

**FITONEMATOLOGIA**

**Manual de Laboratorio**

**Editado por: (1985)**

**B. M. Zuckerman  
Department of Plant Pathology  
University of Massachusetts  
Amherst, Massachusetts**

**W. F. Mai  
Department of Plant Pathology  
Cornell University  
Ithaca, New York**

**y**

**M. B. Harrison  
Department of Plant Pathology  
Cornell University  
Ithaca, New York**

**Versión en Español: (1987)**

**N. Marbán-Mendoza  
Centro de Fitopatología  
Colegio de Postgraduados  
Montecillos, México**

**Publicado por:**

**Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba;  
Costa Rica**

## FITONEMATOLOGIA

### Manual de Laboratorio

La publicación de este manual ha sido posible gracias al apoyo financiero del Proyecto de Manejo Integrado de Plagas MIP/CATIE dentro del contrato 596-0110 con la Agencia Internacional para el Desarrollo AID/ROCAP



El objetivo principal del Proyecto MIP es el de fortalecer la capacidad técnica de las instituciones nacionales y regionales responsables de la protección de los cultivos, mediante la investigación, capacitación y la cooperación técnica.



El CATIE es una institución de carácter científico y educacional, cuyo propósito fundamental es la investigación y la enseñanza de posgrado en el campo de las ciencias agropecuarias y de los recursos naturales renovables aplicados al trópico americano, particularmente en los países de América Central y el Caribe.

## CONTENIDO

			Pag.
	Lista de Colaboradores . . . . .		7
	Prefacio (Obra Original) . . . . .		9
	Prefacio (Versión en Español). . . . .		11
	Agradecimientos. . . . .		12
<b>Ejercicios</b>			
<b><u>Cuantificación Poblacional de Nematodos y Evaluación de Daños</u></b>			
1	K.R. Barker	Métodos para Muestrear Suelos y Procedimientos para el Diagnóstico de Campo . . . . .	13
2	H. Ferris	Precisión y Confiabilidad del Muestreo . . . . .	25
3	H. Ferris	Modelos para la Predicción de Pérdidas en las Cosechas y Decisiones en el Manejo. . . . .	31
<b><u>Identificación de Nematodos</u></b>			
4	J. D. Eisenback	Utilización de las Características de la Cabeza del Macho para la Identificación de Especies de <u>Meloidogyne</u> . . . . .	39
5	M. B. Harrison y W. F. Mai	Clave Ilustrada para la Identificación de 16 Géneros de Nematodos Fitoparásitos. . . . .	49
6	R. F. Myers	Identificación de Especies y Razas de <u>Meloidogyne</u> Mediante la Prueba con Hospedantes Diferenciales. . . . .	71
7	G.O. Poinar, Jr.	Identificación de Familias de Nematodos Entomógenos con los Estadios de Vida Libre . . . . .	77
8	R. D. Riggs	Identificación del Nematodo Enquistado de la Soya Mediante Ensayos con Plantas Diferenciales . . . . .	87
<b><u>Comportamiento de Nematodos</u></b>			
9	A. Jeyaprakash	Comportamiento en la Búsqueda de Hospedantes: Quimiotaxia	91
10	U. Wyss y U. Zunke	La Alimentación "in vitro" de Nematodos Parásitos de la Raíz	95

### Ciclo de Vida de Nematodos

11	R. M. Riedel	Ciclo de Vida y Diseminación de <u>Aphelenchoides fragariae</u> en Begonia Rieger . . . . .	103
12	B. M. Zuckerman	Embriología y Desarrollo de Nematodos . . . . .	107

### Relaciones Parásito-Hospedante: Patogenicidad

13	K. R. Barker	Diseño de Experimentos en Invernadero y Microparcelas para Evaluar Resistencia a Nematodos . . . . .	113
14	V. H. Dropkin	Efecto de los Niveles Graduales de Inóculo en Plantas: <u>Heterodera glycines</u> en Soya . . . . .	121
15	D. T. Kaplan	Respuesta Vegetal a la Infección de Nematodos en Condiciones Axénicas. . . . .	125
16	G. O. Poinar, Jr.	Infección de Insectos por Nematodos Entomógenos de los Géneros <u>Neoaplectana</u> y <u>Heterorhabditis</u> (Rhabditida: Rhabditoidea) . . . . .	131
17	R. M. Riedel	Patogenicidad y Reproductividad de <u>Aphelenchoides ritzemabosi</u> y <u>A. fragariae</u> en Begonia Rieger. . . . .	137

### Asociación de Nematodos con otros Organismos

18	J. R. Bloom	Interacción de <u>Meloidogyne incognita</u> con el Hongo <u>Fusarium oxysporum</u> f. <u>lycopersici</u> en Plantas de Tomate . . . . .	141
19	H-B. Jansson	Hongos Nematófagos - Aislamientos del Suelo . . . . .	145
20	H-B. Jansson	Captura de Nematodos por Hongos Nematófagos . . . . .	149
21	R. M. Riedel	<u>Aphelenchoides fragariae</u> - <u>Xanthomonas begoniae</u> Interacciones en Begonia Rieger . . . . .	155

### Cultivo de Nematodos

22	R. H. Estey	Cultivo de Nematodos Bacteriófagos . . . . .	159
----	-------------	--	-----

23	R. H. Estey	Cultivo de Nematodos Micófagos . . . . .	165
24	R. N. Huettel	Cultivos en Discos de Zanahoria . . . . .	171
25	R. N. Huettel y R. V. Rebois	Cultivo de Nematodos Fi- toparásitos en Explantes Radicales. . . . .	175
26	R. M. Riedel	Establecimiento de <u>Pratylenchus</u> spp en Cultivos Monoxénicos en Tejidos de Callo de Alfalfa	181

**Control de Nematodos**

27	E. P. Caswell e I. J. Thomason	Control de Nematodos Fitoparásitos con Nematicidas	187
28	M. B. Harrison	Uso de Nematicidas y de Tratamientos Térmicos como Herramientas de Diagnóstico	195

**Técnicas**

29	A. Coomans y R. Vanderhaeghen	Pruebas de Toxicidad "in vitro" . . . . .	201
30	V. H. Dropkin	Métodos para Obtención de Alicuotas . . . . .	207
31	A. P. Elliott y G. W. Bird	Uso y Cuidado de Micros- copios de Campo Claro. . . .	211
32	A. M. Golden	Preparación y Montaje de Nematodos para Observaciones al Microscopio . . . . .	221
33	R. S. Hussey	Tinción de Nematodos en Tejidos Vegetales. . . . .	231
34	L. Niblack y R. S. Hussey	Extracción de Nematodos del Suelo y de Tejidos Vegetales . . . . .	235
35	R. D. Riggs	Preparación de Patrones Perineales de <u>Meloidogyne</u> spp y de Conos Vulvares de Nematodos Enquistados. . . .	243
	Apéndices . . . . .		247

## LISTA DE COLABORADORES

- K. R. Barker; Department of Plant Pathology, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina 27695
- G. W. Bird; Department of Entomology, Michigan State University, East Lansing, Michigan 48824
- J. R. Bloom; Department of Plant Pathology, Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania 16802
- E. P. Caswell; Department of Nematology, University of California, Riverside, California 92521
- A. Coomans; Instituut voor Dierkunde, Rijksuniversiteit Gent, Gent, Belgium
- V. H. Dropkin; Department of Plant Pathology, University of Missouri, Columbia, Missouri 65211
- J. D. Eisenback; Department of Plant Pathology, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina 27695
- Alma Elliott; Division of Nematology, University of California, Davis, California 95616
- R. H. Estey; Department of Plant Science, MacDonal College, McGill University, Ste. Anne de Bellevue, P. Q. Canada H9X 1C0
- H. Ferris; Division of Nematology, University of California, Davis, California 95616
- A. M. Golden; Nematology Laboratory, USDA, ARS, Beltsville, Maryland 20705
- M. B. Harrison; Department of Plant Pathology, Cornell University, Ithaca, New York 14853
- R. N. Huettel; USDA, ARS, Nematology Laboratory, BARC-West, Beltsville, Maryland 20705
- R. S. Hussey; Department of Plant Pathology, University of Georgia, Athens, Georgia 30602
- H-B. Jansson; Department of Microbial Ecology, University of Lund, Helgonavagen 5, S-233 62 Lund, Sweden
- A. Jeyaprakash; Department of Plant Pathology, University of Massachusetts, Amherst, Massachusetts 01003

