

ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL LITORAL SUR “Dr. Enrique Ampuero Pareja”

GUÍA PARA RECONOCER DAÑO EN RAÍCES Y MÉTODOS DE
MUESTREO Y EXTRACCIÓN DE NEMATÓDOS EN RAÍCES Y SUELO



DEPARTAMENTO NACIONAL DE PROTECCIÓN VEGETAL
SECCIÓN NEMATOLOGÍA

Boletín Divulgativo No. 433

Carmen Triviño Gilces

Daniel Navia Santillán

Luis Velasco Velasco

GUÍA PARA RECONOCER DAÑO EN RAÍCES Y MÉTODOS DE MUESTREO Y EXTRACCIÓN DE NEMATÓDOS EN RAÍCES Y SUELO

Carmen Triviño Gilces y Daniel Navia Santillán

Investigadores del Departamento Nacional de Protección Vegetal, sección Nematología,
Luis Velasco Velasco, Asistente de Investigación Agropecuaria del DNPV-Nematología

ESTACIÓN EXPERIMENTAL LITORAL SUR “Dr. Enrique Ampuero Pareja”

Km. 26 vía Durán-Tambo

Casilla postal: 09-01-7069

Teléfonos: 593 - 4 - 2724260 - 61 - 62

Página Web: www.iniap.gob.ec

Email: litoralsur@iniap.gob.ec

COMITÉ DE PUBLICACIONES:

Ing. Agr. M.Sc. Ricardo Moreira Macías

Ing. Agr. Ph.D. Luís Peñaherrera Colina

Ing. Agr. M.Sc. Braulio Lahuathe Mendoza

Edición: Dra. Carmen Triviño G., Daniel Navia S., Luís Velasco V.

Fotos: Autores

Publicación: INIAP Boletín Divulgativo No. 433

Tiraje: 1000 Ejemplares

Impresión: Industria Gráfica El Papiro de Baruc

Cita correcta de la publicación:

Triviño, C., Navia, D., Velasco, L. 2013. Guía para reconocer daño en raíces y métodos de muestreo y extracción de nemátodos en raíces y suelo. Yaguachi, Ec. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Litoral Sur “Dr. Enrique Ampuero Pareja”. Boletín Divulgativo No 433. 17p.

La reproducción parcial o total queda prohibida sin la autorización de los autores ©
Derechos reservados.

Introducción

Los nemátodos fitoparásitos son un grupo de microorganismos, pluricelulares, no segmentados en forma de lombriz, con excepción de pocos géneros en que la hembra adulta adquiere forma abultada; están en abundancia en los campos cultivados de Ecuador y en combinación con otros factores bióticos y abióticos, son uno de los limitantes de la producción agrícola. Se ha determinado especies de nemátodos que antes fueron desconocidas como causantes de daños a los cultivos, y que actualmente están ocasionando grandes pérdidas económicas. La siembra continua sin rotar los cultivos y altas temperaturas, han sido factores determinantes para el incremento de las poblaciones. Sin embargo, para muchos agricultores pasan desapercibidos por ser animales diminutos y cuyos síntomas en la mayoría de los géneros no son específicos, por tal motivo constituyen una limitante significativa, especialmente en agricultura de subsistencia. En campos donde el monocultivo es frecuente como en plantaciones de arroz bajo riego, el manejo de nemátodos se dificulta por los altos niveles poblacionales y la poca o nula disponibilidad de cultivos para rotar.

En forma general, los nemátodos parásitos de plantas reducen la producción agrícola mundial en aproximadamente 11 % (Ravichandra, 2008), lo que representa millones de toneladas de alimento al año. Tomando en cuenta la amenaza de los nemátodos en relación a otras plagas y enfermedades, es un reto de enorme beneficio la cuantificación de los problemas nematológicos a través de la mejora de los procedimientos de identificación en campo y análisis en laboratorio. La primera consideración para el diagnóstico de los problemas nematológicos es la realización de un adecuado muestreo de raíces y suelo, lo que considera también la toma de muestras del follaje según el cultivo, ya que se conoce de la existencia de especies endoparásitas, ectoparásitas y semi-endoparásitas. Los niveles de daño que causan los nemátodos depende de varios factores tales como la densidad poblacional, la patogenicidad de las especies, edad de la planta, resistencia, tolerancia o susceptibilidad de la planta hospedera.

La presentación de esta guía tiene como objetivo facilitar información técnica para efectuar muestreos de raíces y suelo con fines de análisis nematológico y demostrar los procedimientos para extraer los nemátodos de suelo, raíces y parte aérea.

No está demás indicar que la confiabilidad de los resultados de un análisis nematológico depende principalmente del tamaño de muestra, distribución de las submuestras extraídas en el campo, protección de éstas previo al análisis y del equipamiento del laboratorio especializado.

NEMÁTODOS DE IMPORTANCIA ECONÓMICA EN EL ECUADOR Y DAÑOS EN LOS CULTIVOS

1. Nemátodos formadores de agallas en las raíces

En Ecuador, las especies existentes que forman agallas en las raíces son:

Meloidogyne incognita, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. graminicola*, *Rotylenchulus reniformis* y *Nacobbus aberrans*. Las agallas se forman porque al alimentarse el nemátodo inyecta enzimas hidrolíticas a las cuales las células reaccionan provocando hipertrofia e hiperplasia que forman las agallas o nódulos (Taylor y Sasser, 1983).

