

EFICIENCIA DE RECUPERACION DE *Meloidogyne incognita* (NEMATA: HETERODERIDAE) EN DOS SUELOS TROPICALES¹

Oscar Hernández *
Róger López *

ABSTRACT

Extraction efficiency of *Meloidogyne incognita* (NEMATA: Heteroderidae) in two tropical soils. The effects of sample volume (50, 100 or 150 ml), number of sample washings (1, 2 or 3), soil suspension time before pouring the supernatant through a series of sieves (20, 40 or 60 sec), sieve arrangement (A: 100-325 mesh; B: 100-400 mesh; C: 100-325-325 mesh sieves), centrifugation time (3, 4 or 5 min) at 1800 reciprocal centrifugal forces and specific gravity of the sugar solution (1.12, 1.15 or 1.18) on the extraction efficiency (EE) of second stage juveniles (J2) of *M. incognita* from an Ustropept (U) and a Haplustalf (H) soils were investigated. A known density of J2 was inoculated in both soils, which had been previously pasteurized with steam. A higher EE was obtained in both soils with samples that were washed twice, during 20 sec, poured through the B sieve arrangement, centrifuged during 3 min, and using a 1.18 specific gravity sugar solution as the extractant medium. Higher EE were obtained with 100 ml and 150 ml samples from the U and H soils, respectively. In general, the EE was close to 65% in the U soil and only around 19% in the H soil.

INTRODUCCION

Varios aspectos de la Fitonematología dependen de una precisa y confiable estimación de las densidades poblacionales de los nematodos en el suelo y en tejidos vegetales; algunos de estos aspectos incluyen:

- 1) la estandarización, que permite la presentación de datos en una manera fácil de interpretar y usar;
- 2) el desarrollo de funciones de daño, que relacionan las densidades poblacionales con la cuantía del daño causado;

- 3) las recomendaciones para la aplicación de tácticas de manejo, y
- 4) la confiabilidad de numerosas investigaciones (Brown *et al.*, 1987; Ferris, 1987). Es obvio que en estos casos se depende de la eficiencia de recuperación (ER) de los métodos usados para extraer los nematodos fitoparásitos de varios sustratos. Se entiende por ER el porcentaje de nematodos presentes en una muestra que es extraído o recuperado por determinado método de extracción.

En Costa Rica los nematodos formadores de nódulos (*Meloidogyne* spp.) son los de mayor importancia agrícola, debido a su gran gama de hospederos, severos efectos patogénicos sobre las plantas, interacción con otros agentes etiológicos y amplia distribución geográfica (López, 1984); se estima que dentro de este grupo la especie más importante es *M. incognita* (Kofoid y White, 1919) Chitwood, 1949.

1/ Recibido para publicación el 6 de abril de 1989.
* Laboratorio de Nematología, Escuela de Fitotecnia, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. El segundo autor es miembro del Programa Financiero de apoyo a Investigadores del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT).

Se ha demostrado que la ER depende, entre otros aspectos, del método usado, la especie de nematodo en estudio y el tipo de suelo (McSorley, 1987; Viglierchio y Schmitt, 1983). En Costa Rica se ha logrado demostrar que el método de centrifugación en solución azucarada es más eficiente que el del embudo de Baermann modificado para la extracción de segundos estados juveniles (J2) de *M. incognita* y que numerosas variables de ambos métodos afectan la extracción de estos J2 (Alvarado y López, 1982); en esa oportunidad se trabajó con suelos naturalmente infestados, en los que se desconocía la densidad total de J2 presentes, por lo que no fue posible estimar la eficiencia de recuperación. Dadas las anteriores circunstancias y en vista de la necesidad de contar con estos estimados, se planeó la presente investigación, que tuvo como objetivo evaluar el efecto de varias modificaciones del método de centrifugación en solución azucarada sobre la ER de *M. incognita* en dos suelos tropicales, inoculados con una densidad conocida de J2 de esta especie.

MATERIALES Y METODOS

Preparación de los suelos

Un suelo Haplustalf (H) y un suelo Ustropept (U) fueron colectados en las localidades de Repunta y Quebrada Honda del cantón de Pérez Zeledón, provincia de San José, respectivamente. En ambos suelos se cultiva tabaco (*Nicotiana tabacum*) burley en rotación con frijol común (*Phaseolus vulgaris*) o maíz (*Zea mays*). El suelo U tiene una textura franco-arenosa (57,75% arena, 12,25% arcilla, 30% limo), 8,1% de materia orgánica y pH de 6,3 en agua y 5,3 en KCl. El suelo H tiene una textura franco-arcillosa a franco-arcillo arenosa (42,25% arena, 37,25% arcilla, 17,5% limo), 7,0% de materia orgánica y pH de 6,0 en agua y 5,1 en KCl. Ambos suelos fueron trasladados al laboratorio, donde fueron tratados con vapor de agua a 100°C durante 72 h; posteriormente, una vez enfriados, se tomó varias muestras de 100 ml, las que fueron procesadas por el método de centrifugación en solución azucarada (Jenkins, 1964); en ningún caso se pudo recuperar nematodo alguno, por lo que se dedujo que el tratamiento con vapor había sido satisfactorio. Hecho esto se consideró que los suelos estaban listos para realizar la investigación.

