

Modificaciones al método de extracción de nematodos fitoparásitos por centrifugación en azúcar

G. NOMBELA y A. BELLO

Se realiza un estudio del método para la extracción de nematodos del suelo por centrifugación en azúcar de CAVENESS y col. (1955), redescrito por DE GRISSE (1969), que se basa en un cambio de la densidad de la suspensión que contiene los nematodos con el fin de separarlos de las partículas de suelo.

Se introducen en este método algunas modificaciones, que permiten la decantación automática de las muestras en suspensión, por medio de tamices que impiden la pérdida de las especies acuáticas, así como la extracción simultánea por flotación de los quistes de *Heterodera*, al mismo tiempo que se eliminan las fibras vegetales.

Se distinguen en cada muestra tres fracciones: suelo (S), peri-radicular (PR) y raíz (R), que permiten obtener tres suspensiones diferentes donde predominan los nematodos saprófagos, ectoparásitos y endoparásitos respectivamente. La fracción peri-radicular (PR) corresponde a las partículas de suelo que se encuentran adheridas a la superficie de las raíces.

Se recomienda especialmente el método de centrifugación en la extracción de nematodos de escasa movilidad; en este caso se dan algunos resultados que permiten comparar la eficacia de este método con otros que se basan en la movilidad de los nematodos. Se adjuntan esquemas de los métodos de extracción y modelos de las hojas utilizadas en el registro de las características de las muestras y en los recuentos.

Gloria NOMBELA y A. BELLO. Instituto de Edafología y Biología Vegetal, C.S.I.C. Serrano 115 dupl., Madrid.

En el estudio nematológico de un cultivo, el aislar los nematodos contenidos en las muestras de suelo y raíz, con objeto de proceder a su posterior recuento, determinación y estudio, constituye uno de los aspectos fundamentales. El método empleado para ello será tanto más eficaz cuanto mayor número de nematodos consiga extraer, después de eliminar, a ser posible, los demás componentes del suelo (arcilla, arena, limo, materia orgánica, etc.).

La extracción de los nematodos por el método de centrifugación tiene especial aplicación en el estudio de los nematodos de baja movilidad y huevos (Tabla I). Proponemos algunas modificaciones a los métodos descritos en los trabajos anteriores de CAVENESS y col. (1955) y DE GRISSE (1969).

En la extracción se pueden distinguir las fases siguientes: Procesos previos y extracción de las fracciones suelo, peri-radicular y raíz.

Procesos previos a la extracción (fig. 1)

Las muestras de suelo remitidas al laboratorio deberán ir dentro de bolsas de plástico perfectamente cerradas y cada una con una etiqueta, donde figuren el cultivo, síntomas de la planta y otros datos de interés, aunque se puede asignar un número a la muestra y tomar estas características en un cuaderno de campo o en una hoja aparte. Se procurará recoger raíces secundarias que, a ser posible, deberán ir en una pequeña bolsa aparte, dentro de la bolsa de suelo, para evitar que los nematodos de la raíz pasen al suelo (a).

Una vez en el laboratorio, se registran en el cuaderno de muestras las observaciones que figuran en la etiqueta o cuaderno de campo: localidad, coordenadas UTM, provincia, fecha de recolección, recolector, propietario de la parcela, características del cultivo, síntomas, cultivos anteriores, sistemas de fertilización, rotación y riegos, etc. A continuación se le asigna un número de laboratorio que se grapa a la bolsa. Las muestras se deben conservar en cámaras frigoríficas a 5°C.

La preparación de la muestra para la extracción comienza vertiendo el contenido de la bolsa sobre un papel de filtro, y se procede a separar cuidadosamente las raíces del suelo (b). Después de homogeneizado el suelo se pasa por un tamiz de 2 mm de malla, con objeto de eliminar la grava, y se anotan a continuación en la hoja de características (Hoja I) sus rasgos más destacables: textura, humedad, compactación, presencia de raíces de malas hierbas, fauna del suelo, etc.

