

## EXTRACCION DE ALGUNOS NEMATODOS FITOPARASITOS MEDIANTE MODIFICACIONES DE LAS TECNICAS DE CENTRIFUGACION-FLOTACION Y EMBUDO DE BAERMANN MODIFICADO<sup>1</sup> /\*

Melvyn Alvarado-Soto\*\*  
Róger López \*\*

### ABSTRACT

Extraction of some plant-parasitic nematodes by modifications of the flotation-centrifugation and modified Baermann funnel techniques. The comparative efficiency of the modified Baermann funnel (MBF) and flotation-centrifugation (FC) nematode extracting methods, as well as some modifications, was evaluated. Modifications included sample size (50, 100 or 150 ml of soil), number of sample washings (1, 2 or 3), suspension time before washings (20, 40 or 60 s) and sieve arrangement (A = one 50 and two 325 mesh; B = one 100 and two 325 mesh, and C = one 100 and one 325 mesh) for both methods. Centrifugation time (3, 4 or 5 min at 3.000 rpm) and specific gravity of the sugar solution (1.12, 1.15 or 1.18) were evaluated for the FC technique only. With the MBF method significantly higher densities of *Helicotylenchus* sp., *Trichodorus* sp. and *Rotylenchulus reniformis* were recovered with 50 cc soil samples, and significantly more *Helicotylenchus* sp. and *R. reniformis* were recovered with 3 washings and the B sieve arrangement, respectively. With the FC method, significantly higher densities of *Helicotylenchus* sp. were extracted by the 50 ml sample size, 60 s of suspension before washings, 4 min of centrifugation and 1.15 specific gravity.

### INTRODUCCION

En Costa Rica los daños causados por nematodos fitoparásitos cobran cada día mayor importancia debido a la cantidad de cultivos que se ven afectados, tanto en su rendimiento como en su calidad (3, 8, 9). Recientemente se ha encontrado que los métodos de extracción afectan la determinación de las densidades de los nematodos y la

precisión de los análisis (1). Con el fin de obtener una mayor información acerca del efecto de algunas modificaciones de los métodos de extracción tradicionales sobre la recuperación de otros nematodos comúnmente encontrados en nuestros suelos, se llevó a cabo esta investigación.

### MATERIALES Y METODOS

Se colectó muestras de suelo en una serie de plantaciones donde previamente se había detectado infestaciones de ciertos nematodos fitoparásitos; éstas fueron trasladadas posteriormente al laboratorio donde fueron homogeneizadas y cuarteadas hasta obtener las submuestras correspondientes.

En el Cuadro 1 se presentan algunas características de los suelos utilizados en este estudio. Las especies de nematodos y los sitios donde se colectaron fueron los siguientes: *Criconemella* sp. en

1/ Recibido para su publicación el 14 de enero de 1985.

\* Parte de una tesis de grado presentada por el primer autor ante la Escuela de Fitotecnia de la Universidad de Costa Rica.

\*\* Laboratorio de Nematología, Escuela de Fitotecnia, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

Palmira de Alfaro Ruiz (C-P); *Helicotylenchus* sp. en Santa Ana (H-SA); *Trichodorus* sp. y *Heterodera* sp. en Zarcero de Alfaro Ruiz (Tr-ZAR y

He-ZAR, respectivamente) y *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira en Orotina (Rr-O). Los hospedantes donde se encontraron fueron, respectivamente: pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hochst.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), papa (*Solanum tuberosum* L.) y papaya (*Carica papaya* L.).

Cuadro 1. Algunas características de los suelos donde fueron colectadas las especies de nematodos con que se evaluó la eficacia de ciertas modificaciones de dos métodos de extracción.

