

EFFECTO DEL TIEMPO DE LAVADO DE LAS CRIBAS, SU TAMAÑO DE ORIFICIO Y POSICION, SOBRE LA RECUPERACION DE NEMATODOS EXTRAIDOS DE RAICES DE BANANO¹

Mario Araya²*, Róger Jaén*, Alexander Cheves*, Minor Centeno*

RESUMEN

En busca de afinar el método de recuperación de nematodos de las raíces de banano, se evaluó el efecto del tiempo de lavado de cribas, el tamaño de orificio y posición. Las muestras fueron procesadas por el método de licuado y tamizado. Se compararon 6 tiempos de lavado, de 1 hasta 6 min. Trabajando con 2 arreglos de cribas de 0.5/0.150/0.038/0.020 mm y 0.5/0.150/0.025/0.020 mm se calculó el porcentaje de nematodos que pasan la criba de 0.038 y 0.025 mm y luego, utilizando la serie de cribas de 0.5/0.150/0.035/0.025 mm en posición horizontal (90°) e inclinada (45°), se estimó el porcentaje en que los nematodos pasan la criba de 0.038 mm. No hubo efecto del tiempo de lavado de las cribas en la recuperación de *R. similis* (P=0.98), *Helicotylenchus* spp. (P=0.99), *Meloidogyne* spp. (P=0.99), *Pratylenchus* spp. (P=1.0) y nematodos totales (P=0.98). Con los *R. similis* retenidos en la criba de 0.020 mm se estimó que 82% y 38% pasan la criba de 0.038 y 0.025 mm, respectivamente, y con los retenidos en la criba de 0.025 mm se calculó que un 62% de los *R. similis* pasan la criba de 0.038 mm en posición horizontal, mientras en ángulo de 45° pasan sólo un 39%.

ABSTRACT

Effect of sieve washing time, mesh size, and mesh position, on nematode recovery from banana roots. Root samples were processed by the blending method. Six washing times of 1 to 6 min were compared. Working with 2 series of sieves of 0.5/0.150/0.038/0.020 mm and 0.5/0.150/0.025/0.020 mm, the percentage of nematodes that passed through the 0.038 and 0.025 mm sieves was calculated. Then the percentage of nematodes that passed through the sieve of 0.038 mm, was estimated, using the sieve series of 0.5/0.150/0.035/0.025 mm in horizontal position and in an angle of 45°. There was no effect of the sieve washing time on *R. similis* (P=0.98), *Helicotylenchus* spp. (P=0.99), *Meloidogyne* spp. (P=0.99), *Pratylenchus* spp. (P=1.0) and total nematodes (P=0.98) recovery. With the nematodes gathered in the 0.020 mm sieve, it was estimated that 82% and 38% of *R. similis* passed through the sieve 0.038 and 0.025 mm, resp., and with the nematodes retained in the 0.025 mm sieve it was estimated that 62% of *R. similis* passed through 0.038 mm sieve in horizontal position, while with the sieves in a 45° angle only 39% passed.

INTRODUCCION

El método de licuado y tamizado de las raíces, introducido por Taylor y Loegering (1953), es uno de los más usados para la extracción de nema-

1/ Recibido para publicación 19 de mayo de 1998.

2/ Autor para correspondencia.

* Dirección de Investigaciones, CORBANA.
Apartado Postal 390-7210, Costa Rica.

todos en banano (Vilardebo y Guerout 1976, Escobar y Rodríguez-Kabana 1980, Tarté et al. 1981, Panque et al. 1988, Arreaga et al. 1989, Rodríguez 1990, Price 1994). El mismo fue adaptado y modificado para su uso en el laboratorio de nematología de CORBANA por Figueroa (1985).

Para recuperar los nematodos se usan diferentes números de cribas. Las de mayor tamaño de orificio, retienen los restos radiculares e impurezas presentes en las suspensiones, mientras en la más fina se recuperan los nematodos para su identificación y conteo. Según las dimensiones del nematodo o los nematodos que se pretendan extraer, se puede definir un tamaño de orificio de criba particular con el fin de recuperar mayor cantidad de nematodos.

Araya y Vargas (1996) usando la criba de 0.025 mm (N°500) debajo de la de 0.038 mm (N°400) demostraron que los nematodos extraídos de las raíces del banano, pasan la criba de 0.038 mm. El tiempo de lavado de las cribas varía con los laboratorios (Rodríguez 1990, Loos y Loos 1960) y puede afectar también la estimación final de la población de nematodos. Adicionalmente, la posición del juego o serie de cribas, puede influir en la recuperación de los nematodos (Ferris 1987).