Metodología de extracción

Inicialmente se usó una modificación del método de centrifugación en solución azucarada descrito por Jenkins (1964). Esta modificación consiste en poner una muestra de suelo de cierto volumen en el fondo de un recipiente plástico de 5 L de capacidad; luego son agregados a presión aproximadamente 4 L de agua para suspender la muestra ("lavado"); una vez hecho esto se deja sedimentar la suspensión resultante durante cierto tiempo (tiempo de suspensión) y luego se vierte el supernatante a través de un juego de tres cribas (100-325-325 mallas) superpuestas de arriba hacia abajo; las cribas tienen un diámetro interno de 20 cm; esta operación es repetida una vez más (número de lavados); el material retenido en la criba de 100 mallas es lavado con abundante agua, la que cae sobre las otras dos cribas; posteriormente este material es descartado. El material retenido en las dos cribas de 325 mallas es pasado, con la ayuda de agua, a un tubo de centrífuga de 50 ml de capacidad y centrifugado a 1800 gravedades durante 3 min; el líquido supernatante es descartado y sustituido por una solución azucarada de 1,18 de gravedad específica; el material retenido en el fondo del tubo es suspendido en la solución azucarada y nuevamente centrifugado a 1800 gravedades durante 3 min; el supernatante es pasado a través de una criba de 325 mallas para retener los nematodos; inmediatamente se lava la criba con abundante agua potable para eliminar los residuos de la solución azucarada y luego los nematodos son suspendidos en agua y pasados a un platillo siracusa de 20 ml de capacidad; los nematodos son identificados y contados con la ayuda de un microscopio estereoscópico a 45X.

Variables evaluadas

Se evaluó individual y secuencialmente el efecto de:

- el volumen de la muestra (50, 100, 150 ml);
- el número de lavados de la muestra (1, 2, 3);
- el tiempo de suspensión (20, 40, 60 seg);
- el juego de cribas (A: 100-325 mallas; B: 100-400 mallas; C: 100-325-325 mallas);
- el tiempo de centrifugación (3, 4, 5 min) y
- la gravedad específica de la solución azucarada (1,12; 1,15; 1,18) sobre la ER de J2 de *M. incognita* en cada suelo.

En todos los casos, y previo a la evaluación de cada variable, se había inoculado cada muestra con una suspensión que contenía 200 J2 de *M.*

incognita y se había dejado en incubación durante 24 h; de esta manera, sabiendo la densidad inicial presente y luego contando el número de J2 recuperados al final del proceso, se estimó el porcentaje de recuperación; cada tratamiento individual fue repetido cinco veces. Una vez obtenidos los porcentajes de recuperación se hizo la transformación de arcoseno $\sqrt{\%}$ para proceder al análisis estadístico de los datos. Con cada variable se hizo un análisis de variancia y se determinó si hubo efectos o diferencias significativas entre valores promedios, según fuera el caso. Con el fin de tener los datos en una situación comparable, en el caso del volumen de la muestra los porcentajes de recuperación de cada tratamiento fueron expresados en una base común de 100 ml; por otra parte, conforme se fueron evaluando las diversas variables se escogió aquel tratamiento con la mayor recuperación para ser utilizado en la siguiente etapa y así sucesivamente.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos son ilustrados en la Figura 1. En lo referente al volumen de la muestra (Figura 1A) se encontró un efecto cuadrático en ambos suelos. Un efecto similar fue obtenido con el número de lavados de la muestra (Figura 1B) y el tiempo de suspensión (Figura 1C). Con respecto al arreglo de las cribas, se encontró que en ambos tipos de suelo la ER del arreglo B fue significativamente mayor que la de los arreglos A ó C y que el arreglo A fue significativamente superior al arreglo C (Figura 1D). El tiempo de centrifugación de la muestra también tuvo un efecto cuadrático sobre la ER en los dos suelos (Figura 1E). Finalmente, la gravedad específica de la solución azucarada tuvo un efecto cuadrático sobre la ER en el suelo U, mientras que en el caso del suelo H el efecto fue lineal ascendente (Figura 1F).

