

VELOCIDAD Y TIEMPO DE CENTRIFUGACION PARA EXTRAER NEMATODOS FITOPARASITOS DEL SUELO

CHARLES VOLCY*

ABSTRACT

An experiment was carried out in order to compare different combination of speeds and times of centrifugation to isolate **Helicotylenchus dihystra**, **Meloidogyne incognita** and **Tylenchulus semipenetrans**. The centrifugation-sugar screening method was used.

Two loam soils were use with natural infestations of the above mentioned nematodes and a silty loam with natural infestation of **H. dihystra**.

It was concluded that the combination with more consistent results to isolate the spiral eelworm was the centrifugation at 1000 rpm (200 g) for 5 minutes in both cycles, while the combinations with best result to extract the other two species was the centrifugation at 2000 rpm (800 g) for 3 minutes in both cycles.

INTRODUCCION

La flotación-centrifugación está considerada como uno de los métodos más rápidos y eficaces para aislar nemátodos del suelo. Willard y Petrovich (1975) encontraron una eficiencia promedia de 36.5% para este método en suelos arcillosos. Su versatilidad ha sido demostrada no solamente para aislar estados vermiformes de los nemátodos sino también sus huevos (Mc Clure, Kruk y Misaghi, 1973; Schaady Walker, 1975).

La técnica original empleada por primera vez en la nematología agrícola por Caveness y Jensen (1955) consistió en centrifugar el suelo a 4800 rpm (2900 g) durante 5

* Profesor Asociado, Departamento de Biología, Universidad Nacional, A.A. 3840, Medellín, Colombia.

minutos; primero en agua y luego en una solución azucarada. Recientemente, Harrison y Green (1976) retomaron este procedimiento para estudiar algunos parámetros que lo afectan.

La velocidad y el tiempo de centrifugación parecen ser dos de los factores más importantes en la extracción de nemátodos. Ayala, Roman y Tarjan (1963) rebajaron la velocidad a 2200 rpm y los tiempos de centrifugación a 4 y 2 minutos. Bravo (1972) empleó velocidad de 2800 rpm y tiempos de 3 y 2 minutos para extraer larvas de *Tylenchulus semipenetrans*, mientras que en otro trabajo (1976), utilizó 2600 rpm y tiempos de 4 y 1.5 minutos para *Xiphinema mediterraneum*.

Kermarrec y Scotto La Massese (1972) centrifugaron primero a 1800 g durante 4 minutos y luego a 700 g durante un minuto. Wehunt (1973) empleó los mismos tiempos y velocidades recomendados por Jenkins (1964) y Whitehead y Hemming (1965) ensayaron con éxito velocidad de 2000 rpm y tiempo de centrifugación de 5 a 8 minutos.

De su trabajo de evaluación de extracción de nemátodos, Dickerson (1977) demostró claramente la importancia del tamizado del suelo previo a la centrifugación. Indicó que la centrifugación-tamizado puede ser empleada a 2300 rpm (833 g) durante 3 - 5 minutos, mientras que la centrifugación directa se utilizaría a 1500 rpm durante 5 minutos.

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar algunas combinaciones de velocidades y tiempos de centrifugación para extraer diferentes especies de nemátodos fitoparásitos del suelo.

MATERIALES Y METODO

Toma y preparación de las muestras

Se hicieron tres ensayos de la manera que sigue: el primero con muestras de textura franca con infestación natural de *Meloidogyne incognita* y *Helicotylenchus dihystra*; el segundo con suelo franco infestado con *T. semipenetrans* y el último con suelo franco-limoso infestados con *H. dihystra*. Después de haber sido bien homogenizadas a mano, las muestras fueron divididas en volúmenes de 200 c.c. para ser procesadas por el método de flotación-centrifugación.