Para el caso de ataques de *Meloidogyne* spp. (Figura 1) a especies vegetales con raíces de tejido suave como melón (*Cucumis melo* L.), pepino (*Cucumis sativa* L.), tomate de mesa (*Lycopersicon esculentum* Mill), sandía (*Citrullus vulgaris*) entre otras, se forman agallas grandes donde se encuentran varias hembras; mientras que, en raíces de consistencia dura y especialmente en gramíneas entre ellas, caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), maíz (*Zea mays* L.), arroz (*Oryza sativa*), las agallas son pequeñas y pueden contener solo una hembra (Figuras 2, 3, 4, 5, 6, 7).

El nemátodo riñón, *Rotylenchulus reniformis*, cuando ataca forma pequeñas agallas y es donde se encuentra la hembra adulta (Figura 8). Según información foránea esta especie tiene muchos hospederos (McGawley *et al.*, 2011; Marahatta *et al.*, 2012), pero en Ecuador los cultivos más infestados son tomate de mesa (*L. esculentum* Mill), pimiento (*Capsicum annum* L.) melón (*C. melo* L.), cebolla perla (*Allium cepa* L.), soya (*Glycine max* L.), fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.), caupi (*Vigna unguiculata* syn. *V. sinensis*), maracuyá (*Passiflora edulis*), papaya (*Carica papaya*) y piña (*Ananas sativus*) (Triviño y Moreta, 2010).

Nacobbus aberrans es otra especie con dimorfismo, la hembra adulta es abultada (Figura 9), ataca a la raíz formando agallas las cuales se distribuyen como eslabones de rosario (Figura 10), de donde se deriva el nombre común de “nemátodo del rosario” o “falso agallador de raíces”. Se encuentra en los valles cálidos de la Sierra ecuatoriana (Revelo *et al.*, 2007), con mayor frecuencia y población en Pimampiro, El Juncal en tomate de mesa y fréjol; y en el Valle del Guayllabamba en tomate de mesa (invernaderos), pimiento y en flor de verano gipsofila (*Gypsophila* spp.) (Triviño y Espin, 2010).

1.1 *Meloidogyne* spp.

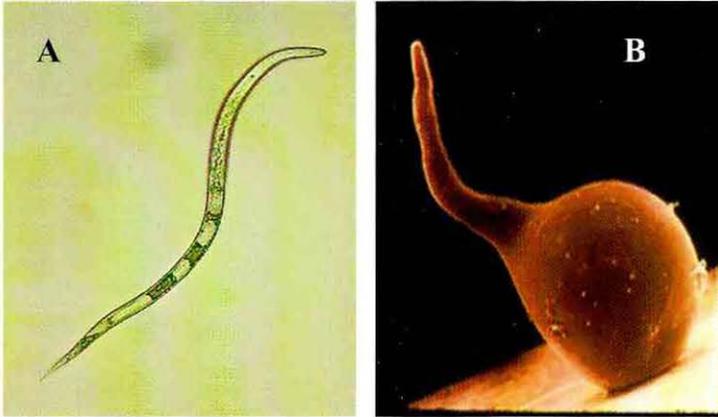


Figura 1. Estados de desarrollo de *Meloidogyne* spp: A) segundo estado juvenil infestivo, B) hembra. INIAP, EELS y PhD. J. Sasser, Universidad Carolina del Norte, respectivamente.

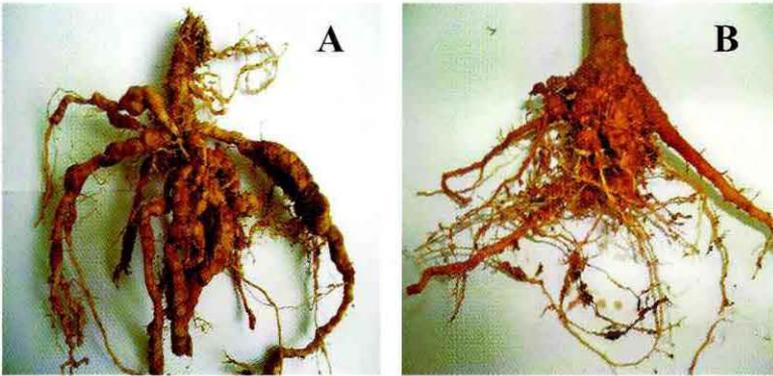


Figura 2. Raíces con agallas causadas por *Meloidogyne* spp: A) tomate de mesa, B) pimiento. INIAP, EELS. 2013.

