

PROYECTO DE NEMATICIDAS

Aplicación agrícola

Meloidogyne spp.

- 1. Cultivo de tomates**
- 2. Cultivo de parásitos**
- 3. Ensayos nematicidas**
- 4. Caracterización de cepas**

1. Cultivo de tomates

-PROTOCOLO DE ESTERILIZACIÓN DE SEMILLAS DE TOMATE

-PROTOCOLO DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE TOMATE

-PROTOCOLO DE CULTIVO DE PLANTINES DE TOMATE IN-VITRO (ESTERILIDAD):

Medio de cultivo para crecer plantines de tomate in-vitro

Germinación de semillas de tomate en medio de cultivo

-PROTOCOLO DE CULTIVO DE PLANTINES DE TOMATE EN MACETA

PROTOCOLO DE ESTERILIZACIÓN DE SEMILLAS DE TOMATE

- Trabajando en esterilidad, colocar semillas de tomate en tubos de 15 ml estériles.
- Agregar 6 ml de solución de lavandina al 2.75% en H₂O_d estéril. Utilizar lavandina comercial (5.5%) sin agregados. De este modo se puede agregar primero el agua y luego la lavandina en partes iguales 1:1.
- Mezclar por inversión durante 10 minutos (Reducir el tiempo de inversión a 5 min produce un retardo en la germinación).
- Dejar sedimentar las semillas y retirar el sobrenadante (volcar cubriendo con la tapa para evitar el descarte de semillas).
- Realizar 6 lavados con H₂O_d estéril llevándolo hasta volumen final de 10 ml. Invertir el tubo unos segundos y dejar decantar las semillas. Retirar el sobrenadante entre lavados.
- En el último lavado, retirar con pipeta el agua y dejar 1 ml en el tubo. Preparar una placa de petri con papel secante estéril en la base. Volcar las semillas sobre el papel.

PROTOCOLO DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE TOMATE

- Se procede a realizar el protocolo de esterilización de semillas de tomate, efectuando una modificación del protocolo en el último paso.
- En el último lavado, retirar con pipeta el agua y dejar 1 ml en el tubo y preparar una placa de petri de 2 cm de espesor (placas de cultivo de células) con un papel secante estéril en la base. Volcar las semillas sobre el papel y humedecer la superficie del mismo con H₂O_d estéril.
- Colocar papel film sellando la placa y cubrir con papel aluminio. Mantener en oscuridad ON a temperatura ambiente (20-25°C).
- Al día siguiente, colocar la placa en un cuarto iluminado a 23°C.
- En aproximadamente 2-3 días las semillas comienzan a germinar. A partir del quinto-sexto día los cotiledones pueden ser trasplantados a macetas.

❖ **Alternativa:** Las semillas estériles pueden ser colocadas en placas con agar 2% estéril preparado en H₂O_d estéril, lo que les permiten germinar.

PROTOCOLO DE CULTIVO DE PLANTINES DE TOMATE IN-VITRO (ESTERILIDAD)

Medio de cultivo para crecer plantines de tomate in-vitro

- Medio de cultivo Murashige y Skoog al 0.5X (1/2MS) sin agregado de vitaminas.
- 0.8% Agar (buena calidad, ej.; Britania)
- 1% Sacarosa
- H₂O_d
- pH 5.8 (Medir antes de incorporar el agar). El pH debe ser regulado por agregado de KOH 3M y HCl 37%, el empleo de NaOH resulta tóxico para las plantas.
- Esterilizar en autoclave.
- Antibióticos (Atb) y antimicóticos (Atm) previamente filtrados con filtro de 0.2 um, pueden ser incorporados al medio de cultivo estéril. Algunos ejemplos de ellos son; Stock de Cefotaxima (Atb) 90 mg/ml en DMSO (1000X), se emplea a Cf de 90 ug/ml. Stock de Nistatina (Atm) 5 mg/ml en DMSO (500X), se emplea a Cf de 10 ug/ml. Stock

de Amphotericina B (Atm) 250 ug/ml en H₂O_d (100X), se emplea a Cf de 2.5 ug/ml. La rifampicina también puede ser empleada como Atm.

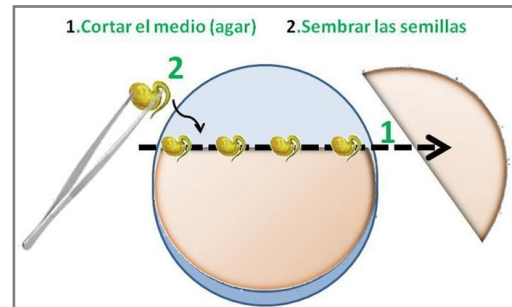
- ❖ **Importante:** En plantas es recomendable no superar el 0.1% de DMSO. A niveles de 1% de DMSO las plantas podrían estresarse. Por otra parte, para ensayos con nematodos no es conveniente superar el 1%. En el modelo *C.elegans* la concentración máxima estándar de trabajo con DMSO es 1%.
- ❖ **Alternativa:** Puede emplearse medio nutritivo de Gamborg B5 con 20 g / l de sacarosa.

Germinación de semillas de tomate en medio de cultivo

-Una vez esterilizadas las semillas, con una pinza estéril colocarlas sobre placas o frascos (con tapa acrílica) con medio de cultivo. Si se emplean placas de cultivo de células (2 cm de alto), primero realizar un corte en el agar como se muestra en el esquema.

-Sellar la placa/frasco con un film y cubrir con papel metálico. Mantener en oscuridad ON a temperatura ambiente (22-25°C).

-Al día siguiente, colocarlas en la cámara de crecimiento con luz (23°C). Aproximadamente en 48 hs comenzarán a germinar. Una vez germinada colocar la placa en posición vertical. Una vez que la raíz haya alcanzado el largo deseado, colocar nuevamente la placa en forma horizontal.



PROTOCOLO DE CULTIVO DE PLANTINES DE TOMATE EN MACETA

- Una vez esterilizadas las semillas y germinadas sobre papel de filtro húmedo, a partir del quinto-sexto día, los cotiledones pueden ser trasplantados a macetas.

-La composición del sustrato a emplear será arena, perlita y vermiculita en relación 1:1:1. Los materiales deben ser enjuagados con H₂O_d estéril y esterilizados antes de ser empleados. La arena colocada en un contenedor, podría ser autoclavada 2 veces. Entre cada proceso de esterilizado, dejar los contenedores dentro del autoclave y al día siguiente esterilizar por segunda vez. Colocar los distintos contenedores con arena, perlita y vermiculita en estufa de secado.

-Limpiar las macetas a emplear con alcohol 70% y colocar en la base de la maceta (lado interno) una gasa o papel secante estéril para impedir que se filtre la arena.

-Realizar la mezcla arena:perlita:vermiculita en relación 1:1:1 y colocar en las macetas. Humedecer con H₂O_d estéril.

-Generar perforaciones en la mezcla para trasplantar los cotiledones (3 por maceta). Una vez plantados, cubrir con la mezcla las raíces y regar con un fertilizante apto para hortalizas (Ej. Fertifox total, se preparan 5ml por litro de H₂O_d estéril y se suministra a las plantas cada dos semanas).

-Las plantas se colocan en un cuarto de crecimiento a aproximadamente 23°C con ciclos luz-oscuridad (Al menos 6-8 hs de oscuridad al día) y se mantienen siempre húmedas.

-El pH del sustrato debe ser medido regularmente con tiras de control, debido a que el pH óptimo de crecimiento del tomate es 5.8. En caso de registrar un pH diferente, puede realizarse el riego con agua con el pH regulado mediante el agregado de KOH 3M.

