

RECUPERACION DE LARVAS DE *Meloidogyne incognita* DE TRES SUELOS TROPICALES
POR MODIFICACIONES DE LAS TECNICAS DEL EMBUDO DE BAERMANN MODIFICADO
Y CENTRIFUGACION-FLOTACION¹ *

MELVYN ALVARADO S.**
ROGER LOPEZ CH.**

Abstract

The comparative efficiency of the centrifugation-flotation (CF) and modified Baermann Funnel (MBF) techniques, as well as some modifications, for the extraction of Meloidogyne incognita larvae from three soil types commonly found in Costa Rica (Ustult, Ustropept and Distropept) was evaluated. Modifications evaluated with both techniques were sample volume (50, 100 or 150 cc), number of sample washings (1, 2 or 3), soil suspension time before each washing (20, 40 or 60 sec) and sieve arrangement (A: one 100 and two 325 mesh sieves; B: one 50 and two 325 mesh sieves, and C: one 100 and 325 mesh sieves). Centrifugation time (3, 4 or 5 min. at 3000 rpm) and specific gravity of the sugar solution (1.12, 1.15 or 1.18) were also evaluated with the CF technique.

Significantly more larvae were extracted with 100 cc soil samples in the Ustropept and Ustult soils with the MBF method.

Significantly higher numbers of larvae were also recovered from the Ustropept soil with three sample washings whereas higher numbers were obtained from Ustult and Distropept soils with 20 and 60 sec of soil suspension before each washing, respectively, with the CF technique; one sample washing also yielded higher numbers of larvae in the Distropept soil. The B sieve arrangement and the 1.12 specific gravity sugar solution recovered higher larvae densities from the Ustropept and Distropept soils, respectively. Significantly more larvae were recovered from the three soil types with the CF than with the MBF technique.

Introducción

En Costa Rica la importancia económica de los nematodos del género *Meloidogyne* Goeldi no difiere sustancialmente de la señalada recientemente (9) para otras áreas tropicales del mundo.

Tampoco existe discrepancia con este informe en el sentido de que *M. incognita* (Kofoid y White) Chitwood es la especie predominante del género.

Por otra parte, es sabido que a menudo se presenta una relación estrecha entre la densidad inicial del inóculo de esta especie y la cuantía del daño causado en numerosos cultivos (4, 5, 7), lo que otorga gran importancia a la cuantificación precisa de la densidad poblacional de esta especie, previo o la siembra de cultivos intolerantes a su ataque.

Dada la carencia de información local, se planteó la necesidad de realizar la presente investigación, en que se evaluó la influencia de algunas variantes sobre la eficacia de los métodos del Embudo de Baermann

¹ Recibido para su publicación el 14 de julio de 1981.

* Parte de una tesis de grado presentada por el primer autor ante la Escuela de Fitotecnia de la Universidad de Costa Rica como requisito parcial para optar al grado de Ingeniero Agrónomo

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

modificado y Centrifugación-flotación para la extracción de larvas de *M. incognita* de tres tipos de suelo comúnmente encontrados en nuestro país (A. Alvarado, Comunicación personal, 1980).

Materiales y métodos

Se colectó muestras de suelos Ustropept (en Santa Ana), Ustult (en Quebrada Honda de Pérez Zeledón) y Distropept (en Repunta de Pérez Zeledón), en la provincia de San José, cultivados con tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), maíz (*Zea mays* L.) y tabaco burley (*Nicotiana tabacum* L.), respectivamente, e infestados todos con *M. incognita*. Algunas características físicas y químicas de estos suelos se presentan en el Cuadro 1.

Una vez en el laboratorio, se homogeneizó y cuarteó el grupo de muestras para su utilización en el estudio.

Se comparó la eficacia de las técnicas de extracción de Centrifugación-flotación en solución azucarada (CF) descrita por Caveness y Jensen (6) y del Embudo de Baermann modificado por Christie y Perry (EBM), de acuerdo a la descripción dada por Thorne (10).

En ambos métodos se evaluó el efecto del volumen de la muestra (50, 100 ó 150 cc), del número de lavados de la muestra (1, 2 ó 3), del tiempo de suspensión

del suelo en el agua antes de su paso a través de las cribas (20, 40 ó 60 seg) y del arreglo de las cribas (A: una de 50 y dos de 325 mesh; B: una de 100 y dos de 325 mesh; C: una de 100 y una de 325 mesh). Además, en la técnica CF se evaluó el tiempo de centrifugación (3, 4 ó 5 min. a 3000 rpm) y la gravedad específica de la solución azucarada (1.12, 1.15 ó 1.18) sobre la extracción de larvas de *M. incognita* de cada uno de los suelos utilizados.

