

MINISTERIO DE AGRICULTURA



Instituto Nacional de Investigación Agraria

DIAGNÓSTICO DEL NEMÁTODO QUISTE DE LA PAPA *Globodera spp.*



INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACION AGRARIA

DIRECCION GENERAL DE INVESTIGACION AGRARIA

Estación Experimental "Santa Ana Huancayo"
Programa Nacional de Investigación en Sistemas Agrarios de Sierra

DIAGNÓSTICO DEL NEMÁTODO QUISTE DE LA PAPA *Globodera spp.*

Ing. Nelly Isabel Romani Córdor

Serie
Folleto N° 1

Huancayo, Perú
Marzo, 2003

© **INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACION AGRARIA - INIA**
DIRECCION GENERAL DE INVESTIGACION AGRARIA
DIRECCION GENERAL DE TRANSFERENCIA DE TECNOLOGIA AGRARIA

Diagramación e Impresión:
Dirección de Comunicación Técnica

Primera Edición:
Enero, 2003
Tiraje: 500 ejemplares

Prohibida la reproducción total o parcial sin autorización

DIAGNÓSTICO DEL NEMÁTODO QUISTE DE LA PAPA

Globodera spp.

El estudio del nemátodo quiste de la papa (*Globodera spp.*) incluye muy a menudo el conocimiento de técnicas de colección, reconocimiento e identificación de este parásito, orientado a implementar alternativas de control para reducir o mantener al nemátodo en el nivel de daño económico. En este sentido el conocimiento de los caracteres morfológicos (identificación), hábito de vida (biología), distribución (dinámica poblacional) así como los síntomas y signos que presentan en el área foliar o en las raíces; son indispensables para un diagnóstico preciso sobre su presencia o ausencia en un campo de cultivo de papa.

El éxito de un diagnóstico depende directamente del muestreo del suelo o planta que se realice y de los métodos de extracción que se utilicen, los mismos que se requieren de mucho cuidado en su selección y aplicación. Asimismo es de suma importancia los conocimientos de técnicas de laboratorio para determinar los niveles de infestación de las muestras con los cuales podremos analizar e interpretar los resultados

1. Toma de Muestras

Normalmente los nemátodos se presentan agrupados, tienen poco movimiento y por lo tanto su distribución es irregular. Como es imposible examinar todo el ambiente en que se encuentran, es necesario realizar un muestreo para la determinación cualitativa y cuantitativa de sus poblaciones.

Por lo general los errores que se producen al analizar las muestras de suelo se deben a irregularidades en el procedimiento para determinar sus poblaciones. Para reducir este error, la

toma de muestra debe realizarse siguiendo la metodología que indicaremos más adelante.

Para reconocer la presencia del nemátodo quiste de la papa (NOP) y/o su distribución la toma de muestra se puede realizar en:

- El suelo (en el campo)
- Tejido vegetal (una planta).

1.1 Muestras de Suelo

El momento adecuado para tomar muestras de suelo es antes de la siembra o inmediatamente después de la cosecha.

Procedimiento:

- El terreno elegido se recorre en zig-zag, espiral o diagonalmente y cada determinado número de pasos, se toma una sub-muestra de suelo.