DISCUSION

Los resultados obtenidos en esta investigación coinciden, en términos generales, con lo encontrado en un estudio anterior (Alvarado y López, 1982), en el sentido de que las diversas variables evaluadas afectan la recuperación de J2 de *M. incognita* en estos suelos tropicales; asimis-

mo, coinciden con algunos de los resultados específicos obtenidos previamente, v.g., el efecto del volumen de la muestra, del tiempo de suspensión y de la gravedad específica de la solución azucarada, así como el del número de lavados, sobre la ER de J2 en los suelos H y U, respectivamente. El efecto del volumen de la muestra sobre la ER podría estar relacionado con el volumen del residuo retenido por la cribas; en ambos suelos el volumen de suelo retenido aumentó conforme aumentó el volumen del suelo procesado, y fue mucho mayor en el suelo H que en el suelo U; es posible que cuando el volumen procesado es pequeño sea más fácil suspender y separar los J2 del suelo, como ha sido señalado previamente para otros nematodos (Alvarado y López, 1982; Alvarado y López, 1985), pero que esto permita que los J2, dado su pequeño tamaño, se pierdan o queden adheridos a las paredes de las cribas con mayor facilidad; conforme el volumen de suelo retenido aumenta y produce cierta oclusión, aumenta la recuperación porque disminuye la pérdida de J2 a través de los huecos de los tamices; sin embargo, si la oclusión aumenta demasiado se vuelve a reducir la recuperación por la dificultad de resuspender los J2 en pasos posteriores del proceso. Debido a diferencias en el contenido de limo y arcilla en los suelos utilizados, es posible que el efecto de aumento y posterior disminución de la recuperación sea obtenido rápidamente en el suelo H; sin embargo, se necesitaría un mayor volumen de suelo a procesar en el U, para obtener un mayor residuo y una eventual disminución en la recuperación, tal y como lo sugieren los resultados obtenidos (Figura 1A).

Por otra parte, el efecto del número de lavados sobre la ER fue similar en ambos suelos, aunque más marcado en el U; este resultado podría estar relacionado con el volumen de suelo retenido y el volumen de agua que pasa a través de las cribas, los que se incrementan conforme aumenta el número de lavados; el volumen de suelo retenido fue ostensiblemente mayor en el suelo H que en el U, como fue mencionado anteriormente; el posible efecto del incremento del volumen de suelo retenido sobre la ER también ha sido mencionado previamente, mientras que en lo relativo al volumen de agua, es posible que un solo lavado sea insuficiente para suspender los J2, mientras que con dos lavados se incrementa este número; un tercer lavado, sin embargo, y sobre todo combinado con poco residuo en las cribas (suelo U) probablemen-