El objetivo del presente estudio fue determinar un tiempo razonable de lavado de las cribas, estimar el porcentaje de nematodos que pasan la criba de 0.038 mm y cómo afecta la posición de la serie de cribas la recuperación de los nematodos.

MATERIALES Y METODOS

Procedimiento general

Muestras procedentes del servicio de monitoreo mensual de nematodos que la Corporación Bananera Nacional (CORBANA) brinda a los productores, fueron usadas en los 3 experimentos. Cada muestra de raíces se tomó de 5 plantas entre 1 y 8 días de florecidas, usando un palín para excavar un hoyo de 13 cm longitud, 13 cm ancho y 30 cm de profundidad (volumen aproximado de 5.070 cm³ de suelo) al frente de las plantas y recolectando todas las raíces contenidas en el volumen de suelo.

La extracción de nematodos se hizo por el licuado de 25 g de raíces funcionales como se detalla en Araya y colaboradores (1995). Todas las cribas usadas fueron de 20.3 cm (8") de diámetro por 5.1 cm (2") de alto. La identificación y conteo de los nematodos recuperados se hizo bajo un microscopio Olympus BX40F-3 a 4X de magnificación, usando alícuotas de 2 ml procedentes de 200 ml de suspensión. Los datos se expresan en nematodos por 100 g de raíces. El total de nematodos corresponde a la suma de los diferentes géneros detectados.

Experimento I: Tiempo de lavado de las cribas

Una vez licuadas las raíces, se procedió a tamizar 30 muestras en un juego de cribas sobrepuestas de arriba hacia abajo de 0.5/0.150/0.038 mm (N°35/100/400). El lavado de las cribas se realizó por medio de una manguera, aplicando agua sin presión y en forma circular, a los residuos contenidos en la criba de 0.5 mm. Al minuto de lavado, se detuvo la aplicación de agua y se cambió la criba de 0.038 mm por una limpia de igual tamaño, se lavó de nuevo en la misma forma por otro minuto y se cambió de nuevo la criba. Este procedimiento se siguió hasta los 6 min, de manera que se recuperó los nematodos retenidos en la criba de 0.038 mm cada minuto, desde 1 hasta 6 min, constituyéndose en los tratamientos. Los datos por nematodo, en cada minuto, fueron sumados para obtener la cantidad recuperada en 1, 2, 3, 4, 5 y 6 min, luego se sometieron a un ANOVA.

Experimento II: Tamaños de orificio

Dos evaluaciones con diferentes muestras, fueron efectuadas considerando los siguientes juegos de cribas:

1. 0.5/0.150/0.038/0.020 mm (N°35/100/400/635 mesh) y,
2. 0.5/0.150/0.025/0.020 mm (N°35/100/500/635 mesh). En ambos casos, el lavado de las cribas se realizó por medio de una manguera, aplicando agua sin presión y en forma circular por 2 min a los residuos contenidos en la criba de

0.5 mm; se separó esta criba y se lavó por 1 min los residuos de la criba de 0.150 mm. Los nematodos se recuperaron en las 2 últimas cribas de cada serie. Los datos se sometieron a un ANOVA y se calculó el porcentaje que representan los nematodos recuperados en la criba de 0.020 mm, en relación a los detectados en el tamiz de 0.038 y 0.025 mm.

Experimento III: Posición de la serie de cribas

Treinta muestras se homogeneizaron individualmente y se dividieron en 2 submuestras de igual tamaño. Cada submuestra se homogeneizó de nuevo y se tomaron 25 g de raíces para la extracción de los nematodos, como se indicó en el procedimiento general.

Luego, usando el juego de tamices de 0.5/0.150/0.038/0.025 mm (N°35/100/400/500 mesh) se comparó la posición horizontal (ángulo 90°), comúnmente usada en el laboratorio, contra una inclinada a un ángulo de 45°. Para esta última posición, se construyó una base de madera con el ángulo indicado para colocar las cribas. El lavado de las cribas en ambos casos fue por 3 min, 2 en la de 0.5 mm y 1 min en la de 0.150 mm. Los nematodos fueron recuperados en las cribas de 0.038 y 0.025 mm. Con los datos de la criba de 0.025 mm se calculó el porcentaje de nematodos que pasan la criba de 0.038 mm en ambas posiciones.