Procedimiento de extracción

A una muestra de 200 ml. de suelo, se le agrega agua hasta completar 600 c.c. Se revuelve la suspensión, se deja reposar durante 15 segundos y se pasa por un tamiz de 250 micras, recogiendo el líquido filtrado en un balde. Se adiciona agua a este recipiente, se repite el proceso dos veces y finalmente se cuela el contenido del balde por el tamiz de 44 micras. Los residuos de este tamiz se lavan, se traspasan a un beaker y luego a los tubos de centrifugación. De allí en adelante, el procedimiento es similar al empleado por Jenkins (1964). Se utilizó una solución azucarada que contenía 500 g de azúcar en un litro de agua, con una gravedad específica de 1:10.

Velocidades y tiempos de centrifugación

Se ensayaron para cada muestra los siguientes tiempos y velocidades de centrifugación que se indican en la tabla 1. La velocidad está expresada en revoluciones por minuto (rpm) y se da su equivalencia en fuerza gravitacional g ó fuerza centrífuga relativa (RCF).

Diseño Experimental

El diseño experimental correspondió a un modelo completamente randomizado con 5 tratamientos (velocidades X tiempos de centrifugación) y 3 replicaciones. Los resultados para cada nemátodo y suelo fueron analizados por separado puesto que formaron parte de ensayos diferentes.

Antes de efectuar el análisis estadístico y la prueba de Duncan ($P = 0.05$), se determinó la simetría de la distribución de los nemátodos en el suelo según el método de Pearson y Barnett (1942). En caso de distribuciones asimétricas, se normalizaron las varianzas con transformaciones logarítmicas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Primer Ensayo

Los resultados de este ensayo están consignados en la tabla 2. Se observa que para aislar *H. dihystra*, el mejor tratamiento fué la centrifugación en dos veces a 1000 rpm (200g) por 5 minutos, mientras que para *M. incognita*, se extrajo la mayor cantidad de nemátodos centrifugando en ambos ciclos a 2000 rpm (800 g) durante 3 minutos. Es de anotar que no hubo diferencias significativas, especialmente para *M. incognita*.

Segundo ensayo

Para aislar larvas de *T. semipenetrans*, la centrifugación a 2000 rpm (800 g) por 3 minutos dió los mejores resultados. Hubo pequeñas diferencias significativas entre los tratamientos.

Tercer ensayo

El mejor tratamiento para extraer *H. dihystra* de suelos franco limosos fue la centrifugación a 1000 rpm (200 g) por 5 minutos en ambos ciclos, seguido muy de cerca por la centrifugación primero a 2000 rpm (800 g) por 3 minutos y luego a 1000 rpm (200 g) durante 2 minutos. Los demás tratamientos, sin tener diferencias entre sí, fueron superados por los ya mencionados.

Existen varios métodos de centrifugación los cuales se basan en tres conceptos físicos: la velocidad que explota las diferencias de tamaño y de forma; la isodensidad que se fundamenta en la diferencia de densidad y el equilibrio que se basa sobre las diferencias de masas (Trautman, 1969). De acuerdo con la clasificación traída por Trautman (1969), se podría concluir que la centrifugación para extraer nemátodos del suelo cae dentro de dos grupos: a. el llamado "movimiento limitado" porque en la primera centrifugación se separa la suspensión en dos componentes: el fluido

sobrenadante, a veces con una nata representada por pequeños desechos de vegetales y el sedimento donde están las partículas finas del suelo y los nemátodos. b. isodensidad, porque se combina la sedimentación y la flotación en el mismo tubo, por el uso de la solución azucarada en la segunda centrifugación.

La fórmula de Andrassy (según Yeates, 1973) que permite calcular la biomasa de los nemátodos tiene en cuenta la longitud y el ancho de estos organismos. Yeates (1973) estudiando la morfometría y el crecimiento de *Helicotylenchus pseudorobustus*, *Anaplectus*, *Bunonema* y de otros nemátodos, determinó que la biomasa aumenta logarítmicamente en cada estado del nemátodo y que varía de especie a especie. Como una aplicación de este principio, Bravo (1977) había señalado que la gran diferencia que existe entre la longitud de las larvas y adultos de *Xiphinema* hacía difícil la escogencia del tiempo adecuado para la sedimentación de las partículas de suelo en los procedimientos de extracción.