De este suelo tamizado se toman 100 gr ó 100 cc, que se depositan en una cápsula de porcelana (c), junto con una etiqueta de plástico en la que figure el número de la muestra; se cubre de agua y se deja durante un cuarto de hora como mínimo antes de proceder a la extracción propiamente dicha.

HOJA I**Características de la Muestra Nº***Fecha inic. análisis:**Fecha de recol.:**Almacenaje**Características:*— *Suelo:*

Peso:

Textura:

Compactación:

Humedad:

Color:

— *Raíz:*

Peso:

Raíz gruesa:

Raíz secundaria:

Estado:

— *Malas hierbas:*— *Fauna acompañante:*— *Observaciones:*

En el caso de que la muestra esté húmeda y no se pueda tamizar, se eliminan las piedras y fibras y se pone directamente la fracción de la muestra a analizar en la cápsula, pasándolo a través de un tamiz de 2 mm de malla al comenzar la extracción.

En cuanto a la raíz, una vez eliminados los posibles terrones que pueda tener adheridos, se examina con cuidado comprobando si corresponde a la planta que estamos estudiando y se deposita en un recipiente con agua. A continuación se lava la raíz con agua a presión sobre un tamiz de 2 mm de malla, que se ha colocado previamente sobre una cápsula, hasta que se elimina perfectamente el suelo adherido. El líquido resultante de este lavado se vierte a un recipiente de aproximadamente 4 litros, junto con una etiqueta de plástico en la que además del número de la muestra figuran las letras PR (correspondientes a las iniciales de la fracción peri-radicular).

La raíz, ya lavada, se pesa y se deposita en un recipiente con otra etiqueta en la que

figure el número de la muestra y la letra R (fracción raíz). Se observan bajo el agua del recipiente los síntomas que presenta la raíz: necrosis, agallas, engrosamiento, presencia de quistes, etc. Se anotan las características observadas en la hoja de «características del laboratorio» en el apartado de observaciones, cuantificando los síntomas a ser posible; al mismo tiempo se corta algún trozo de raíz que presente síntomas para confirmar la presencia de nematodos bajo el microscopio estereoscópico, mediante la separación de los tejidos de la raíz con agujas emangadas.

A continuación se corta la raíz (cuyo peso no debe ser superior a 25 gr) en trozos de una longitud aproximada a los 2 cm; si son raíces de gran tamaño o de especies leñosas se descortezan antes de cortarlas. Se añade agua y se deja macerar durante 1 ó 2 días, antes de la extracción.

Del suelo restante se separan 150 gr que, después de secar, se utiliza para realizar las determinaciones de materia orgánica (M.O.), pH y textura, conservando el resto de la muestra por si es necesario repetir los análisis.

Extracción de nematodos de la fracción suelo (fig. 1)

El contenido de la cápsula se agita mediante movimientos circulares (d) y, después de inclinarla ligeramente y dejándola decantar 1 ó 2 segundos, se vierte el líquido sobrenadante en un bocal de vidrio con capacidad aproximada de 4 litros; se repite la operación hasta que el agua de la cápsula esté completamente clara, quedando en ella únicamente la arena perfectamente lavada, que se elimina.

El bocal se completa con agua, si es necesario, para que quede lleno hasta el borde (e), dejándolo reposar 2 horas como mínimo o mejor toda una noche, para que sedimente el limo y suban a la superficie los restos

vegetales, los cuales se eliminan a presión sobre la superficie del bocal.

Si se sospechaba la presencia de *Heterodera* (cuando se trata especialmente de cultivos de cereales, remolacha o leguminosas), es necesario colocar previamente una tira de papel de filtro de una anchura de unos 10 cm alrededor del borde del bocal antes de llenarlo, para que los quistes se adhieran a ella. En este caso, la tira se retirará cuidadosamente para observarla bajo un microscopio estereoscópico a 20 aumentos (f), antes de proceder a la eliminación de las fibras vegetales.

