

NOTA TÉCNICA

Métodos para la extracción de nematodos presentes en suelos del agrupamiento Ferralítico en Cuba

Dainé Hernández-Ochandia¹, Mayra G. Rodríguez Hernández¹, Ileana Miranda Cabrera¹,
Ricardo Holgado¹¹

¹Dirección de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. ¹¹Norwegian Institute for Bioeconomic Research (NIBIO), Noruega.

RESUMEN: El objetivo de este trabajo fue determinar los métodos más eficientes para la extracción de las comunidades de nematodos presentes en suelos del agrupamiento Ferralítico. Se muestrearon las localidades de Güines y San José de las Lajas, en la provincia Mayabeque, Cuba. El área seleccionada de 1 ha de suelo, se dividió en estratos y de cada uno se tomaron 100 submuestras para conformar cuatro muestras por ha. La toma de muestras se realizó en zig-zag utilizando una barrena; se colocaron en una bolsa de polietileno y se trasladaron al laboratorio de Nematología Agrícola del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Se utilizaron las técnicas de Embudos de Baermann, Bandejas Whitehead modificadas (en ambas con filtros de leche y gasa), así como el método de las dos botellas y la técnica de centrifugación flotación. Se procesaron 5, 25, 50, 100, 150, 250 y 350 gramos de suelo, excepto en la técnica de Embudos Barmann, donde se utilizaron 5 y 25g. Los datos del número de especímenes extraídos por muestra se procesaron mediante Análisis de Componentes Principales. Los mayores recobrados se obtuvieron con los métodos de las Bandejas de Whitehead (con ambos filtros)(100g de suelo) y el método de Centrifugación-Flotación.

Palabras clave: Bandejas de Whitehead, Centrifugación-Flotación, diversidad de nematodos.

Methods for extraction of nematodes present in soils of the Ferralitic group in Cuba

ABSTRACT: The objective of this work was to determine efficient extraction methods to study the soil nematode community present in ferralitic soils. Soil samples were taken following a stratified random design from one-hectare areas chosen in Guines and San Jose de las Lajas (Mayabeque Province, Cuba) The samples were placed in polyethylene bags and taken to the Plant Nematology Lab. of the National Center for Plant and Animal Health (CENSA). The extraction methods examined were the Baermann Funnel technique, the modified Whitehead tray with gauze and milk filter, the two bottle method, and the centrifugation-floatation technique. The quantities of soil processed were 5, 25, 50, 100, 150, 250, and 350 g. The data were analyzed by Principal Component Analysis. The highest quantities of nematodes were obtained by the Whitehead tray technique with both filters and 100g of soil and the centrifugation-floatation technique with 350g of soil.

Key words: Whitehead trays, centrifugation-floatation technique, nematode diversity.

La estimación de densidades poblacionales de los nematodos depende de la precisión del muestreo y de la aplicación de métodos de extracción apropiados y consistentes (1).

Los métodos que se desarrollaron, y se utilizan de manera universal para extraer los nematodos existentes en los suelos y raíces de las plantas hospedantes, obedecen a características de estos organismos, como son el tamaño de sus cuerpos, la movilidad y los hábitos de vida, entre otras.

Según Mensorley (2), los métodos centrifugación-flotación, aparato de Fenwick, elutriador, tamizado, decantación, embudos de Baermann y otros se emplean de manera general en los laboratorios de Nematología; la eficiencia en la extracción de grupos y el número de especímenes por género fueron objeto de estudio por parte de diversos grupos de investigación. Las técnicas varían en su eficacia y habilidad para procesar numerosas muestras. Al respecto señaló este investigador que los métodos de extracción deberían

remover todos los estados de todas las especies con 100% de eficiencia; sin embargo, esto no se obtiene debido a diversos factores que influyen en la eficacia de los métodos de extracción, relacionados con el tipo de suelo y temperatura, el momento de muestro, el tipo de cultivo, entre otros.

Cuando se comienzan a realizar estudios encaminados a conocer la diversidad de nematodos en disímiles agroecosistemas, con el propósito de establecer una relación entre grupos tróficos y prácticas agrícolas, resulta importante establecer, previamente, los métodos que posean elevada eficiencia en la extracción del mayor porcentaje de géneros y especímenes por género. En Cuba, los agalleros son los nematodos más frecuentes y dañinos para la mayoría de los cultivos (5) y representan el género más estudiado; para ello se utilizan las técnicas de embudos de Baermann para extraer juveniles y formas móviles de géneros filiformes y los bioensayos con plantas indicadoras para estimar poblaciones de *Meloidogyne*, mediante las escalas de Zeck, modificada a seis grados (3) y de Taylor y Sasser (4).

