

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERIA
DIRECCION GENERAL DE DESARROLLO AGRICOLA

CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP)

Memorias

PRIMER CURSO NACIONAL
SOBRE TECNOLOGIA DEL

CULTIVO DE PAPA

9 - 20 Septiembre de 1974
Est. Exp. Sta. Catalina (INIAP)



M A G C I P

QUITO
Ecuador

DEPARTAMENTO DE CULTIVOS
SECCION DE TUBERCULOS Y RAICES



MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERIA
CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (C I P)

PRIMER CURSO NACIONAL SOBRE TECNOLOGIA
DEL CULTIVO DE PAPA

Septiembre 9 - 20 de
1.974

Quito - Ecuador

P R E S E N T A C I O N

La Dirección General de Desarrollo Agrícola del Ministerio de Agricultura y Ganadería se encuentra empeñada en el logro completo de los objetivos - de sus Programas de Fomento; y, una de las formas de asegurar esto, es a través de la permanente preparación de su personal técnico que labora - en el campo.

En el caso concreto del personal de la Sección de Tubérculos y Raíces, fue ésta Dirección en estrecha cooperación con el Centro Internacional de la Papa (CIP) y con el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias - (INIAP), la que organizara el Primer Curso Nacional sobre tecnología del cultivo de papa, cuyo resumen de las conferencias expuestas se presentan en esta memoria.

Dejo expresa constancia de mi agradecimiento a todos los Instructores y Conferencistas que intervinieron en el presente curso, y que al permitirnos publicar sus exposiciones, han facilitado la preparación de la presente publicación que sin lugar a dudas será de gran utilidad para los Especialistas, agricultores y demás personas interesadas en el cultivo racional de la papa; igualmente a los organizadores directos y participantes del curso, sin cuyo concurso decidido no hubiera sido posible el conseguir el éxito alcanzado en la ejecución del certamen.

Ing. Marco Peñaherrera G.,
DIRECTOR GENERAL DE DESARROLLO AGRICOLA.

Quito, Septiembre/ 1974

INTRODUCCION

Organizado por la Dirección General de Desarrollo Agrícola, a través del Programa de Tubérculos y Raíces y por el Centro Internacional de la Papa (CIP), se llevó a efecto del 9 al 20 de Septiembre de 1.974, el Primer Curso Nacional sobre Tecnología del Cultivo de Papa, en la Estación Experimental "Santa Catalina".

En el presente compendio, se resume la conferencia de los diferentes Instructores del Curso, siendo por tanto personales sus puntos de vista.

Esperamos que hayan podido cumplirse los objetivos del Certámen, y que su fruto sea positivo en el desarrollo agrícola del país.

Quito, Septiembre de 1974

Los Directivos del Curso

BOSQUEJO DEL PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA ESTUDIOS
DE NEMATODOS

Ing. Mario Defaz *

1. La más completa, y por lo tanto, la mejor muestra consiste, de plantas y tierra de la rizófera de la planta.
2. Las muestras deben ser razonablemente representativas de la extensión implicada, si es sólo parte de una sola planta, una hilera, o una plantación extensa.
3. Las muestras deben mantenerse de manera tal que los nemátodos presentes no mueran por exceso de calor o desecación al llegar al laboratorio o antes de su procesamiento.

MUESTRAS DE TIERRA Y PLANTAS

1. Tierra con:

Nemátodos formadores de quistes

- a. Secas
Recuperadas por flotación o flotamiento
- b. Húmedas
Decantamiento y tamizado

Nemátodos no formadores de quistes

- a. Embudo Baermann
- b. Decantamiento y tamizado
- c. Combinación de ambos
- d. Observación directa

2. Plantas con:

Nemátodos endo y/ó ectoparásitos

- a. Examen directo
De raíces y follaje con nemátodos, ó
Con síntomas del daño causado por los nemátodos
- b. Separación de nemátodos
 1. Rastrillado
 2. Humedecimiento