Para eliminar parte de la arcilla que está en suspensión se utilizan unos sifones de filtración con un tamiz de 28 μm , mediante los cuales el contenido del bocal se reduce (g), y se transvasa a un recipiente graduado de un volumen aproximado de 1.000 cc (h), dejándolo reposar alrededor de una hora; este recipiente contiene fundamentalmente los nematodos y el limo.

Tras la sedimentación, se filtra por un tamiz de 28 μm (i) reduciendo el volumen a unos 300 cc (j), los cuales se distribuyen uniformemente entre los 4 tubos de la centrifuga (k) procurando que su contenido no llegue al borde, y se somete a unas 1.800 revoluciones durante 3 minutos (l). El líquido sobrenadante de los tubos se recoge en un recipiente (o), y se añade a los tubos de la centrifuga una solución de azúcar al 30% (p), homogeneizando el contenido perfectamente con una espátula (q) antes de volver a introducirlos en la centrifuga, esta vez durante sólo 30 segundos (r). El líquido sobrenadante se recoge en el recipiente que contiene la suspensión perteneciente a la 1.^a centrifugación (s) y se filtra todo a continuación por un tamiz de 28 μm (t), al tiempo que se lava intensamente con agua para eliminar el azúcar. El tamiz se inclina y se lava cuidadosamente haciendo escurrir el agua hacia la parte inferior para recoger todo su contenido en una sola porción de dicho tamiz, pasán-