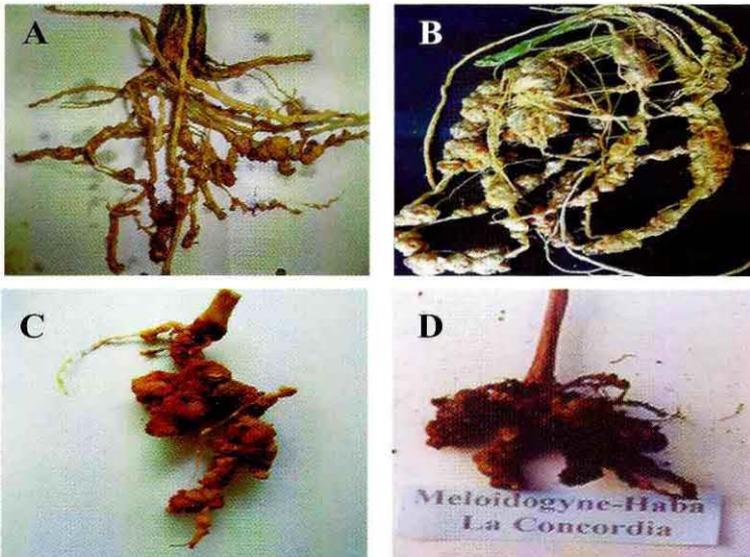




Figura 3. Raíces con agallas causadas por *Meloidogyne* spp: A) pepino, B) sandía, C) melón, D) haba pallar, E) fréjol, F) maíz. INIAP, EELS. 2013.



Naranjilla afectada por *Meloidogyne* sp

Figura 4. Raíces con agallas causadas por *Meloidogyne* spp. A) lechuga, B) albahaca, C) cardamomo, D) banano, E) tomate de árbol, F) naranjilla. INIAP, EELS. 2013.



Figura 5. Raíces con agallas causadas por *Meloidogyne* spp: A) papaya, B) noni, C) pitahaya, D) soya. INIAP, EELS. 2013.

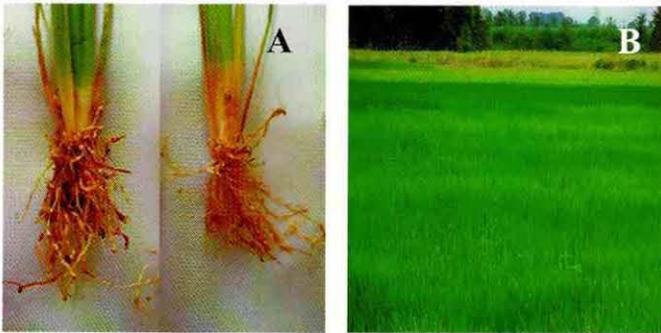


Figura 6. A) Raíces de arroz con agallas causadas por *Meloidogyne graminicola*: B) campo de arroz infestado con *M. graminicola*. INIAP, EELS. 2013.



Figura 7. Raíces con agallas causadas por *Meloidogyne* spp: A) hypericum, B) rosa, C) ginger común, D) ginger torch. INIAP, EELS. 2013.

1.2. *Rotylenchulus reniformis*

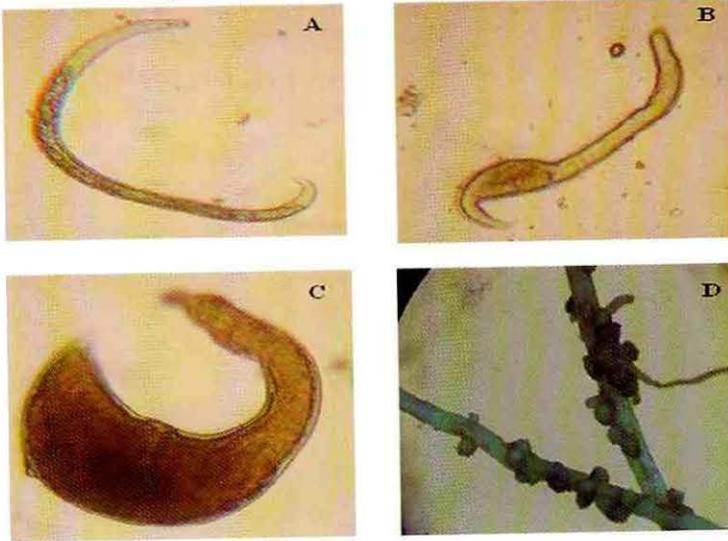


Figura 8. Estados de desarrollo de *Rotylenchulus reniformis* o nemátodo de riñón: A y B) hembra joven, C) hembra adulta, D) raíz de soya INIAP-307 infestada con este nemátodo. INIAP, EELS. 2013.

1.3. *Nacobbus aberrans*

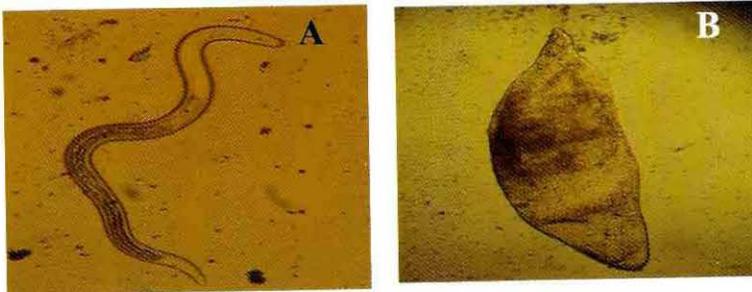


Figura 9. Estados de desarrollo de *Nacobbus aberrans* o nemátodo falso agallador, A) segundo estadio juvenil, B) hembra adulta. INIAP, EELS. 2013.