* Nematólogo de la Estación Experimental Santa Catalina

3. Embudo Baermann
 4. Técnica de extracción de Seinhorst
 5. Método de incubación
 6. Mezclado y tamizado
- c. Impregnación in situ
1. Método del ácido ósmico
 2. Método del lactofenol

SEPARACION DE LOS NEMATODOS DEL SUELO

Nemátodos formadores de quistes

a. Los quistes secos flotarán en la superficie del agua cuando ésta se añade a la muestra. El material flotante es entonces vertido, cernido, recogido con cuchara espumadera, o de cualquier otra manera, y luego colocados en un tamiz de 25 mallas acoplado en uno de 60 mallas, ambos tamices son lavados cuidadosamente con agua. El residuo del tamiz de 60 mallas es lavado y luego distribuido en capas delgadas en vidrio de reloj de Syracuse antes de buscar los quistes bajo el microscopio binocular para disección.

La tierra puede deliberadamente secarse, o dejarla secar para permitir que los quistes estén en situación de flotar.

b. Los quistes húmedos, aunque se hundan, o floten, pueden recogerse de la tierra húmeda removiendo la tierra con un balde de agua, permitiendo que se decante rápidamente, y luego pasando la suspensión decantada a través de tamices de 25 y 60 mallas. El proceso es repetido hasta que en el balde sólo quede arena y cascajo. El residuo del tamiz de 60 mallas es examinado para ver si existen quistes de nemátodos.

Se ha encontrado un colorante diferencial que tiñe los residuos y deja los quistes sin teñir, facilitando el hallazgo de quistes aún en muestras poco infestadas. (Taylor, A. L., J. Feldmesser y G. Fassuliotis, 1952). Los colorantes convenientes para este propósito son: verde llano, verde brillante, verde malaquita y violeta genciana. El tiempo requerido para el teñido depende de la concentración del colorante. Pueden hacerse satisfactorias coloraciones de una hora con un gramo de verde llano en 4.000 ml. de agua, o un gramo de verde brillante o violeta genciana en 32.000 ml. de agua, o un gramo de verde de malaquita en 64.000 ml. de agua; cuando se efectúan coloraciones de un día a otro se requiere la mitad de las concentraciones de estas soluciones.

Nemátodos no formadores de quistes

No se debe permitir nunca que el suelo que contiene nemátodos formadores de quistes se sequen porque algunas especies mueren por desecación, y en todo caso el número de formas recuperables de la muestra será reducido por desecación.

a. Los embudos Baermann sostienen pequeñas cantidades de tierra de donde los nemátodos pueden ser extraídos, mayormente como resultado de su propio esfuerzo como se ha explicado previamente. Pueden colocarse por lo tanto, pequeñas muestras en el embudo sin ningún tratamiento anterior.

Las partículas de tierra tienden más a asentarse dentro del embudo y luego de un corto período, sacarlas con una pequeña cantidad de agua y volverlas a colocar arriba en el embudo. Esta práctica da como resultado muestras menos oscurecidas por los residuos, facilitando así el examen de los nemátodos en el vidrio de reloj de Syracuse dentro del cual las suspensiones de nemátodos han sido vertidas del embudo.

Deben retirarse pequeños volúmenes de agua de los embudos periódicamente por un período de 12 a 24 horas, o más si se desea. El agua en el embudo deberá mantenerse en un nivel que sumerja la muestra.