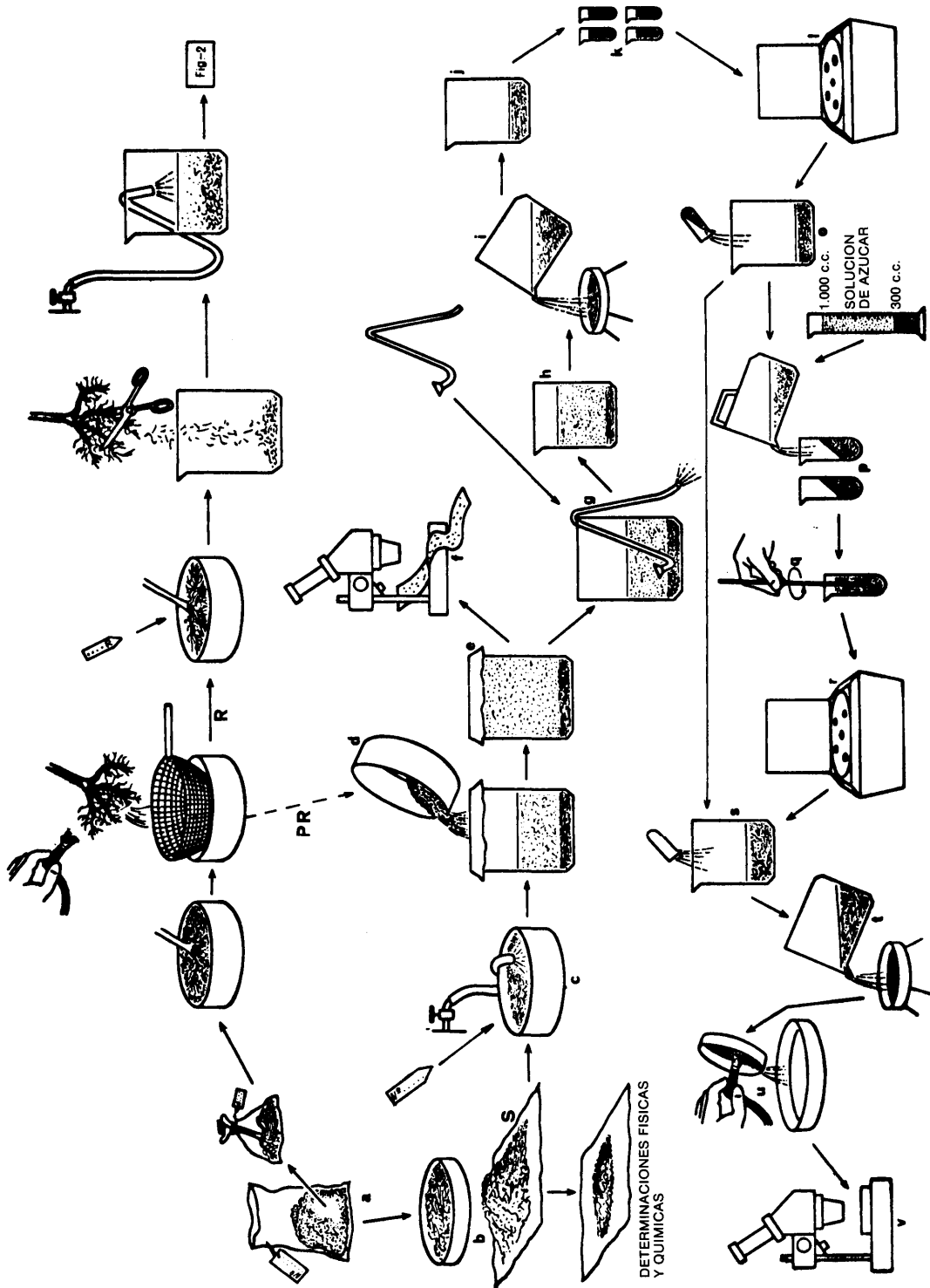


Fig. 1.—Procesos previos y extracción de la fracción suelo y peri-radicular.

dolo a continuación a una placa de Petri (u); así queda lista la muestra para su observación y recuento bajo el microscopio estereoscópico, después de haberla dejado reposar unos minutos (v). El resultado del recuento se registra en la «hoja de recuento», que contiene los nematodos más frecuentes (Hoja II).

Cuando la placa contenga una cantidad excesiva de materia orgánica u otros componentes del suelo, que dificulten la observación de los nematodos al microscopio, se procederá a repartir la muestra entre tantas placas como sean necesarias para facilitar el recuento; o bien, si se prefiere, se repite la centrifugación poniendo la muestra en un solo tubo al que se añade una cucharadita de caolín para que retenga las fibras vegetales, cuidando de equilibrar la centrifuga con los tres tubos restantes llenos de agua.

Si en una primera observación aparece gran número de nematodos en la placa, se divide ésta en dos con un lápiz graso y se procede al recuento de una de las partes, multiplicando el resultado del recuento por 2. Si se quiere expresar en Kgr o litros el recuento se multiplica por 10.

Paralelamente se van aislando los nematodos de interés en un pocillo con agua y se procede a continuación a su fijación y montaje, con el fin de completar su determinación a nivel específico al microscopio óptico.

Extracción de la fracción peri-radicular (Fig. 1)

Se procede igual que para la fracción suelo, con excepción de que la reducción del recipiente graduado de 1000 cc, antes de la centrifugación, debe hacerse a 150 cc para poder distribuir la muestra en sólo dos tubos; los otros dos tubos de la centrífuga se llenan de agua para equilibrarla, o bien se extraen dos muestras simultáneamente.

HOJA II

HOJAS DE RECUESTO Muestra N°:

Nematodos	Suelo	P.R.	R
<i>Pratylenchus</i>			
<i>Paratylenchus</i>			
<i>Xiphinema</i>			
<i>Criconemoides</i>			
<i>Helicotylenchus</i>			
<i>Meloidogyne</i>			
<i>Tylenchorhynchus</i>			
<i>Rotylenchus</i>			
<i>Trichodorus</i>			
<i>Boleodorus</i>			
<i>Heterodera</i>	} larvas } quistes		
<i>Tylenchus</i>			
<i>Ditylenchus</i>			
<i>Aphelenchus</i>			
<i>Aphelenchoides</i>			
<i>Mononchus</i>			
<i>Dorylaimido</i>			
<i>Alaimus</i>			
<i>Rhabditido</i>			
<i>Discolaimus</i>			
<i>Criconemella</i>			