Figura 10. Raíces con agallas causadas por *Nacobbus aberrans*: A) gypsophila (flor de verano), B) tomate de mesa. INIAP, EELS. 2013.

2. *Nemátodo formadores de quistes en raíces de papa*

El nemátodo más importante en el cultivo de papa en Ecuador es *Globodera pallida*. La hembra hinchada tiene forma redonda con un pequeño cuello con el que se sostiene de la raíz (Figura 11). Cuando es inmadura puede ser de color amarillo pálido pero al madurar se oscurece hasta obtener un tono pardo. El cuerpo endurecido de la hembra o “quiste” retiene los huevos en su interior. Los quistes pueden permanecer en el suelo sin eclosionar por 7-10 años en ausencia de hospedero (Ravichandra, 2008). Las señales de daños son perceptibles cuando las poblaciones son altas, por lo que se forman pequeños parches de plantas pequeñas y reducción del número de tubérculos.

2.1. *Globodera pallida*



Figura 11. Quistes de *Globodera pallida* proveniente de cultivo de papa en Ecuador. INIAP, EELS. 2013.

3. *Nemátodos lesionadores de raíces*

En Ecuador los nemátodos lesionadores de raíces más frecuentes y abundantes son *Radopholus similis* (Coob) (Figuras 12 y 13) y *Helicotylenchus multicinctus* (Figura 14) en banano y otras musáceas; *Pratylenchus* spp. (Figura 15), *Helicotylenchus* spp. en maíz, arroz de secano, fréjol, piña, café, caña de azúcar, tomate, pimiento, soya, plátano entre otros y *Hirschmanniella oryzae* en arroz de riego. Con excepción de *Radopholus similis* en banano, no se conocen los daños económicos que están causando estos nemátodos en otros cultivos.

Las lesiones se forman por la oxidación que ocurre en las células cuando el nemátodo inyecta enzimas hidrolíticas al momento de alimentarse. El nemátodo migra entre las células; al inicio las lesiones son pequeñas de color rojizo y pueden ser muy superficiales, después se profundizan y se vuelven necróticas por la invasión acelerada de patógenos secundarios como hongos y bacterias (Sarah *et al.*, 1996; Bridge *et al.*, 1997).

3.1. *Nemátodos lesionadores de las raíces del banano*

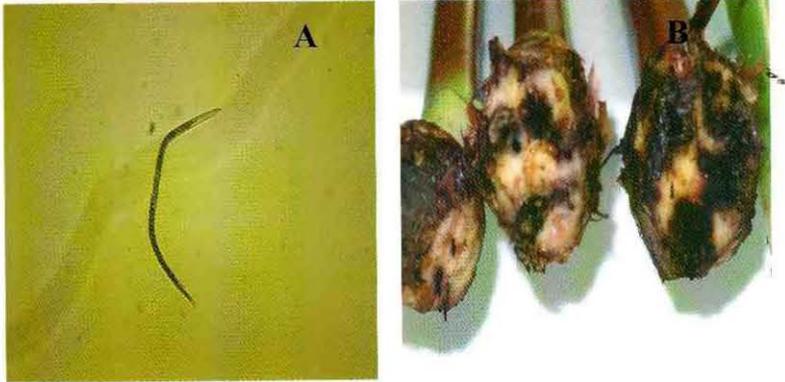


Figura 12. A) *Radopholus similis*, lesionador barrenador de las raíces del banano, B) Cormo de banano cv Williams afectado por este nemátodo. INIAP, EELS. 2013.

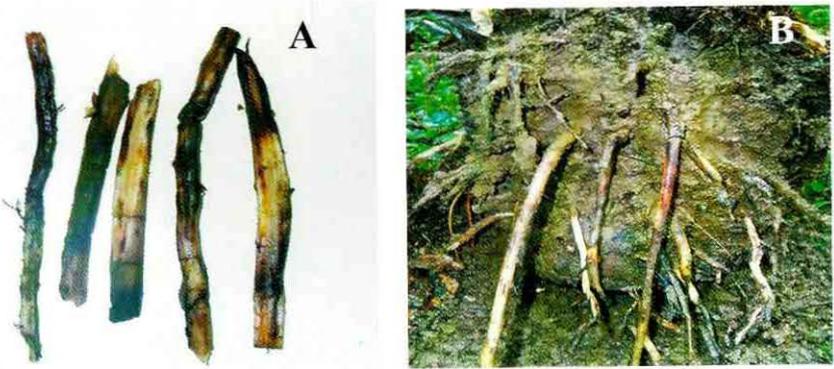


Figura 13. A) Raíces de banano con lesiones causadas por *R. similis*, B) planta volcada por infestación del nemátodo. INIAP, EELS. 2013.

