

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA  
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**INFORME TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN**

**EVALUACIÓN DE ALGUNAS MODIFICACIONES A LOS MÉTODOS DE  
EXTRACCIÓN DE QUISTES EN UN SUELO FRANCO-ARCILLOSO  
INFESTADO CON *Globodera pallida* (Stone 1973)**

**Laboratorio de Nematología, Facultad de Ciencias Agroalimentarias,  
Universidad de Costa Rica**

**Danny Humphreys Pereira**

**Instituto Tecnológico de Costa Rica  
CARTAGO, 2006**

**EVALUACIÓN DE ALGUNAS MODIFICACIONES A LOS MÉTODOS DE  
EXTRACCIÓN DE QUISTES EN UN SUELO FRANCO-ARCILLOSO  
INFESTADO CON *Globodera pallida* (Stone 1973)**

Danny Humphreys Pereira<sup>1</sup>

**RESUMEN**

En enero del 2005, el laboratorio de nematología de la Universidad de Costa Rica diagnosticó la presencia de *Globodera pallida* en un cultivo de papa, ubicado en la zona Norte de Cartago. Esta plaga estaba ausente en Costa Rica, por lo tanto es necesario del uso de metodologías más rápidas y certeras, que le brinden al agricultor un diagnóstico eficiente, para que puedan avalar y continuar con su producción. Se evaluaron dos metodologías de extracción de quistes, utilizando el Fenwick modificado y una solución azucarada. Se tomaron muestras provenientes de un suelo franco-arcilloso, infestado con *G. pallida*. Se evaluó el efecto del tamaño y grado de humedad de la muestra de suelo en la recuperación de quistes, procesadas a través del método de extracción Fenwick. Con el método de extracción en solución azucarada, solo se determinó el tamaño de muestra, el cual las de 200 y 300 cm<sup>3</sup> no difirieron significativamente, siendo mayor la recuperación que la de 100 cm<sup>3</sup>. Con el Fenwick, la recuperación de quistes fue proporcional al tamaño de muestra, la de mayor promedio de quistes fue de 300 cm<sup>3</sup>, seguido por la de 200 cm<sup>3</sup> y finalmente la de 100 cm<sup>3</sup>. La humedad interfirió significativamente la recuperación, debido a que las muestras secas son más fáciles de disgregar con la presión del agua que las muestras húmedas.

**Palabras clave:** Quistes, extracción, solución azucarada, Fenwick, *G. pallida*.

---

<sup>1</sup> INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2006.

**EVALUACIÓN DE ALGUNAS MODIFICACIONES A LOS MÉTODOS DE  
EXTRACCIÓN DE QUISTES EN UN SUELO FRANCO-ARCILLOSO  
INFESTADO CON *Globodera pallida* (Stone 1973)**

**ABSTRACT**

In January 2005, the nematology laboratory of the University of Costa Rica diagnostic the presence of *Globodera pallida* in a potato field, located in the north zone of Cartago. This plague was absent in Costa Rica, therefore is necessary the use of quicker and accurate techniques, that offered the farmer an efficient diagnosis, so that they can validate and continue with their production. Two extraction techniques of cyst were evaluated, utilizing the modified Fenwick method and a sucrose solution. Samples were taken from a clay loam soil, infested with *G. pallida*. The effect of sample size and soil moisture level on recovery of cyst was evaluated, processing through the Fenwick extraction method. With the extraction method using a sucrose solution, only the sample size was determined, where the 200 and 300 cm<sup>3</sup> didn't have significant differences, being greater the recuperation than the 100 cm<sup>3</sup>. With the Fenwick, the cyst recovery was proportional to the sample size; the greater average of cyst was in the 300 cm<sup>3</sup>, followed by the 200 cm<sup>3</sup> and finally 100 cm<sup>3</sup>. The moisture had a significant effect in the cyst recovery since the dry samples are easier to break with high water pressure that the humid samples.

**Keywords:** cyst, extraction, sucrose solution, Fenwick, *G. pallida*

**EVALUACIÓN DE ALGUNAS MODIFICACIONES A LOS MÉTODOS DE  
EXTRACCIÓN DE QUISTES EN UN SUELO FRANCO-ARCILLOSO  
INFESTADO CON *Globodera pallida* (Stone 1973)**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico  
de Costa Rica como requisito parcial para optar al título de Bachiller  
en Ingeniería en Biotecnología.**

**Miembros del Tribunal**

---

**Ing. Luis Salazar Figueroa  
Asesor-UCR**

---

**M.Sc. Vladimir Villalba Velásquez  
Profesor Asesor-ITCR**

---

**Ing. Lorena Flores Chaves  
Lectora-UCR**

**DEDICATORIA**

**A mis padres, Julio y Maritza  
A mis hermanos, Erika y Jonathan**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Ing. Luis Salazar, por su excelente orientación, apoyo durante la investigación y transmisión de valiosos conocimientos.

Al M.Sc. Vladimir Villalba, por sus valiosas sugerencias durante la realización de esta investigación.

A la Ing. Lorena Flores por sus consejos y recomendaciones durante el proceso de la investigación.

A los asistentes del Laboratorio de Nematología de la Universidad de Costa Rica, Walter Solano y Zeidy Montero, por su apoyo técnico y valiosos consejos.

Al Dra. Ana Abdelnour por sus valiosos consejos.

Al Dr. Luis Gómez por aceptar a formar parte del jurado calificador.

A los profesores de la Escuela de Biología por la entrega de valiosos conocimientos.

A mi familia, mi padre Julio, mi madre Maritza, mis hermanos Erika y Tan, mi tía Sara y su familia, por su apoyo en todo momento.

A mis colegas, Marco, Kenneth y Marcia por compartir tantos momentos.

A mis amigas y amigos, por su apoyo incondicional.

A Dios por brindarme la oportunidad de seguir vivo y conocer a estas personas.

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	I
ABSTRACT.....	II
DEDICATORIA .....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
ÍNDICE GENERAL .....	VI
ÍNDICE DE CUADROS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS .....	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
III.A. BOTÁNICA DE LA PAPA .....	4
III.B. DISTRIBUCIÓN MUNDIAL DE <i>Globodera</i> spp. E IDENTIFICACIÓN EN COSTA RICA DE <i>G. pallida</i> .....	5
III.C. NEMATODOS FITOPARÁSITOS ASOCIADOS AL CULTIVO DE LA PAPA.....	6
III.D. CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO <i>Globodera</i> .....	6
III.D.1. Morfología y anatomía de <i>Globodera</i> spp.....	7
III.D.2. Ciclo de vida de <i>Globodera</i> spp.....	7
III.D.3. Dinámica poblacional y patogenicidad de <i>Globodera</i> spp.....	9
III.D.4. Hospederos e interacción con otros microorganismos.....	10
III.E. METODOS DE EXTRACCION DE QUISTES .....	11
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
IV.A. UBICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	14
IV.B. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS .....	14
IV.C. TRATAMIENTOS EVALUADOS POR EL MÉTODO DEL FENWICK.....	15
IV.C.1. Humedad y tamaño de las muestras.....	15
IV.C.2. Separación de quistes de los residuos orgánicos .....	17
IV.D. TRATAMIENTOS EVALUADOS POR EL MÉTODO DE REILLY Y GRANT, EMPLEANDO UNA SOLUCIÓN AZUCARADA .....	18
IV.F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	19
V. RESULTADOS .....	20
V.A. EFECTO DEL TAMAÑO Y HUMEDAD DE LAS MUESTRAS EN LA RECUPERACIÓN DE QUISTES, A TRAVÉS DEL MÉTODO DE FENWICK .....	20
V.B. EFECTO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA EN LA RECUPERACIÓN DE QUISTES, A TRAVÉS DEL MÉTODO DE REILLY Y GRANT .....	23
VI. DISCUSIÓN.....	24
VII. CONCLUSIONES .....	26
VIII. RECOMENDACIONES .....	27
IX. BIBLIOGRAFÍA .....	28