- Dr. D. T. Kaplan; USDA, ARS, 2120 Camden Road, Orlando,  
Florida 32803
- W. F. Mai; Department of Plant Pathology, Cornell University,  
Ithaca, New York 14853
- R. F. Myers; Department of Plant Pathology, Rutgers University,  
New Brunswick, New Jersey 08903
- T. N. Niblack; Department of Plant Pathology, University of  
Georgia, Athens, Georgia 30602
- G. O. Poinar, Jr.; Department of Entomology, University of  
California, Berkeley, California 94720
- R. V. Rebois; USDA, ARS, Nematology Laboratory, BARC-West,  
Beltsville, Maryland 20705
- R. M. Riedel; Department of Plant Pathology, Ohio State  
University, Columbus, Ohio 42310
- R. D. Riggs; Department of Plant Pathology, University of  
Arkansas, Fayetteville, Arkansas 72701
- Ivan Thomason; Department of Nematology, University of  
California, Riverside, California 92521
- R. Vanderhaeghen; Instituut voor Dierkunde Rijksuniversiteit  
Gent, Gent, Belgium
- Urs Wyss; Institut fur Phytopathologie, Universitat Kiel,  
Olshausenstrasse 40-60, D-2300 Kiel 1, Federal Republic of  
Germany
- B. M. Zuckerman; Department of Plant Pathology, University of  
Massachusetts, Amherst, Massachusetts 01003
- U. Zunke; Institut fur Phytopathologie, Universitat Kiel,  
Olshausenstrasse 40-60, D 2300 Kiel 1, Federal Republic of  
Germany

## Prefacio

Desde hace algún tiempo, ha existido gran necesidad de un manual de laboratorio que se utilice conjuntamente con la enseñanza de la fitonematología. El presente esfuerzo se encamina esencialmente a remediar esta situación. Más de la mitad de las personas que colaboran en esta obra, poseen una gran experiencia en la enseñanza de la fitonematología. Su selección se hizo en base a que se ajustaban perfectamente bien a nuestro objetivo de reunir un número de ejercicios de laboratorio reproducibles, fruto de su gran experiencia. Los ejercicios restantes los hemos denominado como "Experimentales", en el sentido de que por lo general no se utilizan en los cursos normales de nematología. En esta categoría se incluyen diversos ejercicios para ilustrar el desarrollo y comportamiento de los nematodos, mediante la utilización de nematodos bacteriófagos, hongos nematófagos y nematodos entomófagos. Con la inclusión de estos ejercicios, pretendemos dar a los estudiantes una visión más amplia de los nematodos y su medio ecológico. Estos últimos ejercicios no se han utilizado previamente en la enseñanza, por lo que su modificación podría ser necesaria.

Un requisito indispensable para llevar a cabo los ejercicios de laboratorio en fitonematología, es la disponibilidad inmediata de nematodos vivos e identificados hasta especie. Para satisfacer en parte esta necesidad, en el Apéndice 2 hemos enlistado los distintos lugares donde se pueden obtener algunos cultivos de nematodos de vida libre o fitoparásitos. Esperamos que en un futuro cercano, podamos contar con un centro repositorio de cultivos de nematodos, similar en sus funciones a la Colección Americana de Cultivos Tipo.

Los editores creemos que este manual de laboratorio representa el primer paso en la obtención de una obra concebida sobre bases muy amplias para la fitonematología. También esperamos que sea de utilidad para los cursos de fitopatología, donde los nematodos son una faceta de su vasto conocimiento.

Bert M. Zuckerman

William F. Mai

Martin B. Harrison

## Prefacio (versión en español)

Por una causa u otra, los países de Hispanoamérica casi siempre han tenido dificultades al acceso de información generada en países desarrollados. La actual crisis mundial sólo ha magnificado en grado superlativo este hecho innegable que, evidentemente, repercute en forma negativa en el desarrollo y progreso de los pueblos. Bajo estas circunstancias, muchas obras escritas por lo general en el idioma Inglés, y excelentemente logradas para estimular la enseñanza e investigación de una área de conocimientos en particular, tardan mucho tiempo en llegar a los profesores, investigadores, técnicos y estudiantes de países de habla hispana; con frecuencia, cuando dichas obras apenas empiezan a ser conocidas, mucha de la información contenida es ya obsoleta.

La nematología no escapa al contexto referido y de aquí nuestro modesto esfuerzo para coadyuvar a contrarrestar esta situación, traduciendo al Español este Manual de Laboratorio. Por su gran calidad didáctica, éste viene a llenar un enorme vacío en la nematología mundial.

Mi estancia sabática en el Departamento de Fitopatología de la Universidad de Massachusetts en Amherst, fue fundamental para la realización del presente esfuerzo. El haber podido hacer uso de la infraestructura de esta institución de gran prestigio resultó crucial, así como la convivencia diaria con B. M. Zuckerman y la relativa cercanía de W. F. Mai y M. B. Harrison, que me permitieron discutir y aclarar las naturales dudas y controversias que surgen en una empresa de esta naturaleza. Cuando fue preciso, contactamos al autor colaborador para esclarecer y, de ser necesario, modificar el escrito original. De esta manera, los pocos cambios introducidos en el contenido y formato de la obra original, hicieron posible mantener la fluidez del texto, reduciendo casi por completo la incorporación de "Notas del traductor". También decidimos omitir los nombres vulgares de nematodos originados de vocablos en Inglés, los cuales, traducidos al Español, carecen totalmente de significado. En estos casos, los redujimos al conocimiento universal citándolos por su nombre científico. Con la excepción justificada de un solo ejercicio, todas las dimensiones restantes fueron transformadas al Sistema Métrico Decimal.

Los compiladores y el suscrito desean que esta obra contribuya al desarrollo de la nematología en los países de Hispanoamérica.

Nahúm Marbán Mendoza  
Amherst, Massachusetts.

## Agradecimientos

Queremos hacer notar nuestro profundo agradecimiento a todas las entidades y personas que en alguna forma contribuyeron a la eficaz realización de la presente obra. Deseamos expresar nuestro reconocimiento a todas las personas que nos revisaron los distintos escritos y que en su oportunidad nos dieron excelentes sugerencias. En ningún caso, son ellos responsables de cualquier error u omisión que se pueda advertir. En este aspecto nos ayudaron en forma particular Héctor Laguette, Rodrigo Tarté, Jorge Pinochet y Pedro Barreda. Nuestras particulares gracias a María de Lourdes Moreno de Marbán quien hizo la transcripción mecanográfica de las diferentes versiones preliminares y la definitiva de la obra. Finalmente consignamos nuestro reconocimiento a las siguientes instituciones cuyo apoyo fue definitivo para la realización de este proyecto: The University of Massachusetts Agricultural Experiment Station, Amherst, Massachusetts; Colegio de Postgraduados, Montecillos, México, Cornell International Agricultural Program y Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.

## Ejercicio 1

### Métodos para Muestrear Suelos y Procedimientos para el Diagnóstico de Campo

K. R. Barker  
Plant Pathology Department  
North Carolina State University  
Raleigh, NC 27695-7616

#### 1. Objetivos

Este ejercicio de laboratorio demuestra las facetas clave para el muestreo de nematodos fitoparásitos, incluye la recolección y extracción de los componentes del suelo y las raíces, la observación de los signos y síntomas así como la diagnosis de enfermedades asociadas. La primera consideración de enorme importancia en la diagnosis de problemas con enfermedades, es el tiempo para muestrear a los nematodos fitoparásitos. Es necesario familiarizarse con los ciclos de vida de los nematodos involucrados con el propósito de seleccionar el tiempo ideal para muestrear, particularmente con los cultivos anuales. Sin embargo, si se desconocen las especies de nematodos involucradas, el muestrear casi al final de la mitad de la estación o cerca de la cosecha, será de gran utilidad para el presente ejercicio, ya que es durante este período cuando las poblaciones de nematodos se encuentran casi en su nivel más alto. Por el contrario, los muestreos tempranos (primavera) nos proveerán de los datos más valiosos para relacionar las densidades y tipos de nematodos en el futuro desempeño del cultivo; a pesar que aquí, los niveles poblacionales son típicamente más bajos, comparados con aquellos obtenidos en la proximidad de la cosecha (Fig. 1).

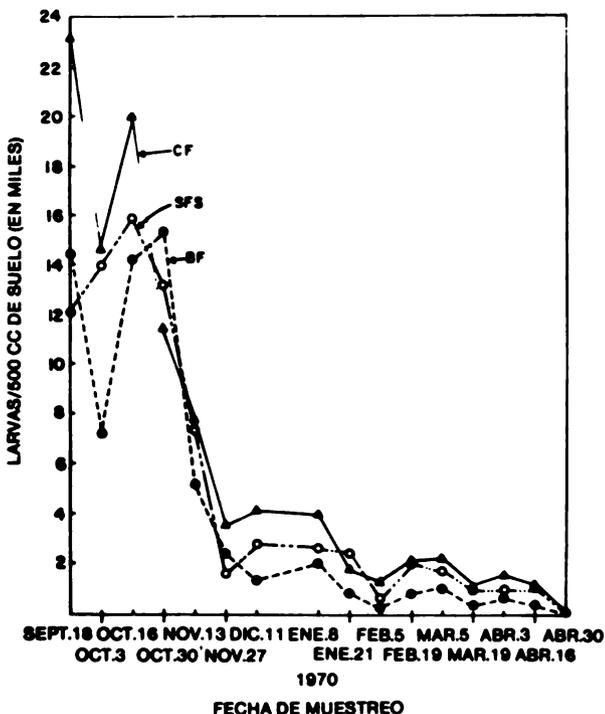


Fig. 1. Declinación de la población de Meloidogyne incognita (juveniles = larvas), en el cultivo del tabaco, determinada por 3 métodos de extracción: CF = centrifugación y flotación; TFA = tamizado y flotación con azúcar y EB = Embudo de Baermann.