La eficacia de ambas técnicas en la recuperación de larvas fue comparada al evaluar el volumen de la muestra; para esto se utilizó un diseño de parcelas divididas con cinco repeticiones donde las parcelas grandes fueron los métodos de extracción y las parcelas pequeñas el volumen de la muestra.

Con las otras variantes sólo se comparó independientemente para cada método de extracción el efecto de cada una; en este caso se usó un diseño irrestrictamente al azar en el que cada tratamiento fue repetido cinco veces.

En cada una de las evaluaciones hechas, y para homogeneizar el criterio a seguir, conforme se fue evaluando el efecto de cada variante se incorporó en la evaluación de la siguiente aquel tratamiento que diera la mayor recuperación, ya fuera estadísticamente significativa o no su diferencia con los otros tratamientos, y así sucesivamente.

Todos los datos obtenidos fueron transformados sistemáticamente en $(X + 1/2)^{1/2}$ para su correspondiente análisis estadístico.

Cuadro 1. Algunas características físicas y químicas de los tres tipos de suelos tropicales con que se evaluó la eficacia de dos métodos y algunas variantes para la extracción de larvas de *Meloidogyne incognita*.

	Tipo de suelo			
	Ustropept	Ustult	Distropept	
Nombre textural	Franco-arcilloso	Franco-arcilloso	Franco-arcilloso	
Arena (%)	35.1	38.1	38.4	
Arcilla (%)	32.1	24.1	48.7	
Limo (%)	32.8	37.8	12.9	
Materia orgánica (%)	42.2	6.2	1.9	
pH	H ₂ O	6.4	5.3	5.9
	KCl	5.6	4.9	5.1

Resultados

Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 2. Con referencia al volumen de la muestra se encontró que con el método EBM se extrajo significativamente más larvas con muestras de 100 que con muestras de 50 cc en el suelo Ustropept. Hubo un efecto cuadrático del volumen de la muestra sobre la extracción, definido por la ecuación $\hat{Y} = 11.1 + 1.57 X - 3.55 X^2$.

En el suelo Ustult se recuperaron significativamente más larvas con muestras de 100 cc que con 150 cc.

En cuanto al número de lavados de la muestra, en el caso del método EBM se recuperó significativamente más larvas con tres que con uno solo en el suelo Ustropept. Con el método CF se recuperó significativamente más larvas con un solo lavado en los

suelos Ustult y Distropept. En ambos casos hubo un efecto lineal descendente del número de lavados sobre la recuperación de las larvas, definido por las ecuaciones $\hat{Y} = 10.85 - 3.79 X$ y $\hat{Y} = 14.86 - 12.31 X$ para el suelo Ustult y el Distropept, respectivamente.

Por otra parte, con el método EBM se extrajeron significativamente más larvas con 20 seg de suspensión en el suelo Ustult, mientras que en el Distropept se recuperaron significativamente más larvas con 60 que con 20 seg de suspensión. En el primer caso hubo

Cuadro 2. Efecto de algunas variantes de las técnicas de extracción Centrifugación-flotación y Embudo de Baermann modificado sobre el número promedio de larvas de *M. incognita* extraídas de tres suelos tropicales.

Tipo de suelo	Técnica de extracción					
	Embudo Baermann modificado			Centrifugación-flotación		
	Ustropept	Ustult	Distropept	Ustropept	Ustult	Distropept
Volumen de muestra						
(cc)						
50	102 b*	64 ab	294 a	196 a	123 a	334 a
100	157 a	72 a	236 a	168 a	124 a	386 a
150	114 ab	44 b	295 a	163 a	87 a	274 a
Número de lavados						
1	194 b	67 a	203 a	640 a	138 a	493 a
2	234 a	62 a	142 a	727 a	111 ab	373 b
3	241 a	55 a	105 a	655 a	105 b	399 b
Tiempo de suspensión						
(seg)						
20	299 a	43 a	129 b	270 a	108 a	272 a
40	357 a	34 b	179 ab	241 a	93 a	285 a
60	419 a	32 b	206 a	284 a	66 b	345 a
Arreglo de cribas**						
A	364 a	29 a	141 a	326 b	84 a	211 a
B	524 a	39 a	129 a	1434 a	89 a	242 a
C	505 a	31 a	127 a	1301 ab	76 a	260 a
Tiempo de centrifugación						
(min.)						
3	—	—	—	979 a	72 a	241 a
4	—	—	—	1105 a	72 a	206 a
5	—	—	—	995 a	63 a	231 a
Gravedad específica						
Solución azucarada						
1.12	—	—	—	958 a	38 a	262 a
1.15	—	—	—	1292 a	40 a	182 b
1.18	—	—	—	1188 a	46 a	274 a

* Promedio de cinco repeticiones. Promedios de una misma variable en una misma columna, seguidos por una misma letra no difieren significativamente entre sí (Duncan, $P = 0.05$). Densidades promedio expresadas/100 cc de suelo.