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características físicas y Químicas del suelo estudiado.....	14
Cuadro 2. Valores promedio del número de quistes de <i>Globodera pallida</i> , recuperados por el método de Fenwick en muestras de suelo sometidas a diferentes secados.....	20
Cuadro 3. Valores promedio del número de quistes de <i>Globodera pallida</i> , recuperados por el método de Fenwick utilizando tres volúmenes diferentes de suelo.....	22
Cuadro 4. Valores promedio del número de quistes de <i>Globodera pallida</i> , recuperados de tres volúmenes de suelo sometido a un secado al aire en el invernadero, utilizando el método de Reilly y Grant.....	23

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Quistes de <i>Globodera pallida</i> y <i>Globodera rostochiensis</i> en raíces de papa.....	8
Figura 2. Estructura del Fenwick.....	12
Figura 3. Extracción de quistes por el método de Fenwick. ....	16
Figura 4. Método de la acetona para la separación de quistes de la materia orgánica. ....	17
Figura 5. Extracción de quistes con solución azucarada. ....	19
Figura 6. Recuperación de quistes de <i>Globodera pallida</i> por el método Fenwick en muestras de suelo sometidas a diferentes secados.....	21
Figura 7. Recuperación de quistes de <i>Globodera pallida</i> en tres volúmenes de suelo utilizando el método de Fenwick.....	22
Figura 8. Recuperación de quistes de <i>Globodera pallida</i> en tres volúmenes de suelo utilizando el método de Reilly y Grant.....	23

## I. INTRODUCCIÓN

La papa es originaria de las tierras altas de Suramérica, donde ha sido consumida por más de 8000 años en las cercanías del Lago Titicaca, en la frontera entre Bolivia y Perú. Su cultivo ocupa el cuarto lugar de importancia en el mundo, después del maíz, trigo y arroz; esto debido a su contenido nutricional y a su siembra en diversos ambientes agroecológicos, destacando, las tierras bajas subtropicales, las zonas templadas, las tierras altas tropicales y subtropicales, y las tierras bajas mediterráneas y áridas (Franco 1994, Brenes *et al.* 2002, CIP 2002).

Una sola unidad mediana de papa contiene cerca del contenido diario de vitamina C requerido para un adulto, mientras que el arroz y el trigo no poseen esta vitamina. Además el tubérculo hervido tiene más proteína y casi el doble de calcio que el maíz. Es un alimento bajo en grasa, representando solo el 5 % de las grasas contenidas en el trigo y un cuarto de las calorías del pan (CIP 2002).

En el año 2004, la producción mundial de papa fue de 327.624.417 ton para un área de 18.630.196 ha. El continente Europeo es el mayor productor de este cultivo, con 8.012.282 ha para una producción de 140.715.659 ton, le sigue el continente Asiático con 129.133.030 ton. Centroamérica junto a Norte América representan el tercer lugar en la producción mundial de papa, con 28.392.649 ton en un área de 747.407 ha. África es el cuarto productor de papa en el mundo con 13.965.085 ton, luego están Suramérica con 13.714.214 ton y Oceanía con 1.703.780 ton (FAO 2005).

En Costa Rica, se produce papa en la provincia de Cartago representando el 85% de la producción nacional, seguido de Alajuela con 14% (Zarcero) y en menor cantidad, la zona de los Santos y Coronado. Estos agricultores están dedicados a la producción de semilla y consumo fresco (80% de la producción total) y el resto de la producción esta destinada para la industria (papa tostada). En el año 2004 se produjeron 76.435 ton de papa, en un área de 3.128 ha, sembradas por 1272 agricultores.<sup>2</sup>

---

<sup>2</sup> Brenes, A. 2005. Producción de papa en Costa Rica (comunicación personal). San José, CR, Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA), UCR.

El uso de insumos agrícolas por parte de los productores de papa, representan cerca del 70% de los costos de producción, el resto es el costo de la semilla (Flores *et al.* 2002). El control de plagas y enfermedades significa un 20% en los costos de producción, monto que posiblemente se incrementará debido al reciente hallazgo de uno de los nematodos más problemáticos en el cultivo de la papa como lo es *Globodera pallida*, encontrado en la principal zona productora de este cultivo en Costa Rica (García *et al.* 2005, Salazar *et al.* 2005). Esta especie junto con *G. rostochiensis* se citan en los países andinos como las responsables de pérdidas en rendimiento que van del 13.2 a 58.0% (Franco 1994).

Dadas las características biológicas de *G. pallida*, y el interés de los productores costarricenses por contar con semilla de papa libre del nematodo, así como el continuar incrementando las exportaciones de este cultivo, respetando las medidas fitosanitarias que para tal efecto se han establecido por parte del Ministerio de Agricultura y Ganadería, y en concordancia con las normas regionales e internacionales establecidas, ante la aparición de una plaga cuarentenaria, es que se plantea este trabajo con el objetivo de adaptar las metodologías existentes de extracción de quistes producidas para este nematodo, de tal forma que se pueda contar con métodos de diagnóstico rápidos y precisos, adaptados a nuestras condiciones. Lo anterior permitirá a los agricultores monitorear sus fincas periódicamente con el fin de tomar la medidas necesarias que le permitan no solo producir para consumo interno sino también exportar a otros países del área.

## **II. OBJETIVOS**

### **General**

Evaluar algunas modificaciones a los métodos de extracción de quistes de Reilly y Grant y al método de extracción que emplea el aparato de Fenwick.

### **Específicos**

1. Determinar la influencia del tamaño de muestra en la recuperación de quistes de *Globodera pallida*, utilizando el aparato de Fenwick.
2. Determinar la influencia que tiene la humedad de las muestras, sobre la recuperación de quistes de *G. pallida*.
3. Evaluar la eficacia del método de extracción de quistes, utilizando una solución azucarada.

### III. REVISIÓN DE LITERATURA

#### III.A. BOTÁNICA DE LA PAPA

La papa (*Solanum tuberosum*) es una especie con mucho polimorfismo, el cual esta compuesta por varios cultivares, que difieren tanto en sus características morfológicas, como de producción. La planta esta formada por tallos múltiples, que se ramifican y llegan a medir hasta 1.5 m de alto; los tallos son verdes o morados, dependiendo del cultivar, poseen forma cilíndrica o prismática, éste con aristas en las partes jóvenes, a veces prolongadas en alas angostas. Las hojas son compuestas, divididas en foliolos irregulares, cuyo número y tamaño es un carácter varietal (León 2000).