RESULTADOS

Tiempo de lavado de las cribas

La cantidad de *R. similis* (P=0.98), *Helicotylenchus* spp. (P=0.99), *Meloidogyne* spp. (P=0.99), *Pratylenchus* spp. (P=1.0) y nematodos totales (P=0.98) recuperados en la criba de 0.038 mm, fue igual en los diferentes tiempos de lavado de las cribas (Cuadro 1). Esto indica que igual cantidad de nematodos se recupera del licuado de raíces y pasan las cribas de 0.5 y 0.150 mm con 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 min de lavado. Las poblaciones estimadas de los nematodos se traslaparon y coincidieron a través de los diferentes tiempos de lavado. El lavado por 6 min permitió tan sólo una recuperación adicional de 6.9%; 3.7%; 11.7%; 0.0% y un 6.7% de los *R. similis*, *Helicotylenchus* spp., *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp. y total de nematodos extraídos en 1 min.

Tamaños de orificio

Evaluación I: En relación a la criba de 0.038 mm (N°400), la criba de 0.020 mm (N°635) recuperó un 82.0% de *R. similis*; 187.8% de *Helicotylenchus* spp., 63.4% de *Meloidogyne* spp., 23.1% de *Pratylenchus* spp. y un 81.8%, de nematodos totales (Cuadro 2).

Cuadro 1. Valores promedio y error estándar del número estimado de nematodos recuperados en la criba de 0.038 mm con diferentes tiempos de lavado.

Tiempos de lavado cribas (min)	Nematodos/100 g de raíces				
	<i>Radopholus similis</i>	<i>Helicotylenchus spp.</i>	<i>Meloidogyne spp.</i>	<i>Pratylenchus spp.</i>	Total de nematodos
1	27.827 ± 3.581*	3.947 ± 676	1.480 ± 483	13 ± 13	33.267 ± 3.752
2	29.213 ± 3.790	4.000 ± 684	1.560 ± 539	13 ± 13	34.787 ± 3.956
3	29.453 ± 3.819	4.040 ± 688	1.600 ± 537	13 ± 13	35.106 ± 3.989i
4	29.573 ± 3.840	4.040 ± 688	1.640 ± 549	13 ± 13	35.267 ± 4.015
5	29.680 ± 3.860	4.093 ± 693	1.653 ± 550	13 ± 13	35.440 ± 4.045
6	29.760 ± 3.876	4.093 ± 693	1.653 ± 550	13 ± 13	35.520 ± 4.060

Datos son medias de 30 observaciones. Total de nematodos = *R. similis* + *Helicotylenchus* spp. + *Meloidogyne* spp. + *Pratylenchus* spp.

* error estándar.

Evaluación II: En relación a la criba de 0.025 mm (N°500), la criba de 0.020 mm (N°635) recuperó un 38.4% de *R. similis*; 51.4% de *Helicotylenchus* spp., 80.6% de *Meloidogyne* spp., 29.0% de *Pratylenchus* spp. y un 41.4%, de nematodos totales (Cuadro 2).

Posición de la serie de cribas

En la posición horizontal, la criba de 0.025 mm (No 500) recuperó un 61.6% de *R. si-*

milis, 50% de *Helicotylenchus* spp., 102% de *Meloidogyne* spp., 30% de *Pratylenchus* spp. y un 61.7% de los nematodos totales retenidos en la criba de 0.038 mm (N°400) (Cuadro 3). Cuando la serie de cribas se utilizó en un ángulo de 45°, la criba de 0.025 mm (N°500) recuperó un 38.5%, 28%, 11.4%, 37.4% y un 35.2% de los *R. similis*, *Helicotylenchus* spp., *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp. y nematodos totales retenidos en la criba de 0.038 mm (Cuadro 3).

Cuadro 2. Valores promedio y error estándar del número estimado de nematodos en 100 g de raíces recuperados con los diferentes arreglos de cribas.

Cribas	Nematodos				Total de nematodos
	<i>Radopholus similis</i>	<i>Helicotylenchus</i> spp.	<i>Meloidogyne</i> spp.	<i>Pratylenchus</i> spp.	
Evaluación I					
0.038 mm (N°400)	20.680 ± 2.540*	213 ± 113	800 ± 226	173 ± 148	21.867 ± 2.533
0.020 mm (N°635)	16.960 ± 2.590	400 ± 179	507 ± 121	40 ± 40	17.906 ± 2.600
Evaluación II					
0.025 mm (N°500)	17.960 ± 2.454	3.653 ± 929	480 ± 193	93 ± 41	22.186 ± 2.477
0.020 mm (N°635)	6.893 ± 1.018	1.880 ± 523	387 ± 205	27 ± 18	9.186 ± 1.003

Datos son medias de 30 repeticiones. Total de nematodos= *R. similis* + *Helicotylenchus* spp. + *Meloidogyne* spp. + *Pratylenchus* spp.

