

Sección del Helminología del Instituto «López-Neyra» de Parasitología.
Laboratorio de Nematodos del Suelo y Plantas.

COMPORTAMIENTO DE LAS HETERODERAS DURANTE SU EXTRACCION DEL SUELO MEDIANTE LAS TECNICAS DE FENWICK Y SU MODIFICACION DE LA ACETONA

POR

*Antonio Tobar Jiménez** y *Concepción Martínez Sierra***

La técnica de Fenwick para extracción de quistes de *Heterodera* del suelo (2) se fundamenta en la propiedad que aquéllos tienen de flotar en el agua, cuando han sido sometidos en la tierra a un proceso de desecación lenta. Los quistes son arrastrados por una corriente ascendente de agua a un cedazo de 165 micras de orificio de malla y de allí son llevados luego, junto con los residuos vegetales, que también flotan, a una fuente de loza blanca, en donde son separados de estos últimos, con ayuda de un pequeño pincel.

A medida que los suelos van siendo más ricos en materia orgánica, la cantidad de restos vegetales y de otra naturaleza que flotan es mayor, y al ser arrastrados, con los quistes, a la fuente, hacen que la separación de estos últimos de aquéllos vaya siendo cada vez más difícil y laboriosa, hasta llegar un momento en que esta técnica clásica de extracción pierde totalmente su valor cuantitativo.

La técnica de Kort (1), que separa los quistes de la tierra mediante una sedimentación diferencial, utiliza una flotación

* Ayudante de Investigación. Consejo S. de I. C.

** Ayudante Técnico del Instituto «López-Neyra» de Parasitología.

en acetona en una de las fases del proceso de extracción, basándose en que la acetona empapa los restos vegetales, que, al mojarse, sedimentan, pero, en cambio, no puede penetrar en el interior de los quistes, empujándolos rápidamente hacia la superficie, de donde son arrastrados, casi limpios, a un papel de filtro y de allí recogidos por diversos procedimientos.

Esta fase de flotación en acetona nos pareció podría ser intercalada dentro del método de Fenwick, en los casos en los que la técnica clásica no puede ser utilizada por las razones antes mencionadas. No obstante, antes de emplearla hemos creído necesario estudiar cuantitativamente el comportamiento, durante dicha flotación, de las especies de *Heterodera* más frecuente en los suelos granadinos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron tres limos arcillosos distintos. El primero, con 726 larvas infectivas enquistadas de *Heterodera schachtii*, 417 de *H. goettingiana* y 127 de *H. avenae* por 100 c. c. de tierra; el segundo, con 507 larvas de *H. goettingiana*; y el tercero, con 103 de *H. avenae*.

La tierra fue cribada y homogéneamente mezclada por el procedimiento del cuarteo y, de ella, se hicieron, para cada uno de los tres suelos, 10 extracciones siguiendo la técnica clásica de Fenwick y 10 con la flotación en acetona intercalada, partiendo para cada una de 100 c. c. de tierra. Se consiguieron al final, por lo tanto, 60 extracciones: 30 con cada una de las dos técnicas.

La trituración de quistes y recuento de larvas se hicieron siguiendo el procedimiento ya descrito por uno de los autores (3).

Para los cálculos matemáticos de los resultados se utilizaron las cifras de quistes proporcionadas por cada extracción y las medias de los tres recuentos de larvas efectuados en tres volúmenes de 1 c. c. de cada suspensión final. Las diferencias entre las extracciones clásica y con acetona se estudiaron, en cada caso, mediante la prueba de la «t» de Student.