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

un efecto lineal descendente del tiempo de suspensión sobre la extracción de larvas, según la ecuación $\hat{Y} = 5.99 - 2.19 X$, en contraste con el caso del suelo Distropept, en que el efecto lineal fue ascendente, según la ecuación $\hat{Y} = 12.96 + 9.22 X$. Con la técnica CF se recuperó significativamente más larvas con 20 que con 60 seg en el suelo Ustult, encontrándose en este caso un efecto lineal descendente según la ecuación $\hat{Y} = 9.38 - 5.77 X$.

En lo concerniente al arreglo de las cribas, se recuperó significativamente más larvas con el arreglo B que con el A en el suelo Ustropept al utilizar la técnica CF.

Finalmente, con el método CF se encontró que en el suelo Distropept se recuperó significativamente más larvas con soluciones azucaradas de 1.12 y 1.18 de gravedad específica que con la de 1.15. Hubo un efecto cuadrático de la gravedad específica sobre la extracción, según la ecuación $\hat{Y} = 15.41 - 0.88 X + 4.83 X^2$.

Al comparar ambos métodos de extracción que en los tres tipos de suelo se recuperó mayores densidades de larvas con el CF que con el EBM, aunque sólo en los suelos Ustropept y Ustult las diferencias fueron estadísticamente significativas.

Discusión

Los resultados obtenidos en cuanto al efecto del volumen de la muestra sobre la recuperación de las larvas (Cuadro 2) no coincidieron con los obtenidos en estudios similares con otros nematodos (1, 2). No se encontró una explicación satisfactoria para tal comportamiento.

En lo concerniente al número de lavados de la muestra y al tiempo de suspensión, los resultados fueron muy irregulares, lo que impidió relacionarlos con las características físicas del suelo u otros factores no cuantificados, dificultándose también el encontrar una explicación lógica a tal comportamiento.

En relación al arreglo de cribas, y con la técnica CF, se observó que la cantidad de residuos de suelo recogidos en las cribas fue menor. Pareciera que en este caso es también aplicable la explicación de que posiblemente al recoger una menor cantidad de residuos en los tubos de centrifuga sea más fácil mezclar la arcilla compacta en el fondo del tubo y resuspender los nematodos en la solución azucarada después de la primera centrifugación, lo que pondría a un mayor número de larvas en contacto con la solución (1, 11).

Con respecto a la gravedad específica de la solución azucarada, no se encontró una explicación satisfactoria para su efecto sobre la extracción de las larvas en el suelo Distropept, al reducirse su recuperación con una solución de 1.15 de gravedad específica en comparación con las de 1.12 y 1.18.

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 extracción de larvas en los tres tipos de suelos evaluados. Varios autores (1, 2, 3, 8) han obtenido resultados similares a los obtenidos en esta investigación en estudios con otros nematodos, al comparar la eficacia de las técnicas CF y EBM. Este último procedimiento para la extracción de nematodos depende de su movilidad y ésta, a su vez, puede estar influida por factores tales como la temperatura, falta de oxígeno en el embudo, obstrucción de las aberturas del filtro de tela del cilindro, 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 es la gravedad específica de los nematodos, que permite separarlos de partículas más densas mediante su flotación en una solución azucarada. En este caso los nematodos pueden ser recuperados aún cuando estén inactivos, lo que probablemente explique, al menos parcialmente, la mayor recuperación obtenida por este método.

En vista de que no hubo una tendencia definida en cuanto a la recuperación de larvas para cada una de las variables evaluadas, podría interpretarse este hecho como una necesidad de hacer un estudio con más tipos de suelo, variables y más repeticiones con el objeto de detectar si existe una tendencia definida o se mantiene el comportamiento exhibido en esta investigación; en cualquier caso, posiblemente se podría llegar a obtener conclusiones más satisfactorias con respecto al efecto de estas variables sobre la extracción de larvas de esta importantísima especie de nematodo fitoparásito.

Resumen

Se evaluó la eficacia de las técnicas Centrifugación-flotación y Embudo de Baermann modificado, así como variantes de las mismas, para la extracción de larvas de *Meloidogyne incognita* en tres tipos de suelo comúnmente encontrados en Costa Rica (Ustult, Ustropept y Distropept). Con ambos métodos de extracción se evaluó la influencia del volumen de la muestra (50, 100 ó 150 cc), del número de lavados de la muestra (1, 2 ó 3), del tiempo de suspensión del

suelo en el agua antes de su paso a través de las cribas (20, 40 ó 60 seg) y del arreglo de las cribas (A: una de 100 y dos de 325 mesh; B: una de 50 y dos de 325 mesh; C: una de 100 y una de 325 mesh). En la técnica CF además se evaluó el tiempo de centrifugación (3, 4 ó 5 min. a 3000 rpm) y la gravedad específica de la solución azucarada (1.12, 1.15 ó 1.18).