b. Decantamiento y tamizado es el método más usado para muestras, promediando de alrededor de medio litro o talvez de un litro. El principio del decantamiento comprende el lavado de los "nemátodos libres" para separarlos de las partículas de tierra removiendo la muestra en agua, permitiendo que las partículas de tierra más grandes se asienten momentáneamente, y luego vertiendo el líquido proveniente de este precipitado, en el cual están suspendidos los nemátodos. Los tamices trabajan en dos maneras para sacar las diferentes clases y tamaños de nemátodos de la suspensión de nemátodos que es vertida sobre los tamices. Si el diámetro del nemátodo es mayor que aquel de la abertura del tamiz, el nemátodo es retenido por el tamiz. Sin embargo si el diámetro del nemátodo es menor que el de la abertura del tamiz, el nemátodo pasará a través del tamiz al menos que el sea cogido y quede colgado a través de los alambres del tamiz. Esto último ocurre con muchos de los nemátodos parásitos vegetales de forma típica Anguilula, los cuales tienen un cuerpo de un diámetro menor que el de las aberturas de un diámetro de 44 mm., de las más fina rejilla de 325 mallas. La siguiente tabla ilustra la relación que existe entre el número de mallas del tamiz con el valor del tamiz en el procesamiento de muestras con nemátodos.

No. de Mallas

25	Retiene residuos y partículas grandes de tierra	Muy grandes para pasar a través del tamiz
50-60	Retiene nemátodos formadores de quistes	Muy grandes para pasar a través del tamiz.
100	Retiene nemátodos en forma de Anguilula de gran tamaño	
200	Retiene nemátodos de la mayoría de los tamaños excepto las	Muchos de los nemátodos son cogidos solamente cuando

	formas más pequeñas	do cuelgan entre los alambres de mallas.
270	Retiene todo tamaño de nemátodos el agua sedimentada - fluye a su través rápidamente	
325	Retiene nemátodos de todo tamaño el agua sedimentada fluye aunque lentamente.	Con excepción de los nemátodos grandes que no pueden pasar a través de las aberturas de 270 a 325.

Es aparente que más de un lavado de la tierra debe requerirse para lograr casi todos los nemátodos en suspensión. También más de una pasada a través de la fina malla del tamiz será necesaria para coger los nemátodos que solamente pueden cogerse cuando cuelgan por casualidad entre las mallas.

Un buen compromiso entre la velocidad y la eficiencia en el procesamiento de muestras de tierra, consiste en dos o tres lavados de la muestra y el pasaje de la suspensión precipitada a través de la más fina malla, cinco veces separadamente, retirando y conservando los residuos de este tamiz luego de cada pasada. La elección de tamices dependerá del objetivo que se tenga en mente, una buena serie general consiste de: Malla 25 para retirar residuos grandes y partículas de tierra; malla 60 si se requieren formas de quistes, de otra manera es eliminado de la serie; y malla 270 para retener todos los otros nemátodos. La de 325 obstruye demasiado pronto con casi todas las tierras menos de las de tipo arenoso. Generalmente se requieren cinco tamizaciones con un tamiz de 270 mallas en el tiempo que se requiere sólo un tamizado o dos con la de 325. Debe recordarse que es necesario repetidas tamizaciones para lograr capturar especies de nemátodos pequeños que solamente se cogen cuando por casualidad cuelgan de la malla fina del tamiz. Por lo tanto la ventaja reside en el más fino tamiz que permite el rápido flujo del agua sedimentada a su través.

Puede ser de valor anotar que los tamices pueden hacerse de tela, si es necesario improvisar. En realidad, algunos trabajadores utilizan tamices de seda fina, o tela de molino de harina como la serie más fina de mallas.

c. Combinación de Decantamiento y Tamizado con el Método del Embudo Baermann

El valor de la combinación de estos dos métodos es procesar una muestra de tierra (Christie y Perry, 1.951) reside en la ausencia de residuos y partículas de tierra que resulta cuando los residuos de los tamices son colocados en un embudo Baermann por 24 horas. Una reciente modifi-

cación de éste método (Feder y Feldmesse, 1.954) sustituye un embudo de vidrio Buchner por el método usual del embudo Baermann. Esto permite el uso de la filtración al vacío. Este método es también de valor general en el manipuleo de los nemátodos en suspensión en fijadores, colorantes, desinfectantes, soluciones de agua tóxicos.

d. La observación directa de muy pequeñas muestras de tierra remojadas en agua en vidrios de reloj, es una manera de encontrar nemátodos, la cual puede ser de valor bajo ciertas condiciones. El tiempo que consume, y la lenta naturaleza de tal técnica limita su uso general. Este método es, por supuesto, el método más perfecto de recuperar todos los nemátodos de una muestra, vivos o muertos. Sin embargo, la pequeñez de la muestra deja duda sobre su valor representativo.