Especie.		<i>Heterodera schachtii</i>							
Suelo.		Primer suelo							
Material contado		Quistes		Larvas					
Técnica.		Clásica	Acetona	Clásica	Acetona	Clásica	Acetona	Clásica	Acetona
Media		85,6	70,0	726	648				
Población (95%)		60,0 - 111,2	48,6 - 91,4	264 - 1188	268 - 1028				
Núm. de recuentos.		9	9	9	9				
Error standard porcentual		15,0	15,3	31,8	29,3				
«t»		2,80**		0,78 (40% - 50%)					
Pérdida por acetona (%)		18,2		10,7					
Especie.		<i>Heterodera goettingiana</i>							
Suelo		Primer suelo				Segundo suelo			
Material contado		Quistes		Larvas		Quistes		Larvas	
Técnica.		Clásica	Acetona	Clásica	Acetona	Clásica	Acetona	Clásica	Acetona
Media		19,4	5,1	417	48	24,4	16,0	507	173
Población (95%)		7,8 - 31,0	2,7 - 7,5	- 123 - 957	- 52 - 148	15,8 - 33,0	3,0 - 29,0	129 - 885	- 151 - 497
Núm. de recuentos.		10	9	10	9	9	10	10	10
Error standard porcentual		29,9	23,5	64,7	104,2	17,6	40,6	37,3	93,6
«t»		7,25****		4,02****		3,27***		4,25****	
Pérdida por acetona (%)		73,7		88,5		34,4		65,9	
Especie.		<i>Heterodera avenae</i>							
Suelo		Primer suelo				Tercer suelo			
Material contado		Quistes		Larvas		Quistes		Larvas	
Técnica.		Clásica	Acetona	Clásica	Acetona	Clásica	Acetona	Clásica	Acetona
Media		15,3	8,8	127	52	13,4	10,1	103	60
Población (95%)		3,7 - 26,9	5,4 - 12,2	- 263 - 517	- 90 - 194	4,8 - 22,0	8,3 - 11,9	- 161 - 367	- 184 - 304
Núm. de recuentos		10	9	10	9	10	9	10	10
Error standard porcentual		37,9	19,3	153,5	136,5	31,9	8,9	128,2	203,3
«t»		3,22***		1,09 (20% - 30%)		2,25*		0,76 (40% - 50%)	
Pérdida por acetona (%)		42,5		59,1		24,6		41,7	

DISCUSIÓN

En el cuadro de los resultados se puede observar, que las tres especies de *Heterodera* estudiadas pierden cantidades significativas de quistes, durante su flotación en acetona (valores significativos de «t»), mientras que la gravedad de la pérdida de larvas (que es lo verdaderamente importante en estos recuentos) varía con la especie.

Estas pérdidas se deben, por un lado, a un fenómeno general, que consiste en que los quistes rotos o deteriorados permiten a la acetona penetrar en su interior y se hunden, en vez de flotar, y, por otro, a la constitución de cada especie en particular, la cual, a consecuencia de las manipulaciones a las que hay que someter las tierras, influye más o menos intensamente en la eficacia de las extracciones.

El primer factor de pérdida no creemos tenga una gran importancia para las larvas enquistadas, porque parece ser que los quistes hundidos son precisamente los viejos y vacíos. El segundo, por el contrario, sí parece influir decisivamente en las cifras finales de larvas.

Nuestras poblaciones de *Heterodera schachtii* suelen tener una pared quística bastante elástica y la masa de huevos larvados, que los quistes tienen en su interior, está separada de su pared (como contraída) y embebida en una sustancia gelatinosa. La *H. goettingiana* es de pared menos elástica y los quistes llenos tienen una masa de huevos que ocupa toda la cavidad interna. La trabécula de gelatina es menos consistente. La *H. avenae*, por último, tiene una pared más o menos elástica y sus quistes, cuando están llenos, tienen una enorme cantidad de huevos sueltos, que ocupan, por completo, todo el quiste.

El primer suelo era un limo muy arcilloso que, por haberse tomado muy húmedo, hubo que disgregar a mano en pequeños grumos en el laboratorio. El paso final de algunos de estos grumos por la malla superior del aparato de Fenwick hubo que forzarlo, también a mano. El segundo y tercer suelos, más ligeros, se cribaron con facilidad y, al contacto con el agua, en el aparato de Fenwick, se deshicieron por completo, sin ayuda manual alguna.

Las presiones a las que se sometieron los quistes de *Hetero*

dera schachtii, en las manipulaciones del primer suelo, no dañaron a éstos grandemente, ni los reventaron y, por su gran flotabilidad, casi todos ellos fueron, en su extracción, a la superficie de la acetona. Como consecuencia, los resultados numéricos de larvas, proporcionados por las dos técnicas, son prácticamente iguales (valor de «t» no significativo). Por el contrario, muchos de los quistes de *H. goettingiana* se rajaron y hundieron luego, al extraerlos, perdiéndose para el recuento sus huevos larvados. El fenómeno fue mucho más acusado en la segunda técnica, por el uso de la acetona.

