Nematología práctica: Una guía de campo y laboratorio

D.L. Coyne, J.M. Nicol y B. Claudius-Cole
Traducción de Soledad Verdejo-Lucas

IPM Integrated Pest Management
IITA
CIMMYT
syngenta®

Esta guía ha sido realizada por el Instituto Internacional de Agricultura (IITA) y el Centro Internacional de Mejora del Maíz y Trigo (CIMMYT) como parte de la estrategia del Programa Avanzado de Manejo Integrado de Plagas (SP-IPM) con objeto de mejorar la calidad y la utilización de la investigación en manejo de plagas. IITA, CIMMYT y el SP-IPM están financiados por un Grupo Consultor para Investigación Agrícola Internacional (CGIAR; www.cgiar.org). La primera tirada de esta guía se realizó gracias a los fondos aportados por el Centro Técnico ACP-EU para la Cooperación Agrícola y Rural (CTA), mientras que esta tirada ha sido financiada en su totalidad por Syngenta.

El **SP-IPM** es un programa global de socios cuya tarea es diseñar conjuntamente los esfuerzos en IPM de los centros internacionales de investigación agrícola y sus socios y enfocar estos esfuerzos hacia las necesidades de los agricultores con pocos recursos en los países en desarrollo. El programa se centra en aquellas áreas donde la investigación promete aportar soluciones a problemas apremiantes para el desarrollo agrícola sostenible pero donde el impacto ha sido hasta la fecha limitado – debido a la fragmentación de los esfuerzos entre diferentes organizaciones o en diferentes regiones del mundo, o bien, debido a la falta de conexión entre los investigadores y los agricultores. El SP-IPM espera conseguir un progreso rápido a través de la disminución de tales restricciones, romper las barreras para el intercambio de información, completar los vacios de investigación donde existan y desarrollar modelos eficaces de cooperación investigador-extensionista-agricultor para promocionar la adopción de las tecnologías de IPM.

SP-IPM c/o IITA, PMB 5320, Ibadan, Nigeria, o bien,
SP-IPM c/o IITA, Carolyn House, 26 Dingwall Road, Croydon, CR9 3EE, UK
www.spipm.cgiar.org

IITA es una organización internacional de investigación para el desarrollo con base en África, establecida en 1967, y gobernada por un Consejo de Patronos. La visión del IITA es ser uno de los socios líderes en investigación en África para encontrar soluciones al hambre y la pobreza. La organización tiene más de 100 científicos internacionales en varias estaciones del IITA ubicados por toda África. Esta red de científicos está dedicada al desarrollo de tecnologías para reducir los riesgos de los productores y consumidores, incrementar la producción local y generar riqueza.

IITA, PMB 5320, Ibadan, Oyo State, Nigeria
www.iita.org

El cometido del **CIMMYT** es actuar como catalizador y líder en una red global de innovación en el cultivo del maíz y trigo, que sirva de sustento a la población más desfavorecida de los países en desarrollo. CIMMYT crea, comparte, y utiliza el conocimiento y tecnología para incrementar la seguridad alimentaria, mejorar la productividad y la rentabilidad de los sistemas productivos y sustentar los recursos naturales.

CIMMYT, AP 6-641, 06600 Mexico DF, Mexico
www.cimmyt.org

SYNGENTA es líder mundial del agro-negocio y está comprometida con la agricultura sostenible a través de la investigación y tecnología innovadora. La compañía es líder en la protección de los cultivos, y ocupa el tercer lugar en el mercado de las semillas comerciales de alto valor económico. Syngenta tiene más de 21.000 trabajadores distribuidos en más de 90 países. “Seed Care” es la sección de negocio de Syngenta que investiga, desarrolla, manufactura y comercializa soluciones innovadoras para el tratamiento de las semillas.

www.syngenta.com

Nematología práctica: Una guía de campo y laboratorio

D.L. Coyne, J.M. Nicol y B. Claudius-Cole
Traducción de Soledad Verdejo-Lucas

IPM Integrated Pest Management
IITA
CIMMYT
syngenta®

Agradecimientos

Los autores agradecen el generoso aporte financiero del SP-IPM y CTA para la producción de esta guía. El núcleo de donantes del SP-IPM que ha contribuido al desarrollo y producción de esta guía está constituido por el Gobierno de Noruega, Suiza e Italia. También agradecemos la generosa aportación de CTA para la primera tirada de esta guía y a Syngenta por hacer posible esta reimpresión.

El Dr. Braima James (Coordinador del SP-IPM) contribuyó con su ímpetu y continuo apoyo a la preparación de la guía que esperamos satisfaga las demandas de nuestros socios y sea de utilidad para aumentar la concienciación y la reducción de los problemas nematológicos. Agradecemos a Braima su continuo apoyo.

Agradecemos muy particularmente los consejos y las numerosas contribuciones del Dr John Bridge durante la preparación de esta guía.

Gracias a Luma Al-Banna, John Bridge, Roger Cook, Don Dickson, Jon Eisenback, Georg Goergen, The Food and Environment Research Agency [Crown Copyright, UK], Dieter Heinicke, Sean Kelly, Sandra Mack, Mariette Marais, Alex McDonald, Hans Meerman, Edward Oyekanmi, Richard Plowright, Roger Rivoal, Richard Sikora, Paul Speijer, Hugh Wallwork, Esther van den Berg y Vivien Vanstone por las fotografías. Gracias también a R. Esser por la figura y a Graham Stirling por permitir la utilización de las figuras y material de referencia relacionado para los apéndices.

Se agradece la ayuda editorial de Duncan Scudamore y Elif Sahin.

Un agradecimiento muy especial a Eleazar Romero del programa de Postgrado de Agronomía de la Universdidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA). Urbanización Terepaima, entre Redoma de Agua Viva y Urb. Chucho Briceño, Cabudare, Estado Lara, Venezuela, por revisar la traducción al español de esta guía.

ISBN 978-131-338-2

© 2007 International Institute of Tropical Agriculture

Todos los derechos reservados. La empresa editora anima al uso adecuado de este material citando adecuadamente la fuente del mismo. Se prohíbe reproducir, copiar o transmitir este documento sin previo permiso por escrito de la editorial.

Reimpresión 2009.

Cita correcta:
Coyne, D.L., Nicol, J.M. and Claudius-Cole, B. 2007. *Practical plant nematology: a field and laboratory guide*. SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Cotonou, Benin.

Existe una versión en PDF de este documento que puede encontrarse en la web del CIMMYT, IITA y SP-IPM.

Contenido

Prefacio **v**

Introducción **1**

Biología básica de los nematodos parásitos de plantas **3**
Apariencia y estructura 3
Ciclo de vida 3
Tipo de nematodos 3
Endoparásitos migratorios *7*
Endoparásitos sedentarios *8*
Ectoparásitos *9*

Síntomas de daño **11**
Síntomas aéreos 11
Síntomas causados por nematodos parásitos de la parte aérea *11*
Síntomas causados por nematodos parásitos de las raíces *11*
Síntomas bajo el suelo 14
Raíces agalladas *14*
Raíces agalladas versus nódulos en las raíces *18*
Sistemas radicales reducidos *19*
Lesiones en raíces y tubérculos *19*
Podredumbre de raíces y tubérculos *21*
Grietas *23*
Quistes o" raíces perladas' *24*

Muestreo **25**
Herramientas para el muestreo 25
Número de muestras 25
Diseño para el muestreo 26
Época de muestreo 26
Recogida de muestras de suelo 27
Recogida de muestras de raíces 28
Recogida de muestras de la parte aérea 28
Cuidado y conservación de las muestras 28

Extracción de nematodos **31**
Elección del método de extracción 31
Preparación de las muestras 32
Etiquetado de las muestras 32
Método de la bandeja 34
Método de la maceración de las raíces 40
Método del tamizado 42
Método de incubación 48

Examen directo del tejido vegetal **51**

Manipulación, fijación y tinción de los nematodos **53**
Manipulación de los nematodos 53
Pesca de nematodos *53*
Envío de los nematodos para su identificación *55*
Servicios para la identificación de nematodos *57*
Muerte de los nematodos 57
Fijación de los nematodos 58
Muerte y fijación en un solo proceso 59
Conservación de los nematodos sedentarios en la raíz o tejido tuberoso 59
Tinción 60
Masas de huevos de Meloidogyne *60*

Estimación de la densidad de nematodos **61**
Recuento de los nematodos 61

Análisis del daño **63**
Estimación de síntomas de nematodos en la planta 63

Referencias y lecturas aconsejadas **65**

Apéndice 1. Ejemplos de géneros de nematodos y especies patógenas de los cultivos de importancia mundial **67**

Apéndice 2. Identificación básica de los nematodos **72**

Apéndice 3. Hojas de registro para medir el daño causado por los nematodos **75**
Índice de agallas producidas por *Meloidogyne* spp. en mandioca 75
Índice de agallas producidas por *Meloidogyne* en zanahoria 77
Índice de agallas producidas por *Meloidogyne* en lechuga 78
Índice de lesiones en raíces de banano 79
Diagrama para la estimación de agallas 81
Diagrama para estimar el daño causado por los nematodos de los quistes en trigo 82

Prefácio

Esta guía es una referencia sencilla y fácil de seguir para evaluar los problemas causados por los nematodos parásitos de plantas. La guía proporciona instrucciones claras e ilustra con fotografías los procedimientos para la toma y procesamiento de muestras para la evaluación de los nematodos y también como acceder a más información para su diagnóstico e identificación. El manual está dirigido a técnicos, agricultores, agentes de extensión, y otras personas con interés en la producción y protección de los cultivos, particularmente en aquellos lugares del mundo donde el acceso a ayuda experta y equipamientos es limitado. La guía se ha realizado en respuesta a la frecuente demanda de los especialistas que percibían la necesisdad de disponer de una guía que ayudase a diagnosticar problemas causados por nematodos. Es de esperar que la guía simplifique algunos aspectos de la nematología y ayude a disminuir el misterio que rodea este problema que afecta a la producción agrícola.

Se dice, a veces, que los nematodos se perciben como un problema para la producción agrícola sólo cuando hay un nematólogo presente y que si no hubiera nematólogos no habría problemas de nematodos. Paradójicamente, los síntomas inespecíficos causados por los nematodos se atribuyen habitualmente a otras causas que parecen más probables u obvias. La realidad es que varios factores limitantes a menudo se combinan dando lugar a la disminución de la producción agrícola y es preciso cuantificar los principales factores limitantes de la producción, entre los cuales se incluyen los nematodos. Teniendo en cuenta la amenaza de los nematodos en relación a otras plagas y enfermedades, es un reto que será de enorme beneficio la cuantificación de los problemas nematológicos a través de la mejora de los procedimientos de campo y laboratorio.

Los nematodos parásitos de plantas se encuentran siempre presentes y están asociados con el crecimiento de la planta y la producción del cultivo. Constituyen una limitación significativa para la agricultura de subsistencia y pueden ser difíciles de controlar. La determinación de la importancia de ciertas especies de nematodos, comunidades de nematodos y la de los nematodos en combinación con otros problemas no es una tarea simple en el mejor de los casos, pero ello es más difícil de conseguir en climas tropicales que en climas templados.

Especies de nematodos que antes eran desconocidas como causantes de daño a los cultivos se están descubriendo continuamente debido a los cambios que experimenta la agricultura para adaptarse a las necesidades cambiantes y a la introducción de nuevos cultivos. La introducción o mejora de las técnicas nematológicas y el diagnóstico puede llevar a la identificación de los nematodos como la causa de un problema que ha existido durante muchos años, pero que debido a la falta de experiencia del personal local, no se había diagnosticado adecuadamente. Todavía queda mucho por aprender sobre los nematodos y el daño que estos causan a los cultivos. Por ejemplo, aún faltan datos fiables sobre la relación entre el número de nematodos y las pérdidas de producción para muchos de los cultivos y tipos de nematodos. En muchos de los países menos desarrollados, la mayoría de la información básica no existe. Por tanto, es importante realizar avances, aunque sean pequeños, en su conocimiento y desarrollo para su utilización posterior a través de publicaciones de redes y sociedades relevantes o revistas nacionales e internacionales.

Es de esperar que esta guía contribuya a mejorar el manejo de enfermedades y plagas, particularmente en aquellos lugares donde la experiencia en nematología es escasa, tal es el caso de los países menos desarrollados del mundo. Un paso inicial para el manejo de nematodos es el establecimiento de la presencia de los mismos a través de la recolección de muestras y su relación con los síntomas, y con ayuda experta, la identificación con exactitud de las especies implicadas. El objetivo de esta guía es proporcionar ayuda para este paso inicial.

Danny Coyne – IITA Nematólogo, Uganda.

Julie Nicol – CIMMYT Int. Nematólogo, Turkey.

Biodun Claudius-Cole – Nematólogo, Department of Crop Protection and Environmental Biology, University of Ibadan, Nigeria.

Introducción

Los nematodos son un grupo diverso de animales con apariencia de gusano. Se encuentran virtualmente en todos los ambientes, tanto como parásitos como organismos de vida libre. Generalmente, son de tamaño diminuto pero algunas especies pueden alcanzar varios metros de longitud. Esta guía se centra específicamente en los nematodos que parasitan las plantas (fitoparásitos), los cuales son muy pequeños, microscópicos, pueden causar daño significativo a los cultivos y se encuentran ampliamente distribuidos (Apéndice 1).

Dado que es difícil o imposible observar a simple vista los nematodos en el campo, y a que los síntomas que producen son a menudo inespecíficos, el daño que ocasionan frecuentemente se atribuye a otras causas más evidentes. Los agricultores y los técnicos a menudo subestiman su efecto. Una apreciación general es que los nematodos parásitos de plantas reducen la producción agrícola en aproximadamente un 11% globalmente (Agrios, 2005), reduciendo la producción en millones de toneladas anualmente.

El nivel de daño que causan los nematodos depende de una amplia gama de factores tales como su densidad poblacional, la virulencia de las especies o aislados, y la resistencia (habilidad de la planta de reducir la población del nematodo) o tolerancia (habilidad de la planta de rendir una cosecha a pesar del ataque del nematodo) de la planta huésped. Otros factores que también contribuyen, aunque en menor medida, son el clima, disponibilidad de agua, condiciones edáficas, fertilidad del suelo, y la presencia de otras enfermedades y plagas. Sin embargo, aunque tengamos conocimiento de la relación nematodo-cultivo y los factores que la influencian, todavía queda mucho por aprender. Por ejemplo, en la mayoría de los caso se desconoce los umbrales del nematodo que causan daño en diversos cultivos en varias partes del mundo y la amenaza que estos representan para los mismos.

Una vez comprobado que los nematodos son los principales responsables del daño observado en un cultivo, se puede decidir cuales serán las opciones de control. Estas dependerán de los nematodos implicados, del cultivo, del sistema productivo y de las condiciones locales. Si se ha identificado la especie del nematodo, entonces se puede considerar la realización de intervenciones específicas, como por ejemplo la utilización de cultivos o variedades resistentes. Si no se ha realizado la identificación, lo más apropiado entonces es utilizar otras opciones más generales o combinación de acciones, como la rotación de cultivos, tratamientos químicos, control biológico y prácticas sanitarias.

El objetivo de esta guía es ayudar al lector en cuanto a:

- Percepción de la biología básica de los nematodos
- Reconocimiento de los diferentes grupos y hábitos alimenticios de los nematodos.
- Identificación de síntomas de daño
- Recolección de muestras de nematodos
- Procesamiento de muestras
- Enviar nematodos y muestras para su identificación precisa.

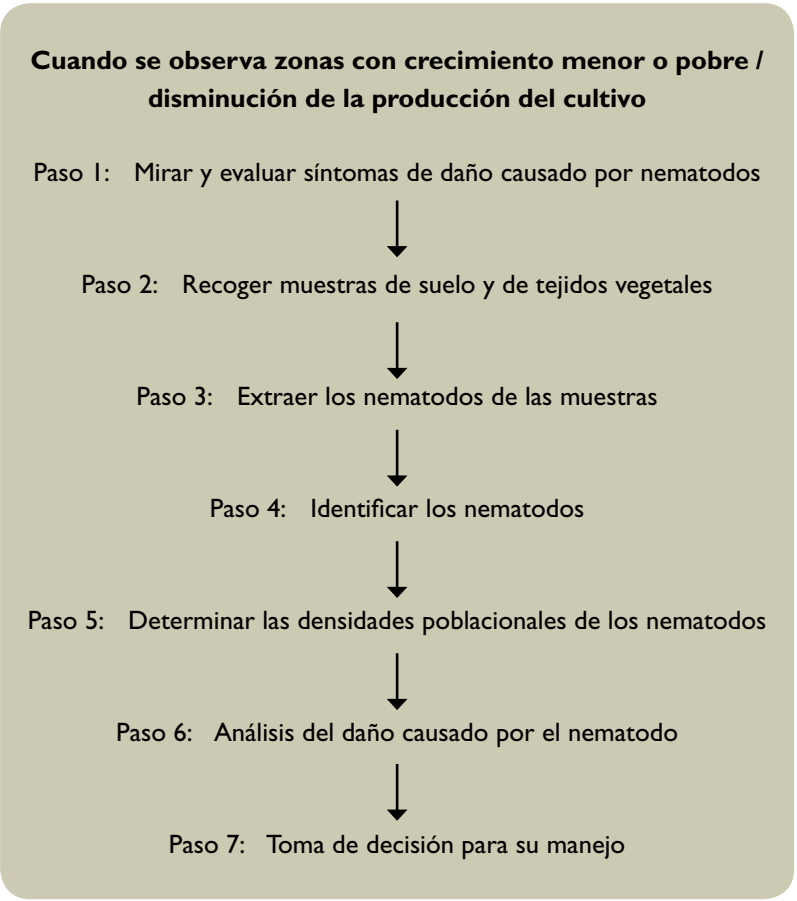


Figura 1. Estadios para la evaluación y manejo de los nematodos.

La Figura 1 muestra los pasos a seguir en la evaluación y manejo de los nematodos. Esta guía proporciona información sobre como llevar a cabo los pasos 1 a 3. También se puede intentar el paso 4 pero probablemente se necesite la ayuda de un nematólogo experto, y ciertamente esta ayuda será necesaria para los pasos finales. Las secciones sobre Referencias bibliográficas y Lecturas recomendadas (página 65) incluyen publicaciones de utilidad que van más allá de los aspectos nematológicos recogidos en esta guía.

Biología general de los nematodos fitoparásitos

Apariencia y estructura

Los nematodos fitoparásitos son vermiformes (forma de gusano) semejantes a hilos con un tamaño que oscila entre 0,25 mm a >1,0 mm de longitud, si bien algunos alcanzan hasta 4,0 mm. Aunque el cuerpo de los nematodos suele estrecharse hacia la cabeza y cola, en la mayoría de los casos existe una gran variedad de formas y tamaños (Fig. 2). Las hembras de algunas especies pierden su forma de verme conforme maduran, se ensanchan y adoptan forma de pera, limón, riñón o esférica cuando alcanzan el estadio adulto.

Como todos los animales, los nematodos tienen sistema circulatorio, respiratorio y digestivo (Fig. 3). Los nematodos fitoparásitos se diferencian de otros nematodos que se alimentan de bacterias y hongos en que tienen una estructura especializada para su alimentación llamada estilete con forma de lanza (Fig. 3). El nematodo utiliza el estilete para inyectar enzimas dentro de las células y tejidos vegetales y extraer su contenido de un modo similar a como lo hacen los pulgones que se alimentan de plantas.

Ciclo de vida

El ciclo de vida de los nematodos se divide típicamente en seis estadios: el huevo, cuatro estadios juveniles y el adulto (Fig. 4). La duración de cada uno de estos estadios del ciclo de vida difiere para cada especie y también depende de otros factores como la temperatura, la humedad y la planta huésped. En condiciones favorables en los trópicos, muchas especies tienen un ciclo de vida corto y completan varias generaciones en una estación del año. Esto puede llevar a un incremento rápido de la población a partir de un solo individuo (si se auto-fertilizan) o de dos individuos del nematodo.

Los nematodos pueden sobrevivir condiciones desfavorables como una estación seca o un invierno frío. La supervivencia de las diferentes especies varía según el estadio del ciclo de vida en que se encuentren; por ejemplo, las especies de *Heterodera* sobreviven mejor en el estadio de huevos encapsulados dentro de los quistes. Las especies de *Ditylenchus* lo hacen mejor como cuarto estadio juvenil y las especies de *Anguina*, como segundo estadio juvenil.

Tipos de nematodos

Los nematodos fitoparásitos se pueden separar en dos grupos: parásitos aéreos- aquellos que se alimentan de las partea aéreas de las plantas- y los parásitos de raíces y tubérculos- aquellos que se alimentan de las partes subterráneas.

También se pueden agrupar por su hábito y movilidad en tres grupos principales:

- Endoparásitos migratorios – nematodos móviles que se alimentan dentro del tejido radical.
- Endoparásitos sedentarios – nematodos que, una vez alcanzado el sitio de alimentación dentro de la planta, cesan de ser móviles y se alimentan desde un sitio fijo.
- Ectoparásitos – nematodos que se alimentan de la planta desde el exterior sin invadir la misma.