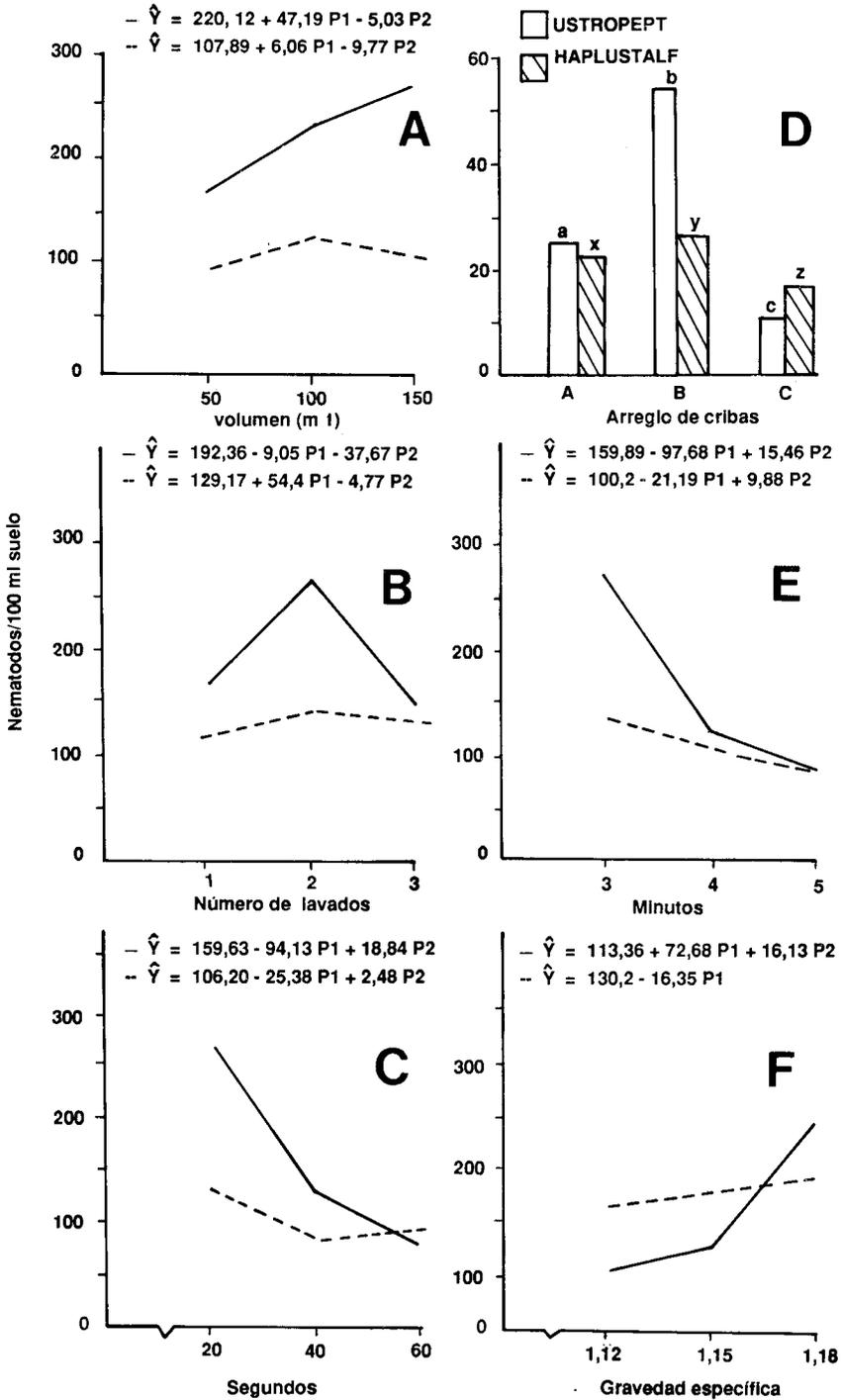


Fig. 1. Efecto del volumen de la muestra (A), el número de lavados (B), el tiempo de suspensión (C), el arreglo de cribas (D) (A: 100-325 mesh; B: 100-400 mesh; C: 100-325-325 mesh), el tiempo de centrifugación (E) y la gravedad específica de la solución azucarada (F), sobre la recuperación de segundos estados de *Meloidogyne incognita* de un suelo Ustropept (—) y uno Haplustalf (---). Nota: 300 nematodos/100 ml de suelo equivalen a un 60% de recuperación.

te incremente la pérdida de J2 por arrastre a través de las cribas, lo que explicaría la reducción obtenida en ambos casos. Una situación similar ha sido informada previamente (Alvarado y López, 1985).

Los resultados obtenidos al evaluar los diversos juegos de cribas fueron similares en ambos suelos; los juegos A (100-325 mallas) y B (100-400 mallas), con sólo dos tamices, fueron más eficaces que el C (100-325-325 mallas), que tenía tres; el tercer tamiz puede reducir la recuperación al retener cierta cantidad de residuos de suelo que pasan a través del primer tamiz de 325 mallas, lo que aumenta el volumen total de suelo retenido, y también al retener cierto número de J2; al comparar entre sí los juegos A y B fue obvio que la criba de 400 mallas fue más eficaz que la de 325 para retener los J2; el menor tamaño de los poros en la primera (38 μ m de abertura) en comparación con los de la segunda (45 μ m de abertura) explica los resultados obtenidos; una situación similar ha sido informada con relación a la recuperación de juveniles de *Rotylenchulus reniformis* Linford y Oliveira, 1940 (McSorley y Parrado, 1981), que tienen dimensiones similares a los de *M. incognita*.

En cuanto al tiempo de centrifugación, el efecto obtenido, similar en ambos suelos, podría estar relacionado con el grado de compactación del suelo en los tubos de centrifuga, ya que conforme aumenta este tiempo se obtiene una mayor compactación, lo que probablemente dificulta la separación de los J2 de éste y su suspensión en la solución azucarada usada como extractante. Una situación parecida ha sido informada previamente para varios nematodos fitoparásitos (Alvarado y López, 1982; Alvarado y López, 1985). El efecto de la gravedad específica de la solución azucarada probablemente se deba a que la separación final se ve facilitada al usar soluciones de mayor gravedad, en las que los J2 flotan y se separan más fácil o más rápidamente que en las de menor gravedad; conviene mencionar que estas soluciones de mayor gravedad específica dañan en mayor grado los J2 y podrían dificultar su identificación, al sufrir su cuerpo un colapso por la alta concentración osmótica de la solución extractante.

