

EFICACIA DE DOS METODOS Y SUS MODIFICACIONES EN LA EXTRACCION DE NEMATODOS ENDOPARASITOS MIGRATORIOS DE RAICES DE PIÑA Y PLATANO

M. Alvarado-Soto y R. López-Chaves

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

Accepted:

12.VII.1981

Aceptado:

RESUMEN

Alvarado-Soto M., y R. López-Chaves. 1981. Eficacia de dos métodos y sus modificaciones en la extracción de nematodos endoparásitos migratorios de raíces de piña y plátano. *Nematropica* 11:129-136.

Se estudió la influencia del tiempo de maceración de las raíces (10, 20 y 30 seg), de la longitud de los trozos de raíz (2, 3 y 4 cm), del peso de la muestra (10, 15 y 20 g) y de la incubación de las raíces maceradas en una solución de H₂O₂ (1, 3 y 5%) durante 48 hr., sobre la extracción de *Radopholus similis* (Cobb) Thorne y *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) Filipjev & Schuurmans Stekhoven de raíces de plátano y piña, respectivamente, mediante las técnicas de maceración de tejidos + embudo de Baermann modificado (MTEBM) y la de maceración de tejidos + centrifugación en solución azucarada (MTC). No se encontraron diferencias significativas en el tiempo de maceración entre ambas especies y técnicas de extracción. Con muestras de 10 g se recuperaron significativamente más nematodos que con las de 15 o 20 g, mientras que la incubación de las raíces en 3% de H₂O₂ extrajo mayores densidades que las otras concentraciones de H₂O₂ o el testigo con sólo agua. Con ambos métodos de extracción se recuperaron significativamente menos *P. brachyurus* al utilizar trozos de raíz de 4 cm. Se extrajo significativamente más *R. similis* con trozos de 3 cm que con los de 2 cm al utilizar la técnica MTC, mientras que con la técnica MTEBM se extrajo significativamente más nematodos con trozos de 3 que con los de 4 cm. En todos los casos la técnica MTC extrajo mayores densidades de nematodos de ambas especies que la MTEBM.

Palabras claves adicionales: extracción, endoparásitos migratorios, técnicas, *Musa*, *Ananas*.

ABSTRACT

Alvarado-Soto, M. and R. López-Chaves. 1981. Efficiency of two methods and their modifications for the extraction of migratory endoparasitic nematodes from pineapple and plantain roots. *Nematropica* 11:129-136.

The effect of root maceration time (10, 20 and 30 sec.), sample weight (10, 15 and 20 g), root length (2, 3 and 4 cm) and incubation of the macerated roots in a H_2O_2 solution (1, 3 and 5%) for 48 hr., on the extraction of *Radopholus similis* (Cobb) Thorne and *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) Filipjev & Schuurmans Stekhoven from plantain and pineapple roots, respectively, by the tissue maceration + modified Baermann funnel (TMMBF) and tissue maceration + centrifugation in sugar solution (TMC) techniques, was evaluated. For both nematode species and both extraction techniques, maceration time did not have any effect on their recovery. More nematodes were significantly extracted with 10 g than with 15 or 20 g root samples. Incubation of the macerated roots in a 3% H_2O_2 solution yielded significantly more nematodes than the other H_2O_2 concentrations or the check with water alone. Significantly less *P. brachyurus* were recovered by both techniques using root pieces 4 cm long, whereas significantly more *R. similis* were recovered by the TMC method using 3 cm rather than 2 cm long root pieces. With the TMMBF method more *R. similis* were significantly extracted with 3 cm than with 4 cm long root pieces. Higher numbers of both nematodes species were recovered with the TMC technique than with the TMMBF method for all the variables studied.

Additional key words: extraction, migratory endoparasites, burrowing nematode, techniques, Musa, Ananas.