Los métodos de extracción poseen gran influencia en los resultados de los estudios de diversidad de nematodos, porque algunos de ellos pueden ser inefectivos para ciertos tipos de nematodos, debido a su tamaño, actividad, adhesión a los sustratos y las propiedades físico-químico de sustratos que pueden ser suelos, sedimentos u otros sustratos (6).

El objetivo del presente trabajo fue determinar los métodos que poseen mayor eficiencia en la extracción de especímenes contenidos en muestras de suelos del agrupamiento ferralítico, comunes en varias zonas de Cuba.

El estudio se desarrolló en el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) y para ello se seleccionaron dos localidades de la provincia Mayabeque, donde se hallan suelos Ferralíticos, cuyo material de origen fue calicaza dura (Tabla 1) que están presentes en diversas zonas de la región occidental del país (7).

En cada municipio se seleccionó una finca productora de alimentos y en ellas se tomaron muestras de un área equivalente a 1ha sembrada de frijol (*Phaseolus vulgaris* L. cv C 25-9N) al trazar en el área imaginariamente tres bloques o estratos; luego en cada uno se tomaron submuestras en zig-zag (8), en el periodo de diciembre de 2015 a abril de 2016.

La muestra, de 1kg por cada hectárea, estuvo compuesta por 100 submuestras o núcleos que se tomaron a una profundidad de 25 cm con una barrena de cánula de 4 cm de diámetro (100cc³ de suelo). La muestra se colocó en una bolsa de polietileno negro y se trasladó al laboratorio de Nematología Agrícola del CENSA, donde se colocó sobre una manta, se homogenizó y pasó por un tamiz de 125 µm para eliminar piedras y materiales orgánicos.

Las muestras se procesaron inmediatamente después del muestro, utilizando cuatro técnicas: I) Embudos de Baermann y II) Bandejas Whitehead (con dos tipos de filtros: filtro de leche y gasa); III) Método de las dos botellas y IV) Centrifugación-flotación.

Las técnicas se desarrollaron siguiendo los protocolos descritos (8, 9) con las particularidades que se relacionan a continuación:

Embudos Baermann: se colocó un tubo vial en el extremo de la manguera y no una pinza. Se evaluaron dos tipos de filtros: tela de gasa (colocada doble) y

TABLA 1. Características y clasificación de los suelos en dos zonas de la provincia Mayabeque, Cuba, que se emplearon en la comparación de métodos de extracción de nematodos para estudios de diversidad./ *Characteristics and classification of soils in two zones of Mayabeque Province, Cuba, that were used in the comparison of nematode extraction methods for biodiversity studies.*

Profundidad	MgO (mg.Kg ⁻¹)	K ₂ O (mg.Kg ⁻¹)	P ₂ O ₅ (mg.Kg ⁻¹)	N (kg.ha ⁻¹)	Mat. Orgánica (%)
Municipio San José de las Lajas					
Clasificación: Ferralítico Rojo Lixiviado Húmico, Eutrico					
0-15cm	10	20	25	18	2,35
Municipio Güines					
Clasificación: Ferralítico Rojo Lixiviado Típico, Eutrico					
0-15cm	15	26	28	20	2,02

leche, se ubicaron sobre tamices de 8 cm de diámetro. Se evaluaron 5 y 25 gramos de suelo, colectando el recobrado a las 24, 48 y 72 horas.

Bandejas Whitehead: se utilizaron placas de 20 cm de diámetro y tamices de 15 cm de diámetro que se construyeron en el laboratorio con tubos de PVC y malla plástica antiinsectos; se pusieron sobre fragmentos de plástico que actuaron como "patas" para levantar el tamiz. En estos tamices se colocaron dos tipos de filtros: gasa y leche. Se utilizaron 50, 100, 150, 250 y 350 gramos de suelo para cada filtro y se colectaron los recobrados a las 24, 48 y 72 horas

Método de las dos botellas: se utilizaron dos botellas de vidrio de 750 ml de capacidad, se le adicionaron 100, 150, 250 y 350 gramos de suelo y agua. La solución se filtró a través de tamices de 125 y 63 μm .