Características	Localidad			
	Palmira de Alfaro Ruiz	Santa Ana	Zarcero de Alfaro Ruiz	Orotina
Nombre textural	franco arenoso	franco arcilloso	franco arcillo arenoso	franco arcilloso
Arena (%)	48,5	35,1	36,8	39,7
Limo (%)	25,9	32,1	27,8	25,6
Arcilla (%)	25,6	32,8	35,4	34,7
Materia orgánica (%)	6,3	4,2	3,2	2,8
H <sub>2</sub> O	6,1	6,4	6,0	5,9
pH				
KCL	5,3	5,6	5,0	5,1
Sub-Orden	Andept	Ustropept	Andept	Ustropept

Se comparó la eficacia de dos métodos de extracción de nematodos del suelo para cada una de las especies mencionadas previamente. Estos métodos fueron el de centrifugación-flotación en solución azucarada y el del embudo de Baermann modificado por Christie y Perry, de acuerdo con las descripciones dadas por Alvarado y López (1). Las variables evaluadas con cada método de extracción, las comparaciones entre métodos, el diseño experimental y el análisis estadístico utilizados ya fueron descritos en un trabajo previo (1).

## RESULTADOS

### Embudo de Baermann modificado (EBM)

En el Cuadro 2 se presenta el efecto del tamaño de la muestra, del número de lavados de la muestra, del tiempo de suspensión antes de los lavados y del arreglo de las cribas sobre el número promedio de cada especie, extraído por la técnica

Cuadro 2. Influencia de ciertas modificaciones sobre el número promedio de algunos nematodos fitoparásitos recuperados por la técnica del Embudo de Baermann modificado.

Especie de* nematodo	Tamaño de muestra (ml)			Números de lavados			Tiempo de suspensión (s)			Arreglo de Cribas***		
	50	100	150	1	2	3	20"	40"	60"	A	B	C
C-PZ	5 a**	3 a	3 a	5 a	6 a	5 a	6 a	4 a	6 a	5 a	6 a	4 a
H-SA	215 a	174 a	80 a	418 b	505 ab	647 a	258 a	283 a	219 a	592 a	809 a	819 a
He-ZAR	26 a	36 a	40 a	46 a	45 a	55 a	46 a	40 a	20 a	50 a	45 a	46 a
Tr-ZAR	29 a	20 a	9 b	51 a	48 a	51 a	48 a	33 a	42 a	45 a	40 a	38 b
Rr-O	1020 a	790 ab	605 b	1225 a	1289 a	1444 a	1702 a	1600 a	1865 a	1245 ab	1349 a	689 b

\* C-PZ (*Criconebella* sp. de Palmira de Zarcero); H-SA (*Helicotylenchus* sp. de Santa Ana); He-ZAR (*Heterodera* de Zarcero de Alfaro Ruiz); Tr-ZAR (*Trichodorus* sp. de Zarcero de Alfaro Ruiz); Rr-O (*Rotylenchulus reniformis* de Orotina).

\*\* Promedio de cinco repeticiones. Promedios en una misma línea para una misma variable, seguidos por una misma letra, no difieren significativamente entre sí de acuerdo con los resultados de la prueba de amplitud múltiple de Duncan ( $P=0,05$ ). Densidades promedio expresadas en número de nematodos/100 ml de suelo.

\*\*\* A: 50-325-325 mesh; B: 100-325-325 mesh; C: 100-325 mesh.

EBM. Se encontró que con un volumen de 50 ml se recuperaron significativamente más H-SA, Tr-ZAR y Rr-O que con 150 ml; al estimar la tendencia de recuperación de estas especies se encontraron efectos lineales negativos, definidos respectivamente por las ecuaciones  $Y = 12,27 - 14,24X_1$ ,  $Y = 4,28 - 5,93X_1$  y  $Y = 28,21 - 18,36X_1$ .

En cuanto a las otras comparaciones del tamaño de la muestra, con respecto a las especies restantes no hubo diferencias significativas.