2. Cultivo de parásitos

- OBTENCIÓN DE PARÁSITOS J2 A PARTIR DE RAÍCES INFECTADAS
- OBTENCIÓN DE HUEVOS DE PARÁSITOS A PARTIR DE RAÍCES INFECTADAS
- LIMPIEZA DE HUEVOS DE PARÁSITOS EMPLEANDO SOLUCIÓN DE HIPOCLORITO
- LIMPIEZA DE HUEVOS EMPLEANDO SOLUCIÓN DE HIPOCLORITO Y VACÍO
- LIMPIEZA DE LARVAS J2 DE ROTÍFEROS PROVENIENTES DE MUESTRAS DE SUELO Y OTRAS PARTÍCULAS (GRADIENTE DE SACAROSA)

Consideraciones del inóculo:

Jóvenes larvas J2, masas de huevos, o suspensiones de huevo se pueden usar como inóculo. Sin embargo, son muchas las ventajas al utilizar una suspensión de huevos obtenidos con hipoclorito de sodio (el hipoclorito de sodio disuelve la matriz gelatinosa y libera los huevos) y ha sido la metodología más utilizada para inocular nematodos (Hussey y Barker, 1973). Las ventajas de este procedimiento son: (a) es un procedimiento sencillo y rápido para la obtención de grandes cantidades de inóculo; (b) el inóculo es fácilmente estandarizado para inoculaciones reproducibles; (c) el inóculo se distribuya uniformemente alrededor de los sistemas de raíces; (d) los huevos son esterilizados superficialmente; y (e) el inóculo no se ve afectado negativamente por la manipulación del procedimiento. Jóvenes J2 o masas de huevos también se pueden utilizar como inóculo. El uso de juveniles como inóculo da una estimación muy fiable de la sincronización y el nivel de infección y puede ser preferible en estudios más detallados de resistencia. Sin embargo, los jóvenes son más sensibles a la manipulación y la infectividad se pierde más rápidamente con el almacenamiento. Las masas de huevos, además de ser difíciles de recoger, no permiten una fácil estandarización del inóculo, el inóculo no se puede dispersar en el suelo, y puede albergar microorganismos patógenos que serán introducidos en el suelo. Sin embargo permite la obtención de cultivos axénicos.

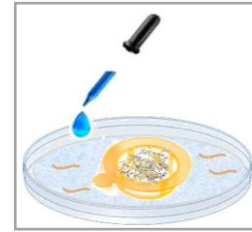
REFERENCIA:

PLANT RESISTANCE TO PARASITIC. Starr, J.L.; Cook, R.; Bridge, J.

Chapter 3 - Root-knot Nematodes: Meloidogyne Species. Hussey, R.S. and Janssen, G.J.W.

OBTENCIÓN DE PARÁSITOS J2 A PARTIR DE RAÍCES INFECTADAS

- En una placa de 2 cm de alto colocar una malla para células (mesh) de 70 um (Biologix, Corning-Falcon, GBO).
- Cortar pequeños fragmentos de raíces con nódulos de infección y colocarlos dentro del canasto con la malla.
- Colocar en la placa de petri H2O_d estéril hasta que el agua entre en contacto con las raíces.
- Dependiendo del grado de infección, rápidamente podrán visualizarse larvas J2 en el agua.
- Utilizando una pipeta, recolectar el líquido en un tubo de polipropileno de 15 ml. Centrifugar durante 3 min a 1500 rpm.
- Descartar el sobrenadante y realizar el recuento en lupa del número de larvas J2/ml de muestra. Realizar el recuento por triplicado y calcular el valor promedio.



- ❖ **Alternativa:** En lugar de la malla, puede emplearse un tejido de poro pequeño o tela bual.

OBTENCIÓN DE HUEVOS DE PARÁSITOS A PARTIR DE RAÍCES INFECTADAS

- Colocar pequeños fragmentos de raíz en un tubo de 15 ml y realizar dos lavados con H2O_d estéril (volcar cubriendo con la tapa para evitar el descarte de las raíces).
- Una vez enjuagadas las raíces, agregar 7 ml de solución de lavandina diluida 1/10 (si la lavandina comercial es al 5.5%, se emplea a una concentración final de trabajo de 0.55%).
- Agitar por inversión las raíces con lavandina durante 4 minutos. Transvasar el sobrenadante a un tubo estéril con cuidado de no pasar los restos de raíz (el sobrenadante contiene los huevos).
- Completar con H2O_d estéril, el tubo que contiene el sobrenadante. Invertir el tubo 4 veces y luego centrifugar durante 3 minutos a 1500 rpm.
- Descartar el sobrenadante con cuidado de no perder el pellet.
- Repetir el lavado 2 veces con H2O_d estéril. Al finalizar, resuspender el pellet en un pequeño volumen de H2O_d estéril. En lupa, realizar el recuento del número de huevos/ml de muestra. Realizar el recuento por triplicado y calcular el valor promedio.

- ❖ **Alternativa:** Una concentración final de trabajo de hipoclorito de 1% puede ser empleada.

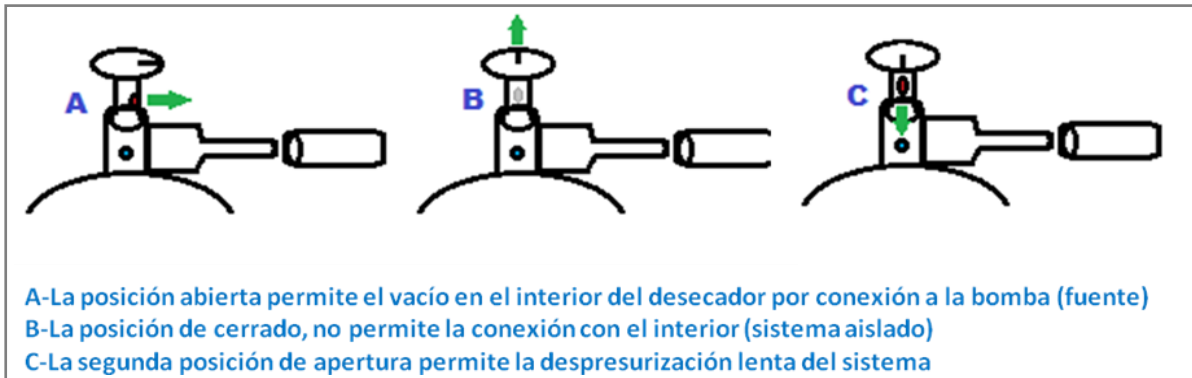
LIMPIEZA DE HUEVOS DE PARÁSITOS EMPLEANDO SOLUCIÓN DE HIPOCLORITO

- El protocolo es el mismo de “**Obtención de huevos de parásitos a partir de raíces infectadas**”. Tener en cuenta, que mientras más vieja es la muestra, más difícil serán de limpiar las masas de huevos.

LIMPIEZA DE HUEVOS EMPLEANDO SOLUCIÓN DE HIPOCLORITO Y VACÍO

Mediante utilización de hipoclorito y presión negativa (en desecador):

- Seleccionar el agente desecante más apropiados para la muestra a desecar (Ej. Cloruro de calcio, silica).
- Colocar el deshidratante dentro de una cápsula de porcelana.
- Levantar la placa del desecador y colocar la placa de porcelana. Colocar nuevamente la placa.
- La muestra con solución de hipoclorito al 1% se coloca en un frasco/placa y se cubre con papel aluminio o parafilm. Se ajusta bien y luego se hacen pequeñas perforaciones sobre el papel empleado (permite la deshidratación).
- Colocar una fina capa de grasa sobre las partes internas del desecador (base y tapa). Se procede a taparlo.
- Abrir la fuente de vacío.
- La llave de vacío del desecador se cierra (B).
- Colocar la manguera de vacío en la boca del desecador.
- La llave de vacío del desecador se abre (A).
- Realizar vacío hasta un mínimo de 10 minutos, hasta que el vacío sea constante en el desecador. Vacío con presión negativa de 30 cm Hg.
- Cerrar la llave del desecador (B) y desconectar la manguera de vacío.
- Cerrar la fuente de vacío.
- La apertura del desecador debe llevarse a cabo de modo lento, colocando un papel de filtro sobre el orificio del tubo lateral al mismo tiempo que se gira la llave del desecador hasta el (C).
- Una vez que las presiones son iguales, se abre el desecador y se retira la muestra. Lavar los huevos estériles con H₂O_d estéril.