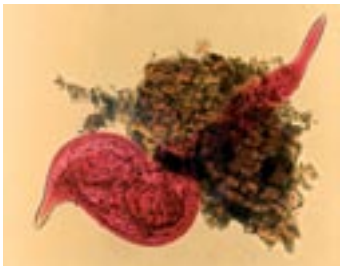
Pratylenchus (forma de gusano/ vermiforme) [JB]

Helicotylenchus (forma de gusano vermiforme/espiral) [GG]

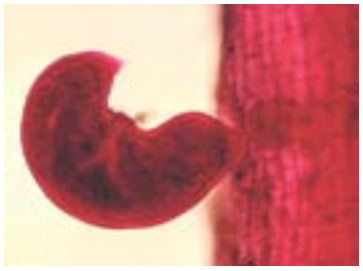
Discocriconemella (ligeramente hinchado)

Nacobbus (hinchado/fusiforme) [JB]

Achlysiella (hinchado/fusiforme) [JB]

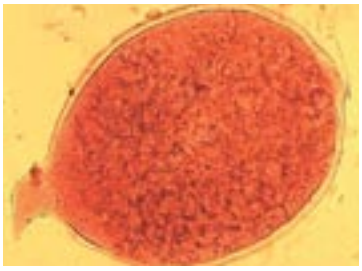


Tylenchulus (forma de pera) [JB]



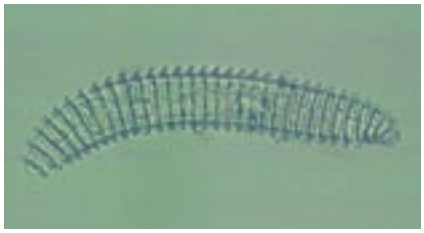
Rotylenchulus (forma de riñón/ reniforme) [JB]

Heterodera (forma de limón)



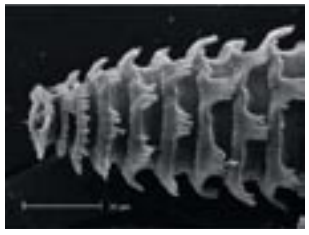
Meloidogyne (forma esférica/de calabaza) [JB]

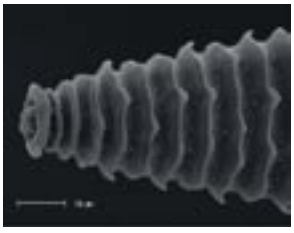
Scutellonema (forma de gusano vermiforme/forma de C) [GG]



Criconematido (acostillado/ surcado)

Hirschmanniella (vermiforme/ largo) [JB]

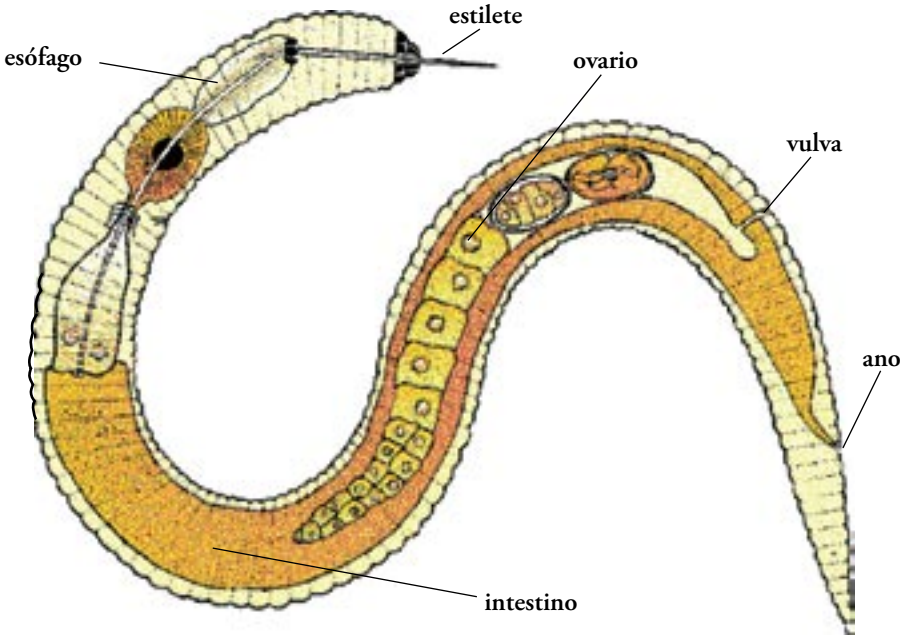




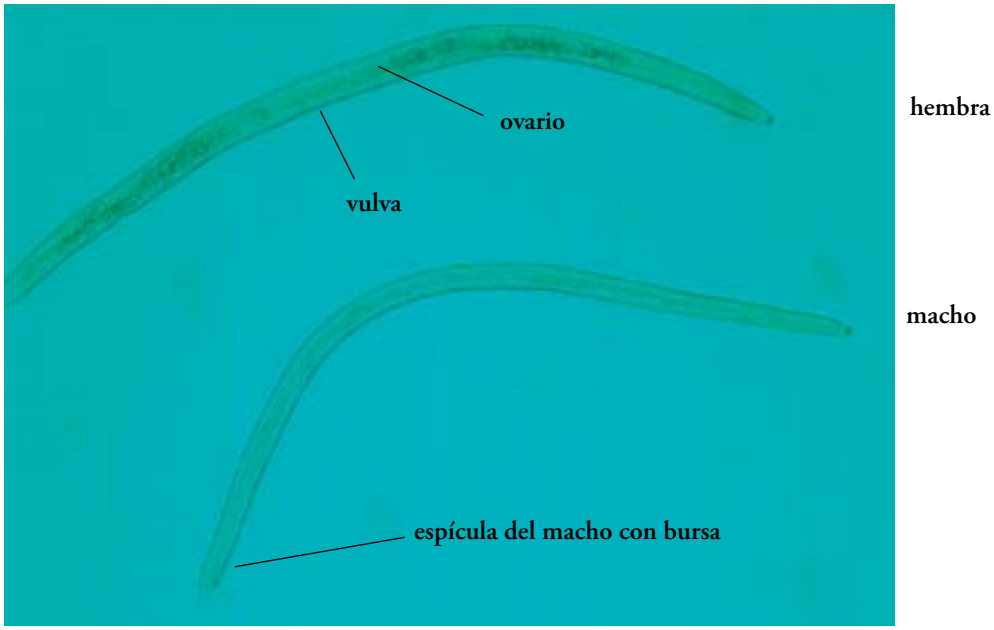
Estructura externa de *Ogma* (costillas expandidas/flotantes) [EvB]

Tylenchulus aspecto sobre la superficie de la raíz (forma de pera) [EvB]

Figura 2. Diversas formas de los nematodos tales como se observan al microscopio.
(Fotografías de J. Bridge [JB], G. Goergen [GG] o E. van den Berg [EvB].)



Estructura típica de un nematodo fitoparásito (cortesía de R. Esser).



Macho y hembra de *Scutellonema*.

Figura 3. Diagrama de la estructura de un nematodo tal y como se observa al microscopio (parte superior). Ejemplo de un nematodo macho y una hembra (*Scutellonema bradys*) tal y como se observan al microscopio con indicación de los órganos reproductivos del macho (espícula) y de la hembra (vulva y ovario) (parte inferior). Nota: No todas las especies de nematodos tienen machos. Algunas especies muestran una bursa protectora alrededor de la espícula pero esta no se encuentra en todas las especies.
(Fotografía de H. Meerman.)

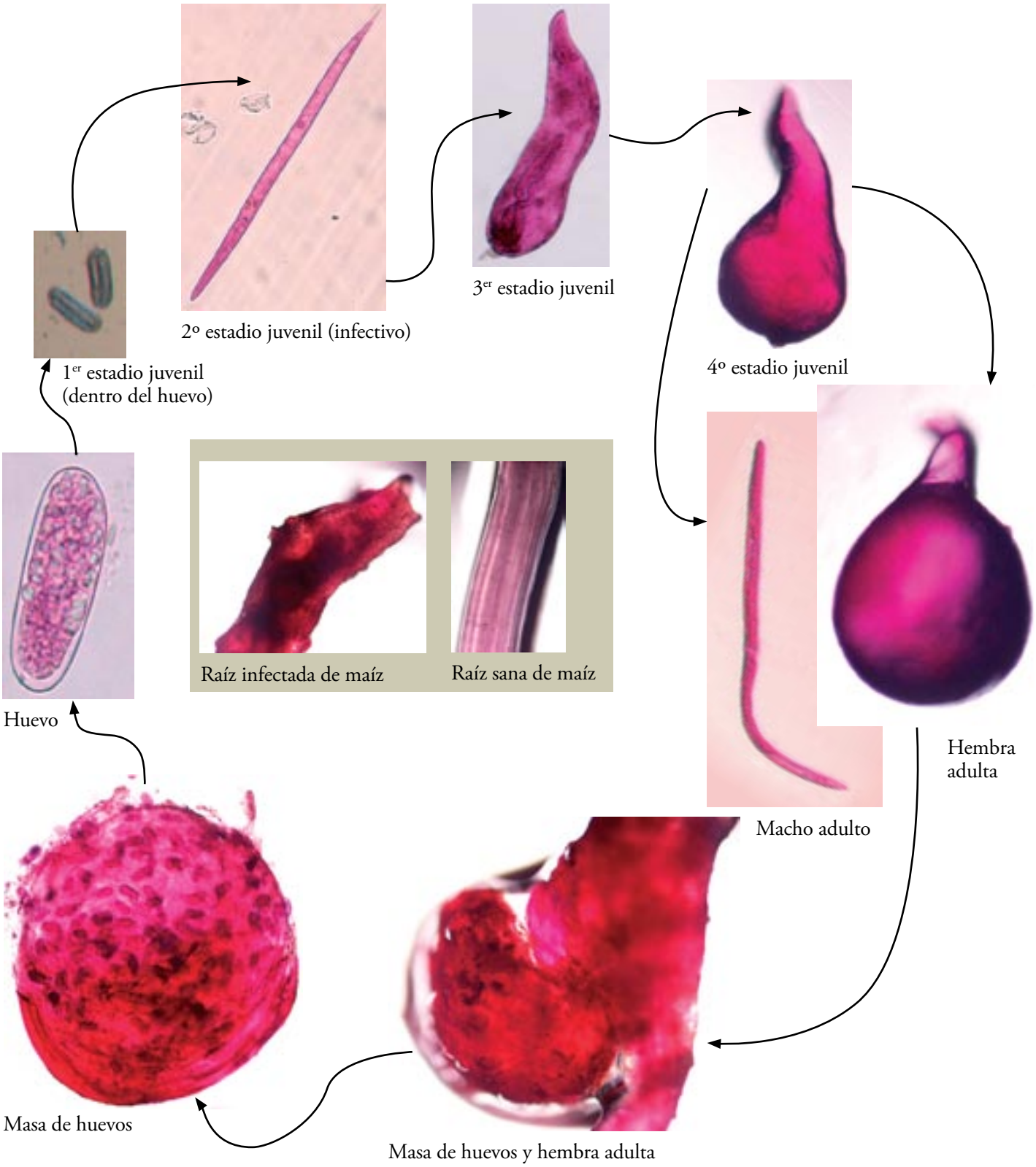
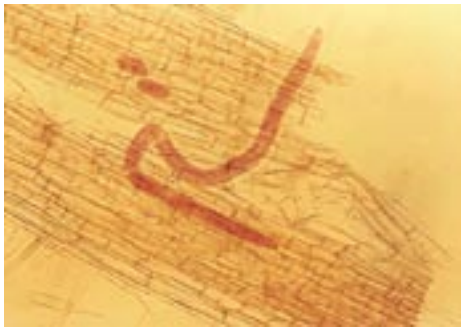


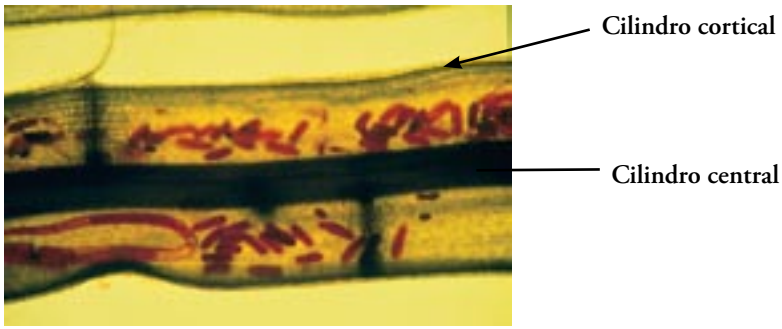
Figura 4. Ciclo de vida de los nematodos. Ciclo de *Meloidognye* en maíz utilizado a modo de ejemplo según se observa al microscopio. La fotos de los estadios no están realizadas a la misma escala. El ciclo de vida de los nematodos migratorios sigue el mismo proceso, pero mantienen su forma de verme durante todo el ciclo y no producen masas de huevos. (Fotografías de E. Oyekanmi.)

Endoparásitos migratorios (Fig. 5)

Todos los estadios del ciclo de vida de los nematodos endoparásitos son móviles excepto el huevo. Los nematodos perforan el tejido vegetal desplazándose de célula en célula, o pueden abandonarlo en busca de nuevos sitios de alimentación. Mientras se alimentan normalmente depositan los huevos dentro del tejido cortical de la planta y también en el suelo que rodea la raíz. Las células dañadas liberan toxinas las cuales provocan la muerte de las células vecinas dando lugar a pequeñas manchas o lesiones de tejido necrótico. Con frecuencia, los hongos que producen podredumbre de las raíces y las bacterias se encuentran asociados con las infestaciones de los nematodos migratorios y entran en los tejidos de la planta a través de las zonas dañadas por los nematodos.



Scutellonema bradys **en yam.**



Hirschmanniella **en arroz** [JB].

Figura 5. Hembras y huevos de nematodos migratorios endoparásitos teñidos de rojo dentro del tejido radical.
(Fotografía de J. Bridge [JB].)

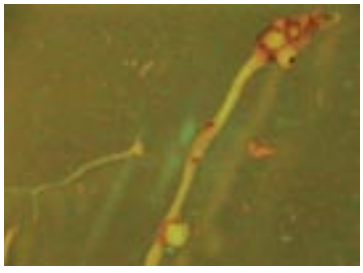
Endoparásitos sendentarios (Fig. 6)

Los juveniles de segundo estadio de los nematodos endoparásitos sedentarios recién eclosionados de los huevos son los que normalmente invaden el tejido de la planta – constituyen el estadio infectivo. Estos se mueven a través de las partículas de suelo para localizar las raíces de la planta huésped, y posteriormente, a través del tejido radical para encontrar un sitio de alimentación. En el sitio de alimentación, se desarrolla la hembra y allí permanece ubicada durante el resto de su ciclo de vida. Conforme la hembra se desarrolla, su cuerpo se hincha y adopta forma esférica, de limón, riñón, u ovoide. El nematodo se alimenta de un número reducido de células vegetales y este proceso está regulado por el nematodo mediante sustancias de crecimiento. Algunos grupos (p.e. los nematodos de los quistes y de las agallas) inducen en la planta huésped la formación de las llamadas "células alimenticias gigantes".

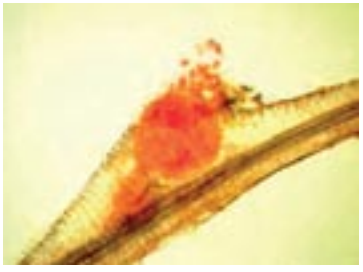
Los machos se mantienen vermiformes durante todo el ciclo de vida alimentándose en la superficie de la raíz durante unos días, durante este tiempo pueden o no fecundar a las hembras antes de migrar al suelo donde mueren.

Las hembras de los nematodos endoparásitos sedentarios generalmente producen una gran cantidad de huevos, que permanecen dentro de su cuerpo (p.e. nematodos de los quistes – *Heterodera* spp.) o se acumulan en masas de huevos (p.e. nematodos de las agallas – *Meloidogyne* spp.) las cuales permanecen unidas a sus cuerpos. Otros nematodos son sedentarios, pero solamente semi-endoparásitos como el nematodo reniforme (*Rotylenchulus* spp.) y el de los cítricos (*Tylenchulus semipenetrans*), los cuales se encuentran embebidos parcialmente en el tejido radical.

Nematodo de los quistes (*Heterodera* spp.) rompiendo el tejido cortical de la raíz de arroz.



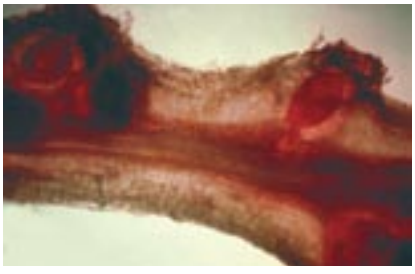
Nematodos agalladores (*Meloidogyne* spp.) rompiendo y sobresaliendo de la raíz de maíz.



Nematodo agallador (*Meloidogyne* spp.) embebido en raíz de calabaza con los huevos libres fuera de la raíz [JB].

Adulto del nematodo de los quistes de los cereales (*Heterodera filipjevi*).

Nematodo reniforme (*Rotylenchulus* spp.) con la parte anterior introducida dentro del tejido radical (semi-endoparásito sedentario) [JB].



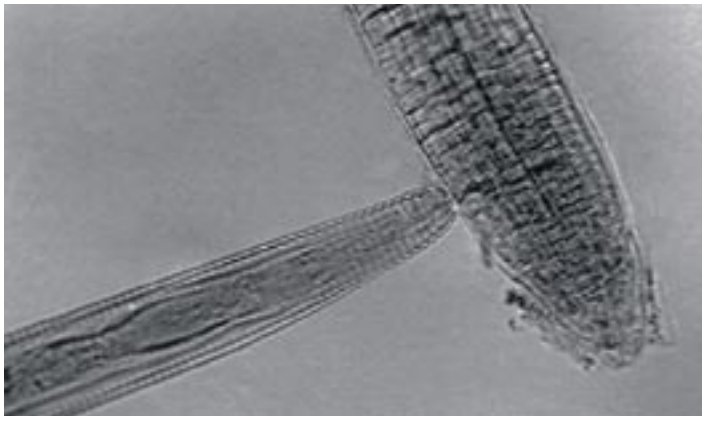
Nematodo agallador (*Meloidogyne* spp.) embebido en las raíces de batata [JB].

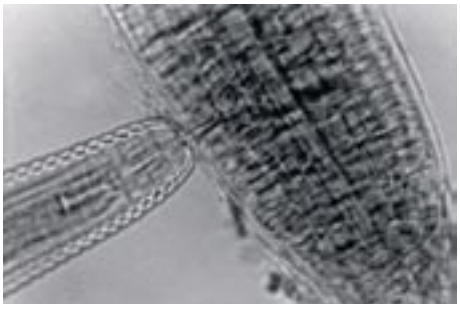
Figura 6. Nematodos endoparásitos.
(Fotografías de J. Bridge [JB].)

Ectoparásitos (Fig. 7)

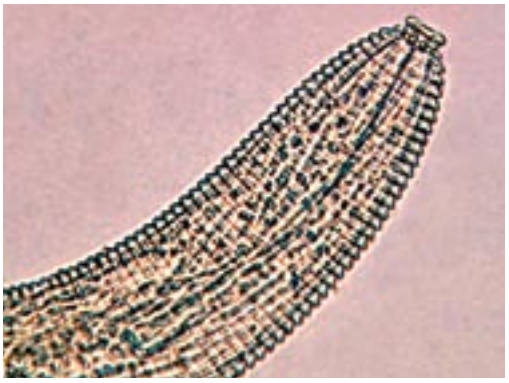
Los nematodos ectoparásitos se alimentan sobre la superficie de la planta externamente, generalmente lo hacen de los pelos radicales o de los tejidos corticales. Normalmente, se encuentran en grandes densidades poblacionales pero no siempre constituyen un problema. Sin embargo, pueden causar un daño grave cuando la planta está sufriendo otros estreses bióticos o abióticos. (p.e. ataques fúngicos o poca disponibilidad de agua). Ejemplos de nematodos ectoparásitos son los nematodos de anillo (*Criconemoides* spp.), los nematodos de espiral (*Helicotylenchus* spp.) y el nematodo aéreo que produce la punta blanca del arroz (*Aphelenchoides besseyi*).

Es bien sabido que algunos ectoparásitos actúan como vectores transmisores de virus de plantas, por ejemplo algunas especies de los nematodos daga (*Xiphinema* spp.), nematodos aguja (*Longidorus* spp.) y especies de nematodos que causan atrofia (*Trichodorus y Paratrichodorus* spp.).

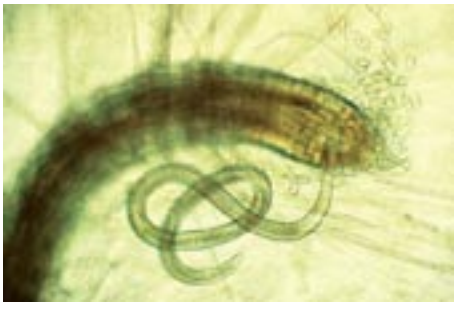




Aulosphora alimentándose en una raíz de arroz y detalle a mayor aumento del estilete penetrando el tejido radical.



Discocriconemella y detalle a mayor aumento de la región de la cabeza [GG].



Tylenchorhynchus alimentándose en la punta de la raíz [JB].

Figura 7. Nematodos ectoparásitos.
(Fotografias de G. Goergen [GG] y J. Bridge [JB].)

Síntomas de daño causados por nematodos

Uno de los mayores retos en la identificación de los nematodos como los agentes causales de daño a los cultivos es el hecho de que la mayoría de ellos no producen síntomas de diagnóstico específico y por tanto fáciles de identificar. El daño causado por los nematodos es generalmente inespecífico y se confunde fácilmente con otros síntomas atribuibles a estréses de origen biótico o abiótico. Por ejemplo, la clorosis puede deberse a una deficiencia en nitrógeno o puede ser debida a los nematodos; el crecimiento pobre puede deberse a la baja fertilidad del suelo, a estrés hídrico o puede deberse a los nematodos.

Por tanto, se recomienda determinar la existencia de nematodos cuando el cultivo esté sufriendo pérdidas de producción y mostrando alguno de los síntomas que se describen a continuación. Información adicional sobre el cultivo, el historial del mismo, y las prácticas de manejo, junto con la información contenida en esta guía también puede indicar que los nematodos están implicados en el problema observado.

Los síntomas de daño causado por los nematodos pueden manifestarse tanto en la parte aérea como en la subterránea.

Síntomas aéreos

Los síntomas en la parte aérea se clasifican en dos categorías: aquellos causados por nematodos parásitos de la parte aérea de las plantas que atacan al follaje y aquellos causados por nematodos parásitos de las raíces que atacan las raíces de las plantas.