La biomasa y por ende la longitud y el ancho de los nemátodos son los parámetros que en última instancia determinan la fuerza centrífuga relativa (RCF) a la cual deben ser sometidos estos organismos para ser depositados en la primera centrifugación. Se ha visto que a menor biomasa mayor debe ser la fuerza centrífuga relativa. En términos generales, se requieren fuerzas hasta de 3000 g para las bacterias (Collins, 1967) y de 3000 - 10000 g para las primeras etapas de purificación de los virus (Steele, 1964). En la mayoría de los trabajos de nematología, se han empleado fuerzas inferiores a 1000 g, salvo algunas excepciones (Kermarrec y Scott La Massese, 1972; Caveness y Jensen, 1955, Schaad y Walker, 1975). Bajo este criterio, parece lógico haber encontrado resultados satisfactorios con los rangos de fuerza aquí ensayados (200 - 800 g).

Velocidades de 2000 rpm (800 g) por 3 minutos fueron las mejores para extraer larvas de *T. semipenetrans* y de *M. incognita*. Esto se explica por la gran similitud en los datos morfométricos de los dos nemátodos. Sin embargo, para *H. dihystra*, fué suficiente una fuerza de 200 g por 5 minutos debido posiblemente a una mayor longitud y ancho y en consecuencia, a un mayor valor en la biomasa.

Tabla 1 —Velocidades y tiempos de centrifugación ensayados para aislar varias especies de nemátodos fitoparásitos.

Tratamientos	CICLOS DE CENTRIFUGACION			
	Primer ciclo de centrifugación		Segundo ciclo de centrifugación	
	Velocidad	Tiempo (min)	Velocidad	Tiempo (min)
1	2000 rpm (800g)	3	2000 rpm (800g)	3
2	2000 rpm (800g)	3	1000 rpm (200g)	2
3	1500 rpm (300g)	3	1500 rpm (300g)	3
4	1000 rpm (200g)	5	1000 rpm (200g)	5
5	1500 rpm (300g)	3	1000 rpm (200g)	2

Tabla 2 — Rendimiento de 5 tratamientos (velocidades x tiempo de centrifugación) para aislar diferentes especies de nemátodos fitoparásitos en suelos franco y franco-limosos.

Tratamientos	Población 1/ de nemátodos aislada en suelos de textura			
	Franca	Franco-limosa		
	H.d ^{2./}	M.i	T.S.	H.d
1	626,6ab*	113,3b	819,7b	149,7a
2	552,6a	75,3a	553,2b	260,0b
3	806,6b	60,0a	506,7ab	146,7a
4	846,6b	100,0ab	413,3ab	293,3b
5	806,6b	86,6a	373,3a	120,0a

1/ Expresada en 200 ml de suelo y promedio de 3 replicaciones.

2/ H.d = *H. dihystra*; M.i = *M. incognita*; T.s = *T. semipenetrans*.

* Tratamiento de una misma columna de nemátodos con letras iguales indican no diferencia significativa al 5% de probabilidad.

Los rangos de velocidad y de tiempo aquí ensayados fueron relativamente estrechos y aún bajo estas condiciones, hubo siempre 1 - 2 tratamientos que mostraron cierta tendencia a extraer la mayor cantidad de nemátodos en el suelo. Esto quizá indica que para cada especie, hay una combinación de velocidad y de tiempo más adecuada para la extracción. No hay mención en la literatura que haga referencia a este aspecto, aunque el hecho de que Bravo (1972 - 1976) empleó velocidades y tiempos diferentes para extraer *T. semipenetrans* y *X. mediterraneum*, induce a pensar en la veracidad de esta afirmación. No obstante lo anterior, la poca significancia entre los tratamientos sugiere que se requieren aparentemente combinaciones menos específicas para *M. incognita* y *T. semipenetrans* que para *H. dihystra*.