REFERENCIA:

METHODS AND TECHNIQUES FOR NEMATOLGY . By J. van Bezooijen . Revised version 2006

LIMPIEZA DE LARVAS J2 DE ROTÍFEROS PROVENIENTES DE MUESTRAS DE SUELO Y OTRAS PARTÍCULAS (GRADIENTE DE SACAROSA)

- Las larvas eclosionadas en H₂O_d (Protocolo “**Obtención de parásitos J2 a partir de raíces infectadas**”) son colocadas en un tubo de 15 ml y centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos. Controlar que las larvas no hayan quedado adheridas a la pared del tubo.
- Descartar el sobrenadante con cuidado y resuspender el pellet con los parásitos en un volumen final de 2 ml de H₂O_d. Transvasar los parásitos (2ml) a un eppendorf de 2 ml (las larvas se adhieren mucho al plástico por lo que no es conveniente trabajar en tubos de 15 ml o 50 ml). Centrifugar a 2500 rpm durante 5 min para concentrarlos y dejarlos resuspendidos en 1 ml de H₂O_d.
- Agregar sobre la superficie lentamente 1 ml (Relación 1:1) de solución de sacarosa estéril 60% preparada en H₂O_d.
- Mezclar por inversión.
- Centrifugar a 50g (630rpm / 660rpm) por 1min e inmediatamente centrifugar a 1150g (3000 rpm / 3180rpm) por 3 min.
- Los rotíferos, restos celulares y pequeñas partículas quedarán en el fondo del tubo. Mientras que en la superficie quedarán resuspendidas los juveniles J2.
- Aproximadamente tomar con pipeta 1 ml del sobrenadante (chequear la presencia de parásitos a trasluz). Sacar con cuidado desde la superficie (La mayoría de los gusanos quedan flotando) y colocarlos en un nuevo eppendorf de 2 ml).
- Realizar lavados de las larvas mediante agregado de H₂O_d hasta completar el volumen del tubo. Invertir y centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos. Descartar el sobrenadante y repetir el lavado del pellet 3 veces.
- Realizar el recuento de juveniles J2, para ello resuspender el pellet de larvas en un pequeño volumen de H₂O_d estéril. En lupa, realizar el recuento del número de J2/ml de muestra. Realizar el recuento por triplicado y calcular el valor promedio.

❖ **Importante:** Este protocolo es útil para ensayos de actividad locomotora registrados por un sistema automático sensible (Ej. WMicrotracker). Los rotíferos generan señales positivas falsas.

3. Ensayos nematocidas

**A: TOXICIDAD DE COMPUESTOS EN PLACAS DE 96 POCILLOS (FONDO PLANO).
SISTEMA DE LECTURA EN MICROTRACKER ONE.**

B:QUIMIOTAXIS DE RAÍZ:

Ensayo en porta objeto

Ensayos en placas de pocillos (atracción a la raíz)

Ensayos en placas de pocillos (atracción a un compuesto)

C:ENSAYOS DE INFECCION:

Evaluación en placa de petri, de la entrada de larvas J2 en la raíz

Infección de plantines de tomate en maceta e in-vitro

Sistema de evaluación de nematocidas (método barker)

Recuento de huevos a partir de raíz

Recuento de hembras y J2 a partir de raíz.

Tinción de nematodos con fucsina ácida – glicerina

Tinción de masas de huevos con erio Glaucine

**A: TOXICIDAD DE COMPUESTOS EN PLACAS DE 96 POCILLOS (FONDO PLANO).
SISTEMA DE LECTURA EN MICROTRACKER ONE.**

- Obtener una población de animales J2 libres de rotíferos. Ver la sección del **“Limpieza de larvas J2 de rotíferos provenientes de muestras de suelo y otras partículas (gradiente de sacarosa)”**.
- Realizar el recuento de juveniles J2, para ello resuspender el pellet de larvas (obtenido del protocolo anterior) en un pequeño volumen de H2O estéril. En lupa, realizar el recuento del número de J2/ml de muestra. Realizar el recuento por triplicado y calcular el valor promedio. Realizar el ensayo con 100 J2 por pocillo.
- En un Falcon de 15 ml estéril, para completar una placa de 96 pocillos, colocar un volumen correspondiente a 10000 larvas J2 totales. Agitar suavemente la suspensión con larvas antes de realizar el pasaje.
- Llevar la solución a un volumen final de 9 ml con H2O estéril.
- Homogeneizar la mezcla (Vórtex suave).
- Cargar un volumen de 90 ul de la solución de larvas con una micropipeta multichannel P200 con tips estériles y descargarlo en cada pocillo de la placa.
- Controlar en lupa que cada pocillo contenga un número similar de larvas. Cada pocillo contendrá un número aproximado de 100 J2.
- Medir al menos 30 minutos el registro basal en el Microtracker. Temperatura 20°C.
- Una vez finalizado el registro basal, en cada pocillo colocar 10 ul de cada droga a testear. Tener en cuenta que la concentración stock de la droga será diluida 10 veces al ser agregada sobre los 90 ul de solución de larvas. Por lo tanto la concentración de trabajo será 1/10 de la solución stock. Se recomienda preparar el stock al 10X.
- Cubrir la placa con un film para evitar efectos no deseados de compuestos volátiles y llevar nuevamente a registrar por el tiempo que demande el ensayo. Temperatura 20°C.

- ❖ **Importante:** Para eliminar la estática de los nematodos y evitar que queden adheridos al fondo del pocillo, puede emplearse una concentración final de tritón al 0.01%. para armar la solución de larvas J2
- ❖ **Importante:** El número de larvas J2/pocillo a emplear, se calculó mediante una prueba de estandarización en WMicrotracker. Un número de 70 larvas muestra actividades de 40-70 por hora; 100 larvas muestra actividades de 90-100 por hora; 150 larvas muestra actividades de 130-140 por hora; 200 larvas parecen llegar a un plató, siendo los valores similares a 150 J2. Es importante emplear cantidades de J2 que superen las 70 larvas ya que en cantidades menores el registro de actividad es muy bajo. Sin embargo, esta información podrá variar de acuerdo a la variedad de parásito empleada.

B: QUIMIOTAXIS DE RAÍZ

- Preparar Pluronic F-127 gel al 23%. Para hacer 100 ml de gel, adherir 23 Gr de Pluronic F-127 a 80 ml de H2O fría estéril a 4°C y llevar a volumen. Disolver por agitación durante 24 hs en frío. El gel disuelto debe guardarse a 15°C y también se guardarán las alícuotas fraccionadas para el experimento.
- ❖ **Importante:** Pluronic F-127 gel no es tóxico, disuelve en Frío (4°C) y forma un gel a temperatura ambiente. A 15°C entre concentraciones de 20-30% también permanece como líquido.

Ensayo en porta objeto

- Un volumen de solución de gel de 80 ul en 10 mM de sodio fosfato, pH 7 , a 15°C contiendo 150 larvas J2 se pipetea sobre cada portaobjetos de vidrio (cinco).
- A partir de una planta de tomate de 5 días de edad, se corta una punta estéril de raíz de 1 cm de longitud y se coloca en el centro del gel, luego se cubre con un cubreobjetos de vidrio.
- Se realiza el recuento de larvas J2 iniciales sobre la raíz.
- Los portaobjetos se transfieren a placas de Petri forradas con papel de filtro húmedo (cámara húmeda) y se incuban a temperatura ambiente .
- A partir de 6 h después del inicio del ensayo, los J2 deberán ser controlados, fotografiando cada 2 min durante 20 min .

- ❖ **Importante:** Colocar el cubre objeto puede favorecer la formación de acumulos de larvas. Es importante no colocar más de 200 J2.
- ❖ **Importante:** Luego de 6 hs, el Pluronic gel comienza a deshidratarse. Por ello, en caso de requerir realizar ensayos de largo plazo se debe optar por los ensayos en placa.

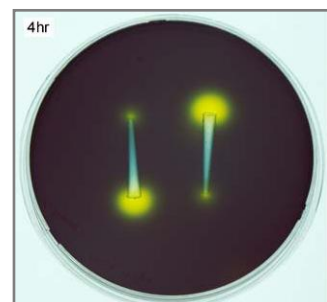
Ensayos en placas de pocillos (atracción a la raíz)

- Cada punta de la raíz se coloca en placas de 12 pocillos o de 6 pocillos conteniendo larvas J2 suspendidas en 1 o 3 ml de gel Pluronic , respectivamente. Se utilizarán 200 J2 en placas de 12 pocillos y 600 J2 en placas de 6 pocillos. Es decir, 200 larvas J2/ml de gel.
- El número de nematodos que tocan las terminales de la punta de la raíz (los últimos 1.5 mm) deben contarse al inicio de la infección y a las 2 hs post-infección (ver **alternativa**).
- Diez repeticiones deben incluirse en cada experimento y repetirse al menos dos veces.