INTRODUCCION

Uno de los aspectos más importantes de la Fitonematología es la determinación de la densidad económicamente crítica de los nematodos parásitos en las plantas cultivadas, interpretándose ésta como aquella densidad de una especie de nematodo en la cual el costo de la alternativa de combate bajo consideración es igual al valor del daño ocasionado al cultivo por dicha población (1, 3). La metodología de extracción de los nematodos juega en este caso un papel preponderante en la determinación de esta densidad. Es necesario contar con técnicas confiables que permitan recuperar nematodos en cantidades que permitan obtener resultados representativos de la población existente en el suelo o en las raíces (1).

La importancia económica de los nematodos endoparásitos migratorios *Radopholus similis* (Cobb) Thorne y *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) Filipjev & Schuurmans Stekhoven en varios cultivos tropicales está bien documentada (4, 5, 8, 10). Dada la carencia de información local sobre la eficacia comparativa de algunos métodos usados comúnmente en Costa Rica para la extracción de estas dos especies, se realizó la presente investigación, en que se compararon dos métodos y se cuantificó el efecto de cuatro variables, algunas nuevas y otras ya evaluadas (6, 13), sobre la recuperación de estos endoparásitos migratorios.

MATERIALES Y METODOS

Se recolectaron raíces de piña (*Ananas comosus* L.) en Pital de San Carlos, y de plátano (*Musa acuminata* X *M. balbisiana*, AAB) en Río Frío, parasitadas por *P. brachyurus* y *R. similis*, respectivamente. En el laboratorio las raíces fueron procesadas por el método descrito por Taylor y Loegering (14). Una vez maceradas, las raíces fueron sometidas a dos métodos alternativos de extracción: a) el método de centrifugación en solución azucarada (MTC) descrito por Caveness y Jensen (2) y (b) el método del embudo de Baermann modificado por Christie y Perry (MTEBM), según la descripción dada por Thorne (15). La identificación y recuento de los nematodos recuperados por ambos métodos se efectuó bajo un microscopio estereoscópico.

En ambos métodos de extracción (MTC y MTEBM) se evaluó por separado la influencia del tiempo de maceración de los trozos de raíz (10, 20 y 30 seg a 21,000 rpm), peso de la muestra (10, 15 y 20 g), longitud de los trozos de raíz (2, 3 y 4 cm) e incubación previa de las raíces maceradas en una solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , 1, 3 y 5%) durante 48 hr., sobre la recuperación de ambas especies.

La eficacia de ambos métodos en la recuperación de las especies de nematodos fue comparada entre sí en el caso de la primera variante evaluada (tamaño de la muestra); para esto se utilizó un diseño experimental de parcelas divididas con cinco repeticiones, donde las parcelas grandes fueron los métodos de extracción y las parcelas pequeñas el tamaño de la muestra. Con las otras variantes evaluadas sólo se comparó independientemente para cada método de extracción, el efecto de cada variante; en este caso se usó un diseño completamente al azar en el que cada tratamiento fue repetido cinco veces. Antes de proceder a la evaluación de los métodos de extracción y sus variantes sobre la extracción de *R. similis*, se determinó el grado de necrosis en las raíces con la densidad de nematodos recuperados de ellas. Para esto se asignó una escala arbitraria de acuerdo al porcentaje de tejido necrosado medido longitudinalmente según la escala 1= 0-25%; 2= 26-50%; 3=51-75% y 4=76-100%. Se utilizaron sólo raíces de grado 2 para las evaluaciones de extracción. Todas las variables fueron analizadas estadísticamente, y los valores promedios fueron comparados entre sí mediante la prueba de amplitud múltiple de Duncan. Todos los datos fueron transformados sistemáticamente en $(X + \frac{1}{2})^{1/2}$ para su correspondiente análisis estadístico.