Método de centrifugación-flotación: se usaron una centrífuga de marca MSE, una balanza digital KERN JKL® y un set de tamices de 300, 125, 63, 45 y 38 μm . Se empleó una solución azucarada de densidad 1,18 (equivalente al uso de 484 g de azúcar crudo x L de agua⁻¹).

Para cada combinación método/volumen de suelo se procesaron tres réplicas. El estudio se repitió dos veces en el periodo.

Las suspensiones de nematodos se colocaron en un beaker de 50 ml, se dejaron reposar durante 20 minutos, se decantaron y se desechó el sobrenadante. Se concentraron, mataron con calor y fijaron con TAF (8). Para el conteo de especímenes, las suspensiones se colocaron en placas Petri de 9 y 15 cm y se observaron en un microscopio invertido (Zeiss®) con 40x. El recobrado de las muestras a las 24, 48, 72 horas se observó por separado. Los nematodos se extrajeron con un selector y se montaron en portaobjetos; se contabilizó el número total de especímenes por género y se identificaron utilizando diferentes claves (10, 11).

El número total de nematodos de cada género y el número total de nematodos extraídos por cada método se usaron para determinar la eficiencia de extracción. Con los datos se construyó una base de datos en sistema Excel y se procesaron estadísticamente mediante un análisis de Componentes Principales (CP) con el Paquete Estadístico InfoStat 2016.

En ambas localidades se encontraron 20 géneros, ubicados dentro de los cinco grupos tróficos (12) que habitan los suelos: bacteriófagos, fungívoros, herbívoros (con mayor número de géneros, en correspondencia con la procedencia de las muestras de un área de cultivo intensivo), omnívoros y predadores.

El mayor número de nematodos se recobró cuando se empleó la técnica de Bandejas de Whitehead (con filtros de leche y gasa: 100g de suelo como submuestra) y centrifugación (Fig. 1).

El método de extracción de Bandejas de Whitehead posee diferentes ventajas, entre ellas aparecen, según Coyne *et al.* (9), que no se necesita disponer de un equipo especial para procesar las muestras, es flexible y fácil de adaptar a circunstancias básicas utilizando el material disponible localmente, se puede extraer una amplia variedad de nematodos móviles y es una técnica muy simple y de fácil reproducción.

Para Cuba resulta un método factible, pues los materiales que requiere son de fácil adquisición y la construcción de los accesorios es muy simple. Su empleo en los laboratorios a nivel nacional facilitaría el proceso de extracción de nematodos contenidos en muestras de suelos del agrupamiento Ferralítico, por lo que es necesario acometer su evaluación en varios laboratorios del país para determinar así su eficacia para extraer especímenes presentes en otros tipos de suelos.

Los dos tipos de filtros utilizados permiten extraer adecuadas cantidades de especímenes; sin embargo, a pesar de que ambos se encuentran en el país, el filtro de leche es especializado para uso en la industria láctea y su costo es muy superior al filtro de gasa, material que se encuentra en hospitales y centros de higiene, por lo que se recomienda que se use un filtro de gasa.

La técnica de centrifugación-flotación resultó favorable por el número de especímenes recobrados de los suelos del tipo Ferralítico (150, 250 y 350g de suelo) (Fig. 1). Esta aprovecha las diferencias de gravedad específica entre nematodos y fracciones de suelo (8); es una técnica muy rápida y el recobrado es limpio, por lo que resulta fácil su observación al microscopio; no obstante, se debe trabajar con rapidez y cuidado, pues los nematodos se pueden deformar y hacer muy difícil la identificación. En el laboratorio del CENSA se utiliza de forma rutinaria, pero se procesaban solo 100 g de suelo. Los resultados de este estudio sugieren la necesidad de hacer modificaciones a los protocolos de trabajo al aumentar el volumen de suelo de la submuestra a procesar a través de esta técnica hasta 150 g. Este método permite extraer formas inactivas y nematodos lentos como Criconematidae, además de posibilitar la observación y la selección directas bajo el microscopio (13).