* error estándar.

Cuadro 3. Valores promedio y error estándar del número estimado de nematodos en 100 g de raíces, según la posición de las cribas.

Nematodo	Horizontal (90°)		Inclinada a 45°	
	0.038 mm	0.025 mm	0.038 mm	0.025 mm
<i>Radopholus similis</i>	15.946 ± 1.708*	9.826 ± 1.106	16.320 ± 1.854	6.280 ± 776
<i>Helicotylenchus</i> spp.	1.733 ± 551	867 ± 299	1.853 ± 512	520 ± 192
<i>Meloidogyne</i> spp.	640 ± 203	653 ± 251	1.520 ± 739	173 ± 122
<i>Pratylenchus</i> spp.	133 ± 62	40 ± 22	107 ± 60	40 ± 29
Nematodos totales	18.427 ± 2.034	11.386 ± 1.313	19.800 ± 1.960	6.987 ± 838

Datos son medias de 30 observaciones. Total de nematodos= *R. similis* + *Helicotylenchus* spp. + *Meloidogyne* spp. + *Pratylenchus* spp.

* error estándar.

DISCUSION

Las medias y el error estándar de los nematodos detectados fueron muy constantes en los diferentes tiempos de lavado, lo que indica que cualquier tiempo es apropiado. En el laboratorio, el paso generalizado es lavar la criba de 0.5 mm/2 min y la de 0.150 mm/1 min. Comparando estos 3 min con lo recuperado a los 6 min el aumento fue tan sólo de 1.0% en *R. similis*, 1.3% en *Helicotylenchus* spp., 3.3% en *Meloidogyne* spp., 0% en *Pratylenchus* spp. y un 1.2% en el total de nematodos. A pesar que no se encontró diferencia estadística en los tiempos de lavado, se sugiere continuar usando los 3 min comúnmente empleados. Tres minutos también son usados por Rodríguez (1990). Para laboratorios que quieran cambiar el tiempo de lavado a 1 min, significaría perder un 5.4% de *R. similis*; 2.3% de *Helicotylenchus* spp.; 8.1% de *Meloidogyne* spp.; 0% de *Pratylenchus* spp. y un 5.5% del total de nematodos, lo cual probablemente no tiene implicación para la toma de una decisión de manejo.

El uso de una criba de tamaño de orificio más fino, como la de 0.020 mm (N°635 mesh sieve) permitió demostrar que un 82% de los *R. similis* pasan la criba de 0.038 mm (N°400), mientras solo un 38.4% pasan la criba de 0.025 mm (N°500). También se detectó una mejor recuperación de *Helicotylenchus* spp. y del total de nematodos con la criba de 0.025 mm. El haber determinado un mayor porcentaje de *Meloidogyne* spp. y *Pratylenchus* spp. que pasa la criba de 0.025 mm es contradictorio, pero factible porque los 2 grupos de muestras son independientes. Comparando los nematodos retenidos en las cribas de 0.025 y 0.020 mm de la Evaluación II, con los contenidos en las cribas de 0.038 y 0.020 mm de la Evaluación I, se observa que la población de *Meloidogyne* spp. y *Pratylenchus* spp. fue solo un 66 y un 56%. Al existir menor cantidad de nematodos, probablemente hubo una mejor distribución de los mismos en el área de la criba lo que facilitó su paso a través de los orificios. Además, la relación es porcentual, y mayor en la Evaluación II, pero en términos numéricos la cantidad de nematodos retenidos fue inferior. Es decir, el contenido individual de cada género afectó en forma particular su recuperación. En

muestras pareadas, es de esperar que menor cantidad de estos nematodos pase la criba de 0.025 mm.

En un estudio anterior Araya y Vargas (1996) encontraron que la criba de 0.025 mm (N°500) recuperó un 33.5%, 96.4%, 73.6% y un 9.1% de los *R. similis*, *Helicotylenchus* spp., *Meloidogyne* spp. y *Pratylenchus* spp. detectados en el tamiz de 0.038 mm (N°400), respectivamente. Por tanto, si se quiere aumentar la eficiencia de recuperación de este método, debería cambiarse la criba que se usa para coleccionar los nematodos. En este caso, a pesar de que los nematodos pasan la criba de 0.025 mm (N°500), se propone su uso, ya que en la de 0.020 mm se dificulta el lavado. El agua escurre muy lentamente a través de los orificios de la criba, lo que provoca el llenado y en algunos casos el derrame de agua en las cribas, con la consiguiente pérdida de nematodos. Adicionalmente, se observó que se requería más tiempo para el lavado de las cribas, lo que repercute negativamente en la eficiencia del laboratorio.