La inflorescencia es una cima terminal, que aparenta salir lateralmente por el crecimiento simpodial del tallo; dependiendo de la variedad las cimas se reducen a inflorescencias en forma de umbelas y en otros a unas pocas flores al extremo de un eje sencillo. Las flores nacen de pedúnculos delgados, el cual se abren primero son las apicales de la inflorescencia; la floración puede variar, de días a meses, dependiendo del cultivar. (León 2000).

En el nudo cotiledonal de la semilla, brotan dos o más rizomas, que al final desarrollan tubérculos diminutos; estos corresponden a un engrosamiento entre el penúltimo nudo del rizoma y su yema terminal; en el tubérculo se forman nudos u ojos en que las hojas están representadas por escamas (León 2000).

El tubérculo esta compuesto por la cáscara o periderma, formada de células alargadas en sentido tangencial; las más externas dan a la superficie características de los cultivares, como lisas y brillantes o aterciopelada; los tejidos corticales debajo del periderma contienen parénquima con almidón, taninos, proteínas y pigmentos; el resto del tubérculo esta formado por parénquima, separado en dos por los haces vasculares. Los ojos contiene una o más yemas, que dan origen a los tallos aéreos; la dominancia apical en el brotamiento de las yemas es muy marcada. La forma, color y textura del tubérculo va depender de la variedad, por ejemplo, las más avanzadas pueden ser elipsoidales a esféricos, con ojos escasos y superficiales, con cáscara lisa, blanca y rosada; los primitivos muestran una diversidad de formas y colores (León 2000).

### **III.B. DISTRIBUCIÓN MUNDIAL DE *Globodera* spp. E IDENTIFICACIÓN EN COSTA RICA DE *G. pallida*.**

Los nematodos formadores de quistes, *G. pallida* y *G. rostochiensis* se encuentran ampliamente distribuidos en los cinco continentes; en América los países con presencia de alguna de las dos especies son: Estados Unidos, Canadá, México, Costa Rica, Panamá, Colombia, Venezuela, Bolivia, Perú, Ecuador, Chile y Argentina. En Europa se ha identificado a *G. pallida* en países como Austria, Bélgica, Dinamarca, Francia, Alemania, Italia, Grecia, Hungría, Irlanda, Islandia, Luxemburgo, Malta, Holanda, Noruega, Portugal, Polonia, Rusia, Rumania, España, Suecia, Suiza y Turquía. En Asia se reporta a *G. pallida* en Chipre, India, Pakistán y Malasia. En África este nematodo se encuentra en Algeria y Tunes. Y en Oceanía se localiza solo en Nueva Zelanda (Turner y Evans 1998, Valerín 2003).

En Costa Rica, el primer hallazgo de uno de los nematodos del quiste de la papa, fue informado por Ramírez y Bianchini (1973), quienes indicaron la presencia de *G. rostochiensis* en 18 fincas de la provincia de Cartago entre los años 1972-1974. Sin embargo, en los siguientes años no se logró determinar su presencia y las pruebas de patogenicidad en dos variedades de papa fueron negativas (Ramírez 1979).

A inicios de enero del 2005, el laboratorio de Nematología de la Universidad de Costa Rica diagnosticó a través de un análisis morfológico la presencia de *G. pallida* en la provincia de Cartago (Salazar *et al.* 2005). Posteriormente el Laboratorio de Biotecnología del Centro de investigaciones Agronómicas confirmó por medio de técnicas moleculares, usando PCR que se trataba de *G. pallida* (García *et al.* 2005).

### **III.C. NEMATODOS FITOPARÁSITOS ASOCIADOS AL CULTIVO DE LA PAPA**

En Costa Rica, López y Azofeifa (1981) informaron asociados al cultivo de la papa la presencia de varios géneros de nematodos fitopatógenos, entre ellos, *Helicotylenchus*, *Tylenchus*, *Criconemoides*, *Trichodorus*, *Paratrichodorus*, *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Quinisulcius* y *Boleodorus*. Resultados similares fueron presentados por Fernández *et al.* (2002), quienes identificaron géneros como, *Criconemella*, *Helicotylenchus*, *Hemicycliophora*, *Meloidogyne*, *Paratylenchus*, *Pratylenchus*, *Tylenchorhynchus* y *Trichodorus*.

Actualmente unos de los problemas más serios en el cultivo de la papa, es el deterioro de la calidad de los tubérculos causados por *Meloidogyne incognita* y *M. hapla*, en cultivares de papa de uso muy generalizado como es Floresta, agregándose a esta problemática, la reciente aparición del nematodo formador de quistes *G. pallida*, ambos problemas en la Zona Norte de la provincia de Cartago (García *et al.* 2005, Salazar *et al.* 2005).

A nivel mundial, el cultivo de la papa es infectado por dos especies de nematodos formadores de quistes *Globodera rostochiensis* (Wollenweber 1923) y *G. pallida* (Stone 1973) llamados, el primero “nematodo dorado de la papa” y el segundo “nematodo blanco de la papa”. Ambos nematodos han coevolucionado con el cultivo de papa en Sudamérica por cientos de miles de años (Turner y Evans 1998).

### **III.D. CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO *Globodera*.**

Los nematodos del quiste de la papa (PCN) pertenecen al Phylum nematoda, al orden Tylenchida y a la familia Heteroderidae (Tacconi y Ambrogioni 1995). Estudios realizados por Turner y Evans (1998) indican que *G. rostochiensis* y *G. pallida* se separaron hace 10,000 a 90,000 años, sin embargo, recientes estudios moleculares demostraron que la separación se dio hace millones de años.

### ***III.D.1. Morfología y anatomía de Globodera spp.***

Las hembras de PCN son esféricas, sin cono terminal y miden entre 500-600  $\mu\text{m}$ , sin embargo, su tamaño es afectado por el huésped y por el nivel poblacional del nematodo, siendo más pequeñas cuando la población es elevada o el huésped se encuentra fuertemente dañado (Greco y Crozzoli 1995). La cutícula es delgada con líneas superficiales que forman un patrón reticular; poseen una vulva terminal y los huevos producidos son mantenidos dentro de la hembra. El macho adulto es móvil y vermiforme, tienen campos laterales de cuatro líneas y miden aproximadamente 1200  $\mu\text{m}$  de largo y 28  $\mu\text{m}$  de ancho (Baldwin y Mundo-Ocampo 1991, Greco y Crozzoli 1995). La forma de los quistes en las especies de *Globodera*, es variada, pueden ser redondeadas, ovoides, esféricas o en forma de pera (Morgan 1986).

Los juveniles de segundo estado poseen un estilete menor a 30  $\mu\text{m}$ , el cual cubre la cavidad o ancho del cuerpo; su cola es cónica, puntiaguda con la mitad de su parte terminal hialina; presentan fasmidios sin estructura de lentes, dispuestos en una capa muscular, por lo que se les considera puntiformes (Cepeda 1996)

### ***III.D.2. Ciclo de vida de Globodera spp.***

Los nematodos del quiste de la papa (PCN) se reproducen sexualmente; todos los huevos fertilizados se mantienen dentro del cuerpo de la madre, la que al morir sufre una serie de cambios como el engrosamiento de las paredes del cuerpo, formando un quiste protector (Figura 1) (Turner y Evans 1998, Whitehead 1998).