RESULTADOS

Con respecto al tamaño de la muestra (Fig. 1a y 1b), con ambas técnicas de extracción se recuperaron significativamente más nematodos de ambas especies con muestras de 10 que con las de 15 o 20 g. Con la técnica MTEBM se determinó que con una longitud de trozos de raíz de 3 cm se recuperaron significativamente más nematodos de ambas especies que con una longitud de 4 cm. Con la técnica MTC se extrajeron densidades significativamente mayores de *P. brachyurus* con trozos de 3 cm que con los de 4 cm; en el caso de

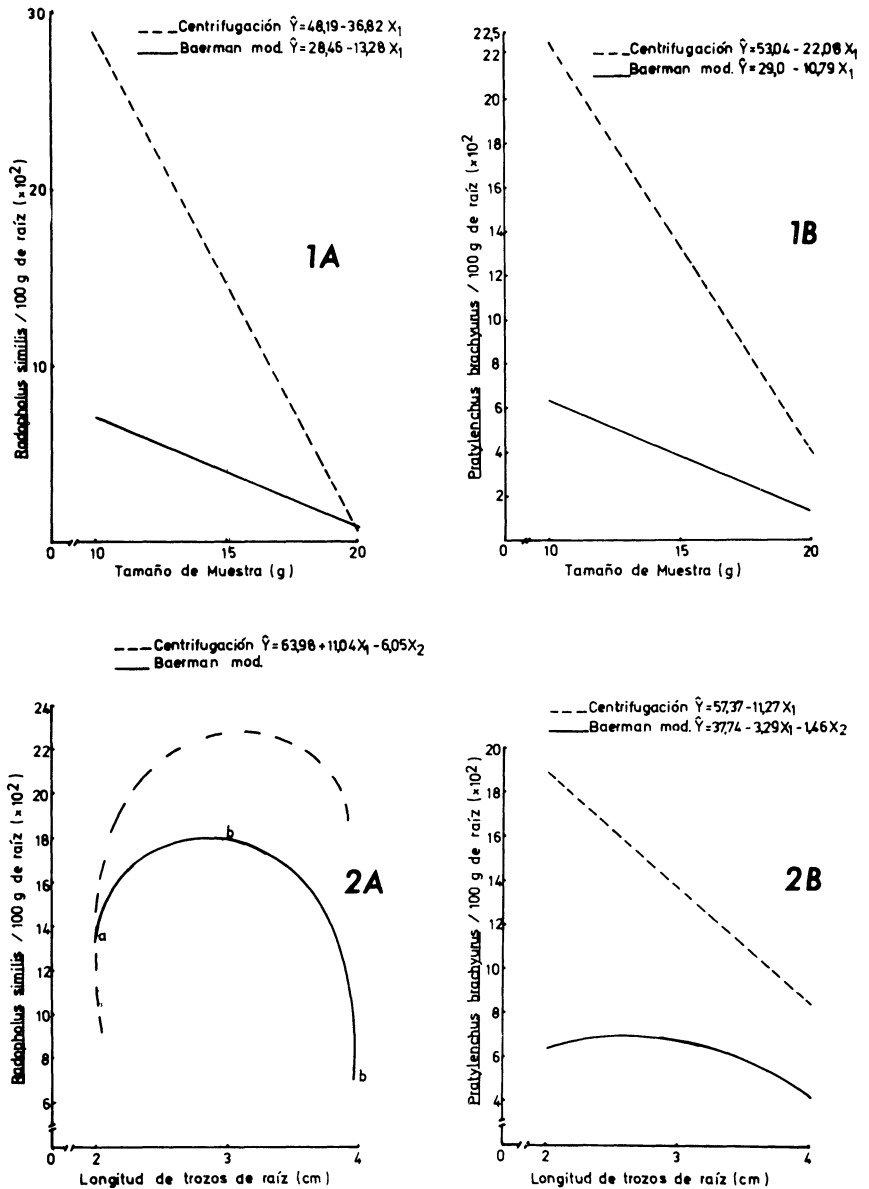


Fig. 1-2. Influencia del tamaño de la muestra y la longitud de los trozos de raíz sobre la extracción de *Radopholus similis* (1a y 2a) y *Pratylenchus brachyurus* (1b y 2b), respectivamente, por dos métodos de extracción.