El Método de las dos botellas, denominado también de los dos Erlenmeyer o botellas de leche, que se basa en las diferencias en tamaño, forma y velocidad

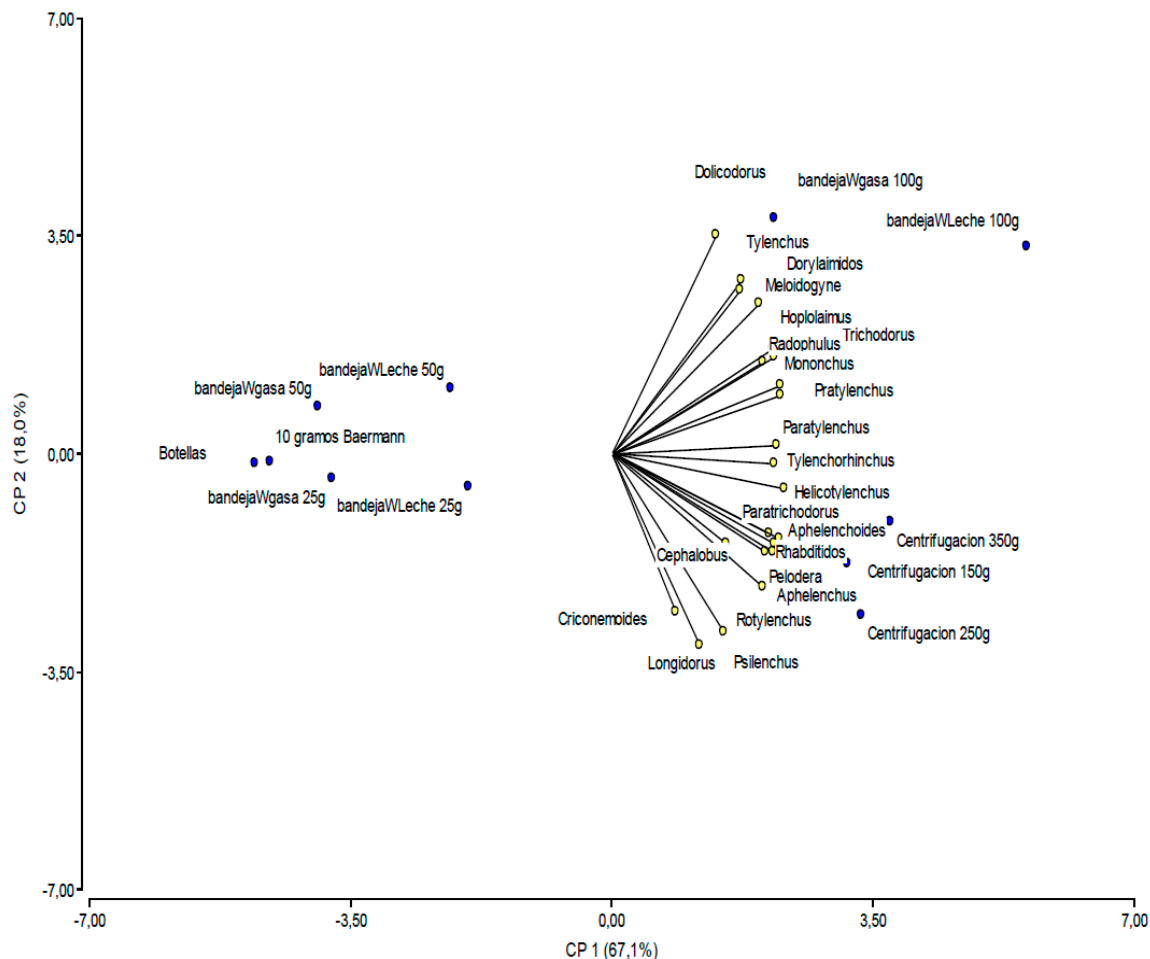


FIGURA 1. Resultados del análisis de CP en la comparación de métodos de extracción de nematodos, a partir de muestras de suelo del tipo Ferralítico, para estudio de diversidad en zonas de Mayabeque, Cuba. / *Results of the PC analysis in the comparison of methods for nematode extraction from ferralitic soils, for diversity studies in Mayabeque, Cuba.*

de sedimentación entre nematodos y partículas del suelo y en la movilidad de los nematodos (9), no resultó satisfactorio para la extracción de nematodos de estos suelos (Fig. 1); lo anterior no concuerda con lo señalado por van Bezooijen (8) sobre que posee alta eficiencia. Tampoco resultaron satisfactorios los métodos de Baermann y bandejas de Whitehead cuando se procesaron volúmenes de suelo menores de 50 g (Fig. 1).

Señaló van Bezooijen (8) que la eficiencia del método de embudos Baermann es bajo, pero es de bajo costo y poco consumo de agua, por ello es el más utilizado por los laboratorios en Cuba; sin embargo, el método de bandejas de Whitehead pudiera ser empleado de manera generalizada en los laboratorios del país, pues se utilizan implementos accesibles, como bandejas o placas Petri y tamices que pudieran

construirse con tubos de PVC de diferentes diámetros y con mallas plásticas en el fondo.