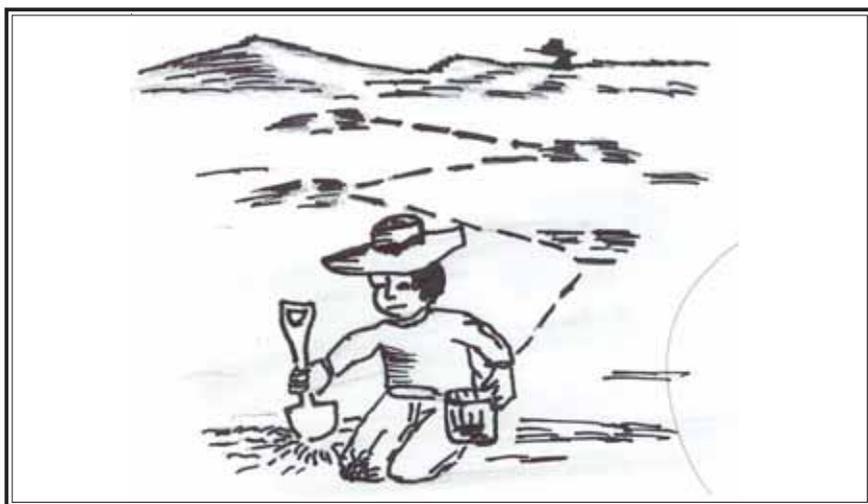


Figura 1: Muestreo de suelo

- Con un barreno de 5 cm de diámetro se toma la sub-muestra que corresponde a los primeros 20 cm de profundidad de la capa arable. También se puede utilizar una lampita de mano.
- Deposite las sub-muestras en una bolsa de plástico. La muestra de suelo por hectárea debe estar formada por no menos de 25 a 50 punciones (sub-muestra), haciendo un volumen aproximado de 1500 a 3000 cc. Al final del recorrido homogenice el contenido y tome una muestra de 1 kg/ha.



Figura 2: Homogenización de suelo colectado

- Etiquetar y marcar adecuadamente la muestra con un lápiz o marcador indeleble, indicando la fecha de colección, ubicación del terreno, nombre del propietario, cultivo anterior, cultivo actual, altura (m.s.n.m.), datos agro climáticos, etc. Las muestras no deben ser expuestas a la radiación solar directa.

1.2 Muestras de Plantas de Papa

El momento adecuado para la toma de muestra de plantas de papa es al inicio de la floración o después de 8 a 10 semanas de realizada la siembra.

Procedimiento:

- Ubicar en el terreno áreas de pobre desarrollo del cultivo o manchones (guiarse por los síntomas foliares de las plantas: amarillamiento, enanismo, emergencia deficiente, etc.)
- Con la ayuda de un trinche extraer cuidadosamente una planta de papa y sacudir suavemente el suelo adherido a las raíces. Se extraen cinco plantas situadas en un manchón y otros cinco plantas en donde el cultivo tiene un desarrollo normal, con la finalidad de saber si existe o no una correlación



Figura 3: Muestreo de planta de papa

entre el daño observado y las poblaciones del nemátodo (signos) en ambos lugares.

- Examinar cuidadosamente las raíces. La presencia de pequeños (aproximadamente 1 mm) corpúsculos esféricos prendidos en las raíces corresponderán a las hembras inmaduras de *Globodera rostochiensis* (color amarillo intenso) o *Globodera pallida* (color blanco o crema). En etapas avanzadas del cultivo se observará la presencia de estos mismos corpúsculos esféricos, pero de color marrón (quistes) que corresponden a las hembras inmadura muertas.

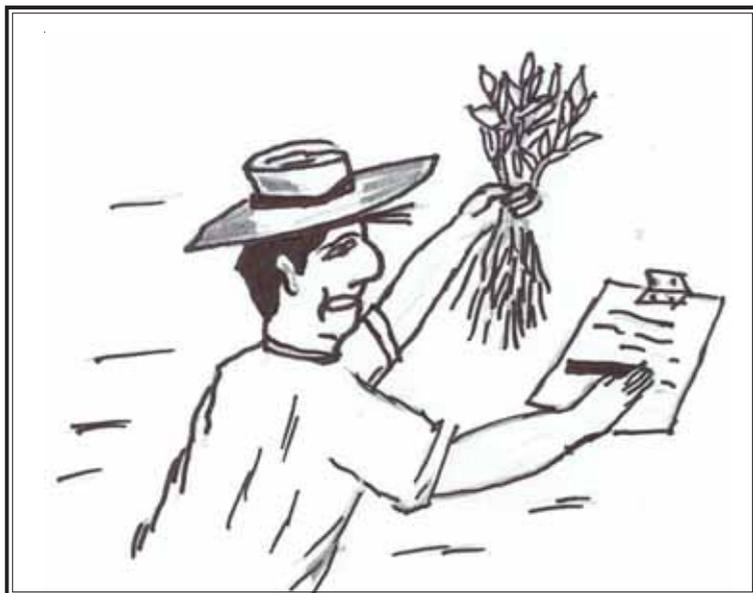


Figura 4: Evaluación de hembras inmaduras del nemátodo quiste en la raíz de la planta de papa

- Es aconsejable tomar muestras de dos o cinco manchones, los que se observarán o analizarán separadamente.

La presencia o ausencia de hembras o quistes (Globodera spp.) nos indicará la incidencia, pero la intensidad de estos indicará la severidad de ataque, que se califica de acuerdo a escalas establecidas (tabla 1).