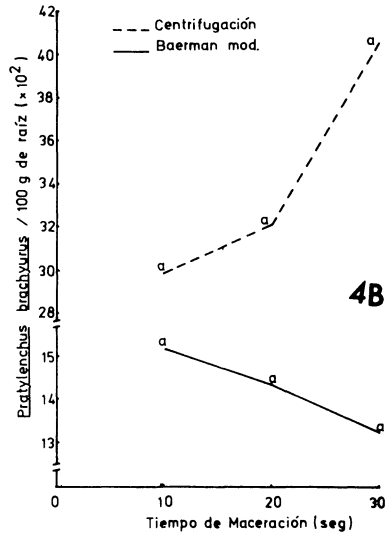
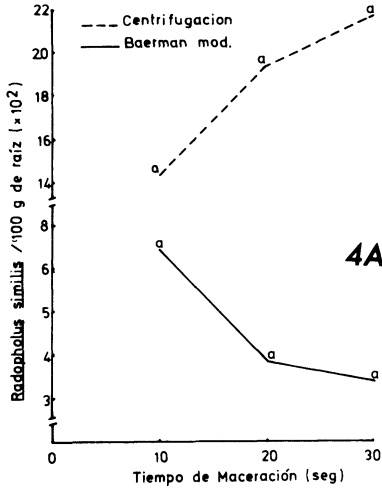
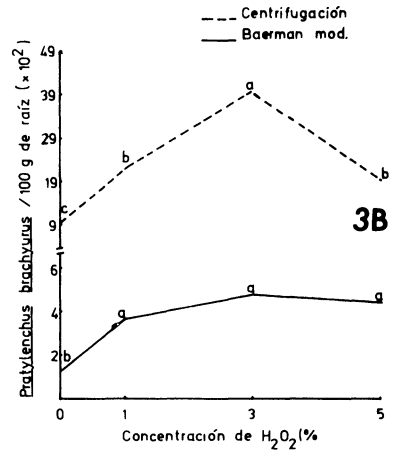
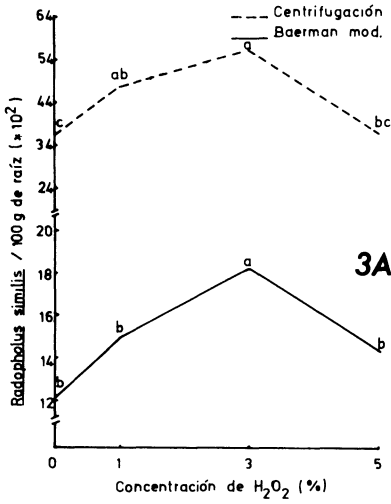


Fig. 3-4. Efecto de la concentración de H₂O₂ y del tiempo de maceración sobre la recuperación de *Radopholus similis* (3a y 4a) y *Pratylenchus brachyurus* (3b y 4b), respectivamente, por dos métodos de extracción. En una misma línea, los puntos señalados por una misma letra no difieren significativamente entre sí (Duncan, P= 0,05).

R. similis se extrajeron significativamente más especímenes con trozos de 3 que con los de 2 cm (Fig. 2a y 2b).

El efecto de la incubación de las raíces maceradas en las diversas concentraciones de H_2O_2 se ilustra en las Fig. 3a y 3b. Con ambas técnicas de extracción se encontró que el 3% de H_2O_2 permitió recuperar mayores densidades de las dos especies que las otras concentraciones de H_2O_2 o el testigo con solo agua. En referencia al tiempo de maceración, no se encontró diferencia entre tratamientos con ambas técnicas de extracción, pero se observó, (Fig. 4 a y 4b) que a medida que aumentó el tiempo de maceración disminuyó la densidad de nematodos extraída por la técnica MTEBM, mientras que con MTC ocurrió lo contrario. Al comparar ambos métodos de extracción se encontró que con el MTC se extrajeron densidades significativamente mayores de las dos especies de nematodos en comparación con las obtenidas con el MTEBM.