Como objetivos del muestreo se pueden también incluir los reconocimientos generales, la diagnosis, los propósitos de asesoría y la experimentación. La presente discusión estará limitada al muestreo para la diagnosis de enfermedades. Aún para este propósito, los principales componentes de las poblaciones que se encuentren en el suelo, en las raíces y/o follaje, deben evaluarse. También deben tomarse en cuenta los diferentes estadios (huevecillos, juveniles, adultos o quistes, como en los casos de las especies de Heterodera y Globodera), que pudieran estar presentes (Barker, 1985a).

## 2. Tiempo Requerido

El tiempo total requerido oscilará entre una y tres horas, dependiendo de la conveniencia de los sitios de muestreo. Una vez que los planes para el muestreo hayan finalizado, la recolección de 2-4 muestras de suelo deberá tomar aproximadamente entre 10-20 minutos, si los sitios se ubican de manera conveniente al laboratorio. El proceso de extracción requerirá de otros 20 min aproximadamente. Las determinaciones de las cantidades y tipos de nematodos presentes en las muestras, requerirá de no más de 5-10 min, dependiendo de la experiencia que se tenga en la identificación de especies.

## 3. Procedimiento

Ya se encuentran disponibles trabajos completos sobre el muestreo y la diagnosis de problemas con nematodos (Barker, 1985a). Debido a que la presente discusión podría no aplicarse a todas las situaciones, la consulta de otras publicaciones sobre metodologías y problemas asociados (Barker, 1978, 1985a, b; Southey, 1970), podría ser de gran utilidad.

### A. Preparativos y observaciones preliminares

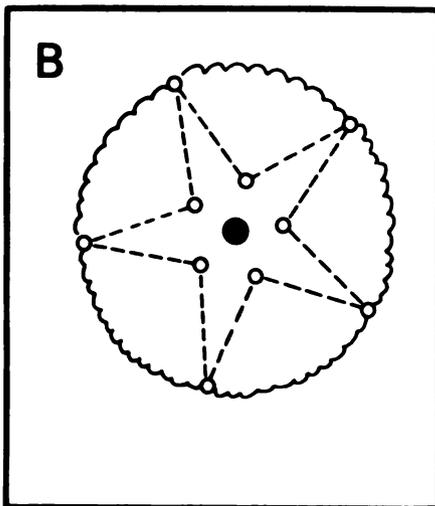
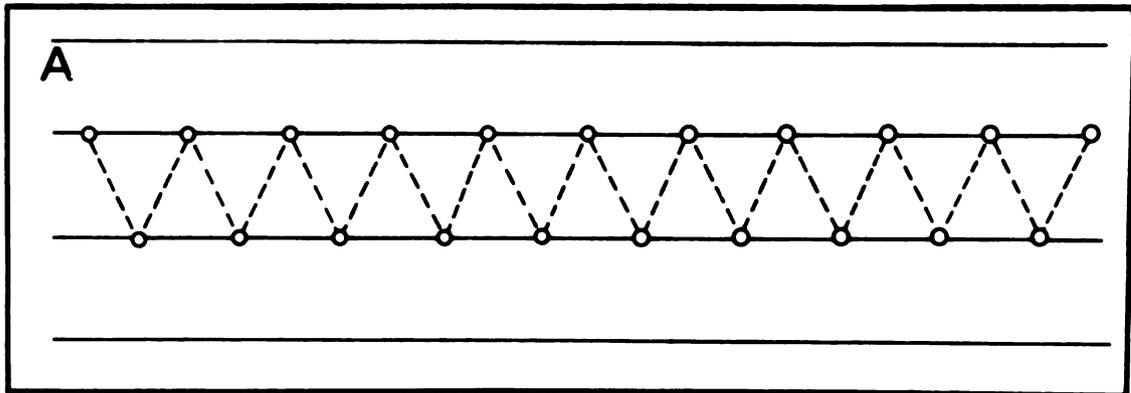
La planificación cuidadosa, así como la obtención del equipo necesario, son condiciones esenciales antes de muestrear. La selección de dos o más nichos ecológicos diferentes, nos permitirá observar diferencias interesantes en las especies de nematodos. Los sitios sugeridos incluyen, como primera localidad, a plantas perennes como: Ornamentales, los bosques o pastizales, y un cultivo anual como segunda. Si éste último no se encuentra disponible o no es conveniente, entonces un césped podría servir como segundo sitio de muestreo. Los croquis de las áreas a muestrear, así como las anotaciones correspondientes a las especies de plantas sujetas al muestreo, podrían hacerse antes que el

muestreo en sí se lleve a cabo. El muestreo deberá circunscribirse a un sólo cultivar o especie de planta.

Los signos y síntomas de los posibles daños ocasionados por nematodos en las partes aéreas de las plantas o raíces, deben de registrarse en el momento del muestreo. Si las poblaciones de nematodos están restringidas solamente al suelo, es posible que la observación de achaparramientos de las partes aéreas así como de síntomas de deficiencias nutricionales, indiquen la presencia de nematodos. La manifestación de patrones irregulares en el crecimiento de los tallos, así como de anomalías asociadas a nematodos foliares en algunas plantas hospedantes, como ornamentales anuales o árboles forestales, deben de anotarse en el momento del muestreo.

#### B. Recolección y manejo de muestras

Para un determinado ensayo con nematodos, el área a muestrear, así como el número de muestras y submuestras a considerar, dependerán de los propósitos del muestreo. Para el diagnóstico de enfermedades deben tomarse muestras apareadas. La primera muestra procederá de plantas sanas (adyacentes a plantas enfermas) (Fig. 2), y estará constituida cuando menos de 10-30 submuestras, que darán un volumen final de aproximadamente 500-1000 cm<sup>3</sup> de suelo. La segunda será similar, pero deberá de obtenerse de plantas raquíticas o achaparradas procedentes de uno o varios lugares. Si no se observan diferencias en los patrones de crecimiento, entonces una sólo muestra por cada sitio de muestreo será suficiente. El muestreo deberá de efectuarse cuando la humedad del suelo sea ligeramente inferior a la capacidad de campo; esto es, cuando el suelo esté ni muy seco ni muy húmedo. El lugar específico para la recolección de muestras de suelo deberá de estar lo más estrechamente vinculado al máximo desarrollo radical de las plantas en cuestión. Este, deberá encontrarse en los surcos para el caso de las plantas anuales (Fig. 2-A). Para el caso de los cultivos perennes, la toma de muestras deberá efectuarse siguiendo la zona de goteo (Fig. 2-B).



**Fig. 2.** Patrones sugeridos para la toma de muestras compuestas de suelo y raíces en ensayos con nematodos. A) Recolección de aproximadamente 20-30 muestras de suelo (con raíces) de la zona radical de un cultivo anual; B) Patrón de recolección de muestras para una sola planta perenne (después de Barker, 1978).

La profundidad de la muestra dependerá del hospedante, el tipo de suelo y las especies de nematodos presentes. En términos generales, las muestras obtenidas entre los 15 y 30 cm de la superficie del suelo representan una muestra adecuada. Aquellas plantas con raíces profundas como el duraznero u otros frutales, requerirán de muestreos profundos de hasta un metro, para poder caracterizar completamente las comunidades de los nematodos asociados. Las muestras apareadas que se mencionaron con anterioridad, pueden ser útiles para comparar las cantidades y clases de nematodos encontrados en plantas sanas, con respecto a las de plantas enfermas.

Una vez tomadas las muestras, éstas se colocan individualmente en bolsas de polietileno o en recipientes adecuados. Las muestras compuestas deben ponerse en bolsas de polietileno selladas de 1 a 2 litros de capacidad, etiquetarse y colocarse en

recipientes aislados para prevenir la exposición al exceso de calor o de la luz directa del sol. Las muestras deben manejarse con cuidado evitando golpearlas o mezclarlas excesivamente, pues algunos nematodos como Paratrichodorus minor y Belonolaimus longicaudatus, pueden ser afectados. Si las muestras van a almacenarse, deben de conservarse idealmente en un sitio cuya temperatura oscile entre los 10-15 C. Si no se cuenta con un incubador de estas características, entonces pueden mantenerse durante 2-3 semanas a la temperatura de 20-22 C.