Tabla 1. Escala de evaluación de suelos infestados por *Globodera* spp. a través de la información directa de quistes en raíces de plantas de papa.

Grado	Presencia de quistes en raíces	Calificación
0	Presencia de quistes en raíces	Nula
1	No hay quistes	Ligera
2	Quistes fáciles de ver	Moderada
3	Numerosos quistes fáciles de ver	Elevada

Fuente: Montecinos & Franco, 1993

2. Métodos para Extraer Nemátodos Formadores de Quistes del Suelo.

Existen numerosos métodos para extraer los nemátodos formadores de quistes del suelo seco, pero a continuación se describe el más común y menos complicado.

Método modificado de Fenwick.

Materiales:

- 100 cc de suelo seco.
- Equipo de Fenwick modificado.
- Tamices de 100 y 150 mesh.
- Embudo de más o menos 100 cm de diámetro.
- Papel filtro o papel facial.
- Erlenmeyer de 500 cc.

Procedimiento:

- Cuando la muestra esta seca, se pasa por un tamiz de 10 mesh para eliminar elementos extraños (piedras, etc.).

- Mezcle vigorosamente el suelo y tome una muestra de 100 cc de suelo seco. (tres repeticiones).

- Llene con agua el aparato de Fenwick modificado.

- Coloque los 100 cc de la muestra de suelo en la parte superior del tamiz.

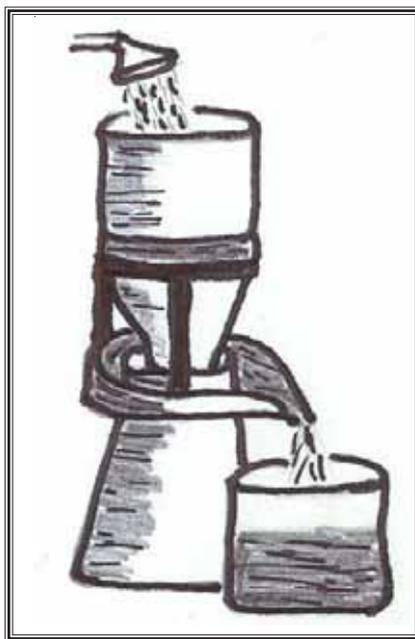


Figura 5: Equipo de Fenwick

- Lave la muestra de suelo dentro del embudo hasta que todo el suelo pase a través del embudo. El material grueso será retenido en la parte superior del tamiz y las partículas pesadas de suelo así como arena sedimentarán en la parte inferior del aparato.
- Quistes, restos orgánicos y otras partículas que flotan son llevados con el agua hacia un collar de la jarra y colectados en un tamiz de 100 ó 150 mesh. Partículas de menor diámetro pasan a través de este tamiz.
- Cuando el agua que desciende por el collar se presenta limpia, retire el tapón de jebes de la parte inferior de la jarra para desaguarla y deje limpio el equipo.
- Los quistes y material orgánico retenidos en el tamiz de 150 mesh, concéntrelos en un solo lado del tamiz y transfíralo a un Erlenmeyer de 500 cc con ayuda de un embudo.
- Deje reposar el Erlenmeyer hasta que los quistes y materia orgánica floten. Algunas partículas de suelo y restos de materia sedimentan.
- Ponga un pedazo de muselina (10 x 10 cm) sobre una malla metálica sujeta a un círculo de metal la cual se encuentra en la parte superior a un soporte de metal.
- Decante la suspensión del Erlenmeyer sobre la muselina. Quistes y restos orgánicos quedarán retenidos en la muselina. Doble los bordes de la muselina, asegúrelo con

un clip y puede hacerlo secar a temperatura ambiente y bajo sombra.

- Después de 2 a 3 días la muestra está lista para ser contada al estereoscopio. Si la muestra tiene alto contenido de materia orgánica, hay la necesidad de realizar una limpieza adicional.

3. Índice o Nivel de Infestación de la Muestra

Si las muestras de suelo están infestadas por el nemátodo quiste de la papa se procede a contar el número de quistes por muestra y a determinar el índice de infestación del suelo que a su vez corresponde a la densidad de población de nemátodos ($NI = DPN =$ huevos y estados juveniles /cc de suelo).

Para ello es necesario tomar en cuenta los siguientes conceptos: Viabilidad total (VT) = Viabilidad infectiva (VI) + Viabilidad residual (VR) donde:

VT = Número de huevos + estados juveniles por quiste (100%).