**Figura 1. Quistes de *Globodera pallida* y *Globodera rostochiensis* en raíces de papa.  
(Fuente: CIP 2002).**

Como la mayoría de nematodos, los PCN presentan cuatro estados juveniles, denominados J1, J2, J3 y J4 y un estado adulto, siendo el segundo estado juvenil (J2) el que invade el hospedero. Los J2 eclosionan en respuesta a exudados de las solanaceas, se orientan hacia los ápices de las raíces usando sus órganos sensoriales para detectar los gradientes químicos de los exudados radicales, luego penetran las raíces cerca de los ápices o lateralmente, penetrando las paredes de las células epidermales con el estilete. Finalmente se establecen con la cabeza cerca de la estela en células del periciclo, corteza y endodermis e inician su alimentación (Turner y Evans 1998, Whitehead 1998).

El estilete que es hueco, perfora las paredes celulares, en ocasiones penetran los estolones y tubérculos en desarrollo, quedándose debajo de la peridermis; los juveniles inducen a la formación de células grandes y multinucleadas alrededor de su cabeza, en respuesta a sustancias introducidas por medio del estilete; después de la cuarta muda, las hembras toman forma de pera y los machos forma vermiforme; los machos dejan las raíces y por estímulos químicos encuentran hembras jóvenes, la mayoría se encuentran en la superficie de las raíces, estolones y tubérculos (Turner y Evans 1998, Whitehead 1998).

Los quistes poseen entre 200 a 500 huevos, y pueden permanecer viables en el suelo por más de 15 años, sin embargo, la viabilidad puede declinar exponencialmente, a causa de ausencia de hospederos, depredación y factores ambientales, como las altas temperaturas. Usualmente se da una generación por cultivo de papa, debido a que los nuevos huevos deben pasar por un periodo de dormancia y necesitan de un lapso de temperaturas bajas en el suelo para romper esa dormancia. Algunos juveniles eclosionan antes que la hembra se vuelva quiste, siempre y cuando haya una adecuada humedad en el suelo, invadiendo nuevos tejidos y produciendo una segunda generación (Turner y Evans 1998, Whitehead 1998).

### ***III.D.3. Dinámica poblacional y patogenicidad de Globodera spp.***

En ausencia de hospederos, los nematodos formadores de quistes (PCN) pueden persistir en el suelo entre 20 a 30 años. Una vez que el segundo estadio juvenil se ha desarrollado dentro del quiste, estos entran en un período de dormancia, por lo que las condiciones ambientales no estimulan la eclosión, hasta que la dormancia haya terminado. Generalmente este período termina antes de la siguiente siembra de papa, además, la mayoría de juveniles entran en dormancia durante su primer año y luego bajo condiciones favorables, eclosionan. De ahí que las poblaciones de PCN introducidas a nuevas regiones se adaptan a diferentes estaciones climáticas, y entre 2 a 3 años se estabilizan en el cultivo hospedero (Turner y Evans 1998).

Muchos juveniles, en ausencia del hospedero, eclosionan espontáneamente, cuando las temperaturas del suelo y humedad son las adecuadas. En condiciones del continente Europeo, el rango de eclosión es de 30-33% anualmente. La temperatura del suelo repercute sobre la eclosión, por ejemplo, en suelos fríos la eclosión declina a un 18% y en suelos con temperaturas de 30 °C la eclosión puede alcanzar un 95%. La textura de los suelos también afecta la eclosión, en suelos arcillosos y limosos es de un 32% y en los arenosos esta arriba del 60% de eclosión. Los exudados radicales estimulan la eclosión entre un 60 a 80% (Turner y Evans 1998).

Una vez que los huevos eclosionan los juveniles dependen de sus reservas de energía para sobrevivir. El estado infectivo (J2) dura entre 6-11 días, bajo condiciones óptimas, por lo tanto deben encontrar rápidamente a sus hospederos. Los juveniles son atraídos hacia las raíces en respuesta a gradientes de diferentes estímulos, entre ellos se encuentran, el gradiente de dióxido de carbono, los que existen alrededor de las raíces, como, aminoácidos, iones, pH y los gradientes de azúcar (Perry 1998).

Las células que se encuentran en los ápices de las raíces son muy activas, están en constante crecimiento y desarrollo, además secretan diferentes exudados, más que en otras regiones de las raíces. Esta actividad se debe a la producción de fitohormonas, entre ellas las auxinas, que son detectadas por los anfidios de los nematodos.

Uno de los sitios de infección preferidos por los J2, son las zonas de elongación, esto a causa de los gradientes de potencial eléctrico. Una vez que los juveniles han penetrado las raíces, estos migran intracelularmente hasta el cilindro vascular, alimentándose de las células del periciclo, corteza y endodermis. El nematodo por medio del estilete inyecta saliva a las células, convirtiéndolas en células grandes, que sirven de reservorio para que el nematodo se desarrolle. Este daño ocasiona problemas en el transporte de agua y nutrimentos para el crecimiento de la planta (Cepeda 1996, Perry 1998).

#### ***III.D.4. Hospederos e interacción con otros microorganismos***

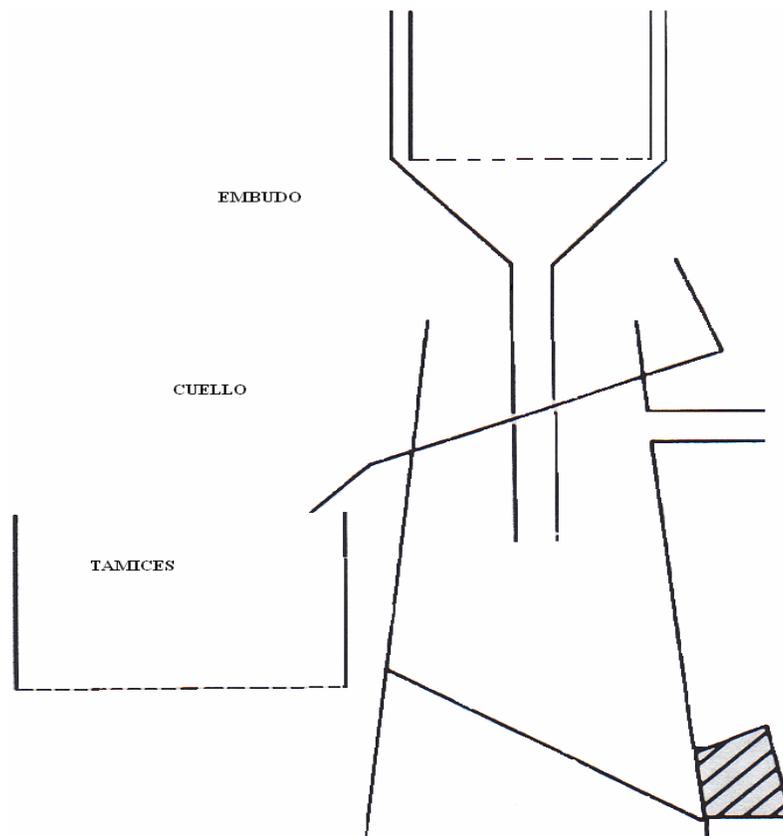
Whitehead (1998) menciona que *G. pallida* se multiplica en plantas de la familia Solanaceae, principalmente infecta al cultivo de papa (*S. tuberosum*), tomate (*Lycopersicum esculentum*) y berenjena (*S. melongena*), atacando además las especies silvestres de *Solanum* y *Lycopersicum*.