### C. Extracción

El "agitador", la "bandeja de Baermann" y los métodos de extracción por centrifugación y flotación se incluyen aquí, pero otras técnicas como el nebulizador de Seinhorst y la combinación de elutriación y centrifugación, pueden utilizarse también, si se tiene el equipo necesario. Antes de extraer los nematodos de las fracciones del suelo, ya sea con la bandeja de Baermann o por medio de centrifugación y flotación, todos los fragmentos de las raíces deben removerse, ya sea manualmente o con la ayuda de un tamiz de cuarzo (4-8 mallas) que retenga a los fragmentos pero permita el paso de las partículas. Los fragmentos radicales deben humedecerse ligeramente y enseguida colocarse en un vaso de precipitado o un frasco de vidrio (1 litro), para extraer los nematodos endoparásitos como se explica posteriormente.

Con el método del "agitador", se pueden obtener considerables cantidades de Pratylenchus y otras especies a partir de raíces infectadas, cantidades similares a las logradas con la cámara nebulizadora, pero no superiores a las que se obtienen con el nebulizador de Seinhorst (Barker, 1985b). El equipo incluye: Un agitador "Gyratory"; tamices de 400 y 500 mallas (aperturas de 38 y 26  $\mu\text{m}$  respectivamente); matraces Erlenmeyer de 125 ml y vasos de precipitados de 150 ml. Las sustancias químicas requeridas son el Aretán (cloruro mercúrico etoxietil) y el antibiótico sulfato de estreptomina, u otro adecuado.

Procedimiento del método con el agitador:

1. Lavar las raíces y cortarlas en pedazos de 1-2 cm.
2. Colocar una muestra representativa (0.5-5.0 gr) en un frasco Erlenmeyer de 125 ml.

3. Agregar la solución compuesta de 10  $\mu\text{g/ml}$  de cloruro mercúrico etoxietil y 50  $\mu\text{g/ml}$  de sulfato de estreptomina, hasta cubrir los tejidos.
4. Poner en marcha el agitador a 100 rpm durante 48 h a 24-28 C.
5. Retener los nematodos sobre la malla de los tamices de 400 o 500 mallas, y decantarlos en un vaso de precipitado de 150 ml para proceder a contarlos.

Las fracciones de suelo que contienen las comunidades de nematodos, pueden extraerse mediante la utilización de las técnicas: Bandeja de Baermann o centrifugación y flotación. La primera es útil para muchas especies de nematodos, aunque generalmente no se obtienen cantidades representativas de los miembros de los Criconematidae, debido a lo lento de sus movimientos.

La bandeja de Baermann es útil para extraer nematodos en muestras relativamente pequeñas de suelo y de fragmentos de raíces que contengan huevecillos y juveniles de ciertas especies de Heterodera (utilizarse solamente en la primavera). Los nematodos migratorios presentes en los desechos, extraerlos con el elutriador (Barker, 1985b). El equipo requerido consistirá de: Cedazo con malla de plástico (tipo tamiz) o de metal, de 17.5 cm de diámetro (20-850  $\mu\text{m}$  de apertura) montado en soportes o patas de 4 mm de altura; papeles resistentes a la humedad; tamiz malla 500 (26  $\mu\text{m}$  de apertura) de 20 cm de diámetro, y recipientes o moldes de aluminio para hornear recubiertos de resinas epoxi. (Nt: los más comunes miden 25 cm de diámetro por 3.5 cm de altura).

Procedimiento para la bandeja de Baermann:

1. Mezclar el suelo.
2. Colocar uniformemente 100  $\text{cm}^3$  de suelo en el papel, puesto a su vez sobre la malla de plástico o de acero inoxidable. Nota: No usar mallas de cobre.
3. Colocar la malla con el suelo dentro del molde, agregando agua suficiente hasta cubrir el suelo.
4. Incubar las muestras a 21-24 C cubriéndolas adecuadamente para impedir la evaporación. Agregar agua conforme se necesite.

5. Tres días después, coleccionar a los nematodos de la suspensión en los moldes. Si está muy turbia, tratar de aclararla pasándola a través del tamiz malla 500. Para lograr la máxima recuperación de nematodos, las colectas deben efectuarse hasta por un periodo de 14 días.

El método de centrifugación y flotación es excelente para obtener del suelo los estadios juveniles de Meloidogyne, particularmente en el establecimiento de ensayos rutinarios. También es uno de los mejores procedimientos para obtener especies de Criconemella (Barker, 1985b). El equipo incluye: Una centrifuga con cabezal de movimiento horizontal; camisas para tubos de 50 ml o mayores y con capacidad operacional de 420 g; agitadores mecánicos; tamices de 35, 60, 400 y 500 mallas (aperturas de 500, 250, 38 y 26  $\mu\text{m}$  respectivamente); matraces Erlenmeyer de 100, 150 y 1000 ml, y separador de muestras de suelo (W. S. Tyler Co., Mentor, OH 44060) o tamices de cuarzo para mezclados. Las sustancias químicas que se requieren son: Una solución azucarada; 454 gr en agua suficiente hasta la obtención de 1 litro de solución (gravedad específica 1.18 o 38.5% por peso). Nota: La utilización de detergentes y de agentes humectantes puede mejorar la recuperación de nematodos con este método.

Procedimiento para la técnica de centrifugación y flotación:

1. Mezclar el suelo.
2. Colocar 100  $\text{cm}^3$  de suelo en un vaso de precipitado de 1000 ml y agregar suficiente agua hasta obtener un volumen de 600 ml.
3. Agitar la suspensión por 20 segundos y permitir que el suelo se sedimente por 60 segundos. El tiempo máximo de sedimentación para los miembros de Criconemella spp, es de 20-30 segundos.
4. Decantar el sobrenadante sobre un tamiz malla 35 empotrado a su vez en otro de malla 400. Sostener ambos tamices en un ángulo de 35-40° durante el proceso de decantación, con el propósito de minimizar las oportunidades de que los nematodos pequeños pasen directamente a través de las mallas.
5. Mediante el uso de una pizeta, lavar la malla del tamiz 35 cuando todavía se encuentre sobre el de

malla 400 (los lavados excesivos son contraproducentes, ya que pueden inducir el paso de los nematodos por ambas mallas). Para el caso de las especies de Heterodera o Globodera, intercalar otro tamiz de malla 60 u 80 entre los tamices de 35 y 400 mallas, con el propósito de retener a los quistes.

6. Arrastrar con agua los desechos y los nematodos retenidos sobre la malla del tamiz 400 y transferirlos a un vaso de precipitado de 150 ml.
7. Vaciar la suspensión a los tubos de centrifuga de 50 ml.
8. Colocar los tubos en el cabezal de la centrifuga, asegurándose que los pesos de los tubos estén balanceados.
9. Centrifugarlos a 420 g durante 5 minutos.
10. Decantar el agua de los tubos (los nematodos se encuentran en el precipitado al fondo de los tubos).
11. Llenar los tubos de centrifuga con la solución azucarada, resuspenderlos con la varilla del batidor motorizado o el mezclador vibratorio.
12. Centrifugar durante 30-60 segundos a 420 g. Los nematodos permanecerán suspendidos en la solución azucarada. No utilizar el freno de ciertas centrifugas, ya que con ello se produce una vibración, lo suficientemente intensa como para desalojar el precipitado.
13. Decantar la solución azucarada conteniendo los nematodos en un tamiz de malla 500. Verter lentamente cuando se esté trabajando con nematodos pequeños.
14. Enjuagar y arrastrar a los nematodos del tamiz de malla 500 para transferirlos a un vaso de precipitado de 150 ml (aproximadamente 20 ml de agua son suficientes para proceder enseguida a contarlos).

#### 4. Fuente de los Materiales

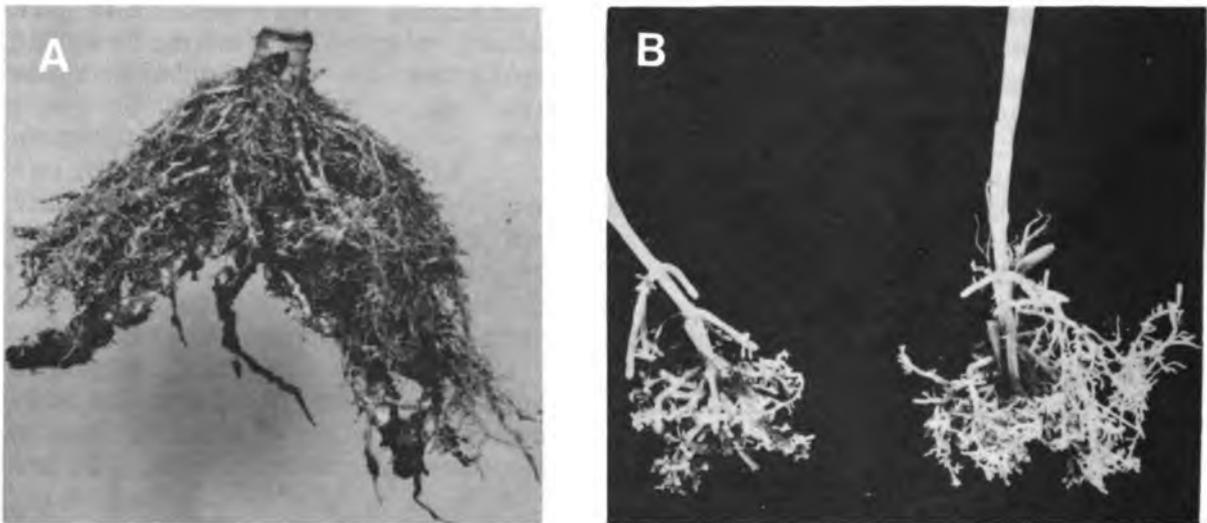
Idealmente, el muestreo debe de llevarse a cabo a finales del verano o en el otoño, cuando los signos y síntomas de los nematodos son más evidentes. La selección de las

plantas a muestrear puede estar condicionada a las circunstancias de cada localidad. Un cultivo con patrón de crecimiento "ondulado" o "parcheado" es, por lo regular, excelente para muestrear nematodos (Fig. 3).