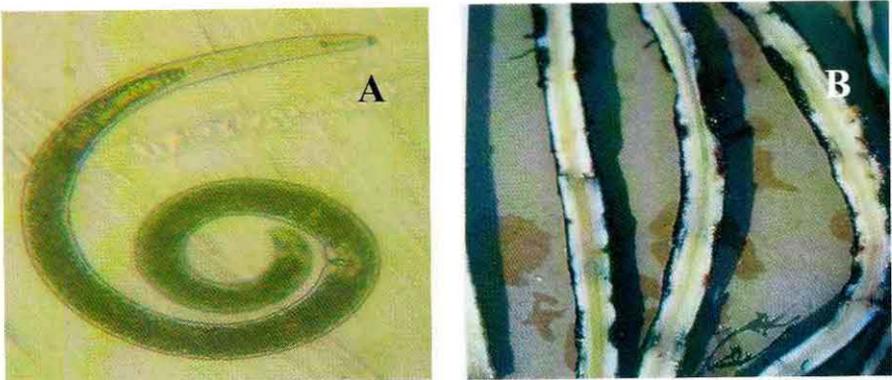


Figura 14. A) *Helicotylenchus multicinctus*, nemátodo espiral, B) raíces de banano con lesiones causadas por el nemátodo. INIAP, EELS. 2013.

3.2. *Nemátodos lesionadores en otros cultivos*

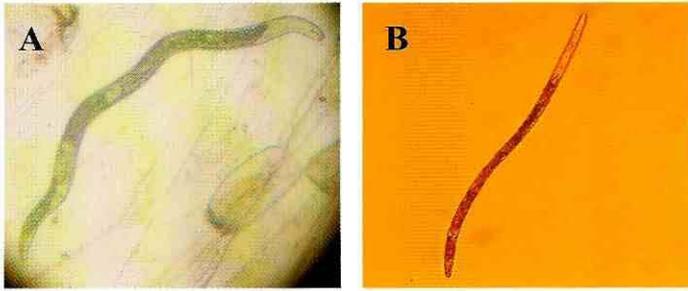


Figura 15. A) *Pratylenchus* sp., extraídos de raíces de banano, B) *Pratylenchus* sp., extraídos de raíces de maíz. INIAP, EELS. 2013.

4. *Nemátodos ectoparásitos importantes*

Los más frecuentes y en mayor población encontrados son *Criconemoides* spp. y *Hemicycliophora* spp (Figura 16); principalmente están en el suelo alrededor de la rizósfera de los cultivos de fréjol y melón en la provincia de Santa Elena; mango y cacao en la provincia del Guayas. *Hemicycliophora* está en altas poblaciones en plantaciones de *Gypsophila* en las provincias de Pichincha e Imbabura.

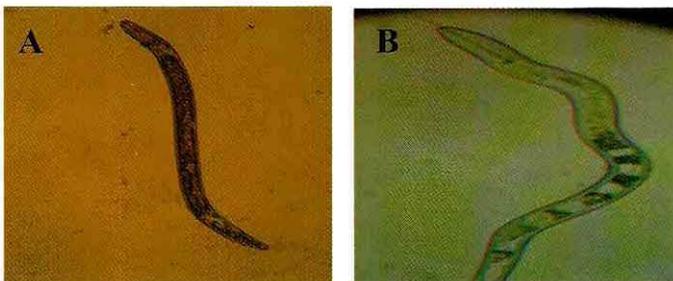


Figura 16. A) *Criconemoides* sp, B) *Hemicycliophora* sp, extraídos de suelo sembrado con cacao. INIAP, EELS. 2013

MÉTODOS DE MUESTREOS DE RAÍCES Y SUELO EN DIFERENTES CULTIVOS PARA ANÁLISIS NEMATOLÓGICO

Muestreo de raíces

Para el muestreo de raíces en cultivos anuales se debe extraer las plantas con todo el sistema radical, seleccionándolas al azar, ó con el método sistemático en zigzag, abarcando toda la plantación (Figura 17). En los cultivos de tomate, melón, sandía, pepino, maíz se extraen 20 plantas/ha; en pimiento, col, cebolla, arroz, fréjol, soya, caupi y otros cultivos con alta densidad de siembra se extraen 30 planta/ha, en arroz 10 sitios/ha (Figuras 18, 19).

En cultivos anuales, las poblaciones de nemátodos más significantes se obtienen cuando el muestreo se efectúa desde el periodo de floración hasta el final del ciclo del cultivo. En tres puntos alrededor de la planta y a una distancia aproximada de 20 – 30 cm de la base del tallo, se introduce en el suelo una barreta afilada hasta 20 cm de profundidad, se arranca la planta y se colectan las raíces sin lastimarlas. Las muestras, una vez recolectadas, se depositan en bolsas plásticas no perforadas y se identifica con la siguiente información: nombre del cultivo y variedad, edad de la plantación, nombre de la finca y propietario, ubicación del campo, superficie muestreada, lote del campo, número de plantas por muestra y fecha de muestreo.