La extracción de esta misma especie, por el método clásico, del segundo suelo fue mucho más cuantitativa que en el primero, por existir menos quistes rajados (se pueden aceptar para estos últimos errores inferiores al 20 por 100 y en las larvas de alrededor del 30 por 100). No obstante, tampoco en este caso el método de la acetona demuestra tener utilidad para esta especie, quizá debido a ser sus quistes más pesados y poseer menos facilidad para flotar.

En cuanto a la *H. avenae*, no existen diferencias significativas para las larvas entre las dos técnicas, en ninguno de los dos suelos utilizados. Sin embargo, los enormes errores cometidos, que dependen en gran parte de la gran variabilidad específica en el contenido de los quistes, hacen que ninguna de las dos técnicas tenga valor cuantitativo alguno en su extracción, por lo menos a los «niveles de infección» de esta especie frecuentes en nuestros suelos.

CONCLUSIONES

1.ª Tanto los quistes de *Heterodera schachtii*, como los de *H. goettingiana* y *H. avenae* se pierden, en cantidades significativas, al efectuar su separación de los residuos vegetales de la tierra, mediante flotación en acetona. Afortunadamente, la mayoría de los quistes que se pierden están vacíos.

2.ª La técnica de la acetona se puede utilizar para la extracción de la *Heterodera schachtii*, sin que tengan lugar pérdidas significativas de larvas enquistadas, que es el dato a investigar realmente interesante.

3.ª La *Heterodera goettingiana* no se puede extraer cuantitativamente por este procedimiento y sí mediante la técnica clásica

de Fenwick. No obstante, las tierras deben ser manipuladas con exquisito cuidado, para no deteriorar los quistes llenos y cometer, como consecuencia, grandes errores en su extracción.

4.ª La variabilidad específica del contenido de los quistes de *Heterodera avenae* de nuestras poblaciones hace que no sea posible detectar diferencias en eficacia entre las dos técnicas estudiadas.

RESUMEN

Por resultar extremadamente laboriosa y exenta de valor cuantitativo la extracción de quistes de *Heterodera* de suelos muy ricos en residuos vegetales, mediante la técnica de Fenwick, se estudia la posibilidad de intercalar en el procedimiento clásico una flotación en acetona, lo que proporciona suspensiones de quistes extraordinariamente limpias.

Se demuestra que el nuevo procedimiento es utilizable para la *Heterodera schachtii* y no para la *H. goettingiana*. La gran variabilidad interna de los quistes de *H. avenae* hace que no se puedan detectar posibles diferencias, a nuestros «niveles de infección», entre los dos procedimientos estudiados.

Resalta la necesidad de manejar con gran cuidado las tierras infectadas por la *H. goettingiana*, para evitar la comisión de grandes errores en su extracción.

SUMMARY

The possibility of floating *Heterodera* cysts in acetone to eliminate a given excess of debris is studied quantitatively.

Heterodera schachtii can be extracted by this technique. *H. goettingiana* can only be extracted by the usual technique and soils infested by this nematode must be handled carefully to avoid large errors in its extraction. The great variability in egg numbers of *H. avenae* cysts makes the two techniques unable to show any possible difference between themselves in the extraction of this nematode, at our «levels of infestation».

REFERENCIAS

1. KORT, J. (1960).—A technique for the extraction of *Heterodera* cysts from wet soil and for the estimation of their egg and larval content. *Overd. PlZiekt. Dienst*, 233, 7 pp.
2. OOSTENBRINK, M. (1960).—Estimating nematode populations by some selected methods. (En *Nematology*). *Sasser & Jenkins. Univ. N. Carol. Press. Chapel Hill*. 85-102.
3. TOBAR JIMÉNEZ, A. (1963).—Especies del género *Heterodera* A. Schmidt, 1871 (*Heteroderidae: Nematoda*) de la provincia de Granada, con descripción de un nuevo procedimiento para el recuento de los quistes y sus larvas infectivas, en casos de infecciones múltiples, en análisis rutinarios del suelo. *Rev. Iber. Parasitol.*, 23: 325-339.