La observación preliminar de raíces para detectar la presencia de agallas inducidas por las especies de Meloidogyne (Fig. 4A), o los quistes de las especies de Heterodera o Globodera, puede ser de utilidad para indicar positivamente los signos y síntomas de problemas con nematodos de importancia. Los síntomas de otros nematodos importantes, como los del nematodo lesionador (Pratylenchus spp), consisten en la formación de lesiones necróticas o la restricción severa del crecimiento radical; en ocasiones en combinación con necrosis, como es el caso de algunos nematodos ectoparásitos como Paratrichodorus o Belonolaimus (Fig. 4B). Si no se puede disponer de un cultivo con problema de nematodos, entonces ciertas plantas ornamentales como las azaleas o simplemente un césped mostrando crecimiento pobre, pueden ser de utilidad.



Fig. 3. Parcheado típico en el cultivo de tabaco asociado a nematodos fitoparásitos, en este caso a Globodera solanacearum, quien es capaz de inducir severos achaparramientos (cortesía de J. A. Fox).



**Fig. 4. Síntomas radicales de daños por nematodos: A) Agallas y necrosis radicales inducidas por Meloidogyne incognita en tabaco; B) Efectos típicos del amuñonamiento radical en el maíz asociado a Paratrichodorus minor y Belonolaimus longicaudatus.**

El equipo para el muestreo de nematodos incluye al muestreador tipo tubo o barrena, desarrollado por los edafólogos para tomar cualquier muestra de suelo. Los muestreadores "Oakfield" o "Hoeffler" tipo tubo son eficientes, aunque existen otros substancialmente mejorados (Barker, 1985a). Otros utensilios incluyen: Bolsas de polietileno; etiquetas provistas de alambre para amarrar y sellar a las bolsas; hielera portátil bien aislada para proteger a las muestras de las exposiciones excesivas a la luz directa del sol y el calor.

El equipo útil para la extracción de nematodos de muestras de suelos con distintos procedimientos, son descritos por Hussey en otro ejercicio de laboratorio en este manual, por lo tanto, estas técnicas no las incluiremos aquí, con excepción de los tres métodos siguientes: El agitador para la extracción de nematodos de las raíces, la bandeja de Baermann para suelos y raíces, y la centrifugación y flotación que es adecuada para extraer a la mayoría de los nematodos de una muestra de suelo. El equipo y las sustancias químicas requeridas para cada uno de ellos, así como el

seguimiento respectivo de la técnica, se han mencionado con anterioridad. En los casos que se detecte la presencia de nematodos agalladores o de enquistados, los métodos para las determinaciones de las cantidades de huevecillos, serán críticos para la obtención de una diagnosis completa. Estos y otros métodos útiles ya se han descrito previamente (Barker, 1985b); por lo tanto, no han sido incluidos aquí.

## 5. Resultados

Los nematodos extraídos deben de colocarse en el refrigerador hasta que los conteos de los diferentes géneros y especies se hallan completado. Es importante recordar que estos patógenos son parásitos obligados; por lo tanto una planta severamente dañada, tendrá pocos nematodos en comparación de otra con un daño ligero. Esta relación se debe a la limitación del alimento en las plantas severamente dañadas, y es la razón de tomarse muestras apareadas. La diagnosis completa puede requerir también la determinación de los números de huevecillos de las especies de Meloidogyne y de los nematodos enquistados de los géneros Globodera y Heterodera. (Los procedimientos para estas técnicas se encuentran disponibles en otras publicaciones: Barker, 1985b; Southey, 1970). Independientemente del método de extracción utilizado, las cantidades y tipos de nematodos encontrados deben de expresarse como el número de individuos por unidad de volumen (100-500 cm<sup>3</sup> de suelo), en lugar de la simple estimación del número de nematodos presentes.

Con este ejercicio, uno se familiariza con la recolecta de muestras de suelo, conociendo lo relacionado a la recolecta en sí, la observación de signos y síntomas asociados con los nematodos y el diagnóstico de las enfermedades. También debe de obtenerse un conocimiento claro sobre la gran diversidad de las comunidades de nematodos que parasitan a las distintas especies y variedades de plantas. La recolecta de muestras apareadas o múltiples, constituyen también en buena medida, una base para valorar las variaciones reales de los números de nematodos asociados a las plantas.

## Referencias Recomendadas

Barker, K. R. [Chairman]. 1978. In "Methods for Evaluating Plant Fungicides, Nematicides, and Bactericides" (E. Zehr, ed.), pp. 114-125. Am. Phytopathol. Soc., St. Paul, Minnesota.

- Barker, K. R. 1985a. In "An Advanced Treatise on Meloidogyne, Vol. II Methodology" (K. R. Barker, C. C. Carter, and J. N. Sasser, eds.), pp. 3-17. A Coop. Publ. of the Dept. of Plant Pathol., NC State.
- Barker, K. R. 1985a. In "An Advanced Treatise on Meloidogyne, Vol. II Methodology" (K. R. Barker, C. C. Carter, and J. N. Sasser, eds.), pp. 3-17. A Coop. Publ. of the Dept. of Plant Pathol., NC State Univ. and the U. S. Agency for Intl. Dev. NC State Univ. Graphics, Raleigh, NC.
- Barker, K. R. 1985b. In "An Advanced Treatise on Meloidogyne, Vol. II Methodology" (K. R. Barker, C. C. Carter, and J. N. Sasser, eds.), pp. 19-35. A Coop. Publ. of the Dept. of Plant Pathol., NC State Univ. and the U. S. Agency for Intl. Dev. NC State Univ. Graphics, Raleigh, NC.
- Southey, J. F. 1970. Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes. Min. Agric. Fish. Food Tech. Bull. 2, 5th Ed., 148 pp. Her Majesty's Stationery Office, London.

## Ejercicio 2

### Precisión y Confiabilidad del Muestreo

Howard Ferris  
Division of Nematology  
University of California, Davis 95616

#### 1. Objetivos

Demostrar la relación entre la precisión y confiabilidad de una población evaluada, con la intensidad del esfuerzo invertido en el muestreo.

El ejercicio consiste de dos partes. Todos los estudiantes deben cumplir con la primera. La segunda parte es solamente para aquellos estudiantes interesados en el análisis profundo sobre las relaciones entre las poblaciones de nematodos (densidad y distribución), el número de muestras tomadas y la precisión esperada de la población estimada. Esta última, está dirigida hacia aquellos estudiantes lo suficientemente motivados para informarse de los antecedentes a través de la literatura sugerida, y que posean conocimientos en estadística y un interés especial por los problemas relacionados con el tamaño de muestra y la precisión de los parámetros estimados en una población.

#### 2. Tiempo Requerido

Dos periodos de 3 h y algo de tarea.

Muestreo: 2 h.  
Extracción: 2 h.  
Conteo: 2 h.  
Análisis: 2 h.

#### 3. Procedimiento

##### Parte I

- a. Localizar un terreno de aproximadamente 2 o 4 ha, barbechado o con cultivo en pie.
- b. Dividir al grupo en equipos de trabajo a razón de dos por equipo.
- c. Estratificar o dividir el terreno de tal manera que cada equipo de trabajo reciba aproximadamente la misma superficie. Tomar nota de las áreas con textura y humedad homogéneas, los registros de cosechas previas,

los patrones de rendimiento, etc.

- d. Cada equipo tomará muestras de una diferente sección (estrato) obteniendo 10 unidades de muestreo para analizar individualmente y determinar la densidad poblacional. Cada una de estas muestras consistirá de cuando menos 12 submuestras, obtenidas con un tubo muestreador (Oakfield) de 2.5 cm de diámetro, el cual deberá ser introducido hasta una profundidad de 30 cm, con respecto a la superficie del suelo. Las 12 submuestras de cada unidad de muestreo, deberán de distribuirse en zig-zag a través de todo el terreno, como se ilustra en la Fig. 1.