Síntomas aéreos (Fig. 8)

Estos síntomas son generalmente específicos y están asociados al nematodo que los ocasiona, y por tanto, pueden tener carácter de diagnóstico. Estos incluyen:

- La formación de agallas, o hinchamiento anormal de las semillas (p.e. *Anguina*) o de las hojas (p.e. *Cynipanguina*)
- Estrías en las hojas, decoloración de las hojas (especialmente en climas templados) (p.e. *Aphelenchoides*)
- Hinchamiento, crecimiento arrugado o desorganizado del tejido (p.e. *Ditylenchus*)
- Necrosis interna del tallo puesta de manifiesto por un anillo rojo (*Bursaphelenchus cocophilus*)
- Necrosis de las inflorescencias
- Clorosis/pardeado to de las hojas (agujas de los pinos) y muerte eventual de los árboles (*Bursaphelenchus xylophilus*).

Síntomas causados por nematodos parásitos de las raíces (Fig. 9)

Los nematodos parásitos de las raíces siempre causan crecimiento anormal de la parte aérea en mayor o menor grado, pero estos síntomas por si solos, generalmente, son insuficientes para diagnosticar un problema causado por nematodos de las raíces. La mayoría de los síntomas reflejan o pueden confundirse con otros problemas como disminución en la absorción de agua o alteración en la absorción de nutrientes. Estos síntomas incluyen:

- Clorosis (amarilleo) o coloración anormal del follaje
- Crecimiento deprimido en rodales, manchas o parches

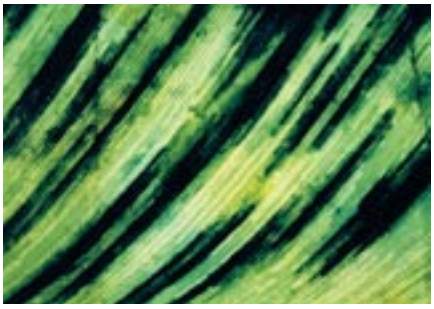
Espigas de cebada y trigo deformadas debido al nematodo de las agallas de las semillas *Anguina tritici* [RS].

Hojas arrugadas o retorcidas de arroz causadas por *Ditylenchus angustus* [JB].

Enfermedad de la punta blanca del arroz causada *Aphelenchoides besseyi* [JB].

Síntomas del anillo rojo (*Bursaphelenchus cocophilus*) en el tronco de cocotero [JB].

Enfermedad de "Ufra" en arroz causada por *Ditylenchus angustus* [JB].



Decoloración y rayado de la hoja (*Musa*) causado por *Aphelenchoides* sp. [PS].

Avena gravemente infectada por el nematodo del tallo causando crecimiento en rodales, pobre, clorosis (izquierda) e hinchamiento basal (derecha) asociado con la infección por *Ditylenchus dipsaci* [HW].

Agalla en semilla de trigo causada por *Anguina tritici* (semilla rota mostrando huevos y juveniles emergiendo desde su interior) [JB].

Figura 8. Síntomas aéreos causados por nematodos parásitos de la parte aérea de las plantas que atacan al follaje. (Fotografías de J. Bridge [JB], R. Sikora [RS], P. Speijer [PS] y H. Wallwork [HW].)

Clorosis y crecimiento deprimido en raíces de arroz (izquierda) causados por *Heterodera sacchari*.

Rodal de crecimiento pobre y clorosis de las hojas inferiores en trigo causado por *Heterodera* spp. [HW].

Retraso en la floración/ maduración y crecimiento deprimido en un rodal de papas solanun causado por el nematodo de los quistes de la papa [DH].

Follage fino y escaso en parcelas inundadas de arroz causado por *Hirschmanniella* spp.

Achaparrado/ reducción de altura en musaceas (plantas de la izquierda) causada por *Pratylenchus coffeae*.

Distribución en rodales y porte reducido en trigo atacado por el nematodo lesionador (*Pratylenchus neglectus*) [RR y RC].

Muerte descendente de las ramas de cítricos causada por *Radopholus similis*.

Caida de banano causada por *Radopholus similis*.

Distribución en rodales, crecimiento pobre y clorosis en maíz debido al nematodo agallador (*Meloidogyne* spp.) [AM].

Figura 9. Síntomas en la parte aérea causados por nematodos parásitos de las raíces.
(Fotografías de R. Cook [RC], D. Heinicke [DH], A. McDonald [AM], R. Rivoal [RR] y H. Wallwork [HW].)

- Follaje fino o escaso
- Síntomas de estrés de agua como marchitez o abarquillado de las hojas
- Muerte descendente de las ramas de plantas leñosas o perennes con poco o muy poco follaje nuevo
- Reducción en el tamaño de los frutos y semillas
- Bajo rendimiento del cultivo (poca cosecha).

Otros síntomas que pueden sugerir infección de las raíces por nematodos son:

- Falta de respuesta normal al abonado
- Tendencia a reaccionar al estrés hídrico más rápida que las plantas sanas y una recuperación lenta al marchitamiento
- Poco o ningún desarrollo de nuevo follaje en el momento de la brotación al inicio de la nueva estación del año
- Problemas de maleza graves (mayor densidad de maleza), debido a que las plantas infectadas por los nematodos tienen menos capacidad para competir con la maleza.
- Mayor incidencia de la enfermedad, debido a la supresión de la resistencia en las plantas infectadas por los nematodos.

Síntomas subterráneos

Estos se deben a los nematodos parásitos de las raíces, y pueden ser lo suficientemente específicos como para permitir el diagnóstico del nematodo. Para observar los síntomas es necesario arrancar o desenterrar las raíces de las plantas. Los síntomas incluyen:

- Agallado
- Raíces escasas, más cortas, engrosadas
- Lesiones en las raíces
- Necrosis en las raíces o tubérculos, podredumbre o muerte
- Agrietado de las raíces o tubérculos
- Quistes o raíz 'perlada'
- Raíces deformadas
- Alteración de la arquitectura de la raíz.

Agallas en las raíces

Las agallas en las raíces están causadas principalmente por el nematodo agallador (*Meloidogyne* spp.), aunque otros nematodos como *Nacobbus aberrans* también puede cuasar agallado en las raíces (Fig. 10). Algunos nematodos, como *Xiphinema* spp., al alimentarse de las raíces pueden dar lugar a hinchamientos o agallas menos definidas que se localizan en las puntas de las raíces.

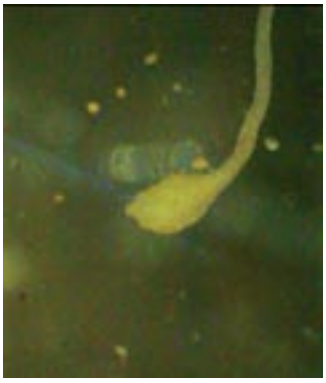
Las agallas pueden variar considerablemente dependiendo de las especies de *Meloidogyne*, el cultivo y cultivar, y si estas tienen lugar en las raíces o en los tubérculos (Fig. 11). La apariencia típica de las agallas es la siguiente:

- Hinchamientos pequeños de forma redondeada
- Abultamientos masivos de tejido indiferenciado que confluyen entre sí.
- Puntas de la raíz hinchadas
- Abultamientos irregulares a lo largo de la raíz
- Puntas de raíz curvadas en forma de gancho
- No se aprecia ningún hinchamiento de forma definida, solamente la superficie levantada en donde se encuentra el nematodo embebido.

Nódulos en raíces de mandioca causadas por *Meloidogyne* spp.

Meloidogyne graminicola en raíces de arroz causando atrofiamiento y agallas en raíces de las plántulas [RP] y puntas de raíces típicamente curvadas [JB].

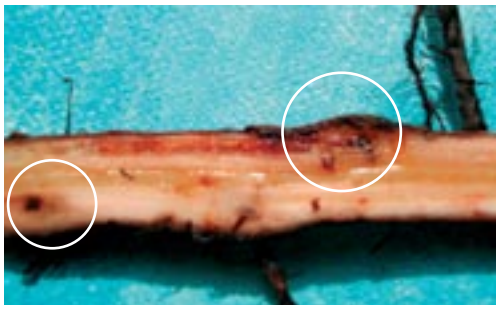
Agrupamiento masivo de tejido radical agallado en hórticolas causas por *Meloidogyne* spp.



Hinchazon de la punta de la raíz en maíz causada por *Meloidogyne* spp.

Agallado leñoso y masivo en las raíces de un árbol causado por *Meloidogyne* spp.

Figura 10 – ***continúa a la vuelta de la página***



Sistema radical de banano deformado con raíces hinchadas (izquierda) y sección longitudinal de la raíz de un banano con la superficie levantada y hembras de *Meloidogyne* spp. embebidas en la misma (resaltadas en la raíz partida derecha).

Agallas en forma de cuentas de rosario en lechuga causadas por *Meloidogyne* spp.

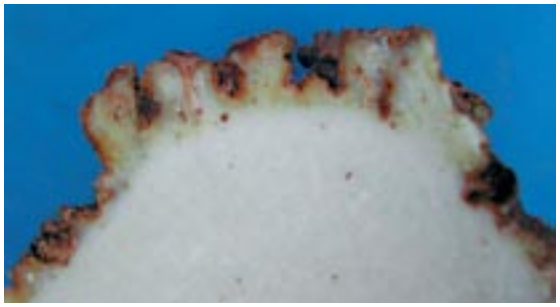
Deformaciones y numerosas agallas y supresión del crecimiento de las raíces en maíz causadas por *Meloidogyne* spp.

Raíces agalladas de papa causadas por *Nacobbus aberrans* [JB].

Figura 10. Raíces agalladas y otros síntomas causados por el nematodo agallador (*Meloidogyne* spp.) y *Nacobbus* sp.
(Fotografías de J. Bridge [JB] y R. Plowright [RP].)

Una idea comúnmente generalizada, pero errónea, es que los nematodos agalladores no atacan a las plantas de la familia de las Gramíneas (pasto y cereales). En realidad, estas especies son fácilmente atacadas por estos nematodos pero el agallado es generalmente menos visible. Sin embargo, normalmente se pueden observar agallas pequeñas (Fig. 10).

Agallas en tubérculos de yam (*Dioscorea* spp.).



Corte transversal de un tubérculo de yam mostrando la superficie elevada y dentada y las hembras del nematodo embebidas en el tejido.

Agallas en papa.

Agallas en remolacha.

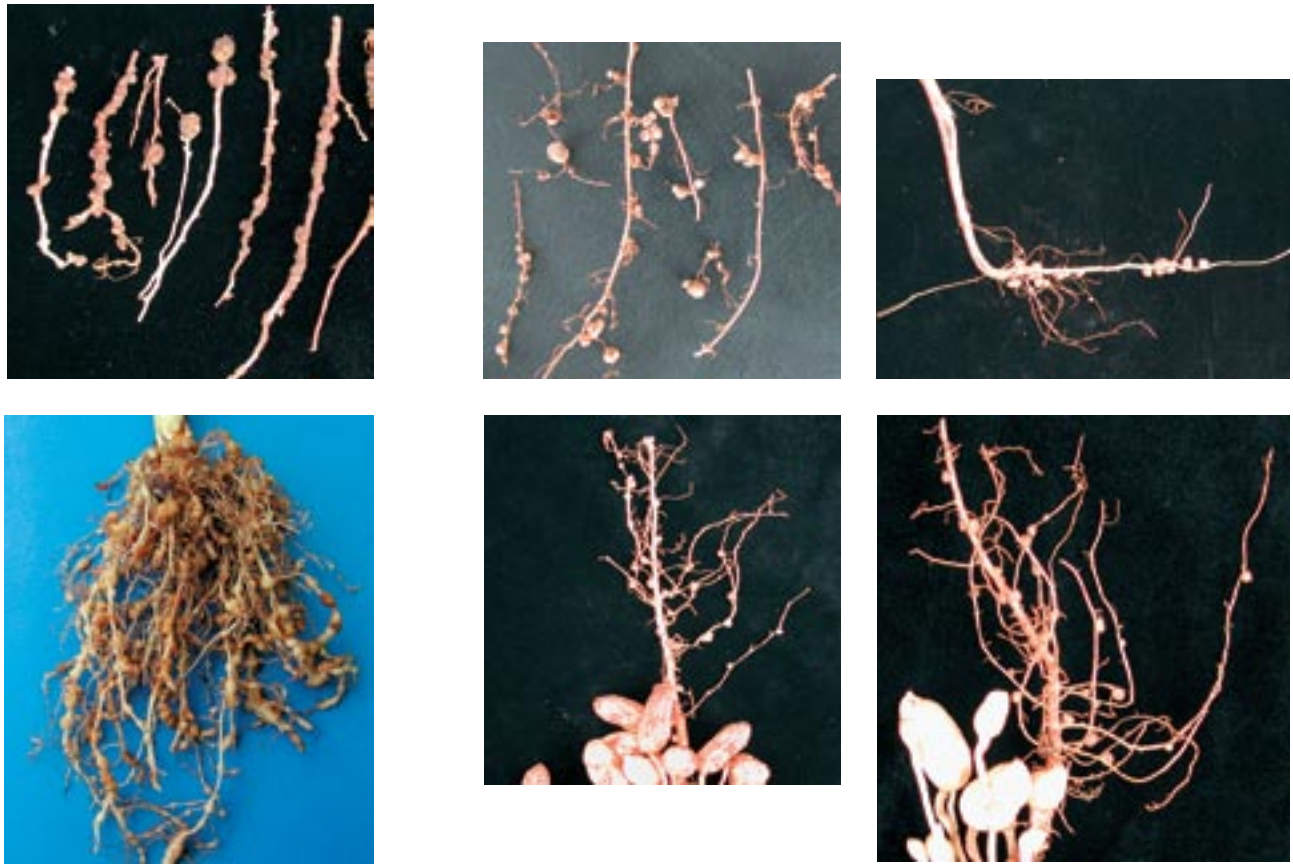
Agallas en raíces de mandioca.

Agallas en zanahoria.

Figura 11. Agallas en organos de almacenamiento causados por el nematodo agallador (*Meloidogyne* spp.).

Agallas en las raíces versus nódulos (Fig. 12)

Las bacterias beneficiosas fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium* producen abultamientos en las raíces llamados nódulos y normalmente se observan en las raíces de las leguminosas. Los nódulos se distinguen de las agallas por su contenido y por la forma en que se encuentran unidos a las raíces. Los nódulos jóvenes y activos tienen en su interior un líquido lechoso de color rosado a pardo, mientras que las agallas suelen ser de naturaleza sólida y aspecto gelatinoso claro cremoso pero en ocasiones



Agallas producidas por el nematodo agallador en mandioca y lechuga (las dos fotos de la izquierda) comparadas con los nódulos producidos por organismos beneficiosos fijadores de nitrógeno (grupo de la derecha) en soja, fríjol y cacahuete.

Raíces de col con síntomas similares a las agallas pero causados por *Plasmodiophora brassicae*.

Figura 12. Agallas en las raíces causadas por nematodos comparadas con otros síntomas semejantes al agallado.

duro. Los nódulos están unidos a la raíz pero se pueden separar con facilidad de la misma; las agallas producidas por el nematodo agallador se originan desde el interior de la raíz y resulta más difícil separarlas de las raíces sin desgarrar el tejido cortical de la raíz.

Algunas enfermedades de las raíces como las raíces en forma de maza causada por el hongo *Plasmodiophora brassicae* pueden dar lugar a deformaciones en el sistema radical que recuerdan el daño causado por el nematodo agallador (Fig. 12).

Sistemas radicales reducidos

La actividad del nematodo puede causar un acortamiento de las raíces de forma tal que la masa radical queda reducida considerablemente o tiene un aspecto achaparrado (Fig. 13).

Raíces de arroz achaparradas y agalladas causadas por *Meloidogyne graminicola* [RP].

Sistema radical de olivo joven severamente atrofiado como resultado de la infección por nematodos lesionadores (*Pratylenchus* spp.).

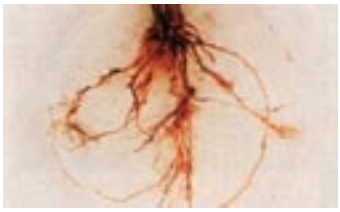
Raíces de maíz engrosadas causadas por *Paratrichodorus minor* [DD].

Figura 13. Acortamiento de raíces.
(Fotografías de D. Dickson [DD] y R. Plowright [RP].)

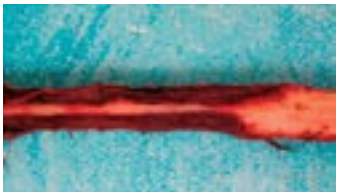
Lesiones en las raíces y tubérculos

Las raíces y tubérculos pueden mostrar áreas de tejido muerto (necrosis) como consecuencia de la actividad del nematodo (Fig. 14 y 15). Conforme el nematodo se alimenta y emigra dentro de las raíces, destruye células de la planta y también interrumpe las funciones celulares normales causando la muerte del tejido.

Raíces de fresa con grandes lesiones causadas por el nematodo lesionador (*Pratylenchus vulnus*) [JB].



Síntomas del nematodo lesionador (*Pratylenchus thornei*) en raíces de trigo.



Raíces de banano mostrando extensas lesiones (necrosis) causadas por *Radopholus similis*.

Raíces de maíz infectadas por nematodos lesionadores *Pratylenchus* (derecha) en comparación con raíces no infectadas (izquierda).

Figura 14. Síntomas de lesiones en raíces.
(Fotografías de J. Bridge [JB].)

Lesiones internas y necrosis visibles bajo la superficie de yam (*Dioscorea*) debidas al nematodo del yam (*Scutellonema bradys*).

Lesiones en batata causadas por *Scutellonema bradys*.

Lesiones internas en batata debidas al nematodo agallador (*Meloidogyne incognita*) [JB].

Lesiones en batata causadas por *Paratrichodorus* (tubérculo del centro) [MM].

Daño causado por *Ditylenchus destructor* en papa [FERA].

Daño causado por *Ditylenchus destructor* en el tejido interno de papa [FERA].

Figura 15. Necrosis y lesiones en órganos de almacenamiento.
(Fotografías de J. Bridge [JB], Food and Environment Research Agency [FERA] y M. Marais [MM].)

Podredumbre de la raíz y de los tubérculos

Los nematodos por sí mismos pueden causar la podredumbre de las raíces y tubérculos debido a la perforación extensa del tejido vegetal dando lugar a necrosis substanciales y muerte del tejido y de la raíz (Fig. 16 y 17). El nematodo barrenador del banano *Radopholus similis*, los nematodos lesionadores *Pratylenchus* spp., el nematodo del yam *Scutellonema bradys*, y *Hirschmanniella miticausa* en taro son ejemplos de ello. Frecuentemente, también se desarrollan infecciones bacterianas y fúngicas que contribuyen a la podredumbre (Fig. 17).

Podredumbre, agrietado superficial (izquierda) y y supresión (derecha) de las raíces de banano causada por una combinación de *Radopholus similis*, *Helicotylenchus multicinctus* y *Meloidogyne* spp.

Necrosis y reducción de las raíces de batata debidas a *Scutellonema bradys*.

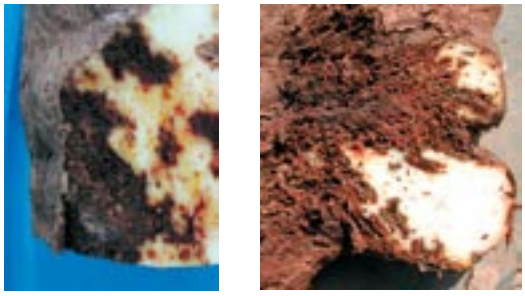
Figura 16. Podredumbre de raíces causadas por infección de nematodos.

Necrosis subsuperficial en raíces tuberosas de mandioca infectadas por el nematodo agallador (*Meloidogyne* spp.), comparadas con raíces no infectadas a la izquierda.

Podredumbre de tubérculo de batata infectado por el nematodo agallador (*Meloidogyne* spp.) [JB].

Podredumbre interna en tubérculo de yam (*Dioscorea*) causada por una infección fúngica que probablemente hayan entrado como resultado del daño causado por *Scutellonema bradys* en el tejido cortical.

Enfermedad del "miti miti" en taro/cocoyams causadas por *Hirschmanniella miticausa* [JB].



Podredumbre seca de yams (*Dioscorea*) causada por el nematodo del yam (*Scutellonema bradys*).

Figura 17. Podredumbre de tubérculos causada por infección por nematodos.
(Fotografías de J. Bridge [JB].)

Agrietado

Las raíces y tubérculos a veces desarrollan una superficie agrietada subsiguiente a la infección por el nematodo (Fig. 18). Este síntoma puede atribuirse a estrés de agua o nutricional durante el crecimiento. El agrietado se observa a menudo en tubérculos de batata causado por el nematodo reniforme (*Rotylenchulus reniformis*). *Scutellonema bradys* puede causar el mismo síntoma en yam (*Dioscorea*).

Escamas y agrietado (izquierda) de la superficie en tubérculos de yam (*Dioscorea*) causado por *Scutellonema bradys*.

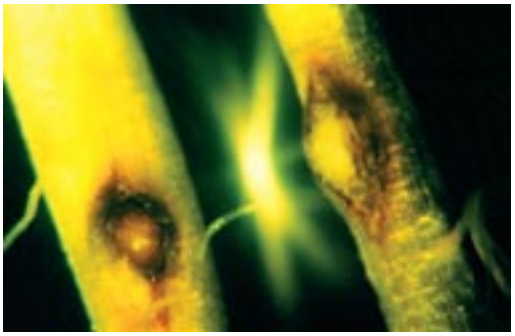
Agrietado de tubérculos de batata causados por *Rotylenchulus* spp.

Agrietado de la superficie de un tubérculo de papa causado por *Scutellonema bradys*.