Por otra parte, se obtuvo una cantidad significativamente mayor de H-SA con 3 lavados que con uno solo; el número de lavados tuvo un efecto lineal positivo en la recuperación de H-SA, definido por la ecuación  $Y = 16,1 - 8,81X_1$ .

No se encontró diferencias significativas en cuanto a las otras comparaciones del número de lavados para las especies restantes. Para las comparaciones del tiempo de suspensión no hubo diferencias significativas en la extracción, aunque se obtuvo mayor recuperación con un tiempo de suspensión de 20 s. Se recuperó una densidad significativamente mayor de Rr-O con el arreglo de cribas B (una de 100 y dos de 325 mesh) que con el C (una de 100 y una de 325 mesh). En las otras comparaciones del arreglo de cribas no se encontró diferencia significativa alguna.

### Centrifugación-flotación en solución azucarada (CF)

La influencia del tamaño de la muestra, del número de lavados, del arreglo de cribas, del tiempo

de suspensión antes de los lavados, de la gravedad específica de la solución azucarada y del tiempo de centrifugación sobre la extracción de los nematodos por el método CF se presenta en el Cuadro 3.

Para las comparaciones del número de lavados no hubo diferencias significativas en la extracción de los nematodos estudiados. Se recuperó significativamente más H-SA con un volumen de 50 ml que con 100 o 150 ml; en este caso se encontró un efecto lineal negativo, definido por la ecuación  $Y = 14,43 - 12,06X_1$ . En cuanto a las otras comparaciones del tamaño de la muestra en las restantes especies, no hubo diferencias significativas. Se encontró que con 60 s de suspensión antes de los lavados se recuperaron significativamente más H-SA que con 20 s; al estudiar su comportamiento en la recuperación, se encontró un efecto lineal positivo, definido por la ecuación  $Y = 3,44 + 4,15X_1$ . Se recuperó significativamente más Tr-ZAR con un tiempo de suspensión de 40 s que con 20 s. No se encontró diferencias significativas en cuanto a las otras comparaciones del tiempo de suspensión.

En lo concerniente al arreglo de cribas, con el A (una de 50 y dos de 325 mesh) se recuperaron significativamente más He-ZAR que con el B. No se encontró diferencias significativas en cuanto a las otras comparaciones del arreglo de cribas para las otras especies.

Se recuperaron significativamente más H-SA con un tiempo de centrifugación de 4 min que con 5 min; el comportamiento en la recupera-

Cuadro 3. Efecto de ciertas modificaciones sobre el número promedio de algunos nematodos fitoparásitos recuperados por la técnica centrifugación-flotación.

Especie de nematodo	Tamaño de muestra (ml)			Número de lavados			Tiempo de suspensión (s)			Arreglo de Cribas***			Tiempo de Centrifugación (min)			Gravedad específica de la solución azucarada		
	50	100	150	1	2	3	20"	40"	60"	A	B	C	3'	4'	5'	1.12	1.15	1.18
C-PZ	25a**	25a	32a	21a	22a	21a	12a	12a	12a	12a	10a	11a	8a	8a	8a	9a	10a	12a
H-SA	289a	200b	148b	577a	730a	758a	549b	751ab	854a	647a	823a	864a	652ab	863a	554b	119b	845a	798a
He-ZAR	58a	46a	42a	123a	124a	128a	147a	143a	113a	257a	172b	202ab	143a	116b	96a	119a	111a	117a
Tr-ZAR	3a	4a	7a	10a	10a	11a	7b	13a	11ab	8a	10a	8a	9a	7a	7a	7a	7a	9a
Rr-O	1268a	1219a	624a	1040a	1280a	1520a	1830a	1848a	1688a	1163a	1290a	1290a	787a	1042a	613a	1220a	1059a	1117a

\* C-PZ (*Criconemella* sp. de Palmira de Zarcero); H-SA (*Helicotylenchus* sp. de Santa Ana); He-ZAR (*Heterodera* sp. de Zarcero de Alfaro Ruiz); Tr-ZAR (*Trichodorus* sp. de Zarcero de Alfaro Ruiz); Rr-O (*Rotylenchulus reniformis* de Orotina).