VI = Número de estados juveniles que han emergido por quiste (60-70%).

VR = Número de huevos + estados juveniles remanentes por quiste (30-40%).

3.1 Viabilidad Total (VT) de los Quistes

Se entiende como viabilidad total (VT) a la cantidad de huevos que se hallan en un quiste. Esto corresponde al 100% del contenido.

Determinar la viabilidad total es un procedimiento casi inmediato al conteo del número de quistes por muestra, más no así para el caso de la viabilidad infectiva y residual. En estos casos hay que esperar algún tiempo después que los quistes han sido expuestos al estímulo del exudado radicular de su hospedante.

Procedimiento:

- De cada muestra, tomar al azar un número determinado de quistes según el tamaño de la muestra que se indica en la tabla 2.
- Colocar los quistes en un triturador de quistes de Huijsman, Oostenbrink o un recipiente parecido. También se pueden triturar los quistes en un recipiente de vidrio.
- Agregue 5 cc de agua y triture los quistes.
- De no contar con el homogenizador, los quistes se colocan en una gota de agua en un porta objeto y con un bisturí se cortan varias veces para liberar los huevos.
- Homogenizar la suspensión con un flujo de aire.
- Con una pipeta tome 1 cc de la suspensión y vierta en una placa de conteo. Realice esta operación tres veces.
- En un estereoscopio contar el número de huevos y larvas de cada repetición.

Tabla 2. Relación entre número de quistes por 100/cc de suelo y el número de quistes a triturarse para evitar errores en el conteo.

Número de quistes/100 cc de suelo	Número de quistes a triturarse
hasta 10	50
10 a 15	45
15 a 20	40
20 a 25	35
25 a 30	30
30 a 35	25
35 a 40	20
40 a 45	15
más de 45	10

Fuente: Van Eck, et. al. 1984

3.2 Viabilidad Infecciosa (VI)

Se define la viabilidad infecciosa (VI) como la cantidad de juveniles (J2) que emergen de los huevos estimulados por el exudado radicular del cultivo de papa. Esto representa el 60 - 70% de la viabilidad total.

Procedimiento

- Coloque 25 quistes dentro de una canastilla de malla y ésta, a su vez, en un recipiente de vidrio de 5 cc. Añada agua destilada e incúbelos a 20 cc.
- Después de 3 a 4 días elimine el agua destilada del recipiente y reemplácela por exudado radicular de papa de una variedad susceptible. Regrese el recipiente al incubador.
- Cada 7 días retire la canastilla que contiene los quistes y cuente el número de J2 que emergieron.
- Repita la secuencia anterior durante 2 ó 3 meses, hasta que emerjan todos los J2.
- Obtenga el promedio de J2 por quiste dividiendo el número total de juveniles contadas entre el número de quistes colocados en la canastilla.



Figura 6: Exudado de la planta de papa

3.3 Viabilidad Residual (VR)

Representa los estados juveniles remanentes que no han emergido, pero que con el estímulo de futuros cultivos de papa, emergerán en las mismas proporciones. De ahí la prolongada persistencia de estos nemátodos en los campos donde se localizan. Normalmente la viabilidad residual corresponde al 30-40% del total.

Procedimiento:

La viabilidad residual se puede determinar de dos formas.

- Por diferencia entre la viabilidad total y la infectiva.
- Siga el mismo procedimiento descrito para determinar la viabilidad total con los quistes utilizados para determinar la viabilidad infectiva.

4. Análisis e Interpretación de los Resultados.

Cuando la VT por quiste es referida al tamaño de la muestra de suelo (100 cc de suelo) y al número de quistes extraídos de ella, se determina la densidad de población del nemátodo (DPN) o nivel de infestación del suelo (NI) donde:

DPN o NI = Número de huevos y estados juveniles / cc de suelo.

La determinación correcta de la infestación del suelo por *Globodera* spp. se logra a través del número de huevos y/o estados juveniles por cc de suelo (Nº huevos + J2/cc de suelo). Esta medida aunque fue muy poco utilizada ya que requiere de cierto equipo y de personal entrenado, evita sobrestimar la

infestación del suelo , porque descarta quistes vacíos y de poca viabilidad.