- ❖ **Importante:** Trabajar con un número de larvas J2 > a 500/ml aumenta la formación de agregados de nematodos, lo cual puede interferir con el ensayo. Una cantidad de 200 J2/ml genera acumulos al cabo de 2 días para M.hapla y la misma cantidad de J2 genera acumulos al cabo de 1 día para M.incógnita y M.Javanica.
- ❖ **Importante:** Las semillas de tomate deben, preferentemente, ser germinadas en agar al 2%. Una vez germinada, se podrá trabajar con el fragmento de raíz.
- ❖ **Alternativa:** M.incógnita y M.Javanica deben ser registradas de 2-3 hs post infección, mientras que M.hapla de 5 a 6 hs post-infección. Esto se debe a que en las condiciones experimentales, M.incógnita y M.Javanica infectan más rápidamente que M.hapla y al mismo tiempo producen infecciones más dañinas en la raíz.

Ensayos en placas de pocillos (atracción a un compuesto)

- Dispensers de químicos podrán ser preparados a partir de tips estándar de 200 ul, cortando 5 mm desde el extremo pequeño y 20 mm desde el extremo grande. Las soluciones químicas se prepararán en 23 % Pluronic F -127 y serán mantenidas en hielo. Aproximadamente 100 ul de la solución de ensayo se pipeteará en cada dispensador químico, que se mantiene horizontalmente mientras la solución se deja gelificar a RT.
- Una placa de Petri con una solución de Pluronic F-127 conteniendo nematodos dispersos (300 J2/ml) se lleva a RT y se



colocan dos dispensers en anti paralelo (en paralelo pero con polaridad invertida). Se ubicaran a no menos de 3 cm del borde de la placa de Petri , antes de que el gel se forme evitando la formación de burbujas en las zonas terminales del dispenser. El dispenser apoyado sobre la superficie de la placa muestra la parte de mayor tamaño a la altura del nivel del gel (3.4 mm de profundidad).

-Iniciado el ensayo, se cuenta el número de nematodos en un diámetro de 5 mm centrada en el extremo pequeño de la punta de la pipeta. Luego se procederá a contar a las 5 y 24 hs. El control a emplear será un dispensador conteniendo 23 % Pluronic F-127 en agua. Los diferentes tamaños de las dos aberturas de distribución permite examinar dos gradientes de concentración diferente al mismo tiempo, y los dispensadores de a pares en cada placa permite realizar el ensayo por duplicado. Incluir al menos tres placas por cada experimento con 2 repeticiones.

Para obtener una visión más amplia de los patrones de distribución de los nematodos en respuesta a gradientes químicos, se tomaran fotografías con poco aumento con una cámara digital mediante el uso de alumbrado lateral y contra un fondo negro.

❖ **Importante:** *Un compuesto atrayente para control positivo puede ser el ácido acético a 0.17M.*

REFERENCIA:

Nematology, 2009, Vol. 11(3), 453-464. Application of Pluronic gel to the study of root-knot nematode behaviour. Congli WANG, Steven LOWER and Valerie M. WILLIAMSON.

J Chem Ecol (2009) 35:1242–1251. Determination of Preferred pH for Root-knot Nematode Aggregation Using Pluronic F-127 Gel. Congli Wang & George Bruening & Valerie M. Williamson.

C:ENSAYOS DE INFECCION

Evaluación en placa de petri, de la entrada de larvas j2 en la raíz

-Verter en placas de petri de 10 cm de diámetro (a 15°C), un volumen de 15 ml de 23 % de gel que contiene Pluronic recién mezclado con larvas J2 (aprox 200-300 J2/ml de gel).

-Aproximadamente se colocan 10 germinaciones de tomate de 3-5 días de edad sobre el gel y se lleva a temperatura ambiente para que el gel solidifique.

-La visualización se realizará a las 6, 24 y 48 hs post-infección. A los 4 días se puede proceder a realizar tinciones con fucsina ácida.

REFERENCIA:

Nematology, 2009, Vol. 11(3), 453-464. Application of Pluronic gel to the study of root-knot nematode behaviour. Congli WANG, Steven LOWER and Valerie M. WILLIAMSON.

Infeción de plantines de tomate en maceta e in-vitro

El número de huevos de nematodos a utilizar para inocular dependerá del tamaño del recipiente de cultivo de las plantas, la idoneidad de la especie de la planta como un anfitrión para los nematodos, las condiciones ambientales, y posiblemente otros factores. Por estas razones, es necesario llevar a cabo pruebas preliminares para determinar la concentración óptima del inóculo para cada situación (Hussey y Boerma, 1981). La concentración a utilizar para el inóculo de huevos obtenidos con 0,525 % NaOCl se basa generalmente en estimar que un 20 a 25 % del porcentaje de los huevos puede eclosionar, aunque la eclosión pueda ser mayor. Luego de la obtención de huevos utilizando NaOCl, se observa mayor proporción de eclosión si las masas de huevos son de mayor edad, ya que tienen una alta proporción de huevos embrionados (Ehwaeti et al., 1998). Para un inóculo de juveniles, de 1 a 2 cm³ de suelo es un buen punto de partida.

Los huevos pueden ser añadidos a una depresión en el suelo en el momento de trasplante de las plántulas, luego de sembrar las semillas o en plantas crecidas a partir de semillas. Los huevos se pueden agregar realizando 2 o 3 depresiones en el suelo alrededor de la base del tallo de las plántulas jóvenes. Los huevos se distribuirán en el suelo, durante el riego de las plantas. La inoculación con juveniles debe retrasarse por un par de semanas después de la siembra o el trasplante de la planta, hasta que haya una buena cantidad de raíces disponible para la infección. El exceso de agua se debe evitar los primeros días post-inoculación con juveniles o huevos.

Cultivos de nematodos pueden ser establecidos a partir de una sola masa de huevos o de una población de campo. El establecimiento de cultivos de una sola masa de huevos (cultivo axénico) asegura el cultivo de una sola especie, pero reduce la variabilidad genética que pueda estar presente si un cultivo se inició a partir de una población de campo (Roberts y Thomason, 1989). Una vez establecido el cultivo, la identidad de la especie debe ser confirmada. La identificación precisa de las especies de nematodos formadores de agallas y la detección de especies mixtas en cultivos de invernadero son problemáticos. Cuatro métodos se utilizan para la identificación de especies y/o control de la pureza de los cultivos stock: (i) fenotipos de isoenzimas de nematodos hembras adultas; (ii) la prueba diferencial de Carolina del Norte; (iii) la morfología de los patrones perineales de nematodos hembras adultas; y (iv) el diagnóstico molecular (Ver sección 4).

-Las infecciones se realizarán en maceta con un número aproximado de 5000 larvas J2.

Alternativamente pueden colocarse masas de huevos en la maceta.

-La obtención de un **cultivo axénico** (una raza) se llevará a cabo por la infección de plantines con una única masa de huevos. Para ello, bajo lupa deberá individualizarse la masa de huevos con una ajuga. La masa íntegra o disgregada será empleada para la infección.

Alternativamente, la masa de huevos puede ser colocada en 0.5% NaOCl por 5 minutos y luego lavada 3 veces con H₂O estéril. Esto permitirá infectar con J2 al dejar incubar los huevos hasta su eclosión a 27°C.

-Las infecciones pueden realizarse en maceta, preferentemente se emplearán plantas de 2 semanas de edad que hayan producido una buena cantidad de raíz. Para crecer las plantas en maceta ver el **“Protocolo de cultivo de plantines de tomate en maceta”**. Antes de proceder a la infección, se deben realizar pequeñas perforaciones a la altura de las raíces donde serán

depositados los parásitos.

-Las infecciones realizadas in-vitro deberán realizarse en esterilidad y será necesario partir de huevos esterilizados para la infección. Para ello puede emplearse el protocolo **“Limpieza de huevos de parásitos empleando solución de hipoclorito”** o la alternativa con vacío. Las contaminaciones con hongos/bacterias pueden reducirse empleando los ATMs y ATBs mencionados en **“Medio de cultivo para crecer plantines de tomate in-vitro”**.

-Luego de un mes post-infección, se deberán controlar las raíces y observar presencia de agallas. Las masas de huevos podrán ser observadas al microscopio.