El daño mecánico causado por el nematodo formador de quistes, además de producir heridas en las raíces de la plantas, generan sitios de entrada para otros microorganismos como hongos y bacterias. Los rendimientos de papa disminuyen más, cuando en el cultivo están interactuando *Rhizoctonia solani* (costra negra) y el nematodo formador de quiste, que cuando está uno solo. Además se ha informado de la interacción entre *Verticillium dahliae* y el nematodo formador de quistes, aumentando este último la severidad de la enfermedad, conocida como muerte temprana (Turner y Evans 1998).

### **III.E. METODOS DE EXTRACCION DE QUISTES**

Uno de los métodos más importantes es el método de extracción Fenwick, creado en 1940 por D.W. Fenwick. Este consiste en un aparato hecho de acero, con una altura de 30 cm; este se estrecha hacia la cima y presenta una base inclinada; tiene un agujero de 2.5 cm de diámetro, ubicado en el lado mas bajo de la base inclinada, que se cierra con un tapón de caucho cuando se utiliza; debajo del borde del Fenwick hay un cuello inclinado con un borde vertical de 6 cm de alto; el cuello se estrecha hacia la salida hasta 4 cm de ancho; opcionalmente puede presentar un pequeño tubo de entrada a 5 cm de la cima, conectado al abastecimiento de agua para llenar el Fenwick; además posee un embudo grande de acero de 20.5 cm de diámetro, con un eje de 20.5 cm de largo, el cual en su interior posee un cedazo de 1 mm de abertura; de la salida del cuello se colocan tamices de 840  $\mu\text{m}$  y 250  $\mu\text{m}$  (Figura 2) (Shepherd 1986).

Inicialmente se llena el Fenwick con agua y se mojan los tamices; se coloca la muestra dentro del embudo, en el cedazo y se incorpora agua a presión; la materia orgánica y algunas partículas de suelo rápidamente flotan hasta el cuello y pasan a los tamices; utilizando este método se recuperan el 70% de los quistes (Shepherd 1986).



**Figura 2. Estructura del Fenwick**  
**(Fuente: Shepherd 1986)**

Un método de extracción de quistes para suelos arcillosos fue propuesto por Williamson, el cual incorporando agua hirviendo, haría que la muestra de suelo se disgregara. Esta se coloca en un juego de tamices de 2 mm, 850 y 250  $\mu\text{m}$ , y con agua hirviendo y una espátula se agita la muestra en el tamiz más alto. Seguidamente se elimina este tamiz y se continúa lavando con agua tibia. Finalmente se recogen los contenidos de cada tamiz y se colocan en beakers (Shepherd 1986).

Reilly y Grant (1985) establecieron una metodología de extracción de quistes de *Globodera tabacum solanacearum*, el que consiste en incorporar 400 cm<sup>3</sup> de una solución de sucrosa (1.37 densidad) a un beaker de 1 L contenido con 100 cm<sup>3</sup> de suelo, seguidamente se agita por 1 min y se deja reposar por 10 min. Luego el sobrenadante se pasa por en juego de tamices de 710, 250 y 38 µm y se lavan con agua para eliminar el exceso de sucrosa. Los quistes son recuperados del tamiz de 710 µm y los juveniles del tamiz de 38 µm, estos son colocados en tubos de centrifuga con la misma solución de sucrosa y se dejan reposar por 10 min. Finalmente, el sobrenadante se pasa por un tamiz de 38 µm y se enjuagan. Este método mejoró la obtención de quistes cuando la recolección de muestras se realizaban en períodos en que los niveles de quistes eran casi no detectables.

Para mejorar la eficiencia en la extracción de quistes se han realizado diferentes metodologías, por ejemplo, Shepherd (1986) recomienda para *Heterodera* y *Globodera* secar las muestras totalmente en un equipo de ventilación especial que pasa aire tibio a través de la muestra, luego se rompen las partículas grandes y se pasa por un tamiz de 4 mm de apertura. Finalmente se dividen en submuestras de 100, 200 ó 500 g y se procesan. Canto y González (1993) sugieren colocar el suelo en bandejas plásticas y secar a la sombra para no afectar la viabilidad de los huevos de *G. pallida* por los rayos ultravioleta, y luego dividir en muestras de 200 cm<sup>3</sup>.

Kim y Riggs (1995) evaluaron muestras directamente de campo, utilizando 100 g de suelo para realizar con equipos portátiles, un diagnóstico en el campo, y así reducir el trabajo que conlleva el procesado en el laboratorio y evitar el transporte de las muestras.

Riggs *et al.* (1997) utilizaron tamaños de 250 cm<sup>3</sup> y 500 cm<sup>3</sup> para extraer juveniles y quistes de *H. glycines*, probando diferentes métodos de empaque y transporte de muestras y demostraron que dichos tamaños no difirieron en la recuperación de quistes, pero si de juveniles.

LaMondia y Brodie (1987) en un suelo orgánico, inoculado con quistes de *G. rostochiensis* y *H. schachtii* demostraron que conforme aumentaba el tamaño de muestra a partir de 500 cm<sup>3</sup> hasta 2000 cm<sup>3</sup> disminuía la cantidad de quistes, debido a la presencia excesiva de materia orgánica.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### IV.A. UBICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Nematología de la Facultad de Ciencias Agroalimentarias perteneciente a la Universidad de Costa Rica, ubicado en San Pedro Montes de Oca, en la provincia de San José, durante el periodo entre Agosto y Noviembre del 2005.

### IV.B. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Se recolectaron muestras de suelo en una finca productora de semilla de papa, ubicada en la provincia de Cartago, en la localidad de Liebres, donde previamente se habían detectado niveles muy altos de infestación por *G. pallida*. Se seleccionaron diferentes puntos de la finca y se tomaron submuestras de suelo para formar una muestra compuesta, de aproximadamente 70 kg y se trasladó al laboratorio. En el laboratorio esta muestra se homogenizó muy bien para finalmente tomar las muestras que serían sometidas a los diferentes tratamientos. Las características físicas y químicas del suelo fueron analizadas por el laboratorio de suelos del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica. Los resultados se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Características físicas y Químicas del suelo estudiado.

Textura	Franco-arcilloso
Humedad gravimétrica	14.94 %
Materia orgánica	4.7 %
pH	5.5

## **IV.C. TRATAMIENTOS EVALUADOS POR EL MÉTODO DEL FENWICK**

### ***IV.C.1. Humedad y tamaño de las muestras***

Se evaluaron tres tratamientos antes de procesar el suelo por el Fenwick, descritos a continuación:

T1- Suelo seco al aire, durante 72 horas, en el invernadero.

T2- Suelo seco en una estufa a 70 °C, durante 5 horas.

T3- Suelo al natural (procesado con la humedad gravimétrica que traía la muestra del campo, 14.94%).

A través del fenwick se procesaron los siguientes volúmenes de muestra:

1- 100 cm<sup>3</sup> de suelo

2- 200 cm<sup>3</sup> de suelo

3- 300 cm<sup>3</sup> de suelo

Para evaluar la humedad y volumen de las muestras se emplearon 15 repeticiones. En la Figura 3 se muestra parte del procesamiento de las muestras empleando el método de Fenwick.