La posición de las cribas afectó el número de nematodos que pasan a través de los orificios. Como se esperaba, un mayor número pasan cuando las cribas se usan en forma horizontal que en ángulo de 45°. Las diferencias variaron con los géneros, es mayor en *Meloidogyne* spp. producto posiblemente, de su mayor longitud, como lo predice Ferris (1987). En *R. similis* y nematodos totales un 23.1% y un 26.5% más, pasaron la criba de 0.025 mm en posición horizontal comparado con la inclinada. En condiciones del laboratorio de nematología de CORBANA, que procesa alrededor de 2000-2500 muestras mensuales, se recomienda continuar con la posición horizontal. El empleo de la posición inclinada tiene algunas desventajas como: a pesar que se podría construir bases para mantener el ángulo de inclinación constante, habría mayor dificultad para el escurrimiento de las cribas y el lavado resultaría más cansado para los operarios, lo que probablemente repercute negativamente en la eficiencia del laboratorio. Para condiciones experimentales, donde se busque mayor eficiencia en la recuperación de los nematodos, es posible considerar el uso del juego de cribas en forma inclinada. Sin embargo, se tendrían 2 porcentajes diferentes de recuperación, que habría que considerarlos al momento de comparar resultados.

LITERATURA CITADA

- ARAYA, M.; VARGAS, H. 1996. Evaluación de alternativas para reducir impurezas de las suspensiones de nematodos extraídas de raíces de banano (*Musa AAA*). CORBANA 21 (46): 99-106.
- ARAYA, M.; CENTENO, M.; CARILLO, W. 1995. Densidades poblacionales y frecuencia de los nematodos parásitos del banano (*Musa AAA*) en 9 cantones de Costa Rica. CORBANA 20 (43): 6-11.
- ARREAGA, J.; SYLTIE, P. W.; MANOSALVAS, L. 1989. Control of *Radopholus similis* (Cobb) Thorne, banana production, and economic factors in Ecuador using Sincosin and Agrispon (biological agents), aldicard, and fenamiphos. Asociación para la Cooperación en Investigaciones de Bananos en el Caribe y en América Tropical (ACORBAT) IX Reunión, Memorias, p. 305-315.
- ESCOBAR, J.; RODRIGUEZ-KABANA, R. 1980. Comparación de un método de flotación con uno de tamizado para la determinación de *Radopholus similis* en raíces de banano. Nematropica 10 (2): 86-88.
- FERRIS, H. 1987. Extraction efficiencies and population estimation. In: Vistas on Nematology. Ed. by J. A. Veech and D. W. Dickson. Maryland. Society of Nematologists, Inc. p. 59-63.
- FIGUEROA, M.A. 1985. Sistema de pronóstico y advertencia en el control de nematodos en banano. ASBANA 9 (23): 10-13.
- LOOS, C. A.; LOOS, S. B. 1960. The black head disease of bananas (*Musa acuminata*). Proc. Helmitl. Soc., Washington 27: 189-193.
- PANEQUE, M.; SAMPEDRO, J.; SANTO, E. 1988. Comparación de métodos de extracción de nematodos en raíces de plátano. Cienc. Tec. Agric. 11 (4): 95-104.
- PRICE, N. S. 1994. Field trial evaluation of nematode susceptibility within *Musa*. Fundam. appl. Nematol. 17 (5): 391-396.
- QUIMI, V. H.; VILLACIS, J. 1977. Estudio comparativo de dos métodos de extracción del nematodo *Radopholus similis* de las raíces de banano. Nematropica 7 (2): 44-47.
- RODRIGUEZ, R. R. 1990. Los nematodos de la platanera (*Musa acuminata* AAA, subgrupo Cavendish Enana) en Canarias (1963-1984). Caja Insular de Ahorros de Canarias. 58 p.
- TARTE, R.; PINOCHET, J.; GABRIELLI, C.; VENTURA, O. 1981. Differences in population increase, host preferences and frequency of morphological variants among isolates of the banana race of *Radopholus similis*. Nematropica 11 (1): 43-52.
- TAYLOR, A. L.; LOEGERING, W. Q. 1953. Nematodes associated with root lesions in Abacá. Turrialba 3 (1-2): 8-13.
- VILARDEBO, A.; GUEROUT, R. 1976. A review of experiments on nematode control with Ethoprop (Prophos); Phenamiphos and Carbofuran in French-speaking West Africa. Nematropica 6 (2): 51-53.