- ❖ **Importante:** *El tiempo óptimo para recolectar las raíces dependerá del tipo de raza del parásito, de la temperatura del ensayo y de las condiciones del sustrato. Se estima que *M.incógnita* y *M.Javánica* producen agallas con huevos a los 30-45 días post-infección a 27°C (Pablo Gauna).*

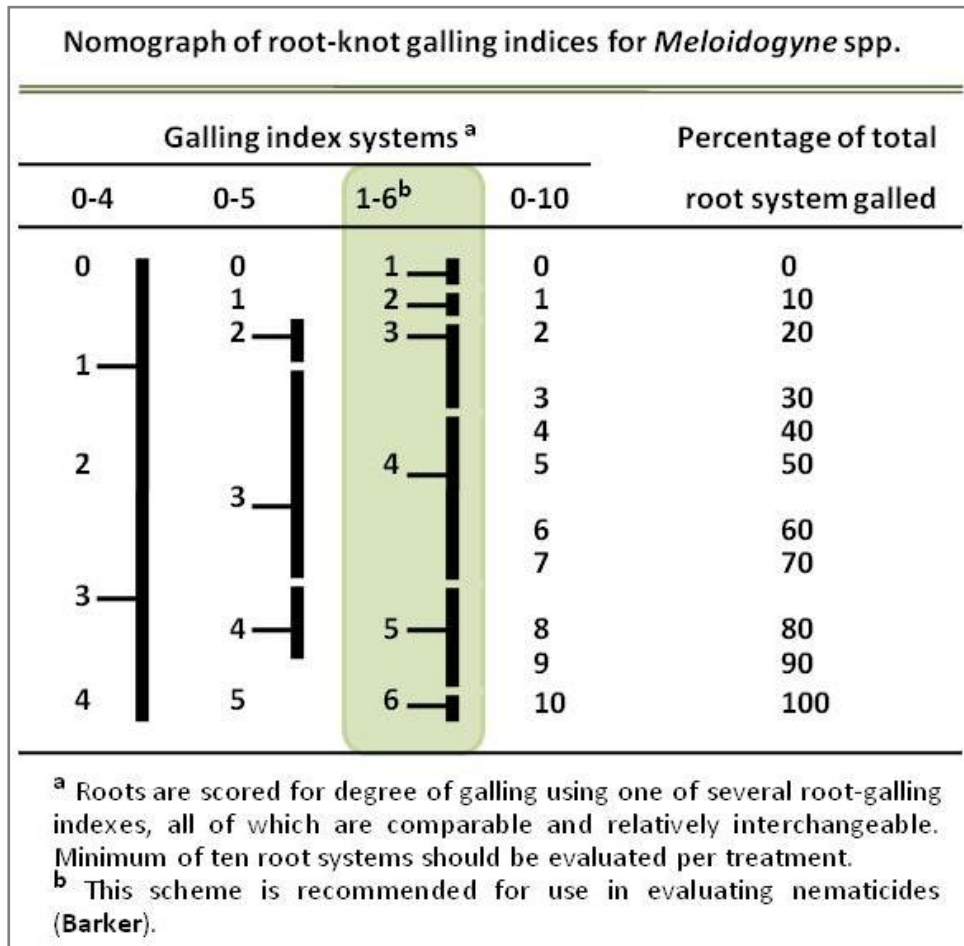
REFERENCIA:

PLANT RESISTANCE TO PARASITIC. Starr, J.L.; Cook, R.; Bridge, J.
Chapter 3 - Root-knot Nematodes: Meloidogyne Species. Hussey, R.S. and Janssen, G.J.W.

Sistema de evaluación de nematocidas (método barker)

-Las raíces infectadas serán evaluadas mediante el método de Barker. Para ello se utilizará la tabla de nomenclado de nivel de infección Sistema Barker 1-6 (Nomograph of root-knot galling índices for *Meloidogyne spp.*).

- Nótese que el índice de 0-10 o el índice porcentual de agallas puede ser extrapolado en la escala de Barker del 1-6. Los valores serán determinados por visualización general de la raíz y evaluando por sectores.



❖ **Importante:** Las infecciones usualmente se encuentran en el valor de escala 4. Un buen nematocida debería asegurar la reducción en escala a un valor 3 de Barker. Los valores extremos de la escala son escasamente observados.

REFERENCIA:

An Advanced Treatise on Meloidogyne. Kenneth Reece Barker, Cathy Cameron Carter, Joseph Neal Sasser Dept. of Plant Pathology, North Carolina State University, 1985 - 223 páginas. Volumen I: Biology and control / Volumen II: Methodology.

PLANT RESISTANCE TO PARASITIC. Starr, J.L.; Cook, R.; Bridge, J.

Chapter 3 - Root-knot Nematodes: Meloidogyne Species. Hussey, R.S. and Janssen, G.J.W.

