias restantes, resultado que también se obtuvo al analizar la región parcial ITS.

En conclusión, los caracteres morfométricos mostraron la existencia de variabilidad intraespecífica entre las poblaciones de *R. similis*; lo cual permitió distinguir a las de las poblaciones de Anserma y Belalcázar por tener esófagos más largos, las de Carepa por sus mayores valores alométricos  $b$  y  $b'$ , y las de Palestina por tener mayor longitud del cuerpo y diámetro en la región anterior en la base del estilete y con esófagos alargados. De igual manera, se demostró que no hubo variabilidad genética entre las poblaciones de *R. similis* de este estudio. Sin embargo, la red de haplotipos mostró variabilidad genética de las poblaciones colombianas de *R. similis* con respecto a las asiáticas y africanas.

## Agradecimientos

Agradecimiento especial a la Universidad de Caldas por el apoyo financiero bajo el Proyecto “Aprovechamiento agroindustrial de los excedentes de producción de plátano y banano en San José-Caldas” y el fondo nacional, Fondo de Ciencia, Tecnología e Innovación del Sistema General de Regalías bajo el proyecto “Implementación de estrategias para el fortalecimiento tecnológico de la actividad agropecuaria y la transformación de plátano en Caldas”.

## Referencias bibliográficas

- Agronet. (2022). Reporte: Área, Producción y Rendimiento Nacional por Cultivo. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1>
- Araya, M. (1995). Efecto depresivo de ataques de *Radopholus similis* en banano (*Musa* AAA). *Corbana*, 20(43), 3-6.
- Arboleda, F., Guzmán, A. y Mejía, L. (2012). Efecto de extractos cetónicos de higuierilla sobre el nematodo barrenador en condiciones *in vitro*. *Luna Azul*, 35, 28-48.
- Bird, A. F. y Bird, J. (2012). *The structure of nematodes*. Academic Press.
- Castillo-Russi, J., Araya-Vargas, M. y Patiño-Hoyos, L. (2010). Respuesta a la aplicación de nematocida en banano en la zona de Urabá, Colombia. *Agronomía Mesoamericana*, 21(2), 307-317.
- Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 17(4), 540-552.
- Cenibanano. (Centro de Investigaciones del Banano). (2018). Informe Cenibanano 2018.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). (2013). *Producción de material de “siembra” limpio en el manejo de las enfermedades limitantes de plátano*. CIAT.
- Costa, D., Falcão, G., Cares, J. y Gomes, A. (2008). Pathogenicity and genetic variability of *Radopholus similis* populations in bananos (*Musa acuminata* AAA and AA) based on RAPD analysis. *Nematologia Brasileira Piracicaba (SP) Brasil*, 32(4), 303-316.
- Edgar, R. C. (2004). Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.*, 32(5), 1792-1797
- Elbadri, G. A., Geraert, E. y Moens, M. (1999). Morphological differences among *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949 populations. *Russian Journal of Nematology*, 7(2), 139-153.
- Elbadri, A., De Ley, P., Waeyenberge, L., Vierstraete, A., Moens, M. y Vanfleteren, J. (2002). Intraspecific variation in *Radopholus similis* isolates assessed with restriction fragment length polymorphism and DNA sequencing of the internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA cistron. *International Journal for Parasitology*, 32, 199-205.
- Fallas, G. A., Sarah, J. L. y Fargette, M. (1995). Reproductive fitness and pathogenicity of eight *Radopholus similis* isolates on banana