**Figura 3. Extracción de quistes por el método de Fenwick. A Incorporación de la muestra de suelo, B Dispersión de las partículas del suelo con agua a presión, C Flotación de quistes y materia orgánica hasta el cuello del Fenwick, D Recolecta en criba de 100 mesh.**

#### ***IV.C.2. Separación de quistes de los residuos orgánicos***

Los quistes y las partículas del suelo extraídos por el método de Fenwick se pasaron a placas petri de 9 cm de diámetro con acetona, para evitar que se diluyera esta con agua cuando se van a separar de la materia orgánica. Se colocaron en erlenmeyers de 250 cc de capacidad y se les incorporó 30 ml de acetona pura, se agitaron y luego se llenaron hasta 0.5 cm de la boca del erlenmeyer, con la misma acetona. Se dejaron reposar por 1 min y se recogieron con un pincel, posteriormente se pasaron a una placa petri de 3 cm de diámetro (Figura 4). Se dejó reposar hasta que la acetona se volatilizara y se realizó el conteo en un estereoscopio a un aumento de 19.5 X.



**Figura 4. Método de la acetona para la separación de quistes de la materia orgánica. A Incorporación de los quistes y de la materia orgánica al erlenmeyer con acetona, B Recuperación de quistes con pincel.**

#### **IV.D. TRATAMIENTOS EVALUADOS POR EL MÉTODO DE REILLY Y GRANT, EMPLEANDO UNA SOLUCIÓN AZUCARADA**

En este caso se escogió el tratamiento de menor costo y contenido de humedad, el cual consistió en secar previamente la muestra al invernadero por 72 horas.

Se evaluaron tres tratamientos, de acuerdo al tamaño de la muestra:

- 1- 100 cm<sup>3</sup> de suelo
- 2- 200 cm<sup>3</sup> de suelo
- 3- 300 cm<sup>3</sup> de suelo

En este caso se emplearon 15 repeticiones por cada tratamiento. El procedimiento seguido fue el siguiente: una vez secadas las muestras al aire, los tamaños de 100, 200 y 300 cm<sup>3</sup> se colocaron en beakers de 600 ml y se les incorporó 400 ml de solución azucarada con una densidad específica de 1.18 (471g sacarosa/1L agua). Se agitó por 1 min con una espátula y se dejó reposar por 10 min. Luego la solución azucarada con las partículas de suelo y quistes contenidas en el beaker se pasó a un tamiz de 100 mesh, realizando un movimiento rotatorio al beaker, con el fin de que los quistes no quedaran adheridos a las paredes. La solución se pasó por el tamiz hasta que el suelo depositado en el fondo del beaker empezara a pasarse. Posteriormente, se lavaron los quistes con agua a presión, para eliminar la solución azucarada. Finalmente, el material se pasó a placas petri y por el método de la acetona se separaron los quistes de la materia orgánica y se realizó el respectivo conteo en un estereoscopio a un aumento de 19.5 X (Figura 5).



**Figura 5. Extracción de quistes con solución azucarada. A Incorporación de muestra al beaker, B Agitación de muestra con solución azucarada por 1 min, C Reposo por 10 min, D Traspaso del sobrenadante a criba de 100 mesh.**

#### **IV.F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Fisher Alfa:  $\leq 0.05$ . Los datos fueron transformados en  $\sqrt{x}$  para su análisis.

## V. RESULTADOS

### V.A. EFECTO DEL TAMAÑO Y HUMEDAD DE LAS MUESTRAS EN LA RECUPERACIÓN DE QUISTES, A TRAVÉS DEL MÉTODO DE FENWICK

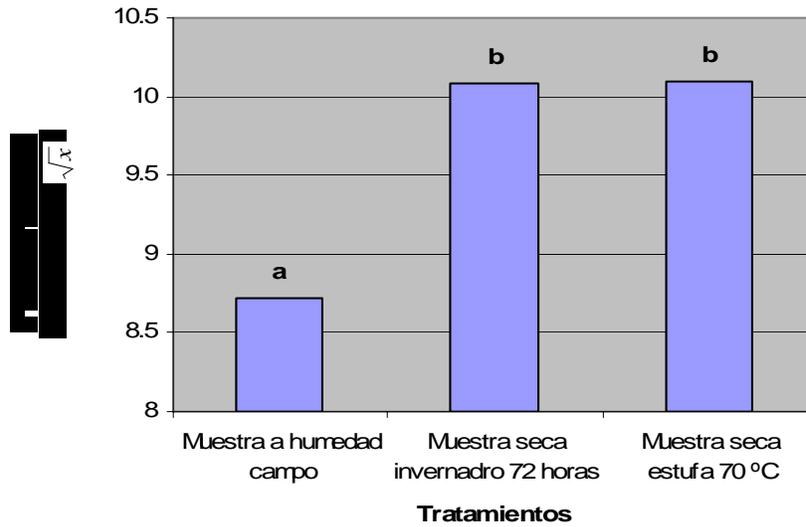
Los resultados obtenidos al someter las muestras de suelo a los tratamientos previos al procesamiento de las muestras por medio del aparato de Fenwick, se presentan en el cuadro 2, no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los valores promedios de las muestras que fueron sometidas a un secado al aire en el invernadero por 72 horas y los valores de las muestras que fueron secadas por medio de la estufa, durante 5 horas a 70 °C, pero si se encontraron diferencias estadísticas significativas entre estos dos tratamientos con respecto al tratamiento en donde las muestras fueron procesadas con la humedad que traían del campo. En la Figura 6 se muestran estos resultados en forma gráfica.

Cuadro 2. Valores promedio del número de quistes de *Globodera pallida*, recuperados por el método de Fenwick en muestras de suelo sometidas a diferentes secados.

Tratamientos	Nº Promedio de quistes <sup>1</sup>
Muestra seca (72 horas en el invernadero)	10,08 b*
Muestra seca (5 horas en estufa a 70 °C)	10,09 b
Muestra con humedad de campo	8,72 a

\*Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ), de acuerdo con la Prueba de Fisher. Los datos fueron transformados a  $\sqrt{x}$ .

<sup>1</sup>Promedio de 15 repeticiones.



**Figura 6. Recuperación de quistes de *Globodera pallida* por el método Fenwick en muestras de suelo sometidas a diferentes secados.**

En el cuadro 3 se presentan los valores promedio del número de quistes extraídos al procesar las muestras de suelo, con los diferentes volúmenes evaluados, por medio del aparato de Fenwick. En este caso se presentaron diferencias estadísticas significativas entre sí, en los valores promedio de los tres diferentes volúmenes de suelo evaluados, obteniéndose con el volumen de 300 cm<sup>3</sup> de suelo, la mayor cantidad de quistes y con el volumen de 100 cm<sup>3</sup> de suelo, la menor cantidad de quistes. En la figura 7 se muestran estos resultados en forma gráfica.

Cuadro 3. Valores promedio del número de quistes de *Globodera pallida*, recuperados por el método de Fenwick utilizando tres volúmenes diferentes de suelo.