Para especies perennes como en mango, guayaba y papaya para el muestreo se seleccionan al azar 10 plantas/ha. Aproximadamente a 60 cm de la base de la planta, con una barreta bien afilada se hace un hoyo de 20 cm largo x 20 cm ancho x 30 cm de profundidad. Se introduce la barreta dos o tres veces en el mismo sitio delimitando el hoyo con las dimensiones indicadas, se extrae el suelo junto con las raíces fuera del hoyo, se colectan las raíces de las 10 plantas, se depositan en una bolsa plástica (muestra conjunta), se tapan los hoyos con el mismo suelo y se identifica la muestra. Las muestras deben ser protegidas de los rayos solares, para evitar su desecación hasta llegar al laboratorio en un máximo de 2 días. En el laboratorio éstas son almacenadas a una temperatura de 10 a 15°C.

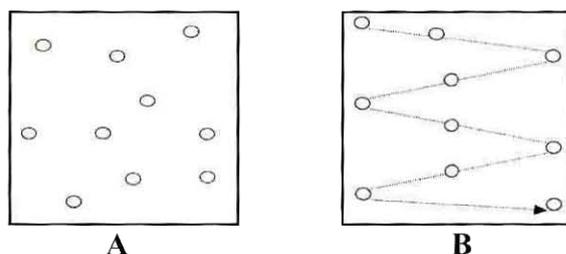


Figura 17. Patrones de muestreo para análisis nematológicos. A) Muestreo al azar; B) Muestreo sistemático. INIAP, EELS. 2013.



Figura 18. A) muestreo de raíces y suelo en campo de arroz, B) extraída de planta para análisis nematológico. Fotos INIAP- EELS.



Figura 19. A) muestreo de raíces y suelo en campo de soya, B) extraída de planta para análisis nematológico. INIAP, EELS. 2013.

Muestreo de raíces en banano y plátano

Para el muestreo de raíces en banano, desde 1 a 4 ha, se toma una muestra formada de cinco plantas seleccionadas al azar, todas ellas recién florecidas que tengan un hijo de sucesión de 1,50 a 2,0 m de altura. Frente al hijo y a 5 cm de distancia de la base de la planta, se hace un hoyo con una barreta bien afilada de dimensiones 30 cm largo x 15 cm ancho x 30 cm profundidad, equivalente a 13,5 dm³ (Figura 20). Se introduce la barreta dos o tres veces en el mismo sitio delimitando un rectángulo con las dimensiones indicadas, se extrae el suelo junto con las raíces fuera del hoyo, se colectan las raíces y se depositan en una bolsa plástica sin orificios, se tapa el hoyo con el mismo suelo y se continúa hasta completar la muestra con las raíces de las cinco plantas o submuestras, se identifica con los datos de colectas antes indicados. Las muestras deben ser protegidas del sol para evitar su desecación hasta llegar al laboratorio en un máximo de 2 días. En el laboratorio éstas deben ser almacenadas a una temperatura de 10 a 15°C.

En los últimos años, las poblaciones de *Helicotylenchus multicinctus* (nemátodo espiral) en raíces y suelo se han triplicado en la mayoría de las plantaciones de banano, por tal motivo es aconsejable que en fincas con estos antecedentes se hagan también muestreos de suelo.



Figura 20. Muestreo de raíces en banano. A) Planta seleccionada, B) hoyo al frente del hijo de sucesión y extracción de raíces para análisis nematológico. INIAP, EELS. 2013.

Muestreo de suelo

En cultivos anuales, en el hoyo de cada planta extraída (10, 20 o 30 plantas/ha según la especie), se sacude el suelo adherido a las raíces y se homogeniza; de cada hoyo se extrae una submuestra de 250 gramos (aproximadamente media libra). En mango, guayaba, papaya y banano de cada hoyo se extrae 500 g, todas ellas se depositan en un recipiente, se homogeniza nuevamente y se toma una muestra compuesta representativa de 1 kg/ha aproximadamente; por último se deposita en una bolsa plástica y se identifica con los mismos datos descritos para raíces (Figura 21). Para el traslado al laboratorio, las muestras se colocan en cajas de cartón o en cajas térmicas para protegerlas del sol.

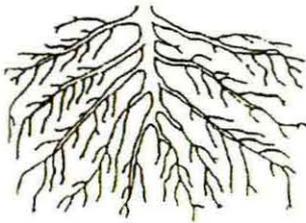


Figura 21. Procedimiento para coleccionar muestras de suelo con fines de análisis nematológico. INIAP, EELS. 2013.

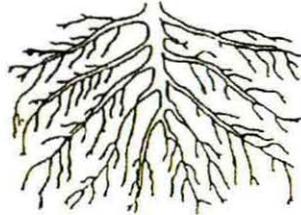
EXTRACCIÓN DE NEMATÓDOS DE RAÍCES POR EL MÉTODO LICUADO – TAMIZADO

Las raíces de cada muestra se lavan individualmente con agua común para retirar los restos de tierra, a cada planta se le evalúa el índice de agallamiento causado por *Meloidogyne*, para lo cual se utiliza la escala de Bridge y Page (1980) calificada de 0 a 10. Seguidamente se cortan las raíces en segmentos de 1 cm de longitud, se homogeniza y se pesa 10 gramos para la extracción de nemátodos. Se colocan en una licuadora y se añade 100 mL de agua, se licua a baja velocidad por 20 segundos en dos tiempos con cinco segundos de descanso. El licuado se pasa por un juego de tres tamices de No. 60, 100 y 500 (250, 150 y 25 μm respectivamente) sobrepuestos de arriba hacia abajo. El primero y segundo tamiz se lavan por 1 minuto cada uno. El sedimento contenido en el tamiz No. 500 se colecta en un vaso graduado, se lava con una piceta; y finalmente el contenido en el vaso se afora a 100 mL, luego se homogeniza con una bomba de aire y se toma una alícuota de 4 mL para la identificación y conteo de los nemátodos utilizando un microscopio (Figura 22).