- plants (*Musa* AAA v. Poyo). *Nematropica*, 25(2), 135-141
- FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations). (2004). *La economía mundial del banano 1985-2002*. FAO.
- Fogain, R. (2000). Effect of *Radopholus similis* on plant growth and yield of plantains (*Musa* AAB). *Nematology*, 2, 129-133.
- González, C., Aristizábal, M. y Aristizábal, J. (2007). Dinámica poblacional de nematodos fitopatógenos en plátano (*Musa* AAB) Dominicó Hartón. *Agronomía*, 15(2), 25-31.
- Gowen, S., Quénéhervé, P. y Fogain, R. (2005). Nematode parasites of bananas and plantains. En: M. Luc (Eds), *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture* (pp. 617-657). CABI publishing.
- Guzmán, Ó. y Castaño, J. (2020). *Nematodos fitoparásitos en cultivos tropicales. Manual de Diagnóstico*. Academia Colombiana de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. 281p.
- Guzmán, Ó. (2011). El nematodo barrenador (*Radopholus similis* [Cobb] Thorne) del banano y plátano. *Luna Azul*, 32, 137-153.
- Jarab, J. y Lozano, Z. (2008). *Meloidogyne* spp. asociados al cultivo de plátano (*Musa* AAB) en Tierralta y Valencia (Córdoba). *Temas Agrarios*, 12(2), 36-44.
- Jenkins, W. (1964). A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Report*, 48(9), 692.
- Kaur, H. y Attri, R. (2013). Morphological and morphometrical characterization of *Meloidogyne incognita* from different host plants in four districts of Punjab, India. *J. Nematol.*, 45(2), 122-127.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16(2), 111-120.
- Koshy, P. K., Jasy, T., Mathew, J. y Nampoothiri, C. K. (1991). Morphometric variability in *Radopholus similis*. *Indian Journal of Nematology*, 21(1), 24-38.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. y Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549.
- Lambert, K. y Bekal, S. (2002). Introduction to plant-parasitic nematodes. *The plant Health instructor*, 10, 1094-1218.
- Larsson, A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets. *Bioinformatics*, 30(22), 3276-3278.
- Leigh, J. W. y Bryant, D. (2015). Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9): 1110-1116.
- MADR (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural). (2017). *Cifras sectoriales cadena del cultivo de banano*. Sistema de Información de Gestión y Desempeño de Organizaciones de Cadena – SIOC. MADR.
- Marin, D., Sutton, T. y Barker, K. (1998). Dissemination of bananas in Latin America and the Caribbean and its relationship to the occurrence of *Radopholus similis*. *Plant Disease*, 82(9), 964-974.
- Meredith, J. (1973). *Algunos métodos de campo y laboratorio para trabajar con nematodos*. Maracaibo, Venezuela. p.44.
- Mgonja, D. M., Temu, G. E., Ndunguru, J. C., Mziray, M. F., Lyantagaye, S. L. y Luambano, N. D. (2020). Molecular approach to confirm traditional identification of sampled in Tanzania. *Journal of Nematology*, 52(20), 1-8.
- Múnera, G. (2008). *Biodiversity of phytoparasitic nematodes associated with Musaceae and fruit crops in Colombia* (Doctoral dissertation). Ghent University.
- Múnera, G., Bert, W. y Decraemer, W. (2009). Morphological and molecular characterisation of *Pratylenchus araucensis* n. sp. (Pratylenchidae), a root-lesion nematode associated with *Musa* plants in Colombia. *Nematology*, 11(6), 799-813.
- Múnera, G., Bert, W., Vierstraete, A., De La Peña, E. y Decraemer, W. (2010). Burrowing nematodes from Colombia and their relationship with *Radopholus similis* populations, *R. arabocoffeae* and *R. duriphilus*. *Nematology*, 12(4), 619-629.
- Perry, R. N. y Moens, M. (2013). *Plant nematology*. Cabi International. UK. 569 pp.
- Plowright, R., Dusabe, J., Coyne, D. y Speijer, P. (2013). Analysis of the pathogenic variability and genetic diversity of the plant-parasitic nematode *Radopholus similis* on bananas. *Nematology*, 15(1), 41-56.
- Roy, S., Roy, K., Sarkar, S., Rathod, A. y Hore, J. (2018). Intra-specific morphological and morphometric variability of *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949. *Journal of Applied and Natural Science*. 10(3): 841-846.
- Rozas, J. P., Librado, J. C., Sánchez, X. y Rozas, R. 2010. DnaSP version 5.10. 1 (Selfextracting file of 4.6 Mb). Universidad de Barcelona.
- Ryss, A. Y. y Wouts, W. M. (1997). The genus *Radopholus* (Nematoda: Pratylenchidae) from native vegetation in New Zealand, with descriptions of two new species. *Int. J. Nematol.*, 7, 1-17.
- Ryss, A. Y. (2003). Taxonomy, evolution and phylogeny of the genus *Radopholus* (didelphic species) according to morphological data, with a key to species (Nematoda: Tylenchida). *Zoosystematica Rossica*, 11(2002), 243-256.
- Sarah, J., Pinochet, J. y Stanton, J. (1996). El nematodo barrenador del banano *Radopholus similis* Cobb. Plagas de *Musa* – Hoja Divulgativa No. 1. (Diciembre, 1996). INIBAP.
- Sher, S. (1968). Revision of the genus *Radopholus* Thome, 1949 (Nematoda, Tylenchioidea). *Proc. Helminthol. Soc. Wash.*, 35, 219-237.
- Siddiqi, M. (2000). *Tylenchida: Parasites of plants and insects*. CABI Bookshop. UK. 834 pp.
- Sikora, R., Coyne, D. y Quénéhervé, P. (2018). Chapter 17: Nematode parasites of bananas and plantains. Pp. 617-657. In: R. Sikora, D. Coyne, J. Hallmann y P. Timper (Eds.), *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. CABI Publishing.
- Tan, M., Cobon, J., Aitken, E. y Cook, L. G. (2010). Support for the 'out-of-Southeast Asia hypothesis for the origin of Australian populations of *Radopholus similis* (Cobb, 1893) (Nematoda: Pratylenchidae). *Systematic Parasitology*, 77(3), 175-183.
- Taylor, A. L. (1969). The Fiji banana-root nematode, *Radopholus similis*. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.*, 36, 157-163.
- Thorne, G. (1961). *Principles of nematology*. McGraw-Hill Book Company, USA. 553 p.
- Valencia, R., Guzmán, O., Villegas, B. y Castaño, J. (2014). Manejo integrado de nematodos fitoparásitos en almácigos de plátano dominico hartón (*Musa* AAB Simmonds). *Luna Azul*, 39, 165-185.