Tratamientos	Nº Promedio de quistes <sup>1</sup>
100 cm <sup>3</sup> de suelo	8,09 a *
200 cm <sup>3</sup> de suelo	9,35 b
300 cm <sup>3</sup> de suelo	11,45 c

\*Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ), de acuerdo con la Prueba de Fisher. Los datos fueron transformados a  $\sqrt{x}$ .

<sup>1</sup>Promedio de 15 repeticiones.

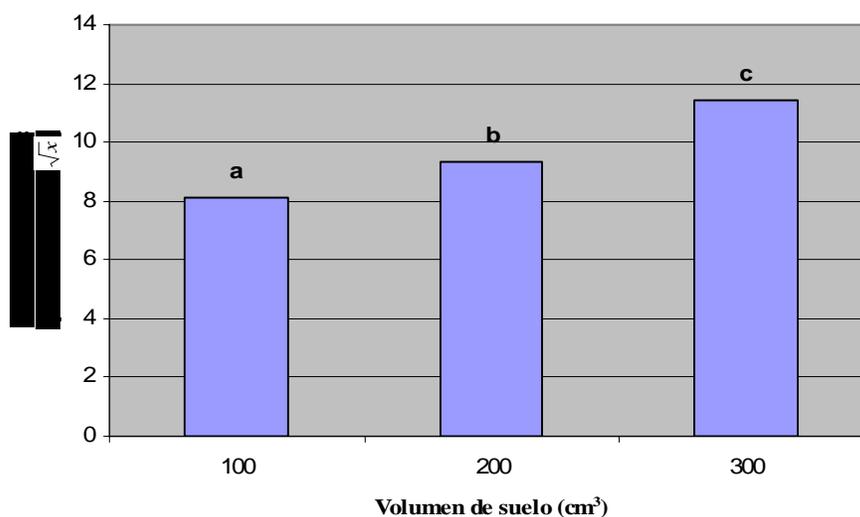


Figura 7. Recuperación de quistes de *Globodera pallida* en tres volúmenes de suelo utilizando el método de Fenwick.

## V.B. EFECTO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA EN LA RECUPERACIÓN DE QUISTES, A TRAVÉS DEL MÉTODO DE REILLY Y GRANT

En el cuadro 4 se presentan los valores promedio del número de quistes extraídos al procesar las muestras de suelo, de los diferentes volúmenes evaluados, por medio del método de Reilly y Grant, en donde las muestras fueron previamente secadas al aire en el invernadero, antes de ser procesadas. No se presentaron diferencias estadísticas significativas al comparar los valores promedio del número de quistes obtenidos en muestras de 200 y 300 cm<sup>3</sup> de suelo pero sí entre estos y el tratamiento en el que se proceso 100 cm<sup>3</sup> de suelo. En la Figura 8 se muestran gráficamente estos resultados.

Cuadro 4. Valores promedio del número de quistes de *Globodera pallida*, recuperados en tres volúmenes de suelo sometidos a un secado al aire en el invernadero, utilizando el método de Reilly y Grant.

Tratamientos	Nº Promedio de quistes <sup>1</sup>
100 cm <sup>3</sup> de suelo	6,13 a *
200 cm <sup>3</sup> de suelo	9,18 b
300 cm <sup>3</sup> de suelo	9,74 b

\*Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ), de acuerdo con la Prueba de Fisher. Los datos fueron transformados a  $\sqrt{x}$ .

<sup>1</sup>Promedio de 15 repeticiones.

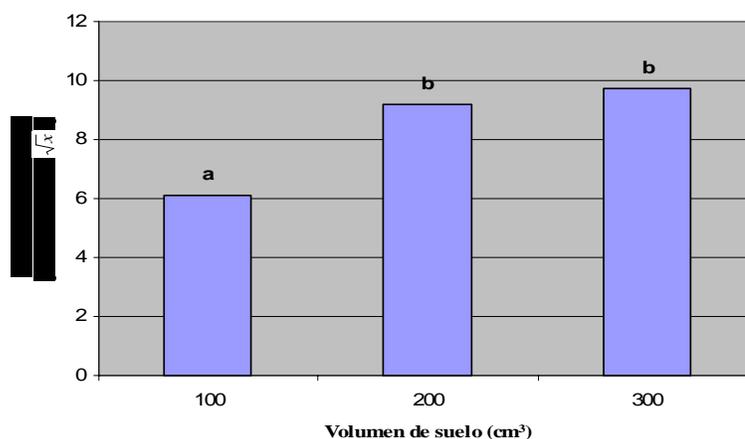


Figura 8. Recuperación de quistes de *Globodera pallida* en tres volúmenes de suelo utilizando el método de Reilly y Grant, para muestras secadas al invernadero.

## VI. DISCUSIÓN

El análisis de los resultados obtenidos al someter las muestras de suelo a los diferentes tratamientos de secado y posteriormente procesadas por el método de Fenwick, permite concluir, que el secado de las muestras bajo condiciones de invernadero por 72 horas, así como el tratamiento que involucró el uso de la estufa por 5 horas a 70 °C fueron los tratamientos más efectivos para obtener mayor recuperación de quistes de *G. pallida*. Comparando estos métodos, el primero tiene la ventaja de ser un método que no requiere de una estufa, lo que representaría una economía tanto en electricidad como en el costo del equipo, sin embargo recordemos que el secado al aire requiere espacio en el invernadero, cuyo tamaño dependerá del número de muestras, así como de una mayor cantidad de tiempo para la entrega de los resultados, estas consideraciones deberán tenerse en cuenta a la hora de decidir cual de los tratamientos se aplica a las muestras. Es además importante considerar que el tratamiento que involucra el uso de la estufa afectaría la viabilidad de los huevos contenidos dentro de los quistes, lo que representa una limitación si se pretende utilizar estos como inóculo viable para trabajos de investigación o enseñanza.

Al analizar los resultados relacionados al volumen de la muestra a procesar, se encontró que a mayor volumen de muestra mayor recuperación de quistes, esto utilizando el método de Fenwick. Estos resultados permiten tomar decisiones sobre el volumen de la muestra más conveniente a utilizar, sin dejar de tomar en cuenta el que al emplear una muestra de mayor volumen se tendrá al final una mayor cantidad de materia orgánica, lo que dificultará la separación y conteo de los quistes.

Al analizar los resultados utilizando el método de Reilly y Grant y sometiendo la muestra a secado al aire, bajo condiciones de invernadero, en forma previa al procesamiento, se encontró que, los tratamientos más efectivos para la recuperación de quistes de *G. pallida* fueron aquellos en donde el volumen de suelo empleado fue de 200 y 300 cm<sup>3</sup> de suelo, sin embargo, estos resultados fueron inferiores a los obtenidos cuando se procesaron las muestras de suelo con estos mismos volúmenes, por el método de Fenwick, lo que deja al método de Reilly y Grant como menos eficaz, adicionalmente este método presentó el inconveniente de que al aumentar el volumen de suelo, la cantidad de materia orgánica que se suspende junto a los quistes es muy alta, lo que dificulta la separación de los quistes.

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo permite obtener una nueva metodología, para el procesamiento de muestras que vengan de áreas en donde se sospeche o bien que estén infectadas por *G. pallida*, lo anterior representa una notable mejoría en el diagnóstico de problemas causados por este nematodo, así como en el procesamiento de muestras, con fines de investigación que se lleve a cabo a futuro.