UBICACION Y REPARACION DE LOS NEMATODOS DE LOS TEJIDOS VEGETALES

a. El examen directo de los tejidos vegetales es a menudo una parte importante en el procesado de la muestra vegetal con el fin de encontrar nemátodos y descubrir la evidencia de sus actividades. Esto último es frecuentemente la única huella de la presencia de nemátodos del tipo ectoparasitario y de alimentación externa particularmente cuando una muestra inadecuada de tierra acompaña al espécimen. El uso del microscopio binocular estereoscópico y de disección ayuda al examen de las partes de la planta sospechosa. Muchas veces es necesario sumergir el material en una fuente poca profunda llena de agua, cuando la estructura de finas raíces es examinada, o cuando se busca nemátodos en la superficie de la planta.

El típico nemátodo de forma de Anguila es usualmente visto como una forma resplandeciente, blanca o transparente, casi siempre notado por el movimiento de su cuerpo. A menudo las hembras sedentarias hinchadas, o quistes son opalescentes, pero pueden variar en colores desde el blanco, a marillo hasta marrón. Algunas formas pueden ser oscurecidas por la matriz de huevos, o por el conjunto de pequeñas partículas adheridas a ellas. Casi siempre es necesario raspar el tejido de la planta. Muchas veces sin apariencia de tener lesiones pueden contener más formas parasitarias que áreas evidentemente deterioradas.

Mayormente no se debe considerar de un exacto valor diagnóstico los síntomas de enfermedad causada por nemátodos, porque otros organismos y condiciones tienen similar efecto en las plantas. La mejor regla es hacer diagnóstico sobre la base de las formas de nemátodos recogidos de los tejidos infectados, o en el caso de ectoparásitos de la raíz, sobre la base de nemátodos recogidos de la rizófera. Sin embargo tiene considerable valor el uso de los síntomas de las plantas como huellas de la posibilidad de nemátodos parásitos de plantas que estén atacadas. Por lo tanto las raíces son revisadas para encontrar agallas o nódulos, lesiones, costras corticales, marchitez, puntas de raíces muertas y dis

torsiones. El follaje es examinado para ver si existen lesiones, decoloramiento, y distorsiones.

b. La separación de los nemátodos de los tejidos vegetales puede hacerse de muchas maneras, dependiendo la selección en la clase de nemátodo comprometido, el tipo y tamaño de la muestra y la cantidad de nemátodos requeridos.

1. Frecuentemente la manera en la cual las muestras vegetales son examinadas primero es raspando partes de la planta enferma dentro de un cristal de reloj lleno de agua, y recogiendo los nemátodos para su identificación.

2. El remojo prolongado de pequeñas fracciones de la planta en agua puede ser necesario para recuperación de nemátodos de leves infestaciones o de tejidos que se han secado. Cortando o partiendo las partes de la planta en pequeños trocitos facilita la libertad o movimiento de nemátodos de los tejidos en todos los métodos sugeridos aquí. Un inofensivo agente remojador tal como el Triton que también puede tener valor cuando se añade al agua usada para lavar o remojar las muestras en cualquiera de estos métodos.

3. La técnica del embudo Baermann es aplicable a los tejidos vegetales de la misma manera que con las muestras de tierra. Las partes de la planta son reducidas a pedazos y sumergidas en agua en el embudo. Como el decaimiento de los tejidos puede desarrollarse rápidamente, y es dañino a los nemátodos, pequeñas porciones del líquido deben retirarse frecuentemente del embudo y añadirse agua limpia aerada. Si fuese necesario una retención prolongada de las partes de la planta en el embudo, es mejor transferir los tejidos a otro embudo conteniendo agua limpia cada uno o dos días.