Extracción de la fracción raíz (Fig. 2)

Tras dos días de maceración de las raíces (a), se reduce el agua que las contiene por filtración a través de un tamiz de 28 μm (b) hasta un volumen de aproximadamente 150 cc y se añaden 2 cucharaditas de caolín (c), con el fin de retener las fibras vegetales durante la centrifugación. Se pasa todo por una batidora eléctrica durante 1,5 minutos (d), para después repartir el contenido en los tubos de la centrífuga (e), sometiénolo al mismo proceso a que hemos sometido las fracciones suelo y peri-radicular.

El resultado de las 2 centrifugaciones se pasa primero por un pequeño tamiz de 2 mm de malla (t) con el fin de retener las fibras vegetales, ya que en este caso los res-

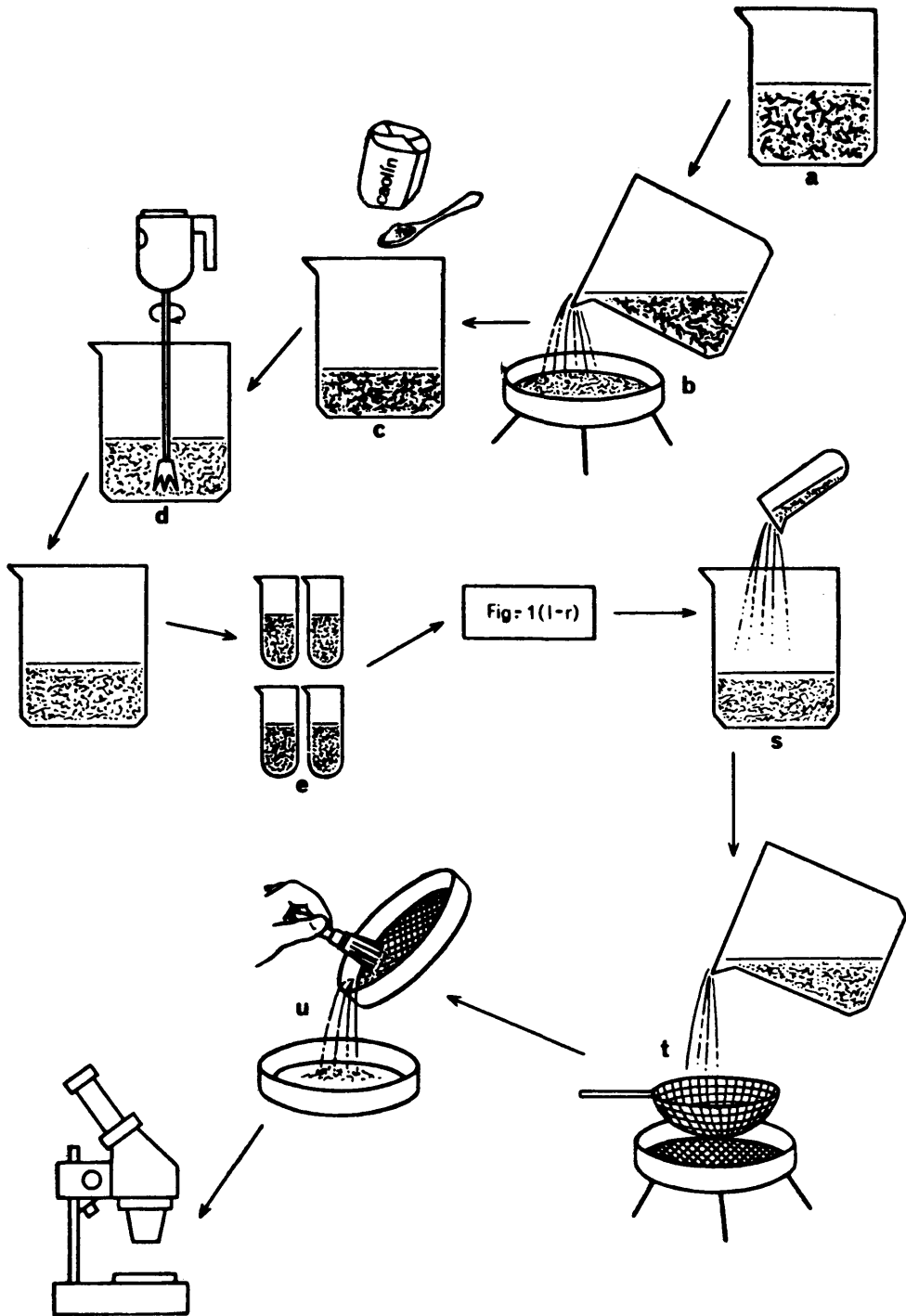


Fig. 2.—Extracción de la fracción raíz.

tos de raíz son muy abundantes y dificultarían la observación y recuento de los nematodos. El tamiz se coloca, sobre otro de 28 μm , recogiendo su contenido en una placa de Petri (u), para su posterior recuento y aislamiento.

Eficacia del método de extracción por centrifugación

En la Tabla I se dan los resultados de la extracción de los nematodos «anillados», que se caracterizan por su baja movilidad, por el método de SEINHORST (1962) y DE GRISSE (1969).

Se observa como del estudio de 19 muestras diferentes extraídas por el método de SEINHORST (1962), que utiliza en alguna de sus fases la movilidad de los nematodos además de la densidad, sólo tres muestras resultaron positivas para los nematodos «ani-

Tabla I.—Resultados de la extracción de los nematodos «anillados» por diferentes métodos

Métodos	Muestras positivas (frecuencia)	Abundancia media
SEINHORST (1962)	3 (15,8%)	0,58
DE GRISSE (1969)	8 (42,1%)	20,37
Nº de muestras = 19		

llados», mientras que ocho lo fueron por el de centrifugación, presentando además en la abundancia media diferencias altamente significativas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a las Ayudantes Diplomados de Investigación Visitación ALVIRA y M^a del Sagrario FERNÁNDEZ su colaboración en la puesta a punto de las técnicas de laboratorio.