El número de nemátodos contados de cada especie o género se multiplica por 25 y la resultante corresponde a la densidad poblacional de nemátodos por 10 g de raíces.



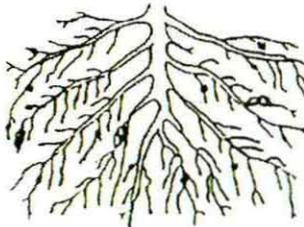
0 No knots on roots



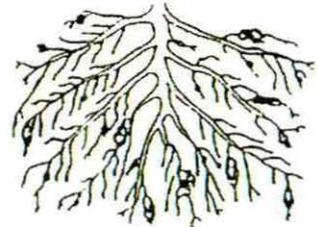
1 Few small knots.
difficult to find



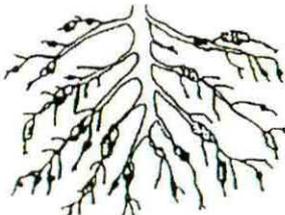
2 Small knots only but clearly
visible. Main roots clean



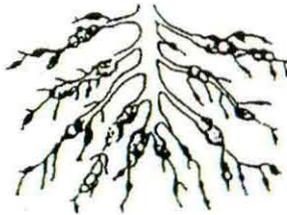
3 Some larger knots visible.
Main roots clean



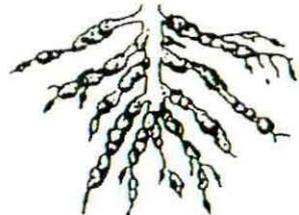
4 Larger knots predominate but main
roots clean



5 50% of roots infested.
knotting on parts of main
roots. Reduced root system



6 Knotting on main
roots



7 Majority of main roots
knotted



8 All main roots knotted.
Few clean roots visible



9 All roots severely knotted
Plant usually drying



10 All roots severely knotted.
No root system. Plant
usually dead

Root-Knot Nematodes Rating Chart – Bridge and Page (1980)

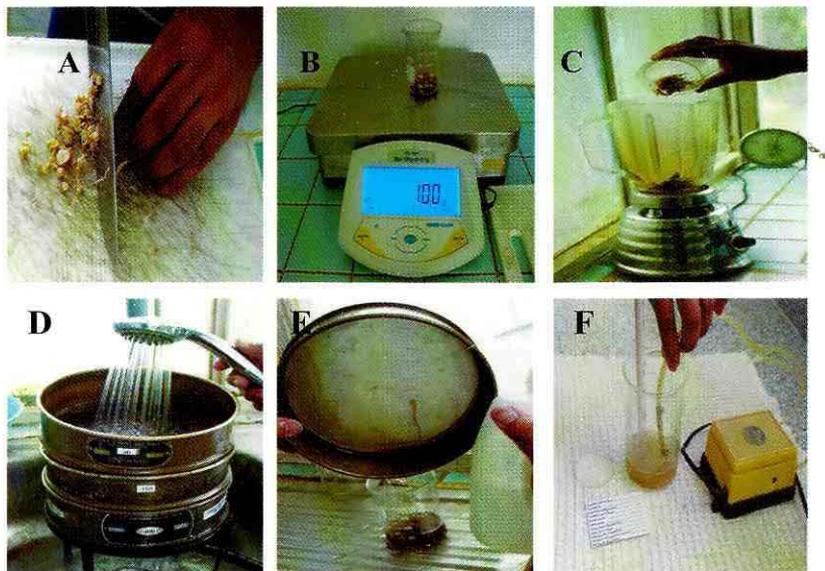


Figura 22. Procedimiento para extraer nemátodos de raíces: A) cortada de raíces, B) peso de muestra para licuar, C) licuada de muestra, D) lavada de muestra a través de tamices, E) colecta de los nemátodos, F) homogenización de solución agua – nemátodos para identificación y conteo. INIAP, EELS. 2013.