CONCLUSIONES

1. La combinación con resultados más consistentes para aislar *H. dihystra* fue la centrifugación a 1000 rpm (200 g) durante 5 minutos en ambos ciclos.
2. Para *T. semipenetrans* y *M. incognita*, se obtuvieron los mejores resultados centrifugando dos veces a 2000 rpm (800 g) por 3 minutos.

RESUMEN

Se llevó a cabo un ensayo a fin de comparar diferentes combinaciones de velocidad y tiempos de centrifugación para aislar *H. dihystra*, *M. incognita* y *T. semipenetrans* mediante el método de flortación-centrifugación.

Se observó que la combinación con resultados más consistentes para aislar el nemátodo espiral fue la centrifugación a 1000 rpm (200 g) por 5 minutos en ambos ciclos, mientras que se obtuvieron los mejores resultados con los otros dos nemátodos centrifugados dos veces a 2000 rpm (800 g) por 3 minutos.

BIBLIOGRAFIA

- AYALA, A., J. ROMAN and A.C. TARJAN. 1963. Comparison of four methods for isolating nematodes from soil samples. Jour. Agric. Univ. Puerto Rico 47: 219-225.
- BRAVO, M.A.C. 1977. Comparison of the Christie and Perry and the centrifugal flotation methods for extracting *Xiphinema mediterraneum* from soil. Agronomía lusit. 38: 203-212.
- BRAVO, M.A.C. 1972. Eficacia do método de fluctuacao centrifuga na extraccáo do nemátodos do pequenas dimensoes. Agronomía lusit. 34: 283-291.
- CAVENESS, F.E. and H. J. JENSEN. 1955. Modification to 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.
- COLLINS, C.H. 1967. Microbiological methods. Second edition London. Butterworths. 404 p.
- DICKERSON, O.J. 1977. An evaluation of the direct centrifugal-flotation method of recovering nematodes from soil: Plant dis. Rept. 61: 1054-1057.
- HARRISSON, J.M. and C.D. GREEN. 1976. Comparison of centrifugal and other methods for standardization of extraction of nematodes from soil. Ann.Appl. Biol. 82: 299-308.
- JENKINS, E.R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. Plant dis. Rept. 48: 692.
- KERMARREC, A. et C. Socotto La Massese. 1972. Données nouvelles sur la composition et la dynamique de la nématofaune des sols des Antilles Françaises. Ann. Zool. Ecol. Anim. 4: 513-527.
- MC CLURE, M.A.; T.H. KRUK and I. MISAGHI. 1973. A method for obtaining quantities of clean *Meloidogyne* eggs. Jour-Nematol. 5: 230.
- PEARSON, F.A. and K.R. BENNETT. 1942. Statistical methods applied to agricultural economics. John Wiley and Sons, Inc. 443 p.
- SCHAAD, N.W. and J.T. WALKER. 1975. The use of density - gradient centrifugation for the purification of eggs of *Meloidogyne* spp. Jour. Nematol. 7: 203-204.
- STEERE, R.L. 1964. Purification. In: M.K. Corbett and H.D. Sister (Ed). Plant Virology: 211-234. Univ. Florida Press. Gainesville.
- TRAUTMAN, R. 1969, Ultracentrifugation. In: Instrumental methods of experimental biology. Ed: D.W. Newman: 211-297. The Mac Millan Company, N.Y. Fifth Printing. 560p.
- WEHUNT, E.J. 1973. Sodium-containing detergents enhance the extraction of nematodes. Jour. Nematol. 5:79-80.
- WHITEHEAD, A.C. and J.R. HEMMING. 1965. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. Ann. appl. Biol 55: 25-38.
- WILLARD, J.R. and M.S. Petrovich. 1975. Efficiency of the centrifugal-flotation method for extraction of nematodes from clay soils. Plant dis. Rept. 59: 314-318.
- YEATES, G.W. 1973. Morfometrics and growth in eight New Zealand soil nematode populations. New Zealand Journal of Science 16: 711-725.