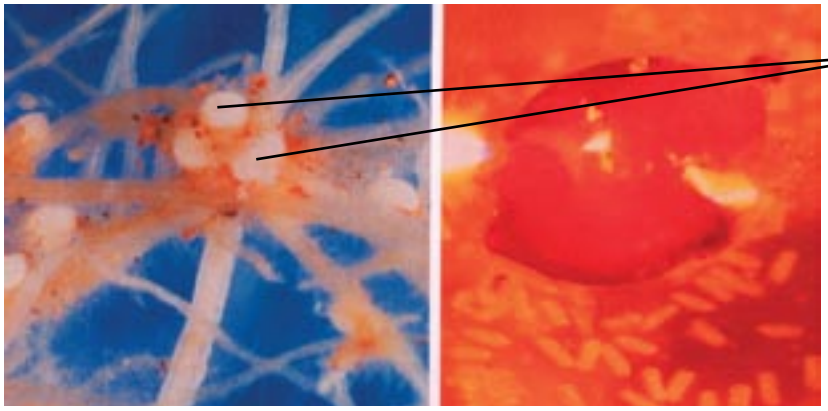
Figure 18. Síntomas de agrietado de tubérculos.

Quistes o 'raíz perlada' (Fig. 19)

Los nematodos de los quistes (p.e. *Heterodera* y *Globodera* spp.) se pueden observar en la superficie de las raíces de las plantas huésped sin necesidad de aumento si se golpea la raíz suavemente para eliminar el suelo adherido a las mismas, o bien, si el observador mira con atención. Las hembras jóvenes se ven como diminutas cuentas o bolitas blancas dando una apariencia perlada a la ráiz cuando hay muchas hembras. Conforme las hembras maduran, el quiste, que puede contener cientos de huevos, se endurece y se vuelve marrón o negro.



Quiste marrón oscuro y hembra blanca de *Heterodera oryzicola* embebida en el tejido radical de arroz [RP].



Hembras blancas del nematodo de los quistes de los cereales, *Heterodera avenae*, del tamaño de la cabeza de un alfiler, causando nódulos en raíces de trigo (izquierda) antes de que las hembras maduren y formen el quiste marrón, mostrado a la derecha con los huevos fuera del mismo [HW].

Raíces de papa con hembras blancas de *Globodera rostochiensis* pegadas a lo largo de la superficie de la raíz dándole la apariencia de cuentas blancas pegadas o aspecto perlado [JB].

Figura 19. Quistes o raíces 'perladas'.
(Fotografías de J. Bridge [JB], R. Plowright [RP] y H. Wallwork [HW].)

Muestreo

Una vez se haya observado síntomas que indican una posible o probable infestación con nematodos, el paso siguiente es tomar muestras de las plantas afectadas y del suelo alrededor de las raíces de las mismas. Posteriormente, éstas se llevan a analizar al laboratorio para determinar que nematodos se encuentran presentes, y si es posible, determinar también sus densidades poblacionales.

Las características del suelo que se relacionan a continuación tienen implicaciones en la forma de realizar el muestreo y por tanto se deben tener en cuenta:

- La distribución en agregados de los nematodos debido al sistema radical de la planta huésped y el comportamiento estacional del nematodo.
- Tipo de cultivo e historial del mismo
- Áreas plantadas con diferentes variedades
- Humedad del suelo
- Compactación del suelo
- Tipo de suelo
- Temperatura y cambios estaciónales.

Herramientas para el muestreo

En la Fig. 20 se muestran una serie de herramientas útiles para el muestreo, entre ellas, pala, azada, pala de mano, destornillador, barreno, cuchillos (para cortar raíces), tijeras, bolsas de plástico de polietileno, etiquetas. El barreno debe tener una caña de 20–30 cm de longitud y 20–25 mm de diámetro, puede ser completamente cilíndrico o semi-cilíndrico. Los barrenos semi-cilíndricos facilitan el sacar del barreno la muestra de suelo recogida. También se necesita rotuladores para etiquetar las bolsas de las muestras, lápiz y cuaderno para anotar los datos.

Figura 20. Surtido de herramientas para tomar muestras de nematodos.

Número de muestras

Tomar un número suficiente de muestras para asegurarse de que son representativas de la situación del campo. Cuanto mayor sea el número de sub-muestras /barrenos combinadas por cada muestra que se tome en un campo, mayor exactitud tendrá la evaluación. Sin embargo, es preciso alcanzar un equilibrio entre el tiempo necesario para tomar las muestras y los medios disponibles.

El procedimiento de muestreo y el número de muestras tomadas debe tener en cuenta la variación o agregación del nematodo. De un área de 0,5 hectáreas, tomar un mínimo de 10 sub-muestras y como máximo de 50. Combinar las sub-muestras para conseguir una muestra compuesta que represente el área del campo muestreada. Al combinar las muestras de esta forma se facilita su conservación ya que se mantiene la temperatura y humedad de las mismas.

Diseño del muestreo

Los nematodos raramente están distribuidos de forma uniforme en el campo, y por tanto las muestras deben tomarse de varias zonas del campo. Recoger muestras por separado de zonas con crecimiento pobre y de zonas con crecimiento relativamente bueno donde estas diferencias sean obvias para poder compararlas. Seguir siempre el mismo procedimiento y modelo en la recogida de muestras durante los muestreos y experimentos para que las comparaciones entre campos, parcela, tratamientos, etc. tengan significado.

El procedimiento de muestreo puedes ser al azar o sistemático (Fig. 21). El muestreo al azar no se adecua a la distribución natural del nematodo en manchas o parches y solo es representativo si el área de muestreo es pequeña. El muestreo sistemático representa un modo más estructurado de tomar muestras ya que considera la naturaleza del campo y la distribución del nematodo.

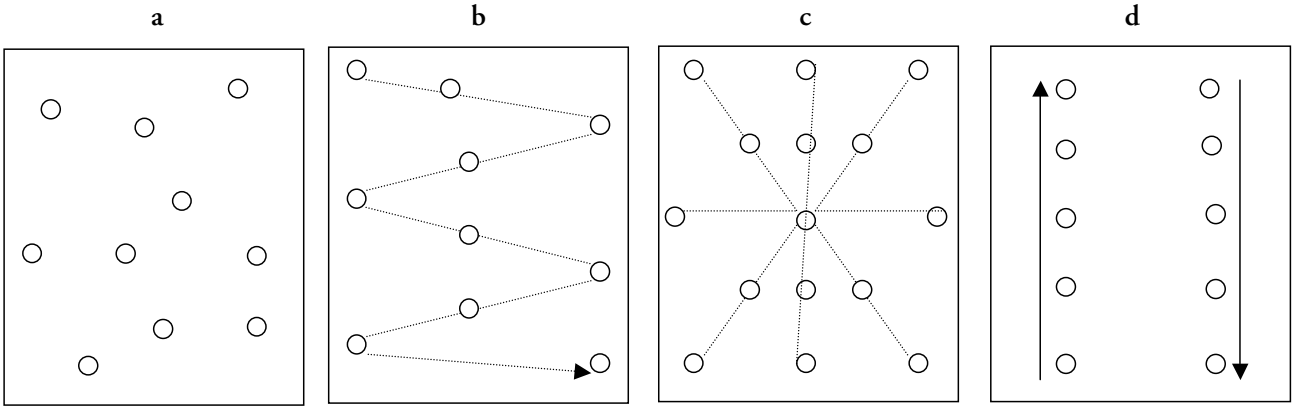


Figura 21. Patrones de muestreo para nematodos. (a) Muestreo al azar; (b–d) muestreo sistemático.

Epoca de muestreo

La época o momento óptimo de muestreo varía dependiendo del cultivo ya que está relacionada con la fase de crecimiento del cultivo y el objetivo del muestreo (predictivo o diagnóstico). El muestreo predictivo (que no es el objeto de esta guía) se realiza al principio de la estación, antes de plantar o justo en el momento de plantar, o bien, al finalizar el cultivo precedente para determinar el número de nematodos (densidad poblacional).

Muchas especies de nematodos incrementan sus densidades poblacionales hasta alcanzar niveles altos durante la campaña del cultivo y éstas densidades poblacionales se reducen durante los periodos entre cultivos (estación seca); esto es más fácil de observar en plantas anuales que en perennes o en los cultivos arbóreos. Por tanto, las muestras deberán tomarse idealmente a mitad de la campaña y/o al finalizar la cosecha con fines de diagnóstico. Los cultivos perennes se pueden muestrear durante el periodo de crecimiento activo de la planta o árbol, es decir, durante la estación lluviosa/crecimiento para identificar el problema.

Recolección de muestras de suelo

Como regla general, evitar muestrear el suelo cuando esté muy húmedo o muy seco. Sin embargo, cuando los cultivos crecen normalmente, por ejemplo, en terrenos inundados (p.e. arroz) o condiciones áridas (p.e. sisal), éstos deben muestrearse en estas condiciones para que las muestras sean representativas de las condiciones habituales de cultivo.

Dividir los campos mayores de 1 hectárea en parcelas de 1 hectárea (10 000 m^2) y muestrear estas parcelas por separado. Tomar de 10 a 50 sub-muestras (barrenos) y combinarlas para hacer una muestra compuesta que pese 1–2 kg. Tomar la sub-muestra de suelo de la zona de las raíces con una pala, azada, barreno o herramienta similar que sea adecuada para el cultivo que se está muestreando. Colocarla la muestra compuesta con cuidado en una bolsa, etiquetarla y **cerrar** las bolsas con las muestras (Fig. 22).

Asegurarse de tomar muestras entre las hileras, en los surcos de siembra.

Una vez llenado el barreno, sacarlo con cuidado del suelo.

La muestra debe representar una sección transversal del suelo desde la superficie (0 cm) hasta aproximadamente unos 20–30 cm de profundidad.

En caso de no disponer de un barreno, las muestras también se pueden tomar con una pala u otra herramienta similar.

Colocar el barreno sobre un recipiente grande, plano y de material resistente, preferentemente plástico.

Sacar todo el contenido del barreno sobre el recipiente con la ayuda de un instrumento resistente y sin punta. Asegurarse de que se ha eliminado bien todo el suelo del barreno antes de tomar otra muestra.

Colocar las muestras en bolsas de plástico resistentes que puedan cerrarse. Etiquetar claramente con una etiqueta y escribir con lápiz (no utilizar bolígrafo porque se emborrona y hace ilegible la escritura).

O incluso más fácil, etiquetar la bolsa por fuera con un rotulador impermeable al agua.

Figura 22. Recolección y embolsado de las muestras.

Recolección de muestras de raíces

Las raíces se pueden recolectar al mismo tiempo y de los mismos puntos que las muestras de suelo, y en general, se deben guardar en la misma bolsa que el suelo, ya que de esta forma, el suelo ayuda a conservar las raíces evitando su desecación.

Generalmente, aunque depende del cultivo, 25–100 g de raíces por muestra compuesta son suficientes, pero se puede recolectar menor cantidad cuando las raíces son finas como en el caso del arroz, y mayor cantidad cuando las raíces son grandes y gruesas como en el caso del banano o cuando se trata de árboles. Cuando existen al mismo tiempo, raíces finas y gruesas, como en el banano, se aconseja recolectarlas por separado.

Evitar tomar muestras de plantas muertas o aquellas que estén en avanzado estado de senescencia, ya que los nematodos habrán emigrado de estas plantas a otras fuentes de alimento. En el caso de cultivos con escaso porte, todo el sistema radical de una planta puede constituir una sub-muestra. Arrancar la planta del suelo con sus raíces con la ayuda de una pala o azada de forma que al levantar las raíces una porción considerable del sistema radical permanezca intacto y teniendo cuidado de no romperlas, depositarlas en la tierra. Después de sacudir el suelo de las raíces, tomar al azar sub-muestras de las raíces con un cuchillo o tijeras.

Recolección de muestras de tejido vegetal aéreo

Se deben recolectar hojas, tallos, semillas, u otras partes del vegetal que presenten síntomas y de donde se sospeche que existan nematodos. De nuevo, es importante seleccionar las muestras de un número de plantas afectadas, las cuales deben compararse con porciones de tejido vegetal no afectado de diferentes plantas.

Cuidado de las muestras

Recolectar las muestras en bolsas de plástico resistentes, y etiquetarlas de forma clara y sistemáticamente. Las etiquetas de plástico marcadas con rotulador impermeable al agua o con un lápiz de grafito se puede colocar dentro de la mima bolsa de plástico (Fig. 22), o alternativamente, escribir directamente sobre la bolsa de plástico con un rotulador impermeable al agua el número de la muestra y su referencia. Las etiquetas de papel es mejor sujetarlas por fuera de la bolsa con un alambre o brida. Si se utilizan etiquetas de papel, escribir con lápiz y no con bolígrafo porque éste se borra cuando se humedece la etiqueta. Pero siempre tener presente que las etiquetas de papel se deterioran rápidamente con la humedad.

Anotar siempre que sea posible:

- El cultivo y el cultivar o variedad
- La fecha de muestreo
- El nombre del agricultor
- La localidad (y coordenadas GPS si es posible)
- Un número de referencia (o parcela) si se trata de una parcela experimental
- El cultivo(s) precedente.

Los nematodos son muy **sensibles y perecederos**, y por tanto, es muy importante que se tomen las medidas adecuadas para mantener las muestras recolectadas en buenas condiciones. Las muestras **NO** deben dejarse nunca expuestas a la luz solar ni dentro de un vehículo cerrado estacionado al sol. Tampoco debe transcurrir mucho tiempo desde su recolección hasta su procesamiento.

Las muestras, una vez recogidas, se deben colocar en una bolsa o arcón nevera (contenedor hecho con material aislante; Fig. 23), o empaquetarlas en cajas de cartón de paredes gruesas y colocarlas en zonas sombreadas donde las condiciones sean más frescas. Cuando no es posible procesar las muestras inmediatamente, éstas se pueden almacenar en un refrigerador (aproximadamente 10°C) durante dos semanas como máximo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la supervivencia del nematodo decrece con el tiempo y que los nematodos procedentes de ambientes calurosos pueden sufrir daño al refrigerarlos.

Figura 23. Bolsa/arcón nevera para el almacenamiento de las muestras.

Extracción de nematodos

El paso siguiente en el proceso es extraer los nematodos de las muestras. Las extracciones deben realizarse tan pronto como sea posible después de haber recolectado las muestras dado que éstas se deterioran con el paso del tiempo.

Existen cuatro técnicas básicas de extracción las cuales se describen en esta guía:
- Bandejas de extracción
- Maceración de las raíces y hojas
- Tamizado
- Incubación.

Otros tres métodos - elutriador, el embudo de Fenwick y la centrifugación flotación – requieren un equipamiento especial y no se describen en esta guía. Sin embargo, se puede obtener información sobre estos métodos consultando las referencias bibliográficas incluidas en la sección de Referencias y Lecturas recomendadas (página 65). En algunos casos también es posible examinar directamente los nematodos en el tejido vegetal.

Selección del método de extracción

La selección del método a utilizar depende de las condiciones y materiales disponibles, el tipo de muestra, y también de los tipos de nematodos presentes en la misma. Algunos métodos de extracción son más útiles para un tipo especial de nematodos mientras que otros son más generales. Esta guía describe en detalle los métodos más sencillos incluyendo el de las bandejas de extracción que es útil en la mayoría de las condiciones y proporciona una evaluación razonable de los nematodos en suelo, raíces, semillas o tejido vegetal y se puede replicar fácilmente.

La Tabla 1 muestra el método de extracción más adecuado para cada tipo de nematodo (sedentario/ migratorio) en muestras de suelo, raíces o foliares.

Tabla 1. Método de extracción de elección para diferentes tipos de nematodos y muestras.

	Muestra de suelo		Muestra de raíces o foliar	
	Nematodos sedentarios	**Nematodos migratorios**	**Nematodos sedentarios**	**Nematodos migratorios**
Bandeja de extracción (p. 34)		X		X
Tamizado (p. 42)	X	X		
Maceración de raíces/hojas (p. 40)			X	X
Incubación (p. 48)			X	X

Si se conoce el nematodo diana – como en el caso de parcelas experimentales – entonces se podrá identificar con exactitud el tipo de material que habrá que muestrear y procesar en ese caso (suelo, raíz, tubérculo, hoja, etc.). Pero si no se está seguro, entonces se realizarán extracciones de suelo y raíces para tener en cuenta tanto los nematodos sedentarios como los migradores.

Preparación de las muestras

Las muestras de suelo húmedo (capacidad de campo) se deben mezclar muy bien antes de tomar sub-muestras para la extracción de los nematodos. Romper los terrones o grumos de suelo y eliminar las piedras, raíces y restos vegetales. Pasar el suelo húmedo por un tamiz con malla gruesa con orificios entre 1–2 mm (Fig. 26, paso 1) que se colocará sobre un recipiente adecuado y mezclar muy bien. Tomar una sub-muestra de la mezcla con un vaso o recipiente de volumen conocido (Fig. 26, paso 2); normalmente se utiliza 100 ml de suelo. De cada muestra compuesta de suelo tomada en el campo se deben procesar dos sub-muestras de 100 ml y después realizar la media de los resultados obtenidos.

En el caso de suelo mojado, como el procedente de parcelas inundadas de arroz, es preciso tomar pequeñas bolitas o grumos de varias partes de la muestra de campo o de la base de las raíces y medir la sub-muestra a procesar mediante el desplazamiento del agua para obtener muestras del mismo tamaño (Fig. 29, pasos 1 y 2). Llenar un vaso hasta un volumen determinado marcado previamente (p.e. 200 ml) y añadir los grumos de suelo para aumentar el volumen hasta la cantidad requerida, por ejemplo, un aumento de volumen de 200 a 300 ml es equivalente a una medida de 100 ml de suelo. Posteriormente, utilizar el método de tamizado para extraer los nematodos.

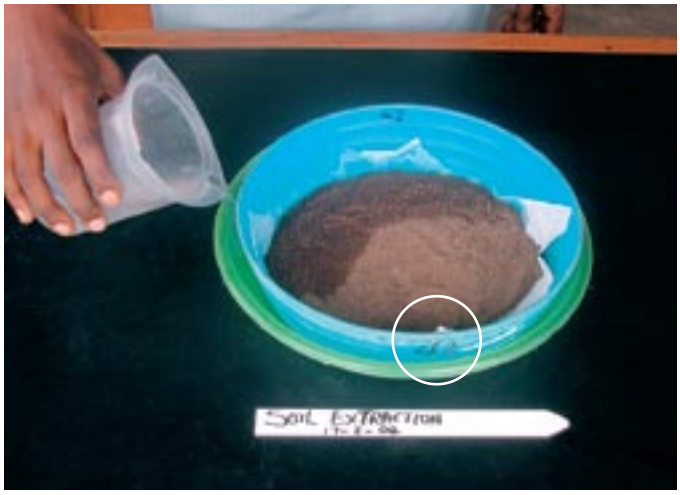
Separar las raíces del suelo y eliminar cualquier suelo adherido a las mismas golpeándolas suavemente o enjuagándolas con cuidado bajo el grifo o en un recipiente con agua. Eliminar el exceso de agua de las raíces colocándolas sobre papel absorbente, trocearlas con unas tijeras y extraer los nematodos de acuerdo con el método de extracción seleccionado.

Etiquetado

Es importante realizar un etiquetado de las muestras que sea **claro**, **correcto** y **consistente** (Fig. 24). Etiquetar los recipientes con un rotulador impermeable al agua o con lápiz graso, o bien, utilizar etiquetas que se puedan quitar y trasladar a lo largo de las diferentes etapas del proceso de extracción. **Asegurarse de que todas las muestras están correctamente etiquetadas en todo momento.**

Etiquetar las muestras con una etiqueta de papel y escribir con lápiz.

Etiquetar la bolsa de la muestra con un rotulador negro impermeable al agua.



Etiquetar la bandeja de extracción con una etiqueta de plástico y también etiquetar la bandeja con un rotulador permanete impermeable al agua o un lápiz graso.

Etiquetar el vaso con un rotulador permanete impermeable al agua o un lápiz graso.

Lápiz graso impermeable al agua.

Figura 24. Materiales para etiquetar y ejemplos de etiquetado.

Método de las bandejas de extracción

Este método (y sus variantes) también es conocido como la técnica de Baermann modificada, el método del cuenco o el método de la bandeja de Whitehead.

Ventajas:

- No se necesita equipo especial
- Es fácil de adaptar a circunstancias básicas utilizando el material disponible localmente
- Extrae una amplia variedad de nematodos móviles
- Es una técnica simple.

Desventajas:

- Los nematodos de gran tamaño y aquellos que tienen movimiento lento no se extraen bien.
- Las extracciones a veces pueden estar bastante sucias (especialmente si el contenido en arcilla del suelo es alto) lo cual dificulta el recuento de los nematodos.
- La proporción de nematodos que se extraen puede variar dependiendo de la temperatura ambiente dando lugar a posibles variaciones en los resultados entre las muestras extraídas en diferentes momentos o épocas del año.
- Se tarda 3 o 4 días en conseguir la máxima recuperación de los nematodos.

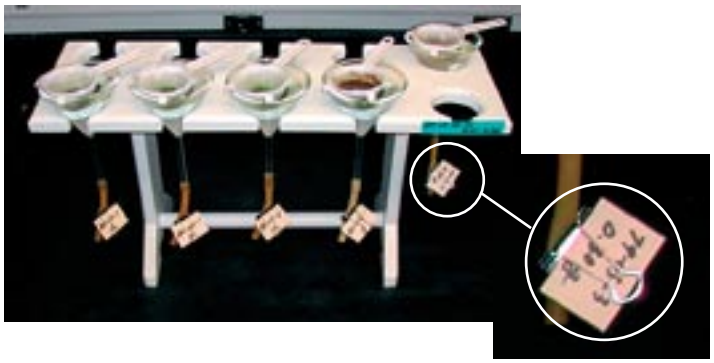
Equipo

- Una cesta (o cedazo doméstico) hecho con malla gruesa (Fig. 25)
- Un plato/bandeja/cuenco, ligeramente más grande que el cedazo
- Papel absorbente (papel de secar las manos, cocina, servilletas de papel)
- Vasos o recipientes para recoger la extracción
- Frascos lavadores
- Rotulador impermeable al agua
- Cuchillos/tijeras
- Balanza para pesar
- Mesa de trabajo o poyata de laboratorio amplia.