Extracción de nemátodos en raíces de banana

Las raíces que conforman la muestra (cinco plantas) se lavan y con un cuchillo pequeño se separan las raíces funcionales (sanas y las de coloración café rojizo sin tejido necrosado) y no funcionales (color negro o tejido necrosado), se pesan por separado cuando están poco húmedas especialmente las no funcionales. Con estos dos valores se hace el cálculo de porcentaje de raíces funcionales. Las dos categorías de raíces se cortan en pedazos de 1 cm de longitud aproximadamente a excepción de las que tienen más de 80 % de tejido necrosado y se homogenizan manualmente, se pesan 25 gramos de raíces totales (funcionales más no funcionales). Se colocan en una licuadora y se añade 100 mL de agua común, se licuan a velocidad alta en dos etapas de 10 segundos cada una, con cinco segundos de intermitencia entre ellas. El licuado se pasa por un juego de tres tamices sobrepuestos de arriba hacia abajo de números 60, 100 y 400 (250, 150 y 38 μ m). El primer y segundo tamiz se lavan por dos y un minuto respectivamente, el sedimento contenido en el tamiz No. 400 se recolecta en un vaso graduado para el cual se lava con una piceta y se afora en 100 mL, se homogeniza con una bomba de aire y se toma una alícuota de 2 mL (Figura 23) para la identificación y conteo de nemátodos en un microscopio con ayuda de contadores - chequeadores. El valor de cada especie o género se multiplica por 200 y el equivalente corresponde a la densidad poblacional en 100 g de raíces totales.

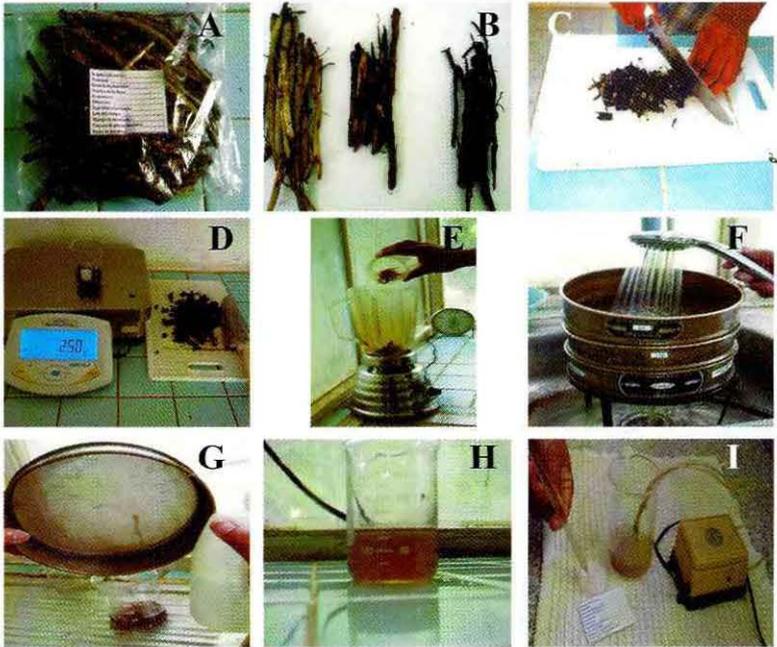


Figura 23. Procedimiento para extraer nemátodos en raíces de banano: A) muestra de raíces, B) selección de raíces sanas y dañadas, C) cortada de raíces, D) pesada de raíces, E) licuada de raíces, F) lavada de muestras a través de tamices, G) recogida de los nemátodos en vaso, H) aforado de la solución agua – nemátodos, I) homogenización de solución agua – nemátodos para el conteo. INIAP-EELS, 2013.

Extracción de nemátodos de suelo por el Método de Incubación

En el laboratorio, la muestra compuesta de suelo traída del campo se coloca en una bandeja, se homogeniza y se extrae una submuestra de 100 cm³ para la extracción de nemátodos.

Se colocan dos platos de aluminio sobrepuestos, el primero con base y soporta al otro que es calado; sobre este último se coloca una malla plástica que soporta una hoja de papel facial. Se deposita el suelo y se dispersa formando una lámina fina; por un lado de la muestra se levanta la malla con cuidado, se agrega agua hasta cubrir el suelo y se deja en incubación tres días. Luego de este tiempo se retira la malla con el suelo y con una piceta se lava el plato calado sobre la base, pasando el contenido agua-nemátodos a través de un tamiz No. 500 (25 μm); el residuo que queda en el tamiz se colecta en un vaso de precipitación y se afora en 100 mL (Figura 24). Se homogeniza y se toma una alícuota de 4 mL para la identificación y conteo de nemátodos utilizando un microscopio y contador-chequeador. El número de cada especie o género se multiplica por 25 y la resultante corresponde a la densidad poblacional de nemátodos obtenida en 100 cm³ de suelo.

Esta metodología es aplicable para extraer nemátodos de suelo de todos los cultivos.



Figura 24. Procedimiento para extraer nemátodos del suelo: A) muestra de suelo, B) homogenización de muestra, C) colocación de platos (1), malla (2) y papel facial (3) antes de colocar el suelo, D) suelo con agua (4) y plato con solución agua-nemátodo (5), E) recogida en vaso la solución agua-nemátodos, F) aforado de solución en vaso para el conteo de nemátodos. Fotos INIAP-EELS.



DIRECCION:

Virgen de Fátima, Km 26 Vía Durán - Tambo

Telf. 04 - 2724261 / 60 / 62 - Ext. 113

Apartado Postal 09-01-7069

E-mail: litoralsur@iniap.gob.ec

<http://www.iniap.gob.ec>

Yaguachi - Guayas - Ecuador