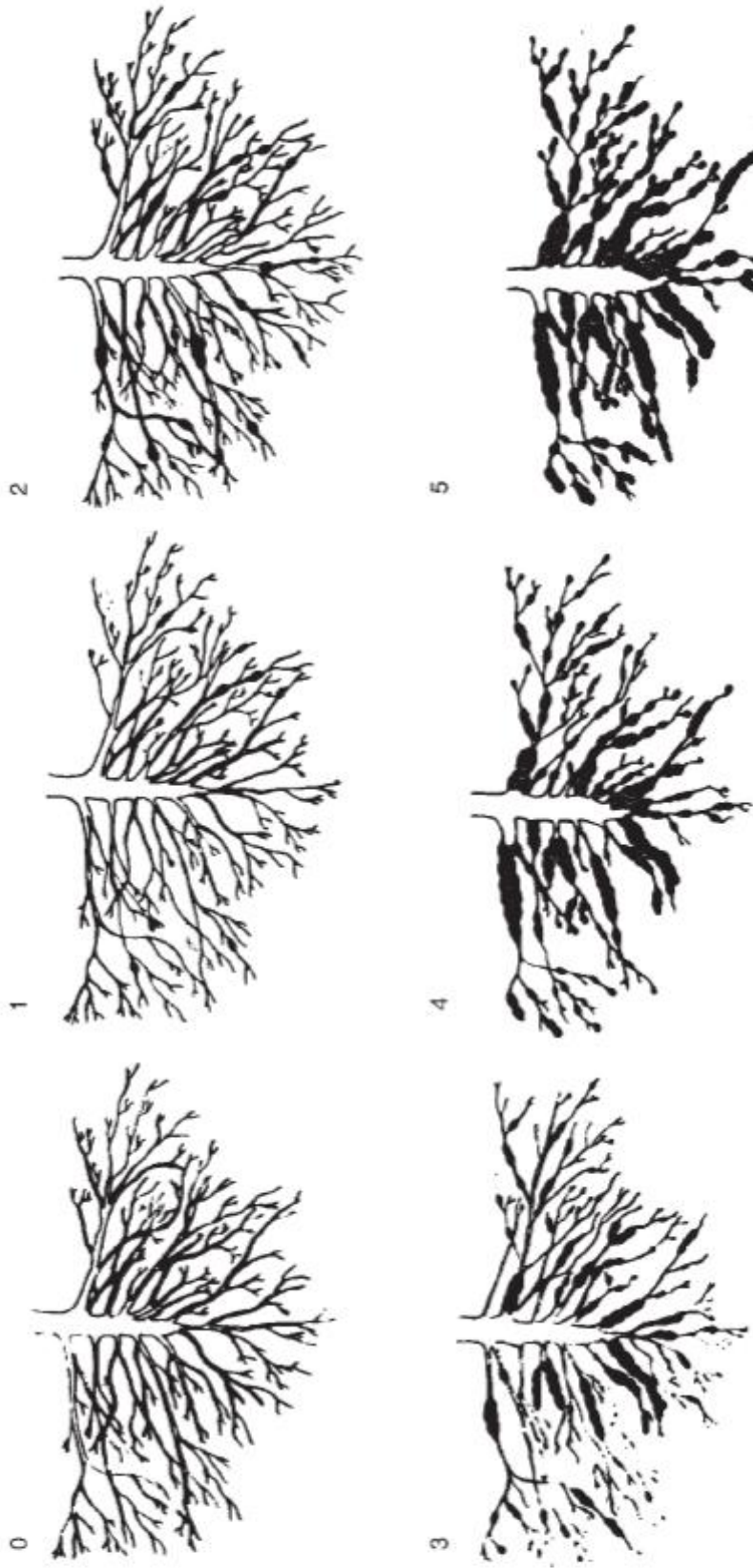
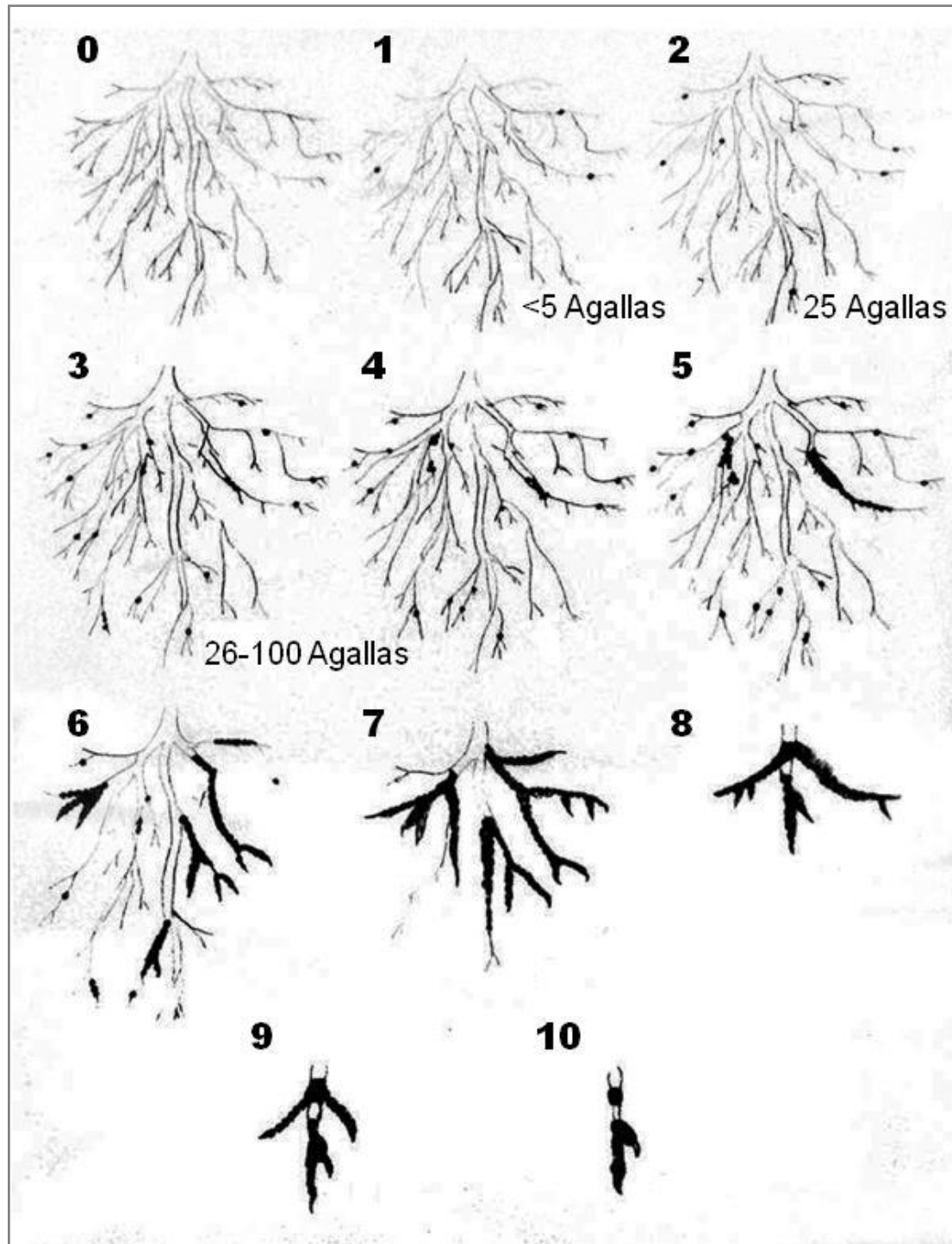


Fig. 3.3. Schematic of a root-knot nematode gall rating system where 0 = no galling, 1 = trace infection with a few small galls, 2 = < 25% roots galled, 3 = 25–50%, 4 = 51–75%, and 5 = > 75% of roots galled. (Drawing courtesy of K.R. Barker.)

El esquema orientativo para la determinación del nivel de infección representado por raíces con agallas numeradas por la escala del 0-10 (Escala de Zeck) puede ser empleado como ayuda para la clasificación:



Explicación del esquema de valoración de la tabla de Zeck:

Valor índice (%)	Grado de contaminación	Explicación del esquema de valoración
0	0	Raigambre sana, no atacada.
1	1	Algunas agallas pequeñas, difíciles de descubrir.
5	2	Pequeñas agallas radicícolas como en <1>, pero más numerosas.
10	3	Gran número de pequeñas agallas radicícolas (Algunas de ellas pueden estar encadenadas entre sí); caracteriza el aspecto de la raigambre, sin inhibir empero seriamente su función.
25	4	Grandes agallas radicícolas comienzan a visualizarse, pero la mayor parte de la raigambre continua funcionando normalmente.
50	5	Un 25% de la raigambre es incapaz de funcionar debido a la presencia de agallas.
75	6	Hasta el 50% de la raigambre es incapaz de funcionar.
90	7	Hasta el 75% de la raigambre es incapaz de funcionar.
100	8	La totalidad de la raigambre está contaminada de agallas, quedando interrumpida la alimentación de la planta; no obstante, la planta misma conserva aún su aspecto verde.
	9	La raigambre está completamente contaminada de agallas, quedando podrida una parte de ella; la planta misma está muriendo.
	10	Planta y raigambre han muerto.

REFERENCIA:

Zeck W.M. 1971. Ein Bonitierungs-schema zur Feldauswertung von Wurzelgallenbefall. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 24 (1): 144–147.

Recuento de huevos a partir de raíz

- Lavar las raíces con agallas de un lote de plantas cosechadas alrededor de 45 a 50 días post-inoculación (si se crecen a temperaturas 25-30°C), cuando se producen los picos de producción de huevos ; Sin embargo , el tiempo puede variar dependiendo de las temperaturas de invernadero. Las plantas viejas con raíces deterioradas no son una buena fuente de inóculo.
- Pesar 5 gramos de raíz, cortarlas y enjuagarlas bien .
- Preparar una solución de hipoclorito de sodio 1.05 % (NaOCl). Mayores concentraciones de NaOCl reducirán la viabilidad del huevo (Hussey y Barker , 1973).

- Colocar las raíces en erlenmeyer de 250 ml (100 ml), añadir 50 ml (20 ml) de la solución de NaOCl 1.05% y sellar con film la parte superior del frasco. Agitar vigorosamente el contenedor de forma manual por 3.5 min. No exponer los huevos a la solución de NaOCl por más tiempo de 4 min . La sobreexposición de huevos a NaOCl reducirá la viabilidad del huevo.
- Rápidamente pasar la solución de NaOCl a través de tamices; una malla de 75 micras de poro (200-mesh) anidado en una de 25 micras de poro (500-mesh). Después de verter la solución de NaOCl, llenar el recipiente con las raíces con agua y dejarlas a un lado.
- Después que la solución de NaOCl ha pasado por los tamices, retirar el tamiz de 75 micras y enjuagar bien los huevos en el tamiz de 25 micras con un chorro de agua para eliminar el NaOCl residual. Por último, enjuagar los huevos/J2 desde el tamiz de 25 micras en un recipiente.
- Cuando se planea recoger los huevos de más de una especie o aislar, empape a fondo todo el equipo en (> 50 ° C) de agua caliente durante 15 minutos entre las colecciones.

❖ **Importante:** *Obtener datos cuantitativos sobre el número de huevos dará una mejor indicación de resistencia a los nematodos formadores de agallas que el número de masas de huevos (Luzzi et al., 1987). El procedimiento descrito para la obtención de inóculo de huevo también se utiliza para recoger los huevos para la determinación del número de huevos por planta o por gramo de raíz. Sin embargo, para obtener huevos con este fin, una concentración de 1.05% de NaOCl se utiliza para maximizar la recuperación de huevos. Una concentración de NaOCl más elevada se puede utilizar para este propósito si la viabilidad del huevo no es una preocupación. El peso en gramos de la raíz fresca debe medirse antes de la obtención de los huevos de modo que los datos de huevo se puedan expresar sobre o por gramo de raíz. Los datos del recuento de huevos pueden ser utilizados para desarrollar un índice de la resistencia (número total de huevos por planta ÷ número de huevos en la planta susceptible estándar) para comparar los genotipos.*

REFERENCIA:

PLANT RESISTANCE TO PARASITIC. Starr, J.L.; Cook, R.; Bridge, J.
Chapter 3 - Root-knot Nematodes: Meloidogyne Species. Hussey , R.S. and Janssen, G.J.W.