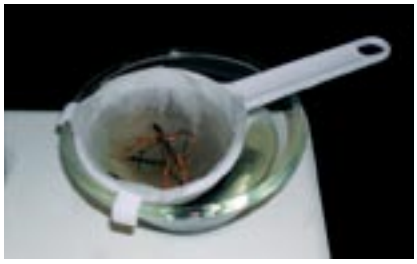
La mayoría de los utensilios necesarios se pueden comprar en el mercado o fabricar con materiales que se consiguen con facilidad (Fig. 25). Los embudos se pueden sujetar en una gradilla o un soporte con tubos de goma insertados en el vástago y cerrados en la base inferior con una pinza (Fig. 25, arriba). Para construir el tamiz se puede utilizar una malla anti-insectos sujeta a una sección de tubería de plástico de unos 10 cm a 15 cm de diámetro aproximadamente (Fig. 25, centro). Es **muy importante** que la malla y la base del tamiz estén ligeramente elevadas (~2 mm) respecto a la base de la bandeja/ plato. Para ello, se puede utilizar por ejemplo, tres o cuatro "patas" pequeñas hechas de la misma tubería que se pegarán con pegamento a la base del tamiz (Fig. 25, abajo). Este espacio es necesario para que los nematodos puedan pasar con facilidad al agua. En caso contrario, los nematodos no migrarán al agua.

Método

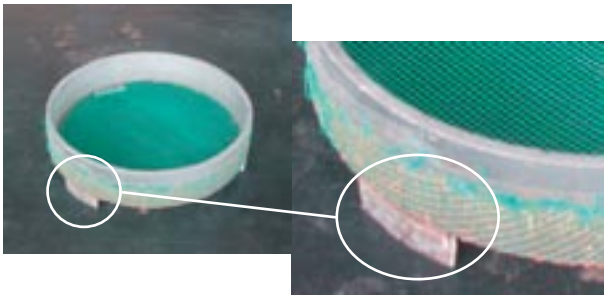
Es muy importante asegurarse de que durante todo el proceso, todos los recipientes utilizados para cada muestra estén etiquetados de forma correcta y consistente durante todo el proceso ya que es muy fácil cometer equivocaciones. Las extracciones de suelo y raíces se deben etiquetar por separado.



Ejemplo del método de extracción del embudo con el tubo de goma sujeto con una pinza y etiquetado en la base. Los nematodos se concentrarán en el tubo de goma justo por encima de la pinza.



Ejemplo de diferentes tipos de tamices o cedazos y bandeja sencillos. El ejemplo de la bandeja naranja a la izquierda se ha hecho utilizando una sección transversal de tubería de PVC y una malla anti-mosquito sujeta al fondo con pegamento para cosntruir el tamiz. Es muy importante que el tamiz no descanse directamente sobre el fondo de la bandeja sino que debe quedar un pequeño espacio que lo levante del fondo.



Tamiz hecho con tubería de PVC y malla con "patas" de plástico para levantarlo del fondo y asegurarse que el nematodo puede migrar facilmente al agua.

Figura 25. Diferentes maneras de extraer nematodos de una muestra.

Para muestras de suelo:

Separar las raíces de las muestras y colocarlas aparte en otro plato. **Etiquetar**.

Utilizar un tamiz de malla gruesa para eliminar las piedras y residuos vegetales del suelo y deshacer los grumos o terrones de suelo (Fig. 26, paso 1).

En un recipiente de plástico (palangana, cubo) mezclar muy bien la muestra de suelo.

Tomar una medida de suelo (p.e. 100 ml) (Fig. 26, paso 2).

Colocar papel absorbente (papel de secar las manos, servilletas de papel, etc.) sobre un tamiz/cedazo de plástico (colocado sobre un plato de plástico) y asegurarse de que toda la base del tamiz quede completamente cubierta por el papel (Fig. 26, paso 3). **Etiquetar**.

Poner la medida de suelo sobre el papel colocado sobre el tamiz. Es importante que el suelo quede sobre el papel – las salpicaduras de suelo da lugar a extracciones sucias difíciles de contar (Fig. 26, paso 4).

Añadir agua a las bandejas de extracción (Fig. 26, paso 5) despacio y con cuidado (entre el borde de la malla y el lateral de la bandeja) y no al papel o suelo. Añadir un volumen determinado de agua a cada bandeja para humedecer el suelo o las raíces pero sin cubrirlo asegurándose de que hay suficiente agua como para que no se seque la muestra. Las muestras de suelo requieran mayor cantidad de agua que las de raíces. Posteriormente, añadir más agua si fuera necesario.

Dejar las bandejas de extracción en reposo (preferentemente en la oscuridad) por un periodo de tiempo determinado (48 horas si es posible) (Fig. 26, paso 6) y reponer el agua de las bandejas si hay posibilidad de que se sequen. Los nematodos en el suelo o en el tejido vegetal se moverán a través del suelo o tejido vegetal y pasarán al agua colocada en la bandeja/placa y allí se quedarán.

Después del periodo de extracción, levantar el tamiz que contiene el suelo y dejar que el agua escurra sobre la bandeja de extracción (Fig. 26, paso 7).

Poner el tamiz aparte y tirar el tejido vegetal/suelo a la basura.

Verter el agua de la bandeja/plato en un vaso previamente **etiquetado** con la ayuda de un frasco lavador para lavar la bandeja o plato. (Fig. 26, pasos 8 y 9). Dejar que las muestras sedimenten (Fig. 26, paso 10).

Para contar los nematodos extraídos, concentrar el volumen de la suspensión vertiendo el agua cuidadosamente o sifonar el exceso de agua (teniendo cuidado de no perder los nematodos depositados en el sedimento), o bien, pasar la extracción por un tamiz con luz de malla muy pequeña (p.e. 20–30 µm) (Fig. 26, paso 11). Lavar los nematodos retenidos en este tamiz y recogerlos en un vaso (o tubo) para su recuento o conservación si se van a enviar fuera o contar más tarde (Fig. 26, pasos 12 y 13).

1. Tamizar la muestra por un tamiz grueso para eliminar restos vegetales y grumos.

2. Medir una submustra de suelo estandarizada en volumen, p.e. 100 ml.

3. Cubrir el cedazo con papel absorbente y colocar sobre un plato o bandeja de plástico.

Figura 26 – *continua en la página siguiente*

4. Colocar el suelo sobre el papel procurando que este quede depositado sobre el papel y no caiga ningún suelo sobre o fuera de los bordes.

5. Añadir con cuidado el agua a la bandeja y asegurandose que se vierte en el hueco entre la bandeja y el tamiz.

6. Dejar reposar las extracciones de las muestras durante 2 días, revisando periódicamnete el nivel de agua para asegurarse que las muestras permanecen húmedas y que no se secan debido a la evaporación. Si ello sucediera, añadir más agua a la bandeja hasta completar el nivel incial.

7. Levantar el tamiz de la bandeja con cuidado, dejar que escurra el agua y tirar el papel y el suelo a la basura.

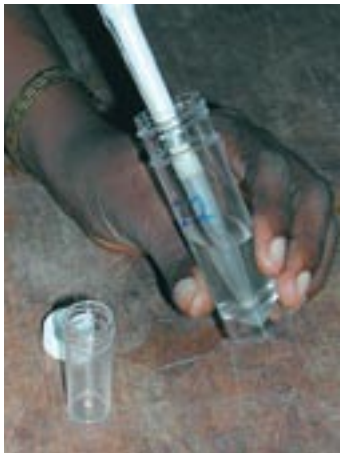
8. Verter el agua que contiene los nematodos sobre un vaso previamente etiquetado.

9. Lavar muy bien la bandeja sobre el mismo vaso con la ayuda de un frasco lavador.

10. Dejar que sedimenten los nematodos en las muestras durante unas horas o toda la noche.

11. Reducir el volumen de la suspension mediante decantación, o bien, pasándola a través de un tamiz de luz de malla pequeña (p.e. 28 µm) y recoger la suspensión retenida en el tamiz en un vaso para determinar los nematodos.

12. La muestra se puede guardar en un tubo si no se va a observar inmediatamente.



13. Si la muestra se va a envíar fuera para su evaluación, los nematodos se pueden recolectar, una vez hayan sedimentado, del fondo del tubo con una pipeta y depositarlos en un tubo o vial más pequeño para su almacenaje o envío.

Figura 26. Método de las bandejas para extraer nematodos de muestras de suelo.

Para muestras de raíces:

En ocasiones, las raíces se pueden separar en diferentes categorías, como por ejemplo trozos de raíces gruesas y duras y raíces alimenticias finas. Es útil extraer por separado los nematodos de cada categoría de raíces dado que la textura del tejido radical y el tipo de nematodos que las invade puede variar, al igual que las densidades del nematodo en una y otra categoría. La eficiencia de la extracción también puede variar puesto que los nematodos que salen de las raíces más gruesas tardarán más tiempo en hacerlo.

Golpear suavemente las raíces/tubérculos para eliminar el suelo adherido a las mismas o enjuagarlas bajo el grifo de agua y después eliminar el exceso de agua colocándolas sobre papel absorbente. Pelar con cuidado los tubérculos con un cuchillo o pelador de cocina quitando la piel o cáscara superficial.

Cortar las raíces (o las cáscaras de los tubérculos) en trozos muy pequeños con la ayuda de un cuchillo o tijeras y colocarlas en un cuenco o plato previamente etiquetado (Fig. 27, paso 1). Mezclar muy bien todo el material cortado.

Tomar y pesar una sub-muestra (p. e. 5 g) del material cortado en una balanza. (Fig. 27, paso 2).

Colocar la sub-muestra de raíces pesada sobre un papel absorbente colocado sobre el tamiz situado sobre la bandeja previamente etiquetada (Fig. 27, paso 3).

Continuar el procedimiento siguiendo los pasos indicados para la extracción de nematodos del suelo detallado anteriormente (Fig. 26, pasos 5–13).

Alternativamente,

utilizar el método de maceración de las raíces para las raíces más gruesas (Fig. 28, páginas 40–41), y luego completar el procedimiento siguiendo los pasos descritos para las bandejas de extracción (Fig. 26, pasos 5–13).

Si los nematodos se van a enviar fuera para su identificación o recuento, éstos deben conservarse de acuerdo con el protocolo descrito en las páginas 57–60.

1. Cortar las raíces o cáscaras de los tubérculos y colocarlas en un plato o cuenco previamente etiquetado.

2. Pesar una sub-muestra de raíces.

3. Colocar la sub-muestra de raíces en tamices para su extracción.

A continuación seguir los pasos 5–13 descritos en la Figura 26.

Figura 27. Método de las bandejas para extraer nematodos de muestras de raíces.

Método de maceración de las raíces

Conocido también como el método de maceración de las raíces seguido de incubación y extracción en bandeja.

Ventaja:

- No se necesita equipo especial.

Desventaja:

- El tiempo empleado en la maceración es crítico – debe ser el suficiente para permitir que el nematodo pueda salir fácilmente del tejido de la planta, pero a su vez, debe evitarse que el nematodo sufra daño por una maceración excesiva.

Equipo

- Vasos
- Tijeras/cuchillos
- Frasco lavador
- Rotulador impermeable al agua
- Balanza para pesar
- Batidora domestica

Método

Cortar las raíces y las cáscaras de los tubérculos (en su caso) en trozos pequeños (Fig. 28, pasos 1 y 2) y mezclarlos.

Pesar una sub-muestra (Fig. 28, paso 3). Ponerla en la batidora y añadir agua en cantidad suficiente para cubrir justamente las cuchillas de la batidora.

Macerar las sub-muestras de raíces y cáscaras finas durante intervalos de 5 segundos, o bien, de 10 segundos para raíces más duras, y esperar brevemente a que la suspensión repose entre las dos maceraciones (Fig. 28, paso 4).

Verter la suspensión de raíces en agua en un vaso y enjuagar la batidora de los residuos adheridos a las paredes y recoger el líquido de lavado con la ayuda de un frasco lavador en el mismo vaso donde se ha recogido la suspensión de raíces. (Fig. 28, paso 5).

Verter cuidadosamente la suspensión de raíces en agua sobre papel absorbente colocado sobre un tamiz y a continuación seguir el método de la bandeja de extracción. (Fig. 26, paso 5 y siguientes).

Opcionalmente, las raíces se pueden teñir antes de la maceración para mejorar la visibilidad de los nematodos después de la extracción (ver página 60).

1. Después de lavar los tubérculos, perlarlos finamente con un cuchillo o pelador de verduras.

2. Cortar las cáscaras o las raíces con unas tijeras o cuchillo.

3. Pesar una sub-muestra.

4. Macerar las raíeces/ cáscaras en una batidora.

5. Verter la suspensión macerada en un vaso previamente etiquetado y lavar el interior de la batidora sobre el vaso.

6. Verter la muestra cuidadosamente sobre el papel colocado sobre el tamiz de forma similar al método de las bandejas. 5–13 descritos en la Figure 26.

A continuación, seguir los pasos 5–13 descritos en la Figure 26.

Figura 28. Método de la maceración de las raíces.

Método del tamizado

Ventajas:

- Buena extracción de todo tipo de nematodos
- Bueno para los nematodos de gran tamaño y aquellos de movimiento lento
- Idóneo para extraer nematodos de suelo mojado
- Útil para extraer quistes del suelo.

Desventajas:

- Los nematodos pueden posarse con las partículas de suelo si el suelo no está bien disperso
- Los nematodos se dañan con facilidad
- Requiere un equipamiento más especializado

Equipo

Para nematodos móviles en el suelo:

- Vasos y cubos
- Rotulador impermeable al agua
- Tamices de 20 cm de diámetro (Endecotts¨ o Retsch¨) de 2 mm, 90 µm (o 53 µm) y 38 µm de luz de malla
- Equipo de bandejas de extracción

Para recuperar quistes de nematodos sedentarios (p.e. *Heterodera*):
Se utilizará el mismo equipo que para los nematodos móviles en el suelo, pero además se necesita

- Tamices de 20 cm diámetro (Endecotts¨ or Retsch¨) de 2 mm, 250 µm, y 150 µm de luz de malla
- Embudos
- Papel de filtro (o papel de secar las manos)

Si se desconoce si hay nematodos sedentarios entonces se necesita utilizar todo el equipo.

Método

Para nematodos móviles en el suelo:

Llenar un cubo con 6 litros de agua aproximadamente. Marcar un nivel de agua trazando una línea con un rotulador impermeable al agua dentro del cubo para que todas las muestras se procesen en el mismo volumen (Fig. 29, paso 3).

Poner una sub-muestra de suelo oreado, tamizado y mezclado o de suelo mojado medido mediante el desplazamiento de agua en un vaso (Fig. 29, pasos 1 y 2) dentro del cubo (Fig. 29, paso 4).

Mezclar muy bien el suelo y agua con la mano en el cubo (Fig. 29, paso 5). Dejar que las partículas más grandes del suelo sedimenten durante 30 segundos (Fig. 29, paso 6).

Verter lentamente ¾ partes de la parte superior del agua a través de tamices superpuestos: utilizar un tamiz de 2mm de luz de malla para retener los restos vegetales y descartarlos, o sólo los tamices de 90 µm y 38 µm para capturar los nematodos si no hay restos vegetales (Fig. 29, paso 7). Este paso necesita dos personas. Tener mucho cuidado de que el agua no rebose los bordes de los tamices superpuestos (ni tampoco entre los tamices) cuando se está vertiendo el cubo de agua sobre los tamices ya que se perderían los nematodos con el agua que se derrame. Verter lentamente y golpear suavemente el tamiz inferior si fuera necesario para facilitar que el agua fluya a través de los tamices.

Volver a llenar el cubo hasta la marca señalada (Fig. 29, paso 8) y repetir el proceso una o dos veces más (Fig. 29, pasos 5– 7).

Lavar los residuos capturados en los tamices de 90 y 38 µm, concentrarlos en la parte inferior del mismo y recogerlos en un vaso previamente **etiquetado** y asegurarse que los tamices quedan bien limpios lavándolos por la parte de atrás con suavidad (Fig. 29, pasos 9–11).

Dejar reposar las extracciones en los vasos durante 2–3 horas para que los nematodos en suspensión sedimenten en el fondo del vaso. Si fuera necesario, decantar o eliminar el exceso de agua.

1. Añadir agua a un vaso hasta un volumen conocido, p.e. 200 ml.

2. Medir el suelo añadiendo grumos de cada muestra compuesta hasta que el agua desplazada alcance el volumen superior marcado.

3. Medir un volumen determinado de agua utilizando una línea previamente marcada en el interior del cubo.

4. Verter la sub-muestra de suelo previamente medida dentro del cubo con agua.

5. Mezclar muy bien.

6. Dejar sedimentar el suelo durante 30 segundos.

7. Verter lentamente ¾ partes del agua sobre dos tamices superpuestos (90 y 38 µm de luz de malla) con el tamiz de 90 µm en la parte superior.

8. Volver a llenar el cubo con agua y repertir los pasos 5, 6 y 7.

9. Concentrar los residuos extraidos lavando los tamices con cuidado con una manguera principlamente por la parte de atrás.

10. Asegurarse que los tamices están bien lavados por detrás y que todos los residuos y nematodos capturados sobre la superficie del tamiz se encuentran concentrados en la parte inferior del mismo.

11. Lavar con cuidado los residuos recogidos en los tamices de 90 µm y 38 µm en un vaso previamente etiquetado.

Figura 29. Extracción de nematodos del suelo mediante tamizado.

Se pueden continuar procesando las extracciones de acuerdeo con el método de las bandejas de extracción (Fig. 26, pasos 3–13, página 37).

Para recuperar quistes de nematodos sedentarios:

Secar al aire las muestras de suelo antes de proceder a la extracción (Fig. 30, paso 1).

Llenar un cubo con 6 litros de agua aproximdamente. Marcar un nivel de agua trazando una línea con un rotulador impermeable al agua dentro del cubo (Fig. 30, paso 2).

Añadir la sub-muestra de suelo medida al cubo (Fig. 30, paso 3).

Mezclar muy bien el suelo y agua con la mano, y dejar que las partículas del suelo sedimenten durante 60 segundos. Los quistes flotarán en el agua (Fig. 30, pasos 4 y 5).

Verter lentamente ½ parte de la parte superior del agua a través de tamices superpuestos: 2mm para retener los restos vegetales y descartarlos, los tamices de 250 µm y 150 µm se utilizarán para capturar los quistes (Fig. 30, paso 6).

Lavar los residuos capturados en los tamices de 250 µm y 150 µm y recogerlos en un vaso previamente etiquetado (Fig. 30, pasos 7 y 8).

Volver a llenar el cubo hasta la marca señalada (Fig. 29, paso 8) y repetir el proceso (pasos 4–8) al menos una vez, recogiendo todos los residuos capturados en los tamices en el mismo vaso. Repetir este proceso tantas veces como sea necesario hasta tener la seguridad de que se han recuperado todos los quistes que había en la muestra depositada en el cubo.

Preparar y **etiquetar** un filtro (papel de filtro, de secar las manos, filtro de leche) para colocarlo sobre un embudo (p. e. en forma de cono) sobre un soporte o vaso (Fig. 30, paso 10).

Verter la extracción sobre el filtro colocado en el embudo (Fig. 30, pasos 11 y 12). Dejar que el agua drene a través del embudo.

Quitar con cuidado el papel de filtro del embudo y colocarlo en una bandeja con algo de agua para que el filtro permanezca húmedo antes de su observación directa al microscopio (Fig. 30, paso 13). Para observar los quistes, abrir con cuidado el filtro y extender el contenido del mismo sobre el papel de filtro y a continuación observar a la lupa.

Alternativamente:

Dejar que el papel de filtro se seque en el embudo para posteriormente recogerlo y conservarlo hasta su observación, pesca y recuento de los quistes (Fig. 30, paso 14).

1. Secar el suelo al aire en un plato.

2. Llenar el cubo con agua hasta la línea marcada.

3. Verter la sub-muestra de suelo previamente medida dentro del cubo con agua

4. Mezclar muy bien.

5. Dejar sedimentar el suelo durante 60 segundos.

6. Verter la mitad del agua lentamente sobre tres tamices superpuesto de 2 mm, 250 y 150 µm.

7. Lavar los residuos capturados sobre los tamices de 250 y 150 µm lavándo los tamices por detrás si fuera necesario.

Figura 30 – *continua en la página siguiente*

8. Lavar los residuos recogidos en los tamices de 250 y 150 µm sobre un vaso previamente etiquetado con la ayuda de un frasco lavador.

9. Volver a llenar el cubo con agua y repertir los pasos 4–8.

10. Doblar un círculo de papel de filtro en cuatro partes y abrirlo en forma de cono, ponerlo sobre un embudo colocado sobre un vaso o plataforma para que no se caiga.

11. Verter la extracción sobre el papel de filtro.

12. Dejar que el líquido drene a través del papel de filtro.

13. Colocar el papel de filtro con los quistes y residuos extraidos en un plato o cuenco con agua en el fondo para mantener la humedad si el recuento de los quistes se va a realizar inmediatamente.

ou

14. Alternativamente, dejar que los extractos se sequen en el embudo si los quistes no se van a contar en ese momento.

Figura 30. Extracción de nematodos de los quistes mediante el método de tamizado.

Los quistes procedentes de las sub-muestras de suelo secadas al aire flotarán en la superficie del cubo, pero si las circunstancias no permiten el secado al aire, los quistes se pueden extraer directamente de las muestras del suelo. Muchos quistes flotarán, pero los quistes nuevos más pesados quizás no lo hagan por lo que será necesario agitar el agua y reducir el tiempo de sedimentación antes de decantar la suspensión de agua a través de los tamices.

Los quistes también se pueden pescar del tamiz, o directamente de las muestras secas bajo la lupa con la ayuda de un pincel fino. La determinación del número de quistes en el suelo es un dato útil, pero también es preciso determinar el número de huevos contenidos en los quistes. Para ello habrá que romper y/o aplastar los quistes para liberar los huevos contenidos en su interior (ver Referencias y Lecturas recomendadas).