## VII. CONCLUSIONES

Con el método de extracción de Fenwick, el grado de humedad de la muestra de suelo tiene una marcada interferencia con la recuperación de quistes, obteniendo una mayor cantidad de los mismos cuando menor sea la humedad de las muestras.

El volumen de la muestra de suelo utilizado por el método de Fenwick está directamente relacionado con la cantidad de quistes extraídos, a mayor volumen mayor recuperación de quistes.

El método de extracción de quistes de Reilly y Grant empleando una solución azucarada, es más eficaz cuando se emplean volúmenes de muestras de 200 y 300 cm<sup>3</sup> de suelo, en comparación con 100 cm<sup>3</sup> de suelo, lo anterior sometiendo las muestras a un secado al aire, previo al procesamiento. Sin embargo, éste método es menos eficaz en la recuperación de quistes que el método de Fenwick.

## VIII. RECOMENDACIONES

Evaluar por medio del método de Fenwick, suelos con texturas diferentes al empleado en este trabajo y utilizados en la siembra de papa.

Evaluar métodos que ayuden a separar con mayor facilidad los quistes de las partículas de materia orgánica, una vez procesadas las muestras.

Procesar muestras por los métodos de extracción Fenwick y el de Reilly y Grant, provenientes de suelos con bajas densidades del nematodo formador de quistes.

Ante la nueva problemática causada por *Globodera pallida* es necesario continuar esta investigación con el fin de adaptar los diferentes métodos de extracción de quistes y brindarle al productor un diagnóstico más rápido y certero.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Baldwin, J; Mundo-Ocampo, M. 1991. Heteroderinae, cyst and noncyst forming nematodes. *In* Nickle, W. Manual of agricultural nematology. New York, US. MARCEL DEKKER. p. 275-362.
- Brenes, A; Rivera, C; Vásquez, V. 2002. Principales enfermedades y plagas de la papa en Costa Rica. San José, CR. EUNED. 98 p.
- Brodie, B. 1998. potato cyst nematodes (*Globodera* species) in Central and North America. *In* Marks, R; Brodie, B. eds. Potatoes cyst nematodes: biology, distribution and control. Wallingford, UK. CAB INTERNATIONAL. p. 317-331.
- Canto, M; González, A. 1993. Uso de la gasolina para la separación de quistes de *Globodera pallida* y materia orgánica en muestras extraídas de suelo. *Nematrópica* 23(1): 57-61.
- Cepeda, M. 1996. Nematología agrícola. México, D.F. Editorial Trillas. 305 p.
- CIP (Centro Internacional de la papa). 2002. About potato (en línea). Lima, PE. Consultado 6 dic. 2005. Disponible en <http://www.cipotato.org/potato/potato.htm>
- CIP (Centro Internacional de la papa). 2002. Nematodos (en línea). Lima, PE. Consultado 6 dic. 2005. Disponible en [http://www.cipotato.org/potato/Pests\\_Disease/IPM/Pests/nema.htm](http://www.cipotato.org/potato/Pests_Disease/IPM/Pests/nema.htm)

- García, D; Salazar, L; Brenes, A; Gómez, L. 2005. Identification of the potato cyst-forming nematode in soil samples from Costa Rica by PCR. *In* XLV Congreso Anual de la Sociedad Americana de Fitopatología-Division 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, CR 108 p.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2005. Agricultural Data FAOSTAT (en línea). Consultado 1 dic. 2005. Disponible en <http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture>
- Fernández, O; Perlaza, F; Quesada, A. 2002. Nematodos asociados a los cultivos agrícolas de Costa Rica (en línea). San José, CR. Consultado 1 dic. 2005. Disponible en <http://www.protecnet.go.cr/plagas/listanematodos.htm>
- Flores, D; Barboza, S; Orozco, R. 2002. Guía para la producción de semilla prebásica y básica de papa en Costa Rica. San José, CR. EUNED. 33 p.
- Franco, J. 1994. Problemas de nematodos en la producción de papa en climas templados en la región andina. *Nematropica* 24(2):179-195.
- Greco, N; Crozzoli, R. 1995. Nematodos del quiste de la papa, *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida*: aspectos generales (en línea). *Fitopatología Venezolana* 8(2). Consultado 1 dic. 2005. Disponible en <http://www.redpav-fpolar.info.ve/fitopato/>
- Kim, D; Riggs, R. 1995. Portable cyst extractor: detecting cyst nematodos in the field. *Journal of Nematology* 27(1): 125-126.

- LaMondia, J; Brodie, B. 1987. Extraction of cyst nematodes from organic soils. *Journal of Nematology* 19(1): 104-107.
- León, J. 2000. *Botánica de los cultivos tropicales*. 3 ed. San José, CR. IICA. 485 p.
- López, R; Azofeifa, J. 1981. Reconocimiento de nematodos fitoparásitos asociados con hortalizas en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 5(1/2): 29-35.
- Morgan, A. 1986. Morphology and identification of cyst nematodes. *In* Lamberti, F; Taylor, C. eds. *Cyst nematodes*. New York, US. Plenum press. p. 23-45.
- Perry, R. 1998. The physiology and sensory perception of potato cyst nematodes, *Globodera* species. *In* Marks, R; Brodie, B. eds. *Potatoes cyst nematodes: biology, distribution and control*. Wallingford, UK. CAB INTERNATIONAL. p. 27-49.
- Ramírez, A. 1979. Muestreo poblacional del nematodo dorado (*Globodera rostochiensis*) y otros nematodos asociados al cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). *Agronomía Costarricense* 3(1): 13-20.
- Ramírez, A; Bianchini, R. 1973. El nematodo dorado (*Heterodera rostochiensis* Woll) en Costa Rica. San José, CR. Ministerio de Agricultura y Ganadería. 38 p.
- Reilly, J; Grant, C. 1985. Seasonal fluctuations of *Globodera tabacum solanacearum* as estimated by two soil extraction techniques. *Journal of Nematology* 17(3): 354-360.
- Riggs, R; Schmitt, D; Mauromoustakos, A. 1997. Comparisons of extraction and shipping methods for cyst and juveniles of *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology* 29(1): 127-132.

- 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-Division 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, CR 108 p.
- Shepherd, A. 1986. Extraction and estimation of cyst nematodes. In Southey, J. eds. Laboratory methods for work with plant and soil nematodos. 6 ed. London, GB. Ministry of Agriculture, Fisheries and food. p. 31-49.
- Tacconi, R; Ambrogioni, L. 1995. Nematodi da quarantena. Bologna, IT. Lo Scarabeo. 191 p.
- Turner, S; Evans, K. 1998. The origins, global distribution and biology of potatoes cyst nematodes (*Globodera rostochiensis* (Woll) and *Globodera pallida* Stone). In Marks, R; Brodie, B. eds. Potatoes cyst nematodes: biology, distribution and control. Wallingford, UK. CAB INTERNATIONAL. p. 7-26.
- Valerín, M. 2003. Principales plagas cuarentenarias para Costa Rica (en línea). San José, CR. Consultado 24 nov. 2005. Disponible en <http://www.protecnet.go.cr/plagas/1ListaCuarentenaWeb.pdf>
- Whitehead, A. 1998. Plant nematode control. London, UK. CAB INTERNATIONAL. 384 p.