Para el caso de *Globodera* spp. se estableció una escala para estimar la perdidas de rendimiento que considera la severidad de daño medida por el números de huevos y/o estados juveniles por gramo de suelo (tabla 3)

Tabla 3. Niveles de infestación de los suelos por *Globodera* spp. y perdidas de rendimiento, en base al numero de huevos y J2 por gramo de suelo

Grado de infestación de rendimiento	Huevos + J2 por gramo de suelo	Pérdidas de rendimiento (%)
Libre	0	0
Incipiente	1	5
Media	5.2 – 15	13
Alta	15.1 – 35	45
Muy alta	>35	58

Fuente: Ramos et.al.1998

Bibliografía

- Anderson, S. 1970. A method for the separation of *Heterodera* cysts from organic debris. *Nematologica* 16:222-226.
- Anscombe, F. J. 1950. Soil sampling for potato root eelworm cysts. *Ann. appl. Biol.* 37:286-295.
- Barker, K. R. 1985. Sampling nematode communities. In: An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Volume II. Methodology. Ed. K. R. Barker, C. C. Carter and J. N. Sasser. pp. 3-17.
- Barker, K. R. 1985. Nematode extraction and bioassays. In: An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Volume II. Methodology. Ed. K. R. Barker, C. C. Carter and J. N. Sasser. pp. 19-35.
- Canto- Saenz, M.; González, A. Uso de gasolina en la separación de quistes de *Globodera pallida* y materia orgánica en muestras extraídas de suelo. *Nematropica* 23:57-61.
- Clarke, A. J.; Perry, R.N. 1977. Hatching of cyst-nematodes. *Nematologica* 23:350-368.
- Den Ouden, H. 1960. Periodicity in spontaneous hatching of *Heterodera rostochiensis* in the soil. *Nematologica* (Suppl. II):101-105.
- Ellenby, C.; Gilbert, A.B. 1960. Progress in the study of the physiology of the hatching factor of the potato root eelworm *Hetrodera rostochiensis* Wollenweber. *Nematologica* (Supp. II):106-111.

- Faulkner, G. J. N., Greet. D.N. 1984. A machine for the rapid and efficient separation of nematode cysts from dried root debris. *Nematológica* 30: 99-102.
- Fenwick, D. W., Widdowson, E. 1958. The conduct of hatching tests on cyst of the potato-root eelworm *Heterodera rostochiensis* (Woll.). *J. Helminth.*, 32, 125-134.
- Forrest, J. M. S.; Perry, R.N. 1980. Hatching of *Globodera pallida* eggs after brief exposures to potato root diffusate. *Nematologica* 26:130-132.
- Gonzalez, A. y Franco, J. 1993. Manual de técnicas y métodos para estudios del nemátodo quiste de la papa *Globodera* spp. Centro Internacional de la Papa (CIP) y Programa de Investigación de la Papa (PROINPA). 99 pp.
- Hesling, J. J. 1952. An improved method of separating eelworm cyst from debris. *J. Helminth.*, 26, 69-70.
- Jones, F. G. W.; Gander, M.C. 1962. A bioassay for *Heterodera* spp. without counting cysts or larvae. *Nematologica*, 8, 39-50.
- Ramos, J.; Franco, J.; Ortuño, N. ; Oros, R. y Main, G. 1998. Incidencia y Severidad de *Nacobbus aberrans* y *Globodera* spp en el cultivo de la papa en Bolivia: Perdidas en el valor bruto de su producción. IBTA/PROINPA. 201 pp.
- Southey, J. F. 1970. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. *Tech. Bulletin, Minist. Agric. Fish. Fd.* 2 (5th ed), 148 pp.

- Van Ech, A. ; Eguiguren, R.; Défaz, M.; Revelo, J. y Cedeño, G. 1984. Técnicas de laboratorio en nematología. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). 29 pp.
- Widdowson, E. 1958. Potato root diffusate production. *Nematologica* 3:6-14.
- Widdowson, E. 1958. Observations on the collection and storage of potato root diffusate. *Nematologica* 3:173-178.
- Winslow, R. D. 1955. The hatching responses of some root eelworm of the genus *Heterodera*. *Ann. appl. Biol.* 43:19-36.

ESTACION EXPERIMENTAL SANTA ANA - HUANCAYO

Carretera Huancayo – Hualahoyo km. 6,8

e-mail : iniasana@mag.minag.gob.pe
staana@fenix.inia.gob.pe

Teléfono : 064 - 247011 / 064 - 247096

Telefax : 064 - 246206