Método de incubación

Este método también se conoce como incubación de las raíces en bolsas de plástico o frascos de cristal.

Ventaja:

- No se necesita equipo especial.

Desventajas:

- La eficiencia de la extracción puede ser relativamente baja
- Los nematodos extraídos a menudo se encuentran en malas condiciones por falta oxigeno.

Equipo

Bolsas de plástico, frascos de cristal, matraces, o vasos similares.

Método

Cortar el tejido vegetal en fragmentos finos y mezclarlo bien (Fig. 31, paso 1).

Pesar una sub-muestra /muestra.

Ponerla en una bolsa de plástico previamente **etiquetada** y cerrarla o en un recipiente (que no sea de metal) con tapadera que contenga una pequeña cantidad (10–20 ml) de agua (Fig. 31, paso 2).

Los nematodos eclosionarán de los huevos o migrarán desde el tejido radical al agua durante un periodo entre 2 a 7 días.

Recoger el agua del recipiente periódicamente (p.e. diariamente), lo que contribuirá a que el nematodo sobreviva, e ir reuniendo sucesivamente los volúmenes de suspensión recogidos en un vaso previamente etiquetado utilizando siempre el mismo vaso para cada muestra (Fig. 31, paso 3).

Reponer el agua cada vez que se decante, cerrar y dejar estar repitiendo el proceso durante el periodo de 2–7 días (Fig. 31, paso 4).

Reducir o concentrar la suspensión/extracción recogida de cada muestra y observar directamente al microscopio o guardar siguiendo los pasos 11–13 de la Fig. 26.

1. Cortar las raíces y pesar una sub-muestra de las mismas.

2. Colocar la sub-muestra pesada de raíces en un frasco, matraz, o bolsa de plástico y dejar durante 2–7 días. Dejar la tapadera del contendor floja, no cerrrar por completo.

3. Agitar a diario el recipiente y verter con cuidado la suspensión en un vaso dejando el tejido vegetal en el recipiente.

4. Después de verter la suspensión, volver a llenar el recipiente con agua.

5. Concentratar la suspensión y recoger los nematodos para determinaciones posteriores, por ejemplo utilizando un tamiz de luz de malla pequeño o dejar sedimentar la suspensión y decantar el exceso de agua. Después seguir, los pasos 12 y 13 de la Fig 26.

Figura 31. Método de extracción por incubación.

Examen directo del material vegetal

El tejido vegetal infectado se puede examinar bajo la lupa de disección, por ejemplo para comprobar si los nematodos están presentes antes de enviar el material para su identificación por expertos. Las hembras adultas sedentarias, que están embebidas en las raíces (ver Figuras 10 y 11) se pueden diseccionar del tejido vegetal y utilizarlas para su identificación. Cuando las muestras se envían fuera para la identificación de las especies, también es necesario enviar el tejido radical (agallado) al taxónomo, conservado en una solución de lactoglicerina. La observación directa también resulta útil para evaluar y observar el tejido foliar y los nematodos que infectan las semillas (ver Fig. 8), y para pescar individuos y ciertos nematodos con objeto de disponer de colecciones de preparaciones de nematodos, etc.

Para la observación directa del material vegetal:

Lavar el tejido vegetal bajo una corriente de agua suave, o colocarlo en un cuenco con agua durante unos minutos para eliminar el suelo y la suciedad adherida pero con cuidado de no desplazar de su sitio los nematodos ectoparásitos que estén alimentándose o sujetos externamente a la raíz.

Cortar el tejido vegetal en trozos de ~2 cm con unas tijeras o un cuchillo.

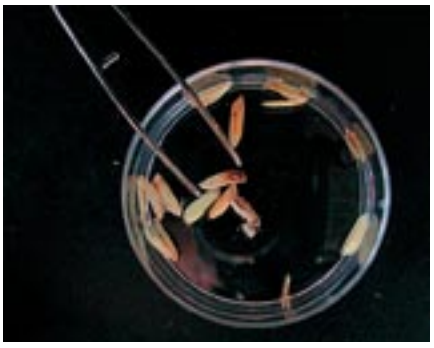
Colocar el tejido vegetal en una placa Petri con agua en su base (Fig. 32).

Para la observación inmediata diseccionar el tejido con la ayuda de agujas enmangadas y pinzas para liberar los nematodos del tejido vegetal. Esto es lo propio para los endoparásitos sedentarios (Fig. 32).

Si los tejidos vegetales contienen nematodos migratorios es aconsejable dejarlos en una placa Petri durante toda la noche o incluso más tiempo. Los nematodos migrarán del tejido vegetal al agua.

Los nematodos se pueden pescar entonces bajo la lupa binocular para su identificación o conservación (y tinción) y /o envío para su posterior identificación.

Disección del tejido vegetal.



Rotura de las cubiertas de las semillas para facilitar el libre movimiento de los nematodos.

Figura 32. Examen directo del material vegetal en agua.

Manipulación, fijación y tinción de los nematodos

Existen varias técnicas de utilidad para la manipulación e identificación de los nematodos, las cuales se describen en esta sección.

Manipulación de los nematodos

Los nematodos son difíciles de manipular debido a su tamaño microscópico particularmente para principiantes. Casi siempre es necesario manipularlos en un medio líquido, generalmente, agua. La utilización de una lupa de disección en lugar de un microscopio ayuda en el proceso. Es preciso seleccionar los nematodos individualmente para establecer cultivos puros o para realizar preparaciones para su identificación, y por tanto, es preciso "pescarlos". Cuando se manipula nematodos procedentes de cultivos puros, se pueden transferir tandas de especimenes con una pipeta capilar de crital (ver Fig. 35). Incluso, se pueden manipular y transferir nematodos individualmente estrechando la punta de la pipeta capilar utilizando un mechero Bunsen.

Pesca de los nematodos

Para observar los nematodos de cerca, a menudo se necesita "pescarlos" individualmente de la suspensión extraída y montarlos sobre un porta-objetos (Fig. 33). Ello pude resultar difícil al principio pero con la práctica resulta más fácil. Los nematodos son translúcidos (se ve a través de ellos) y pude resultar difícil verlos; la observación con luz transmitida colocada debajo de la platina de una lupa binocular ayuda a verlos. (Fig. 34). Si los nematodos se pescan del tejido vegetal o de las raíces, la luz incidente colocada por encima de la platina también puede ser de ayuda.

Figura 33. Pescando nematodos utilizando una astilla de bambú en una lupa de disección.

Se pueden utilizar varios instrumentos para pescar nematodos, por ejemplo un alfiler fino de los utilizados para insectos, una astilla de bambú, una pestaña o cerda de pincel fino pegada al extremo de una aguja enmangada, un palillo de dientes afilado o la parte central de una pluma de pájaro (Fig. 35).

Verter o utilizar una pipeta para colocar una parte de la suspensión de los nematodos (o tejido vegetal infectado) en una placa Petri, cámara de recuento o pocillo de cristal. El volumen de la suspensión añadido debe cubrir el fondo del recipiente superficialmente para facilitar la pesca de los nematodos.

Colocarla bajo una lupa de disección utilizando el aumento más bajo según convenga al observador.

Agitar suavemente la suspensión con un movimiento circular de la muñeca para desplazar los nematodos hacia el centro de la placa.

Localizar un nematodo y levantarlo con suavidad hasta la superficie del agua con la herramienta que se utilice para pescar.

Ir ajustando el objetivo del microscopio para mantener el nematodo siempre enfocado mientras se le está pescando de la suspensión acuosa.

Manteniendo el instrumento de pesca por debajo del nematodo levantarlo con suavidad para sacar el nematodo fuera del agua. El nematodo debe quedarse "colgando" de la punta del instrumento de pesca.

Poner la punta del instrumento de pesca suavemente en una gota de agua sobre un porta-objeto, un pocillo de cristal o en otro recipiente que contenga algo de agua.

Para observar el nematodo(s) sobre el porta-objeto en el microscopio, es útil "relajarlos", para ello, colocar el porta-objeto brevemente sobre una placa caliente (templada, no muy caliente).

Poner bolitas de cristal o astillas de un cubre-objetos en los bordes de la gotita de agua y colocar un cubre-objeto sobre la misma para no "aplastar" al nematodo.

Observar la preparación al microscopio.

Lupa de disección con luz transmitida.

Microscopio con luz transmitida.

Figura 34. Tipos de microscopios utilizados para pescar o contar nematodos.

Figura 35. Una muestra de instrumentos para pescar nematodos: astilla de bambú; puntas de pipeta estiradas mediante calor, aguja de disección con una pestaña pegada a la punta.

Envio de los nematodos para su identificación

Si después del muestreo y extracción, se puede identificar inmediatamente los nematodos a nivel de género y contarlos, ello proporcionará una indicación rápida de cuales son los grupos de nematodos presentes y saber si se encuentran a niveles potenciales de daño o pueden asociarse con el daño observado en el cultivo. Sin embargo, si no se posee la experiencia para realizar esto, o si se necesita conocer la especie del nematodo, será necesario enviar las muestras fuera para que sean identificadas por un nematologo especialista.

Antes de enviar las suspensiones extraídas, se necesita matar los nematodos presentes en las mismas (ver la sección siguiente) y conservarlos, especialmente si se van a enviar fuera del país. Los nematodos se pueden enviar vivos si previamente se ha llegado a un acuerdo con el laboratorio de destino o si se envían dentro del país. A veces, también se puede enviar suelo o tejido vegetal, sin embargo, es fundamental respetar las normas de cuarentena de cada país.

Los nematodos se pueden recolectar en viales o tubos pequeños (Fig. 36) y empaquetarlos cuidadosamente en contenedores de material aislante para su transporte al laboratorio donde se realizará la identificación. Los viales deben estar **claramente etiquetados** con un código/número. Los códigos se deben apuntar en folios por duplicado (uno debe acompañar a los especimenes y el otro debe guardarlo la persona que los envía) indicando todos los detalles de la muestra y este documento se debe guardar hasta que se reciban los resultados de la identificación.

Diferentes tipos de recipientes útiles para guardar o enviar muestras.

Pequeños micortubos úitles para enviar muestras para su identificación.

Transferencia de nematodos a un microtubo para guardarlas o enviarlas.

Utilización de un pocillo de cristal para conservar los nematodos pipeteando unas gotas de formalina.

Figura 36. Almacenaje de muestras de nematodos para su transporte.

Servicios para la identificación de nematodos

Existe un número de taxónomos ubicados en varios centros del mundo capaces de identificar con exactitud los nematodos. Sin embargo, muy pocos centros ofrecen un servicio de identificación rutinaria de nematodos, especialmente a nivel específico. Algunos de los centros que ofrecen este servicio son:

Plant Disease and Diagnostic Services
CABI Bioscience UK
Bakeham Lane
Egham
Surrey TW20 9TY, UK
Tel: +44 (0)1784 470111

Biosystematics
ARC-PPRI
P/Bag X134
Pretoria 0001, Republic of South Africa
Tel: +27 (0)12 356 9830

Nematology
Department of Plant Protection
Faculty of Agriculture
University of Jordan
Amman 11942, Jordan
Tel: +962 (0)6 535 5000–3004

Central Science Laboratory
Sand Hutton
York
YO4 1LZ, UK
Tel: +44 (0)1904 462000

Laboratório de Nematologia
(*Meloidogyne* spp., *Bursaphelenchus xylophilus*)
IMAR-CMA
Departamento de Zoologia
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Universidade de Coimbra
3004-517 Coimbra, Portugal
Tel: +351 239855760

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
(*Meloidogyne* spp.)
Parque Estação Biológica - PqEB
Av. W5 Norte
Caixa Postal 02372 CEP 70770-900,
Brasília - DF, Brasil
Tel: +55 (61) 3403660/34484930

Laboratório de Nematologia da ESALQ
Setor de Zoologia
Av. Pádua Dias, 11
Caixa Postal 9
13418-900 Piracicaba - SP, Brasil
Tel: +55 (19) 34294338/34294269

Antes de enviar cualquier muestra para su identificación, es esencial contactar con el centro de destino y convenir con ellos si tienen capacidad para manipular las muestras que se envían y acordar la mejor manera para su conservación y transporte.

Se puede contactar con la sección de nematología del CIMMYT e IITA que ofrecen consejos generales y entrenamiento. También se puede buscar información a través de las sociedades relacionadas con la nematología listadas en la contracubierta de esta guía.

Muerte de los nematodos

Es importante matar los nematodos con rapidez dado que cada especie adopta una forma particular cuando se han matado rápidamente lo cual puede ayudar en la identificación. El mejor procedimiento para matar los nematodos es el calor suave (55–65°C) que conserva el contenido del cuerpo del nematodo. Si se matan a temperaturas muy altas, el contenido del cuerpo se cuece y desnaturaliza lo que dificulta su identificación. Los nematodos se pueden matar primero y después fijarlos, o bien, se pueden matar y fijar en el mismo proceso.

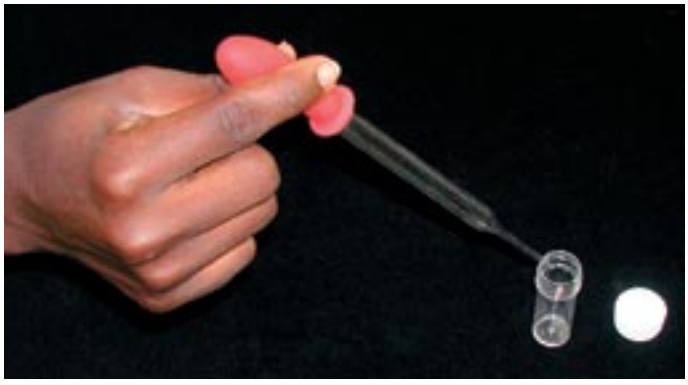
Un método simple y eficiente para matar nematodos es añadir un volumen de agua hirviendo igual al de la suspensión de nematodos. Si se va a enviar toda la extracción, será necesario reducir el volumen de la misma de forma que quede menos de la mitad de la extracción en el frasco o vial donde se envíe. Resulta más fácil matar y fijar los nematodos en un tubo más grande y luego trasvasarlos a tubos más pequeños (Fig. 36), o bien recoger los nematodos del fondo del tubo con una pipeta y colocarlos en los tubos donde se va a enviar.

También se puede matar los nematodos colocando la suspensión concentrada en un volumen pequeño en un tubo y sosteniendo el tubo dentro de un vaso con agua caliente a punto de hervir durante 1-2 minutos, esto puede llevar mucho tiempo cuando hay un número grande de muestras. También puede resultar engorroso ya que hay que tener cuidado que los tubos se mantengan en posición vertical y no se vuelquen en el agua perdiendo así la muestra.

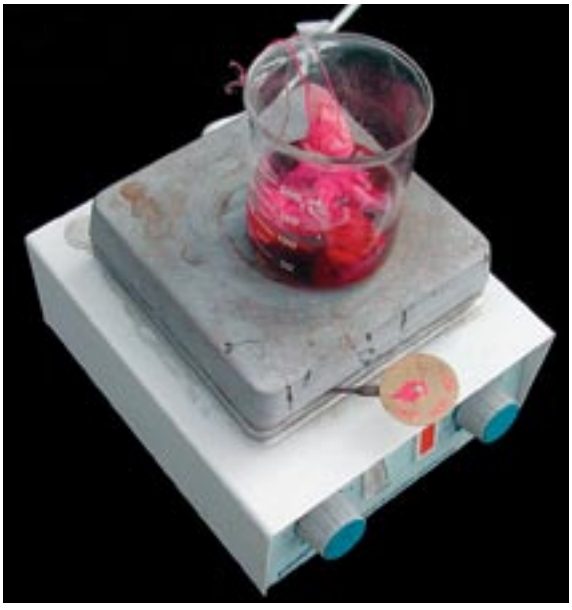
Fijación de los nematodos

El método más simple para fijar y conservar las muestras es pipetear unas pocas gotas de formaldehído (formalina) sobre los nematodos recientemente muertos por el calor. Dos o tres gotas para un frasco o vial de 7 ml es suficiente (Fig. 37); si el frasco es de mayor tamaño, hará falta añadir más gotas. Este es un método rápido y fácil para evitar que las muestras se deterioren durante la manipulación y almacenamiento antes de su identificación, sin embargo, este método no proporciona especimenes de buena calidad para su conservación a largo plazo y también puede dificultar la identificación, especialmente si las muestras no se van a examinar inmediatamente.

Tomar precauciones con el formaldehído porque comporta riesgos para la salud.



Pipeteando formalina en una suspension de nematodos en un tubo de 7 ml para conservar la muestra.



Tinción de tejidos vegetales con fuscina ácida en una solución de lactoglicerina sobre una placa caliente.

Figura 37. Fijación y tinción de los nematodos.

Muerte y fijación en un solo proceso

Calentar el fijador casi hasta el punto de ebullición en un tubo de ensayo o vaso de precipitados colocado en agua hirviendo.

Verter el fijador caliente en un volumen igual al de la suspensión sobre la suspensión de los nematodos (p.e. 2 ml del fijador caliente en 2 ml de la suspensión = 4 ml).

Alternativamente:

Recoger los nematodos en una pequeña gota de agua en un pocillo de cristal y añadir 2–3ml del fijador caliente con una pipeta.

Los fijadores más adecuados son:

TAF
Trietanol**a**mina 2 ml
Formalina (40% formaldehído) 7 ml
Agua destilada 91 ml
El fijador se conserva estable durante mucho tiempo y la apariencia de los nematodos se mantiene como si estuvieran vivos porque los especimenes no se desecan.

FA 4:1
Formalina (40% formaldehído) 10 ml
Acido **a**cético glacial (ácido propiónico) 1 ml
Agua destilada 89 ml
En FA 4:1 los nematodos mantienen su estructura aunque pueden decolorarse después de algún tiempo.

Formalina glicerina
Formalina (40% formaldehído) 10 ml
Glicerina 1 ml
Agua destilada 89 ml

Este fijador tiene la ventaja de prevenir la desecación de los nematodos incluso si los viales no están herméticamente cerrados. Una vez más, recordar que se deben tomar precauciones con los fijadores porque comportan riegos para la salud.

Conservación de los nematodos sedentarios en raíces o tubérculos

La identificación de los nematodos sedentarios requiere el examen de las hembras. Por tanto, los tejidos vegetales que contengan las hembras, como las raíces agalladas, se deben conservar y enviar para su examen. Para ello, será suficiente colocar una sub-muestra pequeña del tejido vegetal infectado dentro de un frasco o vial que contenga lactofenol o lactoglicerina. La tinción previa del tejido vegetal puede ayudar en la identificación.

El lactofenol se puede comprar tal cual, o bien se puede preparar mezclando a partes iguales un volumen de glicerina, ácido láctico y agua destilada (lactoglicerina) y disolviendo una cantidad pequeña (1%) de fenol en la mezcla anterior (lactofenol). Dado que el **fenol es muy tóxico**, es mejor utilizar sólo lactoglicerina aunque esta mezcla es menos eficaz para la conservación de las muestras durante largos periodos de tiempo.

Tinción

La observación de los nematodos dentro del tejido vegetal se hace más fácil utilizando ciertos colorantes que tiñen el nematodo pero dejan el tejido vegetal prácticamente sin teñir (p. e. ver Fig. 5). Las raíces gruesas o abultadas se deben cortar en fragmentos o secciones finas antes de teñirlas para asegurar la transmisión de la luz después de aclararlas.

Teñir con lactoglicerina + 0.1% azul de algodón, o bien, 0.05–0.1% fucsina ácida, luego eliminar el exceso de colorante aclarando las raíces en un vaso con una solución que contenga a partes iguales un volumen de glicerina y agua destilada + unas gotas de ácido láctico. Los mejores resultados se obtienen cuando se dejan desteñir las raíces durante varios días.

Lavar el material vegetal con suavidad para eliminar partículas de suelo u otros residuos adheridos al mismo y eliminar el exceso de agua colocándolo sobre papel secante o absorbente.

Cortar las raíces gruesas o más grandes, o los tubérculos en fragmentos o rodajas de pequeño grosor.

Ponerlas sobre un tejido de muselina o gasa, atar los extremos con un cordón o hilo de algodón, y **etiquetar** con claridad sujetando una etiqueta a cada "bolsa" de muselina. Calentar la solución del colorante casi hasta el punto de ebullición en un vaso sobre una placa caliente.

Poner las bolsas de muselina dentro del colorante caliente y dejar durante unos 3 minutos dependiendo del grosor de las raíces. Utilizar un vaso alto y llenarlo con la solución del colorante hasta la mitad aproximadamente ya que al introducir el tejido vegetal se producirá espuma y así se evitará que se derrame (Fig. 37).

Sacar las bolsas de muselina del vaso con el colorante y lavarlas con agua corriente bajo el grifo.

Colocar las bolsas de muselina en la solución aclarante y dejarlas durante toda la noche o más tiempo.

Examinar al microscopio. Colocar las raíces unas al lado de las otras sobre un porta-objetos y aplastarlas ligeramente con otro porta-objeto colocado sobre el anterior para facilitar la observación de los nematodos teñidos en el interior de las mismas. Los nematodos se teñirán de azul con el azul de algodón y de rojo con la fucsina ácida.

Masas de huevos de *Meloidogyne*

La Phloxina B tiñe la matriz gelatinosa que rodea los huevos de *Meloidogyne* lo cual aumenta la visibilidad de la masa de huevos y permite el recuento rápido de las hembras adultas/masas de huevos presentes. Los huevos conservan su viabilidad después de la tinción. La solución se prepara añadiendo 15 mg (una pizca muy pequeña) a 1 litro de agua.

Colocar las raíces previamente enjuagadas en una bandeja o plato (preferentemente blanco) que contenga la solución de Phloxina B y dejar durante 15–20 min. Contar las masas de huevos teñidas (rojo).

Estimación de las densidades poblacionales de los nematodos

Después de extraer los nematodos del suelo o del tejido vegetal, primero se debe proceder a su identificación y luego a su cuantificación. Ello permite la evaluación de su asociación o potencial de causar daño.