\*\* Promedio de cinco repeticiones. Promedios en una misma línea para una misma variable, seguidos por una misma letra, no difieren significativamente entre sí de acuerdo con los resultados de la prueba de amplitud múltiple de Duncan ( $P = 0,05$ ). Densidades promedio expresadas en número de nematodos/100 ml de suelo.

\*\*\*A: 50-325-325 mesh; B: 100-325-325 mesh; C: 100-325 mesh.

ción tuvo un efecto cuadrático, definido por la ecuación  $Y = 18,49 - 3,59X_1 - 55,7X_2$ . Se obtuvo una cantidad significativamente mayor de H-SA con una gravedad específica de 1,15 que con una de 1,12. En este caso se obtuvo un efecto cuadrático, definido por la ecuación  $Y = 16,85 + 24,99X_1 - 9,34X_2$ . Para las otras comparaciones del tiempo de centrifugación y gravedad específica, no se encontró diferencia significativa alguna, pero se obtuvo una mayor recuperación de nematodos con un tiempo de centrifugación de 3 min y una gravedad específica de la solución azucarada de 1,18.

Los valores promedio de recuperación obtenidos en la comparación de las técnicas de extracción, para cada una de las especies de nematodos evaluadas, se presentan en el Cuadro 4. En la comparación de la eficacia de extracción de las técnicas, se obtuvo densidades significativamente mayores con la técnica CF que con la del EBM, para todas las especies estudiadas, excepto Tr-ZAR.

#### DISCUSION

Los resultados obtenidos en este trabajo en cuanto al tamaño de la muestra coinciden con los obtenidos previamente (1), ya que con muestras de 50 ml se recuperaron relativamente mayores densidades de nematodos que con las de 100 o 150 ml. Pareciera que en este caso es también aplicable la explicación de que posiblemente es más fácil dispersar las partículas al usar un volumen de suelo relativamente pequeño, lo que podría permitir a los nematodos liberarse con mayor facilidad; al igual que en el caso anterior (1), se observó también que el volumen del residuo de suelo retenido en las cribas fue menor cuando se utilizó con muestras de 50 ml, lo que posiblemente incrementó o facilitó la recuperación de los nematodos.

En lo concerniente al número de lavados de la muestra, en la mayoría de los casos no hubo un efecto estadísticamente significativo de ellos sobre la densidad de nematodos que fue recuperada; sin embargo, pareciera haber cierta relación entre el tipo de suelo, el número de lavados y la tendencia en cuanto a la recuperación de los nematodos. Así, por ejemplo, en suelos relativamente pesados como el de Santa Ana hubo incremento en cuanto al número de nematodos recuperados cuando se hicieron 3 lavados en comparación con los casos en que se hizo sólo uno; es posible que en los suelos pesados se necesite dispersar las partículas más de una vez para que se libere una mayor cantidad de

**Cuadro 4.** Eficacia comparativa de los métodos centrifugación-flotación (CF) y embudo de Baermann modificado (EBM) en la recuperación de algunos nematodos fitoparásitos.

Especie de nematodo	Método de extracción	
	EBM	CF
<i>Criconemella</i> sp.	4 b*	28 a
<i>Helicotylenchus</i> sp.	151 b	208 a
<i>Heterodera</i> sp.	24 b	51 a
<i>Trichodorus</i> sp.	18 a	5 b
<i>Rotylenchulus reniformis</i>	196 b	1066 a

\* Densidades expresadas en número de nematodos/100 ml suelo. Promedio de cinco repeticiones. Promedios en una misma línea, seguidos por una misma letra, no difieren significativamente entre sí, de acuerdo con los resultados de la prueba de amplitud de Duncan ( $P=0,05$ ).

nematodos. Por el contrario, en suelos relativamente livianos como el de Palmira de Alfaro Ruiz, en que relativamente pocos residuos quedan en las cribas después del primer lavado, el lavar aún más la muestra podría ocasionar una disminución del número de nematodos retenidos, por cuanto el volumen de agua que pasa a través de las cribas en cada lavado podría arrastrar a cierto número de ellos, al haber poco material de suelo al que éstos podrían quedar adheridos en las cribas.