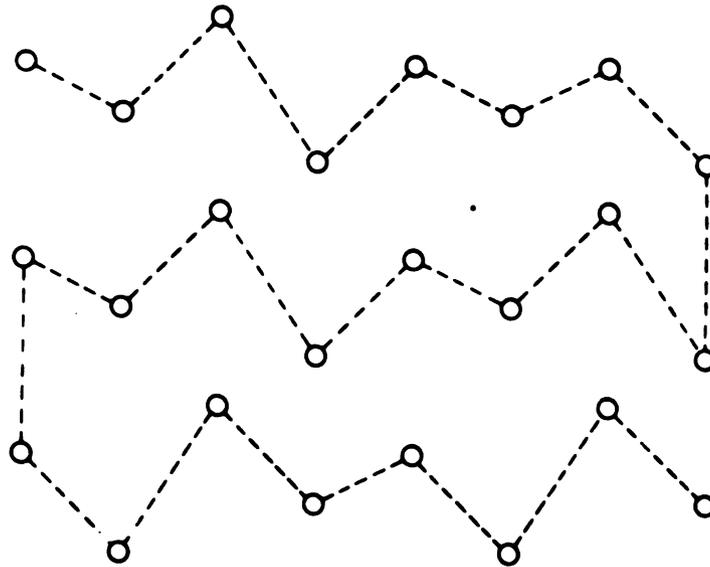


Fig. 1. Patrón recomendado para tomar muestras de suelo en un campo de cultivo en descanso, surcado o con cultivo en pie.

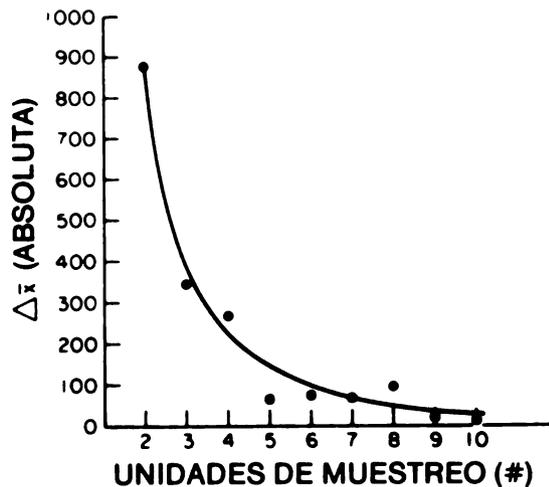


Fig. 2. Relación entre la precisión de la evaluación poblacional y el número de unidades de muestreo (datos obtenidos del ejemplo).

- e. En forma alternada, cada equipo podrá trabajar en una misma sección, pero procurando tomar un número diferente de muestras (unidades de muestreo).
- f. Regresar las muestras al laboratorio para procesar (esta parte podrá considerarse como parte del Ejercicio 1).
- g. Contar e identificar el número de individuos para cada género de nematodos en cada unidad de muestreo. Esto requiere de experiencia en la identificación de nematodos.
- h. Para las diez unidades de muestreo, determinar la magnitud de cambio en los estimados de la densidad poblacional ( $\Delta x$ ), a medida que su número incrementa. Graficar este valor contra el número de unidades de muestreo como se indica en la Fig. 2.  
Ejemplo de cálculos:

Muestra #	Densidad Poblacional Especie A	Media ( $\bar{x}$ ) Progresiva	$\bar{\Delta x}$ Absoluta
1	2108	2108	---
2	357	1233	875
3	2256	1574	341
4	510	1308	266
5	1622	1371	63
6	1805	1443	72
7	986	1378	65
8	642	1286	92
9	1431	1302	16
10	1215	1293	9

$$\bar{x}_2 = 1293$$

$$S^2 = 443816$$

- i. A partir de la gráfica, determinar el número de unidades de muestreo en las cuales la intensificación en el muestreo no es garantía para lograr incrementos en la precisión de evaluación. Observar la falta de confiabilidad al utilizar pocas unidades de muestreo para la estimación. Si se da el caso en que otros equipos de trabajo hayan tomado un número mayor de submuestras para cada unidad de muestreo, observar el efecto en la precisión. Calcular los costos aproximados por unidad de muestreo, en función al tiempo invertido en la obtención de datos. Comentar la relación entre los costos y la precisión.

## Parte II

- a. Para cualquier tamaño de la unidad de muestreo, calcular la media y la varianza de los estimados poblacionales de cada especie de nematodo. Utilizar las 10 unidades de muestreo para los cálculos.

### Antecedentes

Con frecuencia, la distribución espacial de muchas especies de nematodos fitoparásitos se describe adecuadamente por el modelo probabilístico de la binomial negativa (Ferris, 1984). Las poblaciones ocurren en agregados y como característica de este tipo de distribución, la varianza estimada es mayor que la media.

En base a este modelo, el número de muestras requeridas para estimar la densidad poblacional a un nivel especificado de precisión, varía directamente con la densidad de la misma y puede determinarse utilizando la siguiente ecuación:

$$n = t_{\alpha}^2 (1/\bar{x} + 1/k)d^2 \dots\dots\dots(i),$$

donde n = el número requerido de unidades de muestreo.

$\bar{x}$  = La media de la densidad poblacional obtenida en el campo.

d = La desviación aceptable de la población estimada, a partir de sus valores reales; si es aceptable medir a la población dentro del 25% de su valor verdadero, entonces d = 0.25.

$\alpha$  = La proporción de predicciones que no quedaron comprendidas dentro de los límites de confianza deseados.

t = El valor del estadístico t de student al nivel de confianza requerido y con grados de libertad (g.l.) especificados.

k = El parámetro de dispersión de la binomial negativa. (Esto deberá de conocerse antes de que se resuelva la ecuación).

Para usar este modelo y determinar n, utilizar la media y la varianza calculadas para estimar a k, la cual es específica para las diferentes especies. Esto puede aproximarse mediante:

$$k = \bar{x}^2 / (S^2 - \bar{x}) \dots\dots\dots(ii).$$

De los datos obtenidos en el campo, esto sería:

$$k = (1293)^2 / (443816 - 1293) = 3.78.$$

Una vez que el valor de  $k$  se haya determinado, se procederá a seleccionar un valor para " $t$ ", el cual nos permitirá calcular el tamaño de la muestra necesaria para estimar  $\bar{x}$  dentro del valor 0.25 de (la media verdadera de la densidad poblacional). (Ecuación [1]).

Nuevamente y en base a los datos obtenidos en el campo, para  $t$  con g.l. = (una muestra infinitamente grande y de  $\alpha = 0.05$ ):

$$n = (1.96)^2 (1/1293 + 1/3.78) / (0.25)^2,$$

$$n = 16.$$

El valor inicial de un número infinito de g.l. es obviamente irreal, pero nos proporciona la primera aproximación de  $n$ . Podemos mejorar esta aproximación mediante la repetición de los cálculos, utilizando los primeros resultados como los g.l. para seleccionar un valor de  $t$ .

Ejemplo: Donde g.l. =  $n - 2 = 14$ ,  $t_{.05} = 2.145$ ,

$$n = (2.145)^2 (1/1293 + 1/3.78) / (0.25)^2,$$

$$n = 20.$$

Este proceso iterativo deberá de repetirse hasta que los valores estimados para  $n$ , sean muy próximos.

Este valor calculado de  $n$ , indica el número de muestras necesarias para estimar una media de la densidad poblacional, que quedará dentro del 25% de su valor verdadero a un nivel de confianza del 95%.

b. En base a lo publicado por McSorley y Parrado, 1982; y Taylor, 1984; comentar las implicaciones de la magnitud de  $k$  en función de la distribución poblacional.

c. Explorar y discutir el impacto de la precisión requerida (valor  $d$ ), en el número de unidades de muestreo para las especies de las que se obtuvieron los datos de media y varianza. Explorar el efecto de la magnitud del valor de  $k$ , sobre el número de las unidades de muestreo requeridas para un determinado nivel de precisión.

d. Transformar la ecuación (i) a:

$$d = t_{\alpha} \sqrt{(1/\bar{x} + 1/k)/n}$$

para determinar la precisión de los estimados de una población, cuando se obtengan una o dos unidades de muestreo del campo.

#### Referencias Recomendadas

- Elliott, J. M. 1977. Some methods for the statistical analysis of samples of benthic invertebrates. Freshwater Biol. Assoc. Sci. Publ. 25. Ambleside, England.
- Ferris, H. 1984. J. Nematol. 16:246-251.
- Goodell, P. B., and H. Ferris. 1981. J. Nematol. 13:304-313.
- McSorley, R., and J. L. Parrado. 1982. J. Nematol. 14:522-529.
- Taylor, L. R. 1984. Ann. Rev. Entomol. 29:321-357.