4. La técnica de extracción Seinorst, Seinorsto (1.950) ha ideado un aparato de extracción que elimina el defecto arriba mencionado de la excesiva contaminación bacterial, y la consiguiente reducción de oxígeno en el agua. El material infestado es colocado en embudos de la manera usual y rociados con una lluvia de agua de las boquillas de mangueras colocadas arriba. El exceso de agua que no cae en los embudos es recogido en bandejas y se desliza fuera. El agua rociada pasa lentamente alrededor y a través de los tejidos en el embudo, sale suavemente del tallo del embudo dentro de las bandejas chatas abajo. Los nemátodos extraídos se asientan en el fondo de estas bandejas colectoras y el exceso de agua pasa a través de los desagües. Los nemátodos pueden ser colectados y concentrados y están listos para su uso o examen.

5. El método de incubación propuesto por Young (1.954) demostró ser más eficiente que la técnica del embudo de Baermann para la recuperación de los nemátodos minadores y de pradera de las raíces del aguacate. En este método, las raíces lavadas son colectadas y tapadas con un recipiente cubierto tal como los frascos de conservan Mason,

con una pequeña cantidad de agua para mantener una atmósfera húmeda y son incubados a la temperatura ambiente.

Dentro de las pocas horas, los nemátodos se comienzan a acumular con la pequeña cantidad de agua que cae de las raíces al fondo del recipiente. Estos nemátodos son coleccionados para su examen en vidrios de reloj de Syracuse. Por medio de adiciones ocasionales de agua de una botella o pipeta, se mantiene el frasco con agua, que cuando cae sobre las raíces hace bajar más nemátodos. Las raíces pueden conservarse por períodos hasta de varias semanas si se tiene la precaución de mantener una pequeña cantidad de agua en el recipiente. Si los cultivos se contaminan demasiado, pueden ser lavados dentro de los frascos con varios cambios de agua. Los nemátodos pueden recogerse de esta agua mediante el uso del procedimiento combinado del embudo de Baermann y tamiz.

Algunas mejoras sugeridas para esta técnica, comprende la partición de las raíces a lo largo, el despojo de la corteza de las raíces más grandes, y el uso de antibióticos y otros inhibidores bacteriales, los cuales son inofensivos a los nemátodos de estilete, como por ejemplo la penicilina propionato de calcio, y las sulfas. Estos materiales pueden también tener valor para retardar el crecimiento de contaminación en el agua contenida en el embudo Baermann.

6. El método de la licuadora y tamizado desarrollado por Taylor y Loegereing (1.953) es un medio esencial de separar los nemátodos de los tejidos vegetales para que puedan ser recogidos por medio de tamiz. El método es rápido porque no depende de la actividad de los nemátodos para desprenderse de los tejidos. El método debe usarse con precaución, si las infestaciones son leves, ya que algunos de los especímenes pueden ser destruidos por la acción de los cuchillos, o no ser desprendidos de los tejidos vegetales. En la práctica, las partes de la planta son cortadas en pequeños trozos y colocados en la licuadora en un pequeño volumen de agua. La licuadora se opera por 10 - 20 segundos ó hasta que las partes de la planta son reducidos a pequeños fragmentos. La suspensión es pasada simultáneamente a través de un tamiz de 25 mallas para separar las partículas grandes de residuos, a través de una malla de 60 para separar nemátodos formadores de quistes y hembras de heterodera mario ni (*Meloydogyne* sp.), y a través de un tamiz de 200 o de 325 mallas para tamaños y tipos de nemátodos.

Este método es también útil para coger pedazos de la cutícula de los nemátodos hembras de la raíz, libres de su contenido interno para su examen y para obtener microfotos de los dibujos perineales. El residuo del tamiz de 60 mallas es revisado para ver si existen estos fragmentos que serán muy numerosos y fáciles de reconocer si se han usado raíces muy infestadas. También pueden tener mucho valor en este proceso los colorantes diferenciales anteriormente mencionados, para ser usado en las técnicas de recuperación de nemátodos que forman quistes.