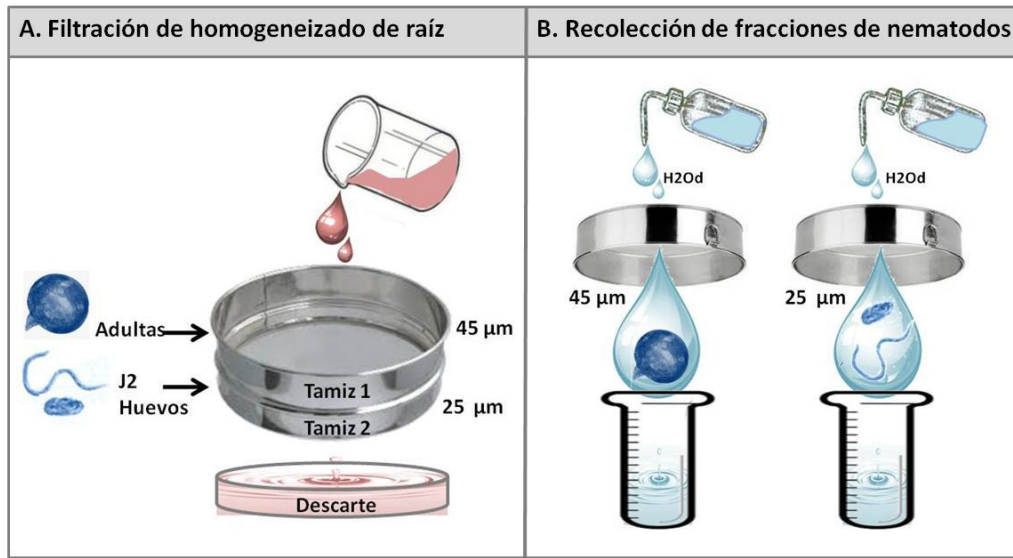
Recuento de hembras y J2 a partir de raíz.

- A partir de una muestra de raíz infectada, pesar 5 gr de la misma para calcular el número de juveniles J2 y hembras adultas (también podría ser empleado para el recuento de huevos).
- Lavar los 5 gr de raíz con H2O y cortarla en fragmentos de 2-3 cm.
- Colocar la raíz pre-lavada en una licuadora y adherir 0.25% de lavandina NaOCl hasta cubrir la raíz. Licuar durante 15-20 seg a baja velocidad hasta homogenizar.
- Pasar el homogeneizado por un primer tamiz de malla 80-200 (180-74 um) para separar los fragmentos grandes y recuperar el filtrado.
- Colocar un tamiz de 45 um anidado en un tamiz de 25 um y un colector de descartes. Pasar el filtrado a través de los tamices (A).
- Luego de colar el homogeneizado, pasar H2O a través de los mismos para barrer restos de

NaOCl y partículas que puedan interferir en la muestra.

-El tamiz de 45 μm retendrá a las hembras adultas y el tamiz de 25 μm retendrá juveniles J2 y huevos. Enjuagar cada tamiz del lado opuesto con H₂O_d, recolectando el lavado en recipientes individuales (B).

-En caso de ser necesario, concentrar las muestras para el recuento mediante centrifugación a 1500 rpm durante 3 minutos. Al finalizar, resuspender el pellet en un pequeño volumen de H₂O_d estéril. En lupa, realizar el recuento del número de huevos, J2, adultas/gramo de muestra. Realizar el recuento por triplicado y calcular el valor promedio.



REFERENCIA:

<http://www.uark.edu/ua/onta/slideShows/presentations/Extraction%20of%20Eggs%20of%20RKN%20Final.pdf>

- ❖ **Alternativa:** El recuento de animales adultos puede realizarse luego de una tinción de nematodos con fucsina ácida, lo cual facilitará la detección de las hembras. El peso de la raíz (1 gr) podrá determinarse antes o al finalizar el recuento. Si se realiza al final, deben lavarse con agua caliente y colocarlas a 100°C para su secado durante aproximadamente 5 días. (Effect of selecte Neotyphodium LolIII isolates on root-knot nematode (*Meloidogyne Marylandi*) numbers in perennial ryegrass. Gwinn, K.D.). Para facilitar la liberación de las hembras, al finalizar el protocolo de tinción con fucsina, se colocan las raíces en glicerol acidificado y agua (1:1), luego se maceran las raíces en licuadora durante 45 segundos resuspendiendolas en 50 ml H₂O_d. El recuento de adultas se realiza sobre 5 ml de muestra (Antagonistic Effects of Some Fluorescent *Pseudomonads* Strains Against Root-Rot Fungi (*Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*) and Root Knot Nematode (*Meloidogyne incógnita*) on Chili (*Capsicum annum*). Syed Abuzar). Las adultas podrían recolectarse sobre una malla de 45 μm para facilitar el recuento.

Tinción de nematodos con fucsina ácida – glicerina

- Segmentos de raíces (1-2 cm) son colocadas en una solución de 1.5% NaOCl (Bleach) en Volumen final. Se dejan en agitación durante 4 minutos.
- Los segmentos de raíz se dejan enjuagar en agua de la canilla durante 30-45 segundos. Mantener en remojo durante 15 minutos para remover el NaOCl residual.
- Retirar el líquido de la raíz y se agrega solución colorante (30 ml de H₂O + 1 ml de colorante).
- La solución con las raíces se calienta y se deja hervir durante 30 segundos.
- Se deja enfriar a RT y luego se retira el excedente de colorante dejando correr agua de la canilla.
- Las raíces son colocadas en 20-30 ml de glicerina acidificada con unas pocas gotas de HCl 5N (2.5 gotas en 20 ml de glicerina).
- Calentar hasta hervor y luego enfriar. Alternativamente, dependiendo de la muestra, se puede sumergir en glicerina precalentada a 40°C.
- Las raíces pueden entonces ser colocadas en portaobjetos cubiertos con cubreobjetos para observarse al microscopio.

COLORANTE: 3.5 gr de fucsina, 250 ml ácido acético y 750 ml de H₂O.

- ❖ **Importante:** El agregado de glicerina permite conservar la muestra durante varios meses con pequeños cambios de contraste.
- ❖ **Calculo:** El ácido clorhídrico comercial es al 37%, lo que equivale a una concentración 10M o 10N.

REFERENCIA:

Journal of Nematology (1983). An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. Byrd, D.W.

Tinción de masas de huevos con erioglaucine

- Lavar las raíces infectadas con agua de la canilla (ej. 45 días post-infección, chequear la presencia de masas de huevos en lupa).
- sumergir las raíces en solución colorante de erioglaucine 0.01% durante 15 minutos hasta teñir las masas de huevos.
- Proceder al recuento de masas de huevos azules.
- Si se desea realizar el recuento de huevos por masa de huevos: tomar 5 masas de huevos de similar tamaño con una aguja y colocarlas individualmente en eppendorfs con 0.5 ml de 0.1% NaOCl para disolver la matriz gelatinosa. Vortexear vigorosamente y realizar en lupa el recuento de huevos por masa.

REFERENCIA:

Competition between the Plant-parasitic Nematodes *Pratylenchus neglectus* and *Meloidogyne chitwoodi*. David bayer

- ❖ **Alternativa:** El recuento de masas de huevos puede realizarse sumergiendo las raíces en solución Phloxine B 0.015% durante 20 minutos, luego de lo cual se enjuagan para eliminar residuos del colorante. Las masas, se visualizaran en rojo. La diferencia con el colorante erioglaucine es su mayor costo en precio. (*Controlling the root-knot nematode, Meloidogyne incognita in cucumber plants using some soil bioagents and some amendments under simulated field condition. Hanan M. Zakaria.*).