Este manual no proporciona una guía para la identificación de los nematodos fitoparásitos, para ello, recurrir a la sección de Lecturas recomendadas en la página 65 (en el Apéndice 2, se incluye una descripción muy básica de los nematodos fitoparásitos más comunes). La estimación de las densidades poblacionales sólo se debe intentar si se han identificado los nematodos con certeza. Si no se posee la capacidad o habilidad suficiente para ello, las muestras deben enviarse a expertos (ver página 57).

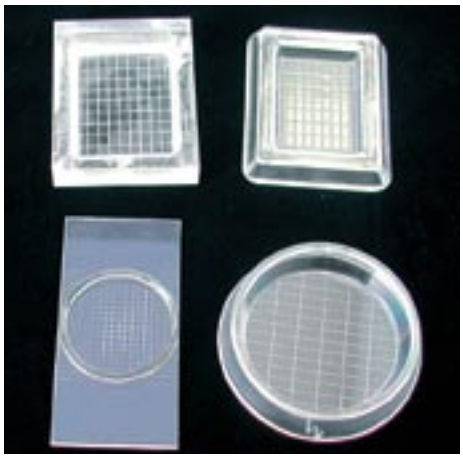
Recuento de los nematodos

Los nematodos extraídos se pueden observar y contar utilizando una lupa binocular o un microscopio (Fig. 34); el tener acceso a ambos es lo ideal.

Es fundamental disponer de una buena iluminación de calidad (luz transmitida situada debajo de la platina). Un aumento de 40 veces generalmente es adecuado (p.e. un objetivo de 4x combinado con un ocular de 10×), pero también se puede utilizar un microscopio (p.e. utilizando un objetivo de 10×) para cuando los nematodos están en malas condiciones o son difíciles de identificar. Las lupas de disección permiten mayor capacidad de maniobra y profundidad de foco, especialmente para muestras sucias. Los nematodos que no puedan identificarse en la cámara de recuento al aumento que se utiliza para contar, o a mayor aumento utilizando el microscopio, se deben pescar individualmente (Fig. 33) y montarlos sobre un porta-objetos para su identificación al microscopio utilizando mayores aumentos.

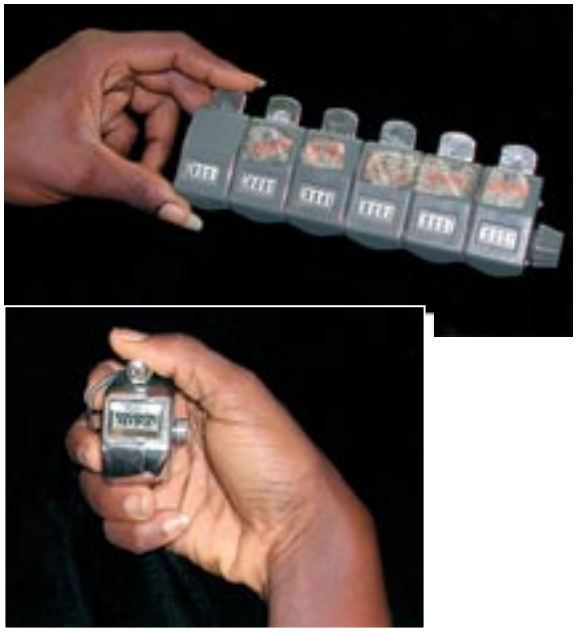
Existen varios modelos de cámaras de recuento, pero básicamente lo que se necesita es una placa de plástico transparente que tenga una cuadrícula sobresaliente grabada en el fondo (Fig. 38). Esta se puede preparar fácilmente marcando líneas en la parte inferior de una placa Petri pequeña. Una placa abierta de plástico rectangular de 5 ml de capacidad es útil para todos los propósitos; también posibilita mover los nematodos o residuos en la placa, y pescarlos para su identificación a mayor aumento (Fig. 33). Los laterales en forma inclinada ayudan a disminuir las distorsiones ópticas causadas por los meniscos mientras que la cuadrícula sobresaliente ayuda a reducir el movimiento de los nematodos entre las líneas de la cuadrícula.

Las muestras concentradas a 5 ml se pueden contar en su totalidad, pero si la densidad poblacional del nematodo es muy alta o la muestra está muy sucia, se contará una porción (alícuota) de la misma diluyendo con agua tantas veces como sea necesario. Sin embargo, se debe tener cuidado y asegurarse de que se ha contado una porción representativa del total de la muestra, lo cual se consigue mezclando concienzudamente la muestra antes de tomar la alícuota.



Tipos de placas de recuento.

Tipos de pipetas.



Contadores individuales y múltiples.

Figura 38. Herramientas para el recuento de los nematodos.

Extraer los nematodos de un peso conocido de material vegetal o volumen de suelo mediante uno de los métodos descritos anteriormente.

Concentrar la suspensión extraída en un determinado volumen conocido utilizando una probeta o vaso graduado (p.e. 10 ml).

Agitar la suspensión inmediatamente antes de tomar una alícuota de la misma.

Utilizar una pipeta con el extremo ancho para tomar las alícuotas para evitar que los residuos la obturen. Se puede cortar las puntas de las pipetas si estas son demasiado estrechas.

Pipetear la alícuota con cuidado en la cámaro o placa de recuento evitando las salpicaduras.

Si hubiera muy pocos nematodos en la muestra, contar todo el volumen de la suspensión.

Si la densidad poblacional del nematodo es alta, contar los nematodos en una alícuota (p. e. en 1 o 2 ml). En ocasiones es necesario diluir la suspensión para facilitar el recuento, por ejemplo, doblando el volumen de la misma.

Contar todos los nematodos en la cámara de recuento siguiendo sistemáticamente el mismo recorrido con la ayuda de la cuadrícula marcada en el fondo de la placa. Algunas veces los nematodos flotan en la superficie de la suspensión, esperar a que sedimenten, o bien, añadir, una gotita muy pequeña de jabón líquido para solucionarlo.

Utilizar un contador (idealmente un contador múltiple; Fig. 38) para contar los diferentes géneros de nematodos presentes en la muestra, y si no se dispone de un contador, anotar en un papel los nematodos contados haciendo una raya o trazo.

Después del recuento, devolver la alícuota contada a la suspensión de donde se tomó.

Repetir el recuento utilizando 2–3 alícuotas por muestra y después calcular la media de las alícuotas contadas antes de calcular el número total de nematodos por muestra.

La media del número de nematodos contados en cada alícuota se debe multiplicar por el volumen total de la suspensión para calcular el número total nematodos presentes en el volumen de suelo o peso de material vegetal a partir del cual se realizó la extracción (p.e. 100 ml de suelo o 5 g de raíces).

Análisis del daño

Estimación de los síntomas de daño en la planta

El daño causado por el nematodo se puede evaluar al mismo tiempo que se recolectan las muestras en el campo. La cantidad de raíces dañadas se estima visualmente (como un porcentaje) utilizando un índice para su estimación (Apéndice 3). La estimación del daño causado por el nematodo agallador es un dato particularmente útil pero también pude estimarse para otros nematodos. Generalmente, existe una buena correlación entre la estimación del daño y las pérdidas de producción.

La estimación del daño proporciona una indicación rápida de ese daño en el preciso momento en que se realiza la estimación. En aquellos lugares donde no existe un equipamiento básico de nematología, esta estimación puede ser el único medio de evaluar el daño. La estimación del daño también puede ser de ayuda en la identificación de resistencia o tolerancia en ensayos de evaluación de variedades.

El número de plantas a evaluar puede ser desde una o dos hasta 25 o más, dependiendo del cultivo y del área que se está evaluando, y también depende de si agricultor quiere asumir un riesgo bajo o alto en el proceso de evaluación. La estimación la debe realizar una sola persona o un número reducido de personas para que el resultado de la estimación sea consistente. Se recomienda la utilización de un índice que refleje el criterio de estimación para consultarlo regularmente y mantener así la consistencia de la estimación.

Cuando se evalúa el daño causado por el nematodo es necesario adoptar un criterio y tomar algunas decisiones, por ejemplo, las plantas con una infección grave causada por el nematodo agallador pueden tener poca cantidad de raíces con agallas para evaluar puesto que éstas se han podrido y desaparecido. Por tanto, el agallado puede parecer mínimo, cuando en realidad, el daño debido al nematodo es grave. También se debe tener en cuenta la variabilidad de la respuesta de los diferentes cultivos y variedades de un mismo cultivo a las especies del nematodo en custión, en particular en el caso del nematodo agallador. A su vez, diferentes especies del mismo nematodo pueden dar lugar a síntomas diferentes; por ejemplo, *Meloidogyne hapla* forma generalmente agallas pequeñas en forma de bolitas o cuentas (como se muestra en lechuga en el Apéndice 3), mientras que *Meloidogyne incognita* causa un agallado más masivo y fusión del tejido radical (Apéndice 3).

Los índices para la estimación de daño que se muestran en el Apéndice 3 sirven de ejemplo y proporcionan una base sobre la cual crear un índice de estimación de daño para otros cultivos teniendo en cuenta las circunstancias particulares del daño causado por cada nematodo. En su mayoría, los índices que se presentan en esta guía estiman el daño en una escala del 1 al 5 con objeto de alcanzar un equilibrio entre el tiempo que se requiere para la evaluación y la precisión de la misma. Si se dispone de más tiempo, los índices basados en una escala del 1 al 10 proporcionan una estimación del daño más precisa.

Referencias y lecturas recomendadas

Agrios, G.N. (2005). *Plant Pathology*, 5th edn. Academic Press, USA. 922 pp.

Bridge, J. and Page, S.L.J. (1980). Estimation of root-knot Nematode infestation levels on roots using a rating chart. Tropical Pest Management 26: 296–298.

Brown, R.H. and Kerry, B.R. (1987). *Principles and Practice of Nematode Control in Crops*. Academic Press, Sydney. 447 pp.

Evans, D., Trudgill, D.L. and Webster, J.M. (1993). *Plant Parasitic Nematodos in Temperate Agriculture*. CAB International, Wallingford. 648 pp.

Luc, M., Sikora, R.A. and Bridge, J. (2005). *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*, 2nd edn. CAB International, Wallingford. 871 pp.

Mai, W.F. and Mullin, P.G. (1996). *Plant Parasitic Nematodes. A Pictorial Key to Genera*, 5th edn. Comstock, London and Cornell University, Ithaca. 276 pp.

Moens, M. and Perry, R. (2006). *Plant Nematology*. CAB International, Wallingford. 447 pp.

Southey, J.F. (1986). *Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes*. Ref. Book 402. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Commercial Colour Press, London. 202 pp.

Speijer, P.R. and De Waele, D. (1997). *Screening of* Musa *Germplasm for Resistance and Tolerance to Nematodes*. INIBAP Technical Guidelines 1. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier. 47 pp.

Stirling, G.R., Nicol, J. and Reay, F. (1999). *Advisory Services for Nematode Pests – Operational Guidelines*. Rural Industries Research and Development Corporation. RIRDC Publication No. 99/41. 111 pp.

Waller, J.M., Lenné, J.M. and Waller, S.J. (2002). *Plant Pathologist's Handbook*, 3rd edn. CAB International, Wallingford. 516 pp.

Wallwork, H. (2000). *Cereal Root and Crown Diseases*. Grains Research Development Corporation Publications, Canberra, Australia. 58 pp.

Whitehead, A.G. (1997). *Plant Nematode Control*. CAB International, Wallingford. 400 pp.

Zuckerman, B.M., Mai, W.F. and Krusberg, L.R. (eds) (1990). *Plant Nematology Laboratory Manual*. University of Massachusetts Agricultural Experiment Station, Massachusetts. 252 pp.

Apéndice 1.
Ejemplos de géneros y especies de nematodos de importancia mundial como patógenos de cultivos

Nematodos y síntomas de daño	Principales cultivos afectados	Distribución
Achlysiella Necrosis en las raíces *Achlysiella williamsi*	Caña de azucar	Australasia
Anguina Agallas en las semillas y hojas, distorsión de las hojas *A. tritici* (ear cockle nematode)	Cereales y pasto Cereales climas templados, principalmente trigo	Clima templado: mundial Clima templado China, este de Europa, India, norte de África, Asia occidental
Aphasmatylenchus Crecimiento pobre de las raíces, clorosis *Aphasmatylenchus straturatus*	Tubérculos	Clima tropical: Oeste de África
Aphelenchoides Necrosis y distorsión de las hojas y semillas, destrucción del micelio fúngico *A. arachidis* *A. besseyi* *A. fragariae* *A. ritzemabosi* *A. composticola*	 Tubérculos Arroz Fresa Crisantemo Champiñones	 Clima tropical: Oeste de África Clima tropical: todas las áreas del mundo donde se cultiva arroz Clima templado: Europa, América del Norte, Japón Clima templado: Europa, América del Norte y del Sur, sur de África y Australia Todas las áreas del mundo donde se cultiva champiñon
Belonolaimus Necrosis de las raíces, clorosis, marchitez *B. longicaudatus*	Maíz dulce, hortícolas, tubérculos, cítricos, algodón	Subtropical: Sudeste USA
Bursaphelenchus Clorosis y muerte del árbol *B. xylophilus* *B. cocophilus* Necrosis (anillo rojo) del tallo, inflorescencia, caida del fruto	 Pino Cocotero, palmera de aceite	 Clima templado: China, Korea, Japan, América del Norte, Portugal,Taiwan, América Central y del Sur, Caribe

Nematodos y síntomas de daño	Principales cultivos afectados	Distribución
Criconemella Clorosis, necrosis de las raíces y de las vainas, marchitez		Clima templado y tropical
C. onoensis	Arroz	Tropical: USA, África Occidental, América Central y del Sur
C. ornata	Tubérculos	Subtropical: USA
C. xenoplax	Frutales	Subtropical: USA
Ditylenchus Lesiones en tallos y hojas, distorsión de las hojas y follaje, podredumbre de bulbos y tubérculos		
D. africanus	Tubérculos	Subtropical: Sur de África
D. angustus	Arroz	Tropical: Bangladesh, India, Burma, Vietnam
D. dipsaci	Habas, cebollas, narcisos y otras bulbáceas, cereales	Europa, América del Norte y Sur, este de Australia
D. myceliophagus	Champiñon	Clima templado: Todas las áreas del mundo donde se cultiva champiñon
Helicotylenchus Necrosis de las raíces	Amplia distribución en muchos cultivos pero daño poco conocido	Clima templado y tropical: mundial
H. multicinctus	Bananos, musáceas	Tropical/subtropical: Todas las áreas del mundo donde se cultiva banano
Hemicriconemoides Destrucción de las raíces, clorosis, muerte descendente de las ramillas		
H. mangiferae	Frutales	Subtropical: Sur de Asia, Africa, América Central y del Sur, Caribe
Heterodera (nematodo de los quistes) Quistes en las raíces, crecimiento pobre de las raíces, clorosis, marchitez		
H. avenae (quiste de los cereales)	Cereales (trigo, cebada, avena)	Global: Centro-oeste de Asia y norte de África, norte de Europa, China, India, Australia, Pacifico Noroeste USA
H. cajani (quiste de la lenteja)	Lenteja (*Cajanus indicus*)	India
H. ciceri (quiste del garbanzo)	Garbanzo, lenteja	Mediterráneo
H. filipjevi (quiste de los cereales)	Cereales (trigo, cebada, avena)	Centro y oeste de Asia, India, China, norte de Europa
H. glycines (quiste de la soja)	Soja, habas	Subtropical: América del Norte y del Sur, Japón, China
H. latipons (quiste de los cereales)	Cereales (trigo, cebada, avena)	Asia occidental
H. mani	Cereales (trigo, cebada, avena)	Asia occidental
H. oryzae (quiste del arroz)	Arroz	Tropical: India, Bangladesh
H. sacchari (quiste de la caña de azucar)	Caña de azucar, arroz	Tropical: África occidental, India
H. schachtii (quiste de la remolacha azucarera)	Remolacha, acelga y otras brásicas	Clima templado/subtropical: Europa, Norte América, oeste y sur de África, Australia
H. zeae (quiste del maíz)	Maíz	Tropical: India

Nematodos y síntomas de daño	Principales cultivos afectados	Distribución
Hirschmanniella (nematodos del arroz y nematodo "mitimiti") Lesiones en las raíces, podredumbre del cormo (enfermedad "mitimiti")		
H. gracilis	Arroz	Tropical
H. imamuri	Arroz	Tropical
H. oryzae	Arroz	Tropical: África occidental, América del Norte y del Sur, sur y sudoeste de Asia
H. spinicaudata	Arroz	Tropical: África, América del Norte y del Sur
Hoplolaimus (nematodos lanza) Necrosis de las raíces		
H. columbus	Algodón	Tropical: USA, Egypto
H. seinhorsti	Algodón, hortícolas	Tropical: África, sur de Asia, América del Sur
Longidorus (nematodos aguja) Agallado de las puntas de las raíces. Transmisores de virus		
L. elongatus	Fresa, remolacha	Climas templados: Europa, Canada
Meloidogyne (nematodos agalladores) Agallado de raíces y tubérculos, clorosis, marchitez		
M. acronea	Algodón, sorgo	Tropical: Sur de África
M. africana	Café	Tropical: África
M. arenaria	Tubérculos	Tropical: mundial
M. artiellia	Trigo, cebada y legumbres	Países Mediterráneos: Italia, Francia, Grecia y España, Asia occidental, Israel y Siberia occidental
M. chitwoodi	Papa, remolacha, cereales	Climas templados: Norte América, Mexico, sur de África, Europa
M. coffeicola	Café	Tropical: América del Sur
M. exigua	Café	Tropical: América del Sur
M. graminicola	Arroz	Tropical: Sur y sudeste de Asia
M. hapla	Pyrethrum, hortícolas, trébol	Clima templado/subtropical: mundial
M. incognita	Hortícolas, algodón, tabaco, gama de huéspedes muy amplia	Tropical: mundial
M. javanica	Hortícolas, algodón, tabaco, gama de huéspedes muy amplia	Tropical: mundial
M. oryzae	Arroz	Tropical: Sur de Asia
M. mayaguensis	Hortícolas, papaya, gama de huéspedes muy amplia	Tropical: mundial
M. naasi	Trigo, cebada	Norte de Europa, Nueva Zealanda, Chile, USA, Iran y antigua Unión Soviética
Nacobbus (falso nematodo agallador) Agallado de raíces		
N. aberrans	Hortícolas, papa, remolacha	Clima templado/subtropical: América del Norte, Central y del Sur, Europa (invernaderos)

Nematodos y síntomas de daño	Principales cultivos afectados	Distribución
Paralongidorus (nematodos aguja) Agallado de las puntas de las raíces. Transmisores de virus		
P. australis	Arroz	Subtropical: Australia
Paratrichodorus Raíces acortadas (engrosadas) ennegrecidas. Transmisores de virus		
P. minor	Hortícolas	Clima templado/subtropical: Europa, USA
Pratylenchus (nematodos lesionadores) Necrosis de las raíces, cormos y tubérculos		
P. brachyurus	Tubérculos, piña, mandioca	Tropical: mundial
P. coffeae	Bananas, yams, café, cítricos, especias, gama de huéspedes muy amplia	Tropical: mundial
P. goodeyi	Bananas	Subtropical: Este y oeste de África, Canarias
P. loosi	Té	Subtropical: Sur de Asia
P. neglectus	Papa, hortícolas, cereales (trigo, cebada, avena)	Australia, oeste de Asia, Norte de Africa, USA, Canada
P. penetrans	Frutales y frutos secos, hortíoclas, pequeños frutos, ornamentales	Climas templados: mundial
P. thornei	Cereales (trigo, cebada, avena)	Australia, Oeste de Asia, Norte de África, Israel, Mexico, USA
P. zeae	Maíz, arroz	Tropical: Sur y sudeste de Asia, África
Radopholus (nematodos barrenadores) Necrosis de las raíces, tubérculos, podredumbre, rotura de raíces, caida de la planta		
R. citri	Cítricos	Tropical: Indonesia
R. similis	Bananas, cítricos, raíces y tubérculos, cocotero, té, pimienta negra, y otras especias	Tropical: mundial
R. nativus	Cereales y legumbres de grano	Clima templado: Australia
Rotylenchulus (nematodo reniforme) Crecimiento pobre de las raíces, clorosis, achaparrado		
R. parvus	Lenteja (*Cajanus indica*), batata	Tropical: África
R. reniformis	Piña, hortícolas	Tropical: mundial
R. variabilis	Batata	Tropical: África
Rotylenchus (nematodos espiral) Crecimiento escaso		
R. robustus	Hortícolas, plantones de árboles	Clima templado: Europa, Norte América, India

Nematodos y síntomas de daño	Principales cultivos afectados	Distribución
Scutellonema (nematodos espiral) Podredumbre seca de los tubérculos, crecimiento pobre de las raíces		Principlamente en los trópicos y África
S. bradys (nematodo del yam)	Yams, mandioca	Tropical: Oeste de África, Caribe
S. cavenessi	Tubérculos	Tropical: Oeste de África
Trichodorus Raíces acortadas (regordetas) ennegrecidas. Transmisores de virus		
T. primitivus *T. viruliferus*	Remolacha, papa	Clima templado/subtropical: Europa, Norte América
Trophotylenchulus Crecimiento reducido de las raíces		
T. obscurus	Café	Tropical: África
Tylenchorhynchus Raíces reducidas	Cereales, hortícolas	Clima templado y tropical
Tylenchulus Crecimiento pobre de las raíces, declinación lenta de los árboles		
T. semipenetrans (nematodo de los cítricos)	Cítricos	Subtropical/tropical: Todas las áreas del mundo donde se cultiva cítricos
Xiphinema (nematodos daga) Agallado de las puntas de las raíces Transmisores de virus		
X. americanum	Árboles, viña,	Clima templado/subtropical: mundial
X. diversicaudatum	Rosas, viña, pequeños frutos	Clima templado: Europa, Norte América, Australia, Nueva Zelanda
X. index	Viña, árboles frutales, rosa	Clima templado: Europa, América del Sur, Mediterráneo, sur de África, este de Australia

Adaptado de la Tabla 13.1 de J. Bridge y T.D. Williams, Plant parasitic nematodes, pp.140–162, *en* Waller et al. (2002) (cortesía de CABI Publishing).