### Ejercicio 3

#### Modelos para la Predicción de Pérdidas en las Crotchas y Decisiones en el Manejo

Howard Ferris  
Division of Nematology  
University of California, Davis 95616

#### 1. Objetivos

Examinar las relaciones del crecimiento de las plantas y la multiplicación de los nematodos, con las densidades poblacionales de éstos al preplante, para desarrollar modelos de punto crítico.

#### 2. Tiempo Requerido

Dos sesiones de laboratorio de 3 h cada una, con dos meses de intervalo entre sí.

Preparación del material: Sembrar semillas de tomate (en México "jitomate") en vermiculita en dos fechas: 7 y 4 semanas antes del ejercicio. Dos semanas después de la siembra trasplantar las plántulas a vasos de plástico de "styrofoam" de 10 cm de diámetro con arena. Asegurar grandes cantidades de inóculo de Meloidogyne sp, estableciendo en el invernadero un número suficiente de plantas infectadas, por lo menos 3 meses antes del inicio del experimento. Dos días antes de iniciar el experimento, extraer los juveniles del suelo contenidos en la fuente de inóculo. Obtener los huevecillos de las raíces de las plantas infectadas, cortándolas en trozos pequeños sumergiéndolas en un volumen suficiente de hipoclorito de sodio comercial al 4% y agitando la suspensión durante 3 min. Para prevenir la mortalidad, separarlos inmediatamente de la solución pasándolos a través de dos tamices empotrados, mallas 100 y 500 respectivamente.

#### 3. Procedimiento

##### Preparativos

- a. Trabajar en grupos de 4. Con las suspensiones suministradas de huevecillos y juveniles de segundo estadio de Meloidogyne sp, cada grupo deberá de preparar 4 repeticiones de las diluciones: O, N, 2N, 4N, 8N, 16N, 32N y 64N,

donde  $N = 1000$ . Preparar 4 repeticiones extras del nivel de inóculo N para utilizarse en el inciso 3c. Además, preparar 31 repeticiones adicionales del nivel de inóculo 16N para utilizarse en la parte 2.

- b. Inocular las macetas (12.5 cm de diámetro) pipeteando el inóculo en una depresión hecha en la arena en la vecindad de la planta. Etiquetar las macetas apropiadamente.
- c. Inocular cuatro macetas extras con la densidad de inóculo N. Doce días después, lavar las raíces de las plantas y teñirlas con fucsina ácida en ácido láctico, hirviendo cuidadosamente como se explica en el Método A al final del ejercicio, (una pequeña modificación de la técnica para teñir con fucsina ácida se explica en el Ejercicio 33). Lavar las raíces teñidas, agregarles algunas gotas de glicerina y montarlas en medio de dos placas de vidrio. Proceder a contar los juveniles que se encuentren en las raíces.
- d. Diseñar y establecer un control en los experimentos, el cual demostrará que los síntomas observados en las plantas se deben a los nematodos y no a cualquier otro factor que uno haya introducido involuntariamente en el sistema.
- e. Dos grupos trabajarán con plántulas de 5 semanas de edad y los otros dos con las de 2 semanas, (7 y 4 semanas después del sembrado, respectivamente).

### Ejecución

Cada 2 meses los sistemas radicales y edáficos así como el crecimiento de las plantas, deben examinarse y evaluarse.

- f. Cortar las partes aéreas de las plantas a ras del suelo y obtener los pesos frescos.
- g. Con la ayuda de un sacabocados o muestreador, obtener 5 muestras de suelo de cada maceta, todas las muestras obtenidas en las 4 repeticiones de cada tratamiento deben colocarse en un vaso de precipitado de 600 ml. De esta manera tendremos al final 8 vasos, cada uno con 20 submuestras. Proceder a extraer los nematodos mediante el tamizado de Cobb (utilizar dos tamices malla 40 y 325, empotrados uno sobre el otro) o con la técnica de elutriación. Lavar cuidadosamente los

fragmentos de las raíces para evitar que las masas de huevecillos adheridas a ellas, se desprendan. (Los fragmentos de las raíces retenidos sobre la malla 40, deberán de transferirse a vasos de precipitado conteniendo 200 ml de agua para procesarse como se indica en el inciso 3h).

Los nematodos juveniles del suelo serán retenidos en la malla del tamiz 325. Transferirlos a un vaso de precipitado, reducir cuidadosamente el volumen de agua mediante el paso de la suspensión a través del tamiz de malla 325 y transferirlos nuevamente al vaso, arrastrándolos con agua. Colocar las muestras en embudos de Baermann y determinar 3 días después la cantidad de nematodos juveniles. Calcular el número de juveniles por maceta.

- h. Extraer los huevecillos de las masas gelatinosas adheridas a las raíces de las muestras que se obtuvieron en el paso 3g, antes mencionado. Para ello, agregar 20 ml de hipoclorito de sodio (4%) a la suspensión y agitar por 5 min. Tomar una alícuota de 10 ml de la suspensión y diluirla en 100 ml de agua en un vaso de precipitado de 150 ml. Extraer los huevecillos de esta muestra con un tamiz malla 500. Teñirlos con fucsina ácida en ácido láctico (3 gotas) calentándolos hasta que empiecen a hervir. Contar los huevecillos de la muestra y calcular sus números por maceta. El número total de huevecillos (3h) y de los juveniles (3g) representan la población final de los nematodos ( $P_f$ ) para este experimento.
- i. Limpiar cuidadosamente los sistemas radicales del suelo, con ayuda de un chorro de agua y evaluar el índice de agallamiento siguiendo el cuadro indicado al final del ejercicio. Calcular los valores promedio para cada tratamiento (ver Método B).

#### Parte I

- (i) ¿Qué evidencias tiene usted para demostrar que los síntomas observados fueron causados por los nematodos?
- (ii) ¿Cuáles son los síntomas causados por Meloidogyne sp, en el tomate?
- (iii) ¿Cuál fue el porcentaje de infección de su inóculo? ¿Fue usted capaz de determinar con

precisión la infectividad del inóculo inicial a partir de las raíces teñidas? (3c). Si la respuesta es negativa, explique el por qué.

Ajustar las tasas reales del inóculo en base al porcentaje de infección de su inóculo.

- (iv) ¿Qué efecto tuvo el incremento en las densidades poblacionales sobre el crecimiento de la planta y los síntomas de la enfermedad?
- (v) Comparar la severidad de los síntomas y los efectos sobre el crecimiento, cuando se inoculan plántulas de distinta edad (verificar con los resultados obtenidos por otros grupos).
- (vi) Graficar  $P_f$  contra  $P_i$  (escala log) y dibujar la curva de reproducción (ver Ferris, 1985a).
- (vii) Graficar el peso de las plantas contra el log de  $P_i$ .
- (viii) Graficar el peso de las plantas contra el índice de agallamiento.

## Parte II

Esta parte requiere de consultar la literatura. La discusión de los conceptos y cálculos puede presentarse por escrito o en forma oral, durante la clase.

- (i) En base a los artículos de Seinhorst y los datos obtenidos, ¿puede usted determinar los valores para la tasa máxima de reproducción ( $a$ ) y la densidad de equilibrio ( $E$ )? Discutir la relación entre  $a$ ,  $E$ ,  $P_i$  y  $P_f$ , para las condiciones en que el experimento se llevó a cabo.

Antecedentes para la pregunta (i):

Seinhorst ha desarrollado un modelo para describir la relación entre la tasa del incremento poblacional de nematodos y la densidad de tal población.

Este modelo depende de dos constantes, las cuales indican la condición de la planta como hospedante para un determinado nematodo fitoparásito:

1. "a" describe la tasa máxima de reproducción en un sistema dado y,

2. "E" describe la densidad de equilibrio, que es aquella densidad poblacional donde la disponibilidad alimenticia es apenas suficiente para mantener la población existente (Seinhorst, 1966).

De esta manera,  $a$  y  $E$ , son específicas tanto para la especie de nematodo como para la planta hospedante en consideración. Estas también dependen de las condiciones externas, tales como el tipo de suelo y agua, las cuales varían con el tiempo, ya que las plantas crecen y cambian durante la experimentación. De acuerdo con Seinhorst, los cambios en los valores de  $a$  y  $E$  durante el experimento, no afectan la forma de la curva para la relación entre las densidades inicial y final de una población, sino sólo su posición relativa con respecto a las coordenadas (Seinhorst, 1966).

La tasa de incremento de una población de nematodos depende de la densidad poblacional ( $P$ ), de tal suerte que para un valor bajo de  $P$ , la tasa de incremento es alta, mientras que cuando el valor de  $P$  es alto, la tasa de incremento es baja. Cuando  $P = E$ , la tasa de incremento es 0.

La multiplicación de la población de los nematodos puede expresarse como:

$$P_f(P_i)^{-1} = aE[(a-1)P_i + E]^{-1}.$$

Cuando el valor de  $P_i$  es muy bajo, cerca de 0, la tasa de multiplicación es muy alta y se aproxima a "a". Cuando  $P_f = P_i$ , la población no se está incrementando y la densidad poblacional es igual a la densidad de equilibrio ( $P = E$  como se mencionó antes).