En relación al tiempo de suspensión antes de los lavados, y por la técnica de extracción CF, en la mayoría de los casos en que hubo diferencias significativas entre tratamientos se observó que conforme aumentaba el tiempo de suspensión se incrementaba la extracción de los nematodos. Esto podría también atribuirse a la cantidad de partículas de suelo en suspensión ya que conforme pasa el tiempo éstas disminuyen, y el volumen de suelo retenido en las cribas también disminuye, lo que podría facilitar y/o incrementar la recuperación de los nematodos.

Con los diferentes arreglos de cribas evaluados, en el caso del método EBM, sólo se afectó significativamente la extracción de *Rr-0*, y con la técnica CF sólo la de *He-ZAR*; el comportamiento obtenido en cada caso fue diferente, lo que dificultó el encontrar una explicación satisfactoria para cada uno.

Resultados similares a los encontrados en esta investigación con relación al tiempo de centrifugación han sido obtenidos previamente (1), ya que con 4 min se recuperó la mayor densidad de *H-SA*; sin embargo, la prolongación del tiempo de centrifugación redujo su extracción. Parece también que en este caso la explicación del resultado está directamente relacionada al género *Helicotylenchus*; Alvarado y López (1) encontraron lo mismo con relación a otra especie de este género, lo que aunado a los resultados obtenidos aquí, pareciera reforzar la hipótesis de que la gravedad específica de *Helicotylenchus* sp. es más alta que la de los otros nematodos estudiados, por lo que al aumentar la gravedad específica de la solución azucarada se puede recuperar una mayor cantidad de especímenes.

Al comparar entre sí las dos técnicas de extracción de nematodos que se evaluaron, se encontró que la técnica CF fue la más eficaz de las dos en la recuperación de todas las especies evaluadas, excepto *Trichodorus* sp.; este nematodo fue recuperado en mayores densidades con la técnica EBM. En este caso en particular, este comportamiento podría deberse a la relativa gran movilidad de los nematodos de este género (L.A. Salas, comunicación personal, 1980).

En general, varios autores (1, 2, 4, 5, 6, 7, 10, 11) han obtenido resultados similares a los encontrados en este trabajo al comparar la eficacia de CF y EBM. Este último método para la extracción de nematodos depende de la movilidad, y ésta, a su vez, puede ser afectada por varios factores, tales como la temperatura, la falta de oxígeno en el embudo, la obstrucción de las aberturas del fondo de tela del cilindro utilizado, etc. Todas estas variables pueden disminuir la densidad de nematodos recuperados de una muestra de suelo. En cuanto a la técnica CF, el principio básico en que se apoya esta técnica es la gravedad específica de los nematodos, que permite separarlos de partículas más densas mediante la flotación en una solución azucarada. En este caso los nematodos pueden ser recuperados aún cuando están inactivos, lo que posiblemente explique, al menos parcialmente, la mayor recuperación obtenida por este método.