4. Caracterización de cepas

-SINGLE WORM PCR (swPCR)

-PRIMERS PARA CLASIFICACIÓN DE *MELOIDOGYNE SPP.*

-MIX DE PCR ESTÁNDAR

-CICLADO DE PCR ESTÁNDAR

SINGLE WORM PCR (swPCR)

Reactivos

Buffer de lisis;

*conservar el stock a -20°C

50mM KCl,

10mM Tris pH 8.3,

2.5mM MgCl₂,

0.45% NP-40,

0.45% Tween-20,

0.01% Gelatin,

Agregar 0.1mg/ml de proteinasa K antes del uso (concentración en Vf)

-Adherir Proteinasa K al buffer de lisis (180 ul buffer de lisis + 20 ul de proteinasa K en stock 1mg/ml).

-Colocar 5 ul del buffer de lisis en la tapa de un tubo eppendorf de 0,2 ml.

-Limpiar 1-4 gusanos en H₂O_d y traspasarlos con ansa al buffer de lisis.

-Centrifugar el tubo durante 15 segundos a 14.000 rpm. Chequear el fondo del tubo en lupa para garantizar la presencia del/los nematodos en el buffer de lisis.

-Congelar los tubos a -80°C durante 1 hora para debilitar las cutículas.

-Realizar el ciclo de lisis. La lisis y liberación del ADN genómico se realizará por calor a 65°C durante 75 minutos, luego la inactivación de la proteinasa K se realizará por calor a 95° por 20 minutos. Finalizar el ciclo a 4°C y mantener hasta el momento de incorporar el mix de PCR.

REFERENCIA:

A genetic mapping system in *Caenorhabditis elegans* based on polymorphic sequence-tagged sites. Williams BD, 1992.

Cloning, sequencing, and mapping of an alpha-actinin gene from the nematode *Caenorhabditis elegans*. Barstead R.J., 1991.

PRIMERS PARA CLASIFICACIÓN DE MELOIDOGYNE SPP.

Nombre	5'-3'	ID primer	Amplificación (pb)
C2F3	GGTCAATGTTTCAGAAATTTGTGG	mDNAmeloid-1A	
1108	TACCTTTGACCAATCACGCT	mDNAmeloid-1B	
HAPLA-1A	CAGGCCCTTCAGCTAAAGA	HAPLA-1A.960pb	960
HAPLA-1B	CTTCGTTGGGGAACTGAAGA	HAPLA-1B.960pb	
HAPLA-2A	TGACGGCGGTGAGTGC GA	HAPLA-2A.610pb	610
HAPLA-2B	TGACGGCGGTACCTCATAG	HAPLA-2B.610pb	
INCOG-1A	TAGGCAGTAGTTGTCTGGG	INCOG-1A.1350pb	1350
INCOG-1B	CAGATATCTCTGCATTGGTGC	INCOG-1B.1350pb	
INCOG-2A	GGGATGTGTAATGCTCCTG	INCOG-2A.399pb	399
INCOG-2B	CCCGCTACACCCTCACTTC	INCOG-2B.399pb	
ARENA-1A	TCGGCGATAGAGGTAATGAC	ARENA-1A.420pb	420
ARENA-1B	TCGGCGATAGACACTACAAC T	ARENA-1B.420pb	
CHITW-1A	TGGAGAGCAGCAGGAGAAAGA	CHITW-1A.800pb	800
CHITW-1B	GGTCTGAGTGAGGACAAGAGTA	CHITW-1B.800pb	
JAVAN-1A	GGTGC GCGATTGAACTGAGC	JAVAN-1A.670pb	670
JAVAN-1B	CAGGCCCTTCAGTGGA ACTATAC	JAVAN-1B.670pb	
Act-4 C.elegans	TGAAGATCCTCACTGAGCGC	Act-4 Fw	En C.elegans 666 pb. Doble banda. Similar en Meloidogyne Spp.
Act-4 C.elegans	AGCACTTGC GGTGGACAATC	Act-4 Rv	

En gris se indican los primers testeados que han amplificado por swPCR.

Región amplificada por el set de primers C2F3/1108: Región variable del DNA mitocondrial (mDNA) COII/16S:

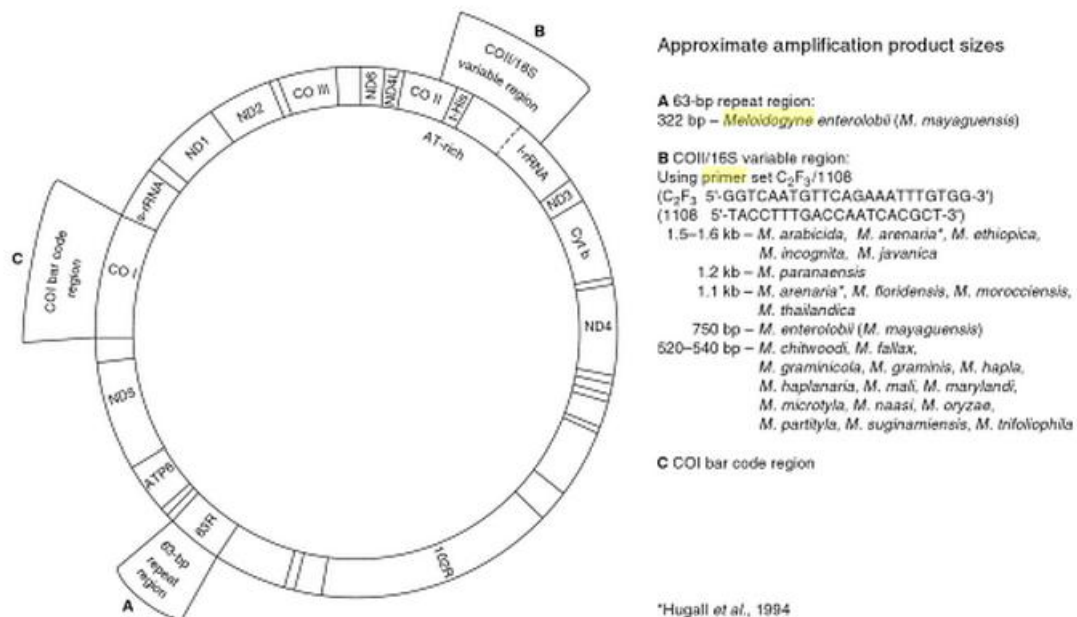


Fig. 4.1. *Meloidogyne* mitochondrial genome structure, showing regions used for diagnostics. (After Okimoto et al., 1991 and sequences from NCBI (US National Center for Biotechnology Information).)

Meloidogyne spp.	Amplicón
<i>M.arabica</i>	1.5-1.6 kb
<i>M.arenaria</i>	
<i>M.ethiopica</i>	
<i>M.incognita</i>	
<i>M.javanica</i>	
<i>M.paranaensis</i>	1.2 kb
<i>M.arenaria</i>	1.1 kb
<i>M.floridensis</i>	
<i>M.morocciensis</i>	
<i>M.thailandica</i>	
<i>M.enterolobii (M.mayaguensis)</i>	750 pb
<i>M.chitwoodi</i>	520-540 pb
<i>M.fallax</i>	
<i>M.graminicola</i>	
<i>M.graminis</i>	
<i>M.hapla</i>	
<i>M.haplanaria</i>	
<i>M.mali</i>	
<i>M.marylandi</i>	
<i>M.microtyla</i>	
<i>M.naasi</i>	
<i>M.oryzae</i>	
<i>M.partityla</i>	
<i>M.suginamiensis</i>	
<i>M.trifoliophila</i>	

MIX DE PCR ESTÁNDAR

PCR	Stock	Cf (uso)	1X
DNA	-	5 ul swPCR o 10-20 ng	5 ul
Primer Fw	5 uM	0.2 uM	1 ul
Primer Rv	5 uM	0.2 uM	1ul
Buffer PCR	10 X	1 X	2.5 ul
dNTPs	5 mM	0.2 mM	1 ul
Mg+2	50 mM	1.5 mM (2mM)	0.75 ul (1 ul)
Taq pol	5 unidades/ul	1 unidad	0.2 ul
H2Od	-		13.55 ul (13.3 ul)
Vf	25 ul		

CICLADO DE PCR ESTÁNDAR

Step	Temperatura °C	Tiempo	Observación
1	94	5 min	Desnaturalización inicial
2	94	40 seg	Desnaturalización
3	50	30 seg	Annealing
4	72	1 min 30 seg	Extensión Aprox 30 seg x Kb
5	32 ciclos	Repite step 2-4	
6	72	5 min	Extensión final
7	10	continuo	hold