Con la técnica EBM se extrajo significativamente más larvas al utilizar muestras de 100 cc en los suelos Ustropept y Ustult. En el Ustropept se recuperó densidades significativamente mayores al lavar las muestras tres veces, mientras que en lo concerniente al tiempo de suspensión se encontró que 20 y 60 seg permitieron extraer densidades significativamente mayores en el Ustult y el Distropept, respectivamente. Con el método CF se encontró que los tratamientos de un solo lavado y 20 seg de suspensión permitieron recuperar densidades significativamente mayores en el suelo Ustult; un solo lavado también permitió recuperar más larvas en el suelo Distropept. La utilización de un arreglo B de cribas y de una solución azucarada con 1.12 de gravedad específica permitió recuperar densidades significativamente mayores de larvas en los suelos Ustropept y Distropept, respectivamente. Se encontró que en los tres suelos se recuperó más larvas con la técnica CF que con el EBM.

Literatura citada

1. ALVARADO, M. y LOPEZ, R. Extracción de nematodos fitoparásitos asociados al arroz, cv. C. R. 1113, mediante modificaciones de las técnicas de Centrifugación-flotación-flotación y Embudo de Baermann modificado. *Agronomía Costarricense* 5(1): (en prensa). 1981.
2. ALVARADO, M. y LOPEZ, R. Extracción de algunos nematodos fitoparásitos mediante modificaciones de las técnicas de Centrifugación-flotación y Embudo de Baermann modificado. *Agronomía Costarricense* 6(1): (en prensa). 1982.
3. AYALA, A., ROMAN, J. y TARJAN, A. C. Comparison of four methods for isolating nematodes from soil samples. *The Journal of Agricultural of the University of Puerto Rico*. 57(4):219-225. 1963.
4. BARKER, K. R. y OLTHOF, T. H. Relationships between nematode population densities and crop responses. *Annual Review of Phytopathology* 14:327-353. 1976.
5. BARKER, K. R. *et al.* Interrelationships of *Meloidogyne* species with flue-cured tobacco. *Journal of Nematology* 13(1):67-79. 1981.
6. CAVENESS, F. E. y JENSEN, H. J. Modification of the centrifugal flotation for the isolation and concentration of nematodes and their eggs from soil and plant tissue. *Proceeding of the Helminthological Society of Washington* 22(1):87-89. 1955.
7. FERRIS, H. y FEIGEN, L. A. Determination of economic threshold levels of *Meloidogyne incognita* for Southern California crops. *Journal of Nematology* 9(4):267 (Abstr). 1977.
8. 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.
9. SASSER, J. N. Economic importance of *Meloidogyne* in tropical countries. In Lamberti, F. y Taylor, C. E., eds. *Root-Knot nematodes (Meloidogyne species) Systematics, biology and control*. New York, Academic Press Inc. 1979 pp. 317-329.
10. THORNE, G. *Principles of nematology*. New York, Mc Graw Hill Inc., 1961. 553 p.
11. WILLARD, J. R. y PETROVICH, N. S. A direct centrifugal-flotation method for extraction of nematodes from clay soils. *Plant Disease Reporter* 56(9):808-810. 1972.

Viene de la página 42

El kelvin. Corresponde a $1/273.16$ de la temperatura termodinámica del punto triple del agua (su símbolo es K).

La candela. Es la intensidad luminosa —en dirección perpendicular y con una superficie igual a $1/600\ 000$ de metro cuadrado— de un cuerpo negro, a la temperatura de solidificación del platino a una presión de $101\ 325$ newton por metro cuadrado.

La mole. Es la cantidad de sustancia de un sistema que contiene tantas entidades elementales como átomos hay en 0.012 kilogramos de carbono 12 .

El radián. Es la medida de un plano cuyo vértice coincide con el centro de un círculo y cuya abertura es igual a la longitud de su radio subtendido como arco.

El steradián. Es la medida de un ángulo sólido con su vértice al centro de una esfera y que abarca sobre su superficie el área de un cuadrado cuyos lados tienen la longitud del radio.

Dirección de Información Pública
y Comunicaciones
IICA

* Tomado y adaptado de: Francisco Campos y Asociados, S.A. — Berlin No. 321, México 21, D.F.