ABSTRACT

NOMBELA, G. y BELLO, A., 1983: Modificaciones al método de extracción de nematodos fitoparásitos por centrifugación en azúcar. *Bol. Serv. Plagas*, 9: 183-189.

A study of the method for soil nematodes extraction by means of centrifugation in sugar according to CAVENESS *et al.* (1955), redescribed by DE GRISSE (1969), has been carried out. This method is based on a change of density of the suspension containing the nematodes, in order to separate them from soil particles.

Some modifications have been introduced in this method, which allow the automatic decantation of samples in suspension by means of sieves which exclude the loss of aquatic species, as well as extraction by flotation of *Heterodera* cysts, simultaneously vegetable fibres are eliminated.

In each sample three fractions are distinguished: soil (S), peri-radicular (PR) and roots (R) that allow to get three different suspensions where saprophytic, ectoparasitic and endoparasitic nematodes predominate respectively. The peri-radicular fraction (PR) corresponds to soil particles which are adhered to the surface of roots.

The centrifugation method is specially useful in the extraction of low mobility nematodes. In this case some results are given that permit to compare the efficiency of this method with other ones based in mobility of nematodes. Diagrams of extraction methods and models of paper sheets used in the register of characteristics and countings of samples are included.

REFERENCIAS

CAVENESS, F. E. and JENSEN, H. J., 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.

GRISSE, A. de, 1969: Redescription on modification de

quelques techniques utilisées dans l'étude des nematodes phytoparasitaires. *Meded. Rijksfe. Gent.*, 34: 361-369.

SEINHORST, J. W., 1962: Modifications of the elutriation method for extracting nematodes from soil. *Nematologica*, 4: 117-128.