DISCUSION

El efecto de la longitud de los trozos de raíz sobre la extracción podría estar relacionado con la mayor o menor superficie de contacto de otros tejidos a la acción de las cuchillas de la licuadora; los trozos pequeños (2 cm) posiblemente no son muy afectados por las cuchillas debido a su tamaño que les podría facilitar el escapar a la acción de éstas. Por otra parte un tamaño de 4 cm puede dificultar la acción de las cuchillas, que no logran macerar totalmente a los trozos de esta longitud. El tamaño de 3 cm pareciera ser el óptimo entre las dos longitudes mencionadas previamente, dado que fue con este tratamiento se obtuvo la mayor recuperación de las dos especies por ambos métodos de extracción.

En cuanto al peso de la muestra, se encontró que a medida que aumentó éste disminuyó la cantidad de nematodos extraídos por ambas técnicas. Resultados similares han sido obtenidos por algunos autores (6, 11) al evaluar la influencia de esta variable sobre la extracción de este tipo de nematodos. El tamaño ideal de la muestra, recomendado por Quimi y Villacis (9) para la extracción de *R. similis*, concordó con el que dió la mayor recuperación de este trabajo. Estos resultados podrían estar relacionados a la superficie de las raíces que está expuesta a la acción de las cuchillas de la licuadora, ya que a medida que aumenta el peso de la muestra, aumenta la cantidad de trozos de raíz y disminuye la superficie de éstas que está expuesta a las cuchillas, lo que dificulta la maceración de los tejidos. Esto eventualmente podría afectar la recuperación de los nematodos, reduciéndola considerablemente. Es posible que este comportamiento haya sido afectado también por el tiempo de maceración, el que fue constante (20 seg) para los tres tamaños de muestra evaluados.

El tiempo de maceración de las raíces no tuvo efectos significativos sobre la recuperación de las dos especies de nematodos en estudio. Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que cuando se utiliza el método MTEBM se

recupera mayor número de nematodos si sólo se maceran los tejidos durante 10 seg, posiblemente porque en este tiempo los tejidos no son macerados finalmente y no atascan o cierran los poros de la tela en el fondo del cilindro que se utiliza en este método. Esto facilita el pasaje de los nematodos al agua inmediatamente debajo de la tela, con lo que la recuperación de especímenes es mayor. Otro factor que también puede haber afectado los resultados obtenidos es la cantidad de nematodos destrozados. Dado a que este método depende de la movilidad de los nematodos para que pasen a través del cilindro con fondo de tela al agua contenida en el embudo, la ruptura de los especímenes, probablemente acentuada con un mayor tiempo de maceración pudo haber disminuido el número de nematodos móviles y consecuentemente la extracción. Por el contrario, con el método MTC se recuperaron mayor número de especímenes con el tiempo de maceración más prolongado, debido probablemente a que con este tiempo se obtuvo la maceración más pronunciada de los tejidos, lo que liberó mayor cantidad de nematodos. Dado que en este caso la extracción no depende de la movilidad de los nematodos, puesto que la solución azucarada permite recuperar especímenes vivos o muertos por igual, lo que interesa es que se liberen de los tejidos la mayor cantidad de especímenes. Esta mayor extracción se obtuvo con 30 seg de maceración.