De las anteriores consideraciones se podría deducir que la recuperación de nematodos del suelo es un asunto complejo, que requiere de un detallado análisis de todo el proceso y que es afectado por el tipo de suelo con que se trabaje; esta situación complica la labor de cualquier Labo-

ratorio de Nematología, donde se encuentran múltiples tipos de suelo. También esta investigación provee evidencia que debe motivar a trabajar aún con más ahinco en esta fase de la Fitonematología ya que, como promedio, apenas se obtuvo una ER de alrededor del 65% en el suelo U y del 19% en el suelo H; esta eficiencia es bastante baja, sobre todo en el caso del suelo H, y evidencia que hay un gran margen de error en los resultados de análisis de suelo, el que debe ser corregido antes de poder contar con un sistema de diagnóstico, advertencia y recomendación para el manejo de nematodos fitoparásitos, que sea confiable y preciso. Otros aspectos que merecen ser estudiados en detalle en futuras investigaciones incluyen la interacción entre variables, como son, número de lavados x volumen de la muestra, volumen de la muestra x arreglo de cribas, número de lavados x tiempo de suspensión, etc., y el desglose y cuantificación de las pérdidas que ocurren en cada paso del proceso total; estos estudios podrían aportar elementos valiosos para incrementar la ER de este importante nematodo fitoparásito.

RESUMEN

Se evaluó individualmente el efecto del volumen (50, 100, 150 ml) de la muestra, el número (1, 2, 3) de veces que la muestra es suspendida en agua, el tiempo (20, 40, 60 seg) que es mantenida en suspensión la muestra, el arreglo de los tamices (A: 100-325 mallas; B: 100-400 mallas; C: 100-325-325 mallas), el tiempo (3, 4, 5 min) de centrifugación a 1800 gravedades y la gravedad específica (1,12; 1,15; 1,18) de la solución azucarada sobre la eficiencia de recuperación (ER) de segundos estados juveniles (J2) de *Meloidogyne incognita* en un suelo Ustrophept y uno Haplustalf. Una densidad conocida de J2 fue inoculada previamente en ambos suelos, los que ya habían sido pasteurizados con vapor. Se obtuvo una mayor ER en ambos suelos con muestras que fueron suspendidas dos veces, durante 20 seg, vertidas a través del juego B de tamices, centrifugadas durante 3 min y con el uso de una solución azucarada de 1,18 de gravedad específica como extractante. Volúmenes de 150 y 100 ml permitieron obtener los mayores ER en el suelo Ustrophept y en el Haplustalf, respectivamente. En general, la ER fue cercana al 65% en el suelo Ustrophept y de apenas un 19% en el Haplustalf.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean agradecer la ayuda técnica del Ing. Luis Salazar, la Sra. Cecilia Jinesta, el Sr. Justo Azofeifa y la Sra. Marielos Serrano Elizondo.

LITERATURA CITADA

- ALVARADO, M.; LOPEZ, R. 1982. Recuperación de larvas de *Meloidogyne incognita* de tres suelos tropicales por modificaciones de las técnicas del embudo de Baermann modificado y centrifugación-flotación. Turrialba 32(1):83-87.
- ALVARADO, M.; LOPEZ, R. 1985. Extracción de algunos nematodos fitoparásitos mediante modificaciones de las técnicas de centrifugación-flotación y embudo Baermann modificado. Agronomía Costarricense 9(2):175-180.
- BROWN, S.M.; MILLER, M.F.; VIGLIERCHIO, D.R. 1987. Laboratory consistency in extraction of nematodes from soil and roots. Nematopica 17(2):179-192.
- FERRIS, H. 1987. Extraction efficiencies and population estimation. In Vistas on Nematology. Ed. by J.A. Veech y D.W. Dickson. De Leon Springs, Florida, Painter Printing. p. 59-63.
- JENKINS, W.R. 1964. A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Reporter 48(9):692.
- LOPEZ, R. 1984. Differential plant responses and morphometrics of some *Meloidogyne* spp. from Costa Rica. Turrialba 34(4):445-458.
- McSORLEY, R. 1987. Extraction of nematodes and sampling methods. In Principles and practice of nematode control in crops. Ed. by R.H. Brown y B.R. Kerry. New York, Academic Press. p. 13-47.
- McSORLEY, R.; PARRADO, J.L. 1981. Effect of sieve size on nematode extraction efficiency. Nematopica 11(2):165-174.
- VIGLIERCHIO, D.R.; SCHMITT, R.V. 1983. On the methodology of nematode extraction from field samples: comparison of methods for soil extraction. Journal of Nematology 15(3):450-454.