Apéndice 2.
Identificación básica de los nematodos

Este manual no proporciona una guía taxonómica de los nematodos fitoparásitos, para ello ver la sección de Referencias y Lecturas recomendadas. Sin embargo, a continuación se ofrece una descripción básica de los nematodos fitoparásitos más comunes. La figura 39 muestra las diferencias visuales entre los nematodos fitoparásitos (región cefálica) y los no fitoparásitos a modo de ayuda para su diferenciación.

Meloidogyne – nematodo agallador
La hembra adulta es esférica o tiene forma de pera con un cuello alargado mientras que los machos tienen forma de gusano (vermiforme).
Los juveniles y las hembras son endoparásitos que causan agallas.
El estilete es delgado con nódulos basales.
Los huevos se depositan en una matriz gelatinosa.

Pratylenchus –nematodo lesionador
Nematodo vermiforme.
Hembra con un solo ovario.
Cabeza relativamente ancha y aplanada y cola redondeada.
La región de los labios es plana y el estilete robusto, de 14–19 µm de longitud con nódulos basales enormes.
Causa lesiones en las raíces de las plantas.
Todos los estadios son infectivos y son endoparásitos migratorios.

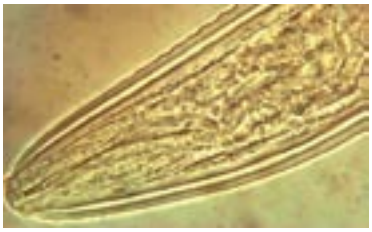
Heterodera –nematodo de los quistes
La hembra adulta tiene forma de limón y forma quistes cuando alcanza la madurez.
La hembra es semi-endoparásita solo con la porción anterior del cuerpo dentro del tejido vegetal.
Los huevos se encuentran retenidos en el quiste pero además pueden poseer una masa de huevos.
El estilete del juvenil es potente y con nódulos prominentes.

Helicotylenchus –nematodo espiral
La región labial es alta, cónica, redondeada.
El nematodo se encuentra generalmente enrollado en una espiral amplia o en forma de C.
Hembra con dos ovarios con la cola dorsalmente curvada.
Son semi-endoparásitos o ectoparásitos y generalmente se encuentran en el suelo.

Scutellonema – falso nematodo espiral
Básicamente aplica la misma descripción que para *Helicotylenchus*, excepto que:
El estilete es más corto y los nódulos basales son menos pronunciados.
La forma relajada es recta o ligeramente en forma de C.
Son principalmente ectoparásitos.

Xiphinema y ***Longidorus*** – nematodos lanza
Nematodos muy largos
El estilete es una estructura larga en forma de aguja sin nódulos basales pronunciados.
La forma relajada es generalmente recta.
Son ectoparásitos.

Nematodos fitoparásitos:



Paratrichodorus [JB]

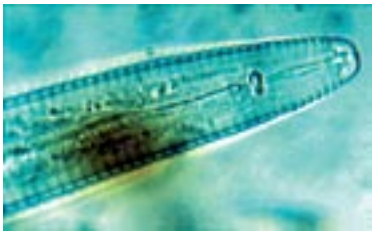
Heterodera [JB]

Scutellonema [JB]

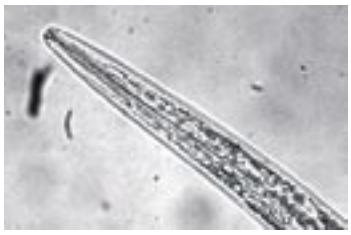
Hemicriconemoides [JB]

Hemicycliophora [JB]

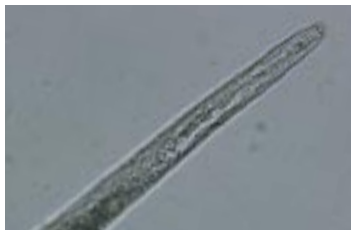
Hoplolaimus [JB]



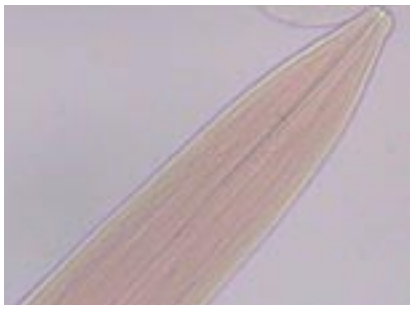
Tylenchorhynchus [JB]



Plectus [JB]

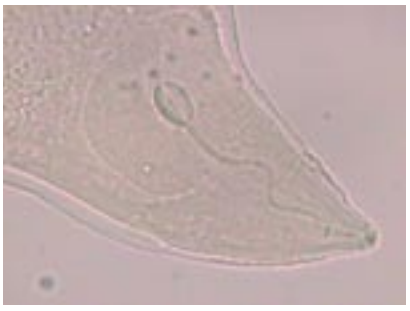


Cabeaza de J2 de *Meloidogyne* [SM]



Xiphinema [LA-B]

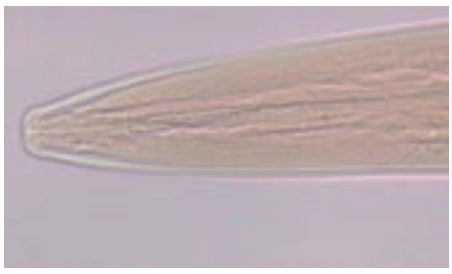
Filenchus [LA-B]



Cabeza de hembra de *Meloidogyne* [LA-B]

Xiphinema [SM]

Helicotylenchus [SM]



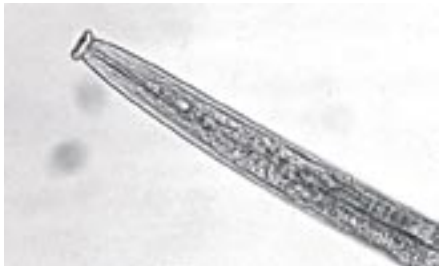
Cabeza de hembra de *Longidorus anterior* [LA-B]

Pratylenchus [SK]

Figura 39 – ***continúa en el dorso***

Nematodos no fitoparásitos:

Mononchus [JB]



Discolaimus [JB]

Figura 39. Comparación de la region cefálica de varios nematodos fitoparásitos y no fitoparásitos.
(Fotografías de J. Bridge [JB], S. Mack [SM], L. Al-Banna [LA-B] y S. Kelly [SK].)

Apéndice 3.
Indices para medir el daño causado por los nematodos

Estimación del daño causado por el nematodo agallador (*Meloidogyne* spp.) en mandioca

Realizar una estimación combinada de raíces y tubérculos cuando se evalúan las plantas en su madurez en el momento de la cosecha o realizar solo una estimación de las raíces de las plantas cuando se arrancan durante el periodo de crecimiento vegetativo.

Raíces de Mandioca

1. No se observan agallas, raíces alimentícias intactas.

2. Se observa al menos una agalla.

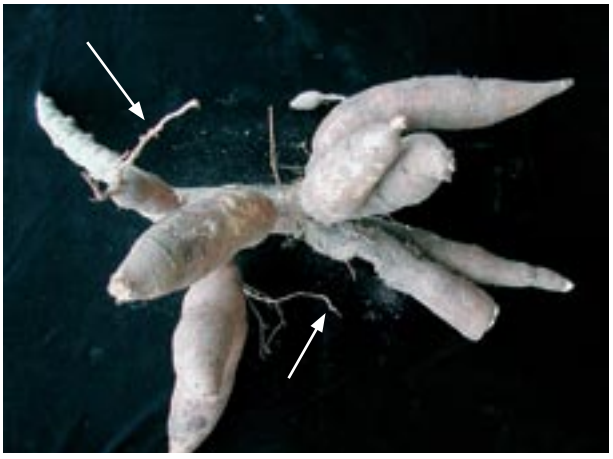
3. Numerosas agallas, aproximadamente el 50% de las raíces afectadas.

4. Numerosas agallas, la mayoría de las raíces afectafas.

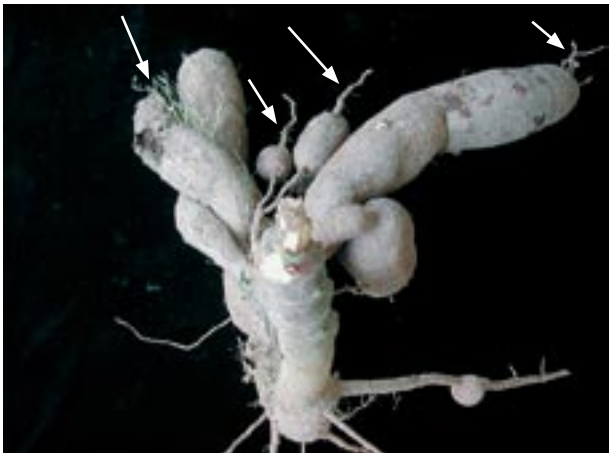
5. Abundantes agallas en la mayoría de las raíces, con necroisis y raíces alimenticias muy afectadas o ausentes.

Plantas de mandioca

1. No se observan agallas, raíces alimenticias y tubérculos sanos.



2. Al menos se observa una agalla en las raíces.



3. Agallas visibles en las raíces, pocas raíces alimentícias y tubérculos de menor tamaño.

4. Numerosas agallas, raíces necroticas y tubérculos de menor tamaño.

5. Abundantes agallas en la mayoría de las raíces, raíces alimentícias casi ausentes y pocos tubérculos.

Estimación del daño causado por el nematodo agallador en zanahoria

1. Sin agallado.

2. Agallado ligero.

3. Agallado moderado.

4. Agallado considerable.

5. Agallado grave.

Estimación del daño causado por el nematodo agallador en lechuga

1. Sin agallas.

2. Agallado ligero.

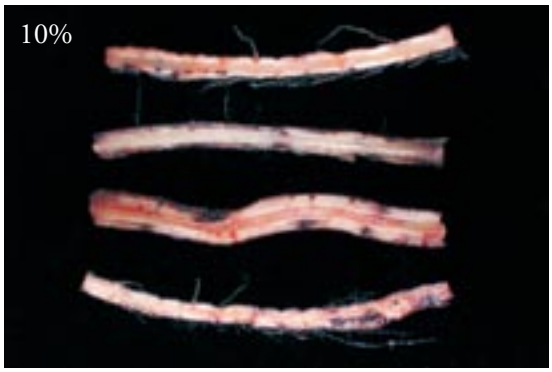
3. Agallado moderado.

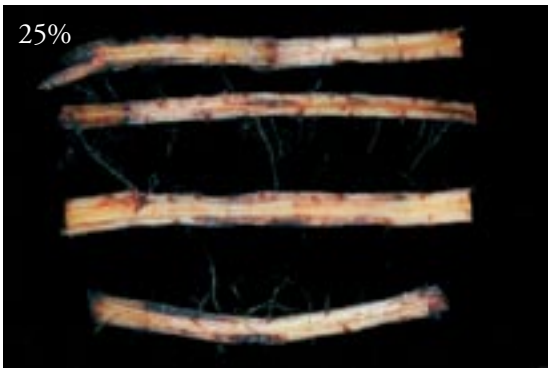
4. Agallas considerable.

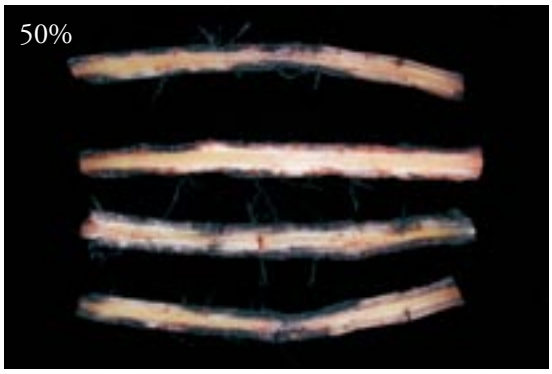
5. Agallado grave.

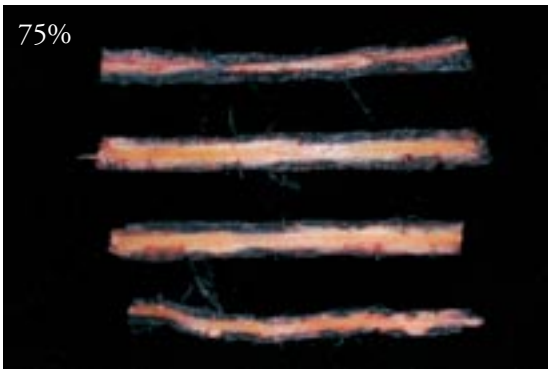
Estimación de lesiones en raíces de banano

Adaptado de Paul Speijer y Dirk De Waele (1997).



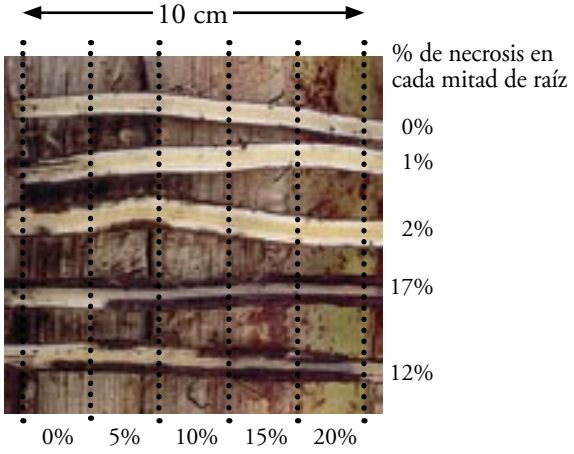






Estimación de lesiones en *Musa*

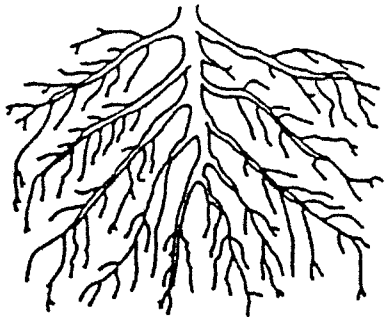
Ejemplo de cinco indices de necrosis (%) de la superficie del cortex de la raíz en raíces de banano cortadas en secciones longitudinales mostrando necrosis causadas por nematodos endoparásitos lesionadores (cortesía de Paul Speijer y Dirk De Waele, 1997).



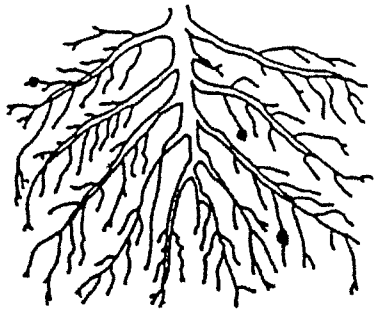
Seleccionar al azar cinco raíces funcionales por muestra (planta). Cada raíz debe tener al menos 10cm de longitud. Cortar longitudinalmente cada raíz por la mitad y descartar una de las mitades. Estimar el daño de la otra mitad de la raíz de acuerdo con el porcentaje del cortex que muestra necrosis. Cada raíz contribuye un 20% al total de la muestra de forma que sumadas se obtiene el 100% para las 5 raíces. Así, si la mitad de la raíz muestra necrosis, indexarla como 10%. Si la raíz no muestra necrosis, indexarla como 0% (ver figura superior). Una vez realizado el indexaje de cada una de las 20 raíces, sumar los 5 índices para obtener el porcentaje total de necrosis de la muestra.

Diagrama del índice de agallas para el nematodo agallador

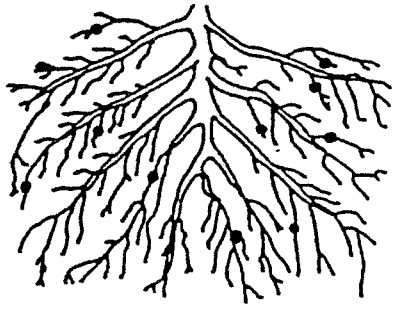
Cortesía de John Bridge y Sam Page (1980)



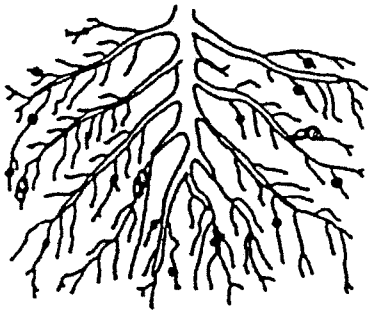
0 – No se observan nódulos en las raíces.



1 – Pocas agallas pequeñas, dificiles de encontrar.

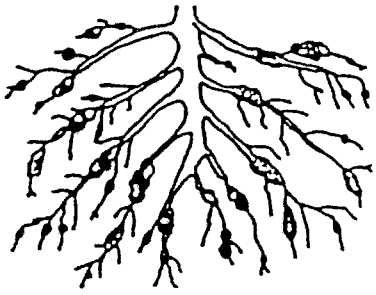


2 – Solo agallas pequeñas pero claramente visibles. Las raíces principales limpias.

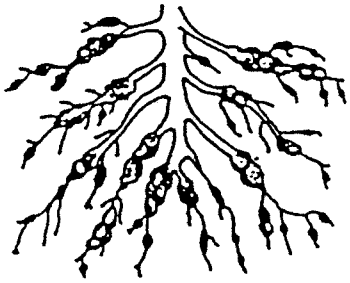


3 – Algunas agallas visibles y grandes.

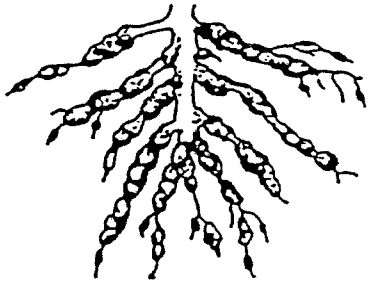
4 – Predomina las agallas grandes pero las raíces principales estan limpias.



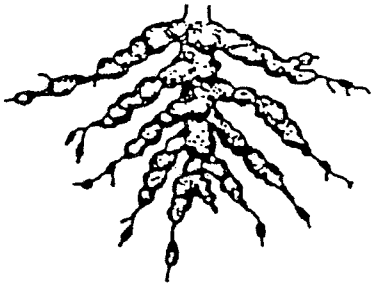
5 – 50% de las raíces afectadas. Agallado de algunas de las raíces principales. Sistema radical reducido.



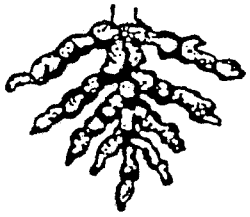
6 – Agallado en las raíces principales.



7 – La mayoría de las raíces principales agalladas.



8 – Todas las raíces principales agalladas incluyendo la central. Se observan pocas raíces límpias.



9 – Todas las raíces gravemente agalladas. Las plantas generalmente se están muriendo.

10 – Todas las raíces severamente agalladas. No hay sistema radical. Las plantas generalmente muertas.

Indice de daño causado por nematodos de los quistes en trigo

Adaptado de A.D. Rovira en Brown y Kerry (1987).

1 – Sin daño, limpia.

2 – Daño ligero.

3 – Daño moderado.

4 – Daño considerable.

5 – Daño grave.

Redes y organizaciones de utilidad

Afro-Asian Society of Nematologists
(http://www.ifns.org/membership/aasn.html)

Australasian Association of Nematologists
(http://nematologists.org.au)

Brazilian Nematological Society
(http://www.ciagri.usp.br/~sbn/sbn_i.htm)

Cereal Nematode Network

Chinese Society of Plant Nematologists
(http://www.ifns.org/membership/cspn.html)

Nematology Initiative in East and Southern Africa

Egyptian Society of Agricultural Nematology
(http://www.ifns.org/membership/esan.html)

European Society of Nematologists
(http://esn.boku.ac.a)

International Federation of Nematology Societies
(http://www.ifns.org/)

Japanese Nematological Society
(http://www.ifns.org/membership/jns.html)

Nematological Society of India
(http://www.ifns.org/membership/nsi.html)

Nematological Society of Southern Africa
(http://www.ifns.org/membership/nssa.html)

Organization of Nematologists for Tropical America
(http://www.ontaweb.org)

Society for Invertebrate Pathology
(http://www.sipweb.org/)

Society of Nematologists
(http://www.nematologists.org)

West and Central African Nematology Network

Creditos:
Fotos: Todas las fotografías han sido realizadas por los autores a menos que se dé credito a otros autores.
Edicción, diseño, maquetación y pruebas de imprenta: Green Ink Publishing Services Ltd, UK (www.greenink.co.uk)
Impresión: Pragati Offset Pvt. Ltd, India (www.pragati.com)

Los nematodos fitoparáasitos estan siempre presentes en los campos de cultivo, pero a menudo, los daños que causan se atribuyen a otras plagas y enfermedades u otros problemas del cultivo. En países en desarrollo, en particular, donde los recursos y facilidades son escasos, es dificil identificar y cuantificar con precisión el problema nematológico.

El objetivo de esta guía es ayudar a superar esta limitación proporcionando una referencia fácil de seguir para determinar los problemas causados por los nematodos fitoparásitos. La guía ofrece instruciones claras y con muchas ilustraciones sobre los procedimentos para recolectar y procesar muestras para evaluar los problemas de nematodos, asimismo ofrece información sobre como acceder a ayuda para su diagnóstico e identificación. El manual está dirigido a técnicos, agricultores, agentes de extensión, y otras personas con interés en la producción y protección de los cultivos, particularmente en aquellos lugares del mundo donde el acceso a ayuda experta e instalaciones avanzadas son limitadas. Es de esperar que esta guía simplifique algunos aspectos de la nematología y ayude a disminuir el misterio que rodea este problema que afecta a la producción agrícola.

ISBN 978-131-338-2

D.L. Coyne, J.M. Nicol y B. Claudius-Cole **Nematología práctica: Una guía de campo y laboratorio**