Los estudios de diversidad de nematodos en los suelos de ecosistemas agrícolas de manejo tradicional o ecológico presentes en Cuba aportarían elementos valiosos para determinar la salud de esos suelos; sin embargo, deberá llevarse a cabo un estudio nacional donde diversos laboratorios evalúen la eficiencia de los métodos de extracción que se seleccionaron aquí, para llegar a establecer una técnica estándar que permita comparar los resultados y establecer un laboratorio de referencia para este tipo de estudios. Según Esquivel (14), con la finalidad de determinar las poblaciones de nematodos en una muestra dada, resulta de suma importancia contar con un laboratorio de referencia, donde se utilice una técnica estándar de extracción.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alberto Hernández, del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) por su colaboración en el análisis físico-químico de los suelos muestreados. A los técnicos Lidia López y Roberto Enrique por la colaboración en los muestreos.

REFERENCIAS

- Manzanilla-López R. Methodology and symptomatology. En Rosa H. Manzanilla-López & N. Marbán-Mendoza (Eds). Practical Plant Nematology. Biblioteca Básica Agraria, México. 2012. Pp. 89-129.
- Mesorley R. Extraction of nematodes and sampling methods. En RH Brown and BR Kerry (Eds). Principles and practice of nematode control in crops. Academic Press. 2007. Pp13-47.
- Anónimo. Cuarentena vegetal. Peritaje nematológico. *Meloidogyne* en suelos para semilleros y viveros. Norma Ramal NRAG 31:2006. 1ª Edición. Ministerio de la Agricultura, Cuba. 2009. 8pp.
- Taylor AL, Sasser JB. Biology, identification and control of root knot nematodes (*Meloidogyne* species). Dept. Plant. Pathol. N. C. State Univ., Raleigh. 1978. 111p.
- Rodríguez MG, Fernández E, Hidalgo-Díaz L, Cuadra R, Draguiche JM, et al. Cuba: Two decades working on integrated nematode management in agricultural cropping systems. Jour Nematol. 2014;46(2):227-228.
- Hodda M, Peters L, Traunspurger W. Nematode Diversity in Terrestrial, Freshwater Aquatic and Marine Systems. En Michael J. Wilson & Thomais Kakouli-Duarte (Eds). Nematodes as environmental indicators. CAB International. ISBN 978-1-84593-385-2. 2009. Pp 45-93.
- Hernández A, Pérez JM, Bosch D, Rivero L, Camacho E; Ruiz J, et al. Nueva versión de la clasificación genética de los suelos de Cuba. Instituto de suelos. Ministerio de la Agricultura, La Habana, Cuba. 64pp. 1999.
- van Bezooijen J. Methods and techniques for Nematology. Wageningen, Holland. 2006. 112 pp.
- Coyne D, Nicol JM, Claudius-Cole B. Nematología práctica: Una guía de campo y laboratorio. 2da Edición, SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Cotonou, Benin. 82pp. 2014. (Versión Traducida por S. Verdejo-Lucas).
- Mai WF, Lyon HH. Pictorial key to genera of plant parasitic nematodes. Fourth Edition, Revised. Published by Comstock Publ., Ithaca. 1975. 219 pp.
- Andrássy I. A taxonomic review of the suborder Rhabditina (Nematoda:Secernentia). Editions de l'office de la recherche scientifique et technique Outre-Mer. ORSTOM, Paris. ISBN: 2-7099-0699-6. 1983. 241pp.
- Yeates GW, Bongers T, De Goede RGM, Freckman DW, Georgieva SS. Feeding habits in soil nematode families and genera--An outline for Soil Ecologists. Jour Nematol. 1993;25(3):315-331.
- Crozzoli R. La Nematología Agrícola en Venezuela. Ediciones de la Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. ISBN: 978-980-00-2797-4. 2014. 447pp.
- Esquivel A. Métodos de extracción de nematodos. Curso optativo de Nematología. CAF 4490. Universidad de Costa Rica. 2013. 11pp. Disponible en: <http://plpnemweb.ucdavis.edu/nemaplex/Courseinfo/Curso%20en%20Espanol/LAB%201%20%20Extracci%C3%B3n%202013.pdf> (acceso: 20 noviembre 2016).

Recibido: 7-10-2016.
Aceptado: 28-11-2016.