## RESUMEN

Se evaluó la eficacia de los métodos centrifugación-flotación y embudo de Baermann modificado, así como variantes de los mismos, para la extracción de algunos nematodos fitoparásitos habitantes del suelo. Con ambas técnicas de extracción se evaluó la influencia del volumen de la muestra (50, 100 o 150 ml), del número de lavados de la muestra (1, 2 o 3), del tiempo de suspensión de la muestra antes de los lavados (20, 40 o 60 s) y del arreglo de cribas (A = una de 50 y dos de 325 mesh; B = una de 100 y dos de 325 mesh, y C = una de 100 y una de 325 mesh). Además se evaluó el tiempo de la solución azucarada (1,12, 1,15 y 1,18) con la técnica CF. Con el método EBM se recuperó significativamente más *Helicotylenchus* sp., *Trichodorus* sp. y *Rotylenchulus reniformis* al utilizar muestras de 50 ml. El lavado de las muestras por 3 veces permitió recuperar densidades significativamente mayores de *Helicotylenchus* sp. Con el arreglo B de cribas se extrajo una mayor densidad de *R. reniformis*.

Con la técnica CF se extrajo densidades significativamente mayores de *Helicotylenchus* sp. con los tratamientos que incluían 50 ml de volumen de muestra, 60 s de suspensión antes de los lavados, 4 min de centrifugación y una solución azucarada con 1,15 de gravedad específica. También se recuperaron densidades significativamente mayores de *Trichodorus* sp. y *Heterodera* sp. con 40 s de suspensión y el arreglo A de cribas, respectivamente. El método CF fue estadísticamente superior al EBM en la extracción de todas las especies de nematodos evaluadas, excepto *Trichodorus* sp.

## AGRADECIMIENTO

Los autores desean agradecer a la Srta. Marcela Rodríguez S. y a la Sra. Dinorah de Arauz su colaboración en la confección de los cuadros y en el trabajo mecanográfico, respectivamente.

## LITERATURA CITADA

1. ALVARADO, M. y LOPEZ, R. Extracción de nematodos fitoparásitos asociados al arroz, cv. CR. 1113, mediante modificaciones de las técnicas de centrifugación-flotación y embudo de Baermann modificado. *Agronomía Costarricense* 5 (1-2): 7-13. 1981.

2. AYALA, A., ROMAN, J. y TARJAN, A.C. Comparison of four methods for isolating nematodes from soil samples. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico* 57 (4):219-225. 1963.
3. CALVO, B. y LOPEZ, R. Combate químico de *Meloidogyne incognita* en dos cultivares de tabaco burley. *Agronomía Costarricense* 4 (2):175-182. 1980.
4. SCOBAR, R. y VOLCY, C. Evaluación de métodos de extracción de nematodos en suelo de textura fina. *Fitopatología Colombiana* 7 (1): 19-23. 1978.
5. HARRIS, R.H.G. y BRAITHWAITE, J.M.C. Evaluation of methods for separating nematodes from soil. *Proceedings of the South African Sugar Technologists Association* 50: 23-28. 1976.
6. HARRISON, J.M. y GREEN, C.D. Comparison of centrifugal and other methods for standardization of extraction of nematodes from soil. *Annals of Applied Biology* 82: 299-308. 1976.
7. KIMPINSKI, J. y WELCH, H.E. Comparison of Baermann funnel and sugar flotation extraction from compacted and non compacted soils. *Nematológica* 17: 319-320. 1971.
8. MATTEY, J. y LOPEZ, R. Evaluación de nematocidas y de métodos de aplicación en el combate de nematodos fitoparásitos y en la producción y calidad de la lechuga. *Turrialba* 28 (1): 15-18. 1978.
9. PERLAZA, F., LOPEZ, R. y VARGAS, E. Efecto de la aplicación combinada de nematicidas y fungicidas en el combate de *Meloidogyne incognita*, *M. hapla* y *Alternaria* sp. en lechuga. *Fitopatología* 13 (2): 90-96. 1978.
10. SPAULL, V.M. y BRAITHWAITE, J.M.C. A comparison of methods for extracting nematodes from soil and roots of sugarcane. *Proceedings of the South African Sugar Technologists Association* 53: 103-107. 1979.
11. WHITEHEAD, A.G. y HEMING, J.R. A comparison of some quantitative methods for extracting small vermiform nematodes from soil. *Annals of Applied Biology* 55: 25-28. 1965.