Los resultados obtenidos con relación a la incubación de las raíces maceradas en una solución de peróxido de hidrógeno previo a la extracción de los nematodos concuerdan con los obtenidos por varios autores (6, 12, 13). Estos resultados podrían atribuirse a la mayor oxigenación del medio que contiene el peróxido de hidrógeno, permitiendo que los nematodos se mantuvieran activos durante más tiempo. Por otra parte, se observó inicialmente, que las soluciones de H_2O_2 tenían una temperatura mayor que la del agua, que era de 24 C. Estos incrementos fueron de 1, 2 y 3 C para las soluciones que tenían 1, 3 y 5% de H_2O_2 , respectivamente. Esta situación pudo afectar la recuperación de los nematodos, dado que hay informes (7) que una temperatura entre 24-27 C puede aumentar la extracción de los nematodos. Se sugiere el uso de la técnica MTCF para la extracción de nematodos endoparásitos migratorios ya que permitió extraer mayores densidades de las especies bajo estudio.

LITERATURA CITADA

1. ALVARADO M. y R. LOPEZ. 1981. Extracción de nematodos fitoparásitos asociados al arroz, cv. C. R. 1113, mediante modificaciones de las técnicas de Centrifugación-flotación y Embudo de Baermann modificado. Agron. Costarr. 5: (en prensa).
2. CAVENESS, F. E. y H. J. JENSEN. 1955. Modification of the centrifugal flotation technique for the isolation and concentration of nematodes and their eggs from soil and plant tissue. Proc. Helm. Soc. Wash. 22: 87-89.
3. FERRIS, H. 1980. Nematology-status and prospects: Practical imple-

- mentation of quantitative approaches to nematology. *Journal of Nematology* 12: 164-170.
4. GEROUT, R. 1975. Nematodes of Pineapple. *PANS* 21: 123-140.
 5. GOWEN, S. R. 1978. Some consideration of problems associated with the nematode pests of bananas. *Nematropica* 9: 79-81.
 6. GOWEN, S. R. y J. F. EDMUNDS. 1973. An evaluation of some simple extraction techniques and the uses of hydrogen peroxide for estimating nematode populations in banana roots. *Plant Dis. Repr.* 57: 678-681.
 7. KEER, A. y M. K. VYTHILINGHAN. 1967. Factors influencing the extraction of nematodes from soil. *Nematologica* 12: 511-517.
 8. LOPEZ, R. 1980. Determinación de los nematodos fitoparásitos asociados al plátano (*Musa acuminata* x *M. balbisiana*, AAB) en Río Frío. *Agron. Costarr.* 4: (en prensa).
 9. QUIMI, V. H. y J. VILLACIS. 1977. Estudio comparativo de dos métodos de extracción del nematodo *Radopholus similis* de las raíces de banano. *Nematropica* 7: 44-47.
 10. ROMAN, J. 1978. Fitonematología Tropical. Puerto Rico, Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico. 256 p.
 11. SIVAPALAN, P. *et al.* 1978. The influence of sample size on recovery of *Pratylenchus loosi* from tea feeder roots. *Nematologica*. 24: 95-99.
 12. SPAULL, V. M. y J. M. C. BRAITHWAITE. 1979. A comparison of methods for extracting nematodes from soil and roots of sugarcane. *Proc. South Afr. Sug. Tech. Assoc.* 53: 103-107.
 13. TARJAN, A. C. 1967. Influence of temperature and hydrogen peroxide on the extraction of burrowing nematodes from citrus roots. *Plant Dis. Repr.* 51: 1025-1028.
 14. TAYLOR, A. L. y W. Q. LOSEGERING. 1953. Nematodes associated with root lesion in abaca. *Turrialba* 3: 8-13.
 15. THORNE, G. 1961. *Principles of Nematology*. McGraw Hill Inc., New York, 553 p.

Recibido para publicar:

4. V. 1981

Received for publication:

AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su agradecimiento al Dr. A.C. Tarjan por su ayuda en la confirmación de la identidad de *P. brachyurus*, y a las señoritas Marielos Serrano y Marcela Rodriguez S. por su esmerada labor mecanográfica y Xenia Salazar por la preparación de las ilustraciones.