- (ii) En base a Ferris (1985a), determinar la curva de multiplicación ( $P_f/P_i$  vs.  $-\ln P_i$ ) y ajustar el modelo  $P_f/P_i = a c P_i^{-b}$ , en base a los datos obtenidos.
- (iii) Calcular la regresión entre el peso de las plantas y el log de la población inicial.
- (iv) Determinar los valores de los parámetros para la ecuación  $y = m + (1-m)Z^{P-T}$  para  $P > T$ , y  $y = 1$  para  $P < T$ . Graficar la función incluyendo los puntos de los datos. Suponiendo que esta función de daño sea aplicable en el campo, determinar los umbrales económicos para un manejo con prácticas agrícolas cuyo valor sea el 25% del valor potencial del cultivo (ver Ferris, 1985b).

- (v) Determinar cuál de los dos métodos, (iii) o (iv), se ajusta mejor. Determinar el peso predecible y verdadero de la planta. Calcular la suma de los cuadrados de las desviaciones de los datos observados a partir de los modelos de predicción.
- (vi) Calcular la regresión entre el peso de la planta y el índice de agallamiento.
- (vii) ¿Cambian estos valores y relaciones cuando son utilizadas plántulas de diferentes tamaños (edades)? Comentar al respecto.

#### Experimento sobre la densidad de siembra

El espaciamiento de las plantas en los campos agrícolas se lleva a cabo para optimizar el uso de los recursos (luz, nutrimentos, agua, etc). Si el efecto de los nematodos es reducir el crecimiento de las plantas, entonces esa disponibilidad de los recursos no es aprovechada óptimamente. Por consecuencia, parecería que el simple ajuste de ese espaciamiento en algunos cultivos, podría ser un método para compensar los daños por los nematodos. Verificar esta teoría observando el crecimiento aéreo de plantas de tomate parasitadas con Meloidogyne spp. Cada grupo de trabajo será provisto con 10 bandejas (35 x 25 cm) conteniendo suelo libre de nematodos. Determinar el espaciamiento óptimo para el crecimiento de las plantas, favoreciendo al máximo el peso fresco por bandeja, bajo la ausencia y presencia de nematodos. Proceder como se indica:

- a. Trasplantar separadamente en las bandejas provistas con el suelo libre de nematodos, diferentes números de plántulas de tomate: 1, 2, 4, 8 y 16. Hacer lo mismo con otra serie de bandejas, pero inocularlas con el nivel 16N de nematodos de la manera como se explicó en la parte 3a. Determinar el máximo desarrollo foliar por planta al finalizar el experimento.
- b. Obtener los datos del experimento dos meses después de haberse iniciado. Cortar las partes aéreas de las plantas a ras del suelo y tomar los pesos frescos para cada bandeja. La densidad poblacional de nematodos para cada planta en el suelo infestado será equivalente al tratamiento 16N de la primera sesión de laboratorio de este ejercicio. Determinar la reducción de peso esperada con esta densidad poblacional y poner a prueba la teoría de que, el conocer la densidad

poblacional de los nematodos permite efectuar los ajustes necesarios en el espaciamiento de las plantas para maximizar la producción.

Ejemplo: Si la máxima producción de las bandejas con el suelo libre de nematodos ocurre con las que poseen 4 plantas, y el nivel inicial de inóculo de 16N reduce al 50% el crecimiento, entonces la máxima productividad en los suelos infestados con nematodos debe de ocurrir con las bandejas que tengan 8 plantas.

### Métodos

#### A. Tinción de Raíces con Fucsina Ácida en Acido Láctico

1. Limpiar las raíces del suelo con agua corriente.
2. Absorber el exceso de agua con papel toalla.
3. Calentar en un vaso de precipitado la suspensión de los sistemas radicales en fucsina ácida-ácido láctico, hasta que empiece a hervir.
4. Las raíces se pueden preservar en la solución de ácido láctico, si no se pueden examinar inmediatamente.
5. Cortar las raíces en pequeños fragmentos. Colocarlos sobre un disco de vidrio, agregar unas gotas de glicerina, diseminarlos y poner encima de ellos otro disco de vidrio para proceder a observarlos bajo el microscopio estereoscópico.
6. Asegurarse de presionar suficientemente los vidrios hasta mantener firmes las raíces entre ambos discos facilitando así la observación de los nematodos teñidos.

#### Fucsina Ácida al 1%

polvo de fucsina ácida	1 g
agua	100 ml.

#### Solución de ácido láctico

ácido láctico	1750 ml
glicerina	126 ml
agua	124 ml.

#### Solución al 0.01% de fucsina ácida-ácido láctico

fucsina ácida al 1%	1 ml
solución de ácido láctico	99 ml.

**B. Evaluación del Índice de Agallamiento por Meloidogyne spp. (Daulton and Nusbaum, 1961)**

<b>Tipo de Infección</b>	<b>Valor Índice</b>	<b>Descripción del Valor Índice</b>
0	0	Sin agallas.
1	1	Incipiente; menos de 5 agallas.
2	5	Muy ligera; de incipiente hasta 25 agallas.
3	10	Ligera; de 26 a 100 agallas.
4	25	Moderada; numerosas agallas distinguibles entre sí.
5	50	Moderadamente grave; numerosas agallas, muchas unidas entre sí.
6	75	Grave; agallas muy numerosas, la mayoría unidas entre sí.
7	90	Muy grave; invasión masiva, poco crecimiento radical.
8	100	Extremadamente grave; invasión masiva, sin desarrollo radical.

**Referencias Recomendadas**

Daulton, R. A. C., and C. J. Nusbaum. 1961. *Nematologica* 6:280-294.

Ferris, H. 1985a. *J. Nematol.* 17:93-100.

Ferris, H. 1985b. Nematode population dynamics and management. In: K. J. Leonard and W. E. Fry (eds.). *Plant Disease Epidemiology*. MacMillan, New York.

Nusbaum, C. J., and K. R. Barker. 1971. Population dynamics. In: B. M. Zuckerman, W. F. Mai and R. A. Rohde (eds), *Plant Parasitic Nematodes*. Vol. 1, Academic Press, New York.

Seinhorst, J. W. 1966. *Nematologica* 12:157-169.

## Ejercicio 4

### Utilización de las Características de la Cabeza del Macho para la Identificación de Especies de Meloidogyne

J. D. Eisenback  
Department of Plant Pathology  
North Carolina State University  
Raleigh, NC 27695

#### 1. Objetivos

Identificar las especies del género Meloidogyne, utilizando la forma de la cabeza de los machos y la morfología del estilete.

#### 2. Tiempo Requerido

Se requieren de 45-60 días aproximadamente, para obtener los cultivos de nematodos; de 24-48 h para recolectar los machos, de 30-45 min para la preparación de los montajes semipermanentes de cuatro especies y finalmente de 30-45 min para examinar e identificar a las especies.

#### 3. Procedimiento

Limpiar las raíces infectadas por nematodos, colocarlas dentro de un vaso de precipitado, cubrirlo con papel aluminio o plástico para envolver e incubar a 20-22 C por un período de 24-48 h. Lavar las raíces periódicamente para recolectar a los machos de cada especie en la suspensión.

Hacer los montajes semipermanentes con 5-10 especímenes de cada especie. Para ésto, transferirlos individualmente con la ayuda del pescador y ponerlos en agua en un portaobjetos con un anillo de resina plástica; proceder a matarlos exponiéndolos cuidadosamente a la flama de un mechero de alcohol, para en seguida transferirlos a otro portaobjetos conteniendo formalina al 2%. Colocar el cubreobjetos y eliminar el exceso de formalina mediante la utilización de triángulos de papel filtro. Sellar los bordes del cubreobjetos con Zut o barniz de uñas transparente.

Examinar las preparaciones al microscopio compuesto en aceite de inmersión, localizar un espécimen apropiadamente nivelado que esté orientado casi lateralmente. Comparar los machos montados con fotografías y dibujos de especímenes típicos de las cuatro especies más comunes, e identificar hasta especie.

#### 4. Materiales

Cultivos de las cuatro especies más comunes de Meloidogyne: M. incognita, M. javanica, M. arenaria y M. hapla (ver Apéndice 2); vasos de precipitado de 400-600 ml; papel de aluminio y plástico para envolver; porta-objetos y cubreobjetos; papel filtro; pescadores de nematodos; Zut, Glycel o barniz para las uñas; pinceles finos para pintar; mesa giratoria para el sellado de preparaciones; agua; formalina al 2%; micropipetas; mecheros de alcohol; cerillos; aceite de inmersión y microscopios de disección y compuesto.

#### 5. Observaciones

La identificación rápida y precisa de las cuatro especies más comunes de Meloidogyne, es posible mediante la comparación de la forma de la cabeza y la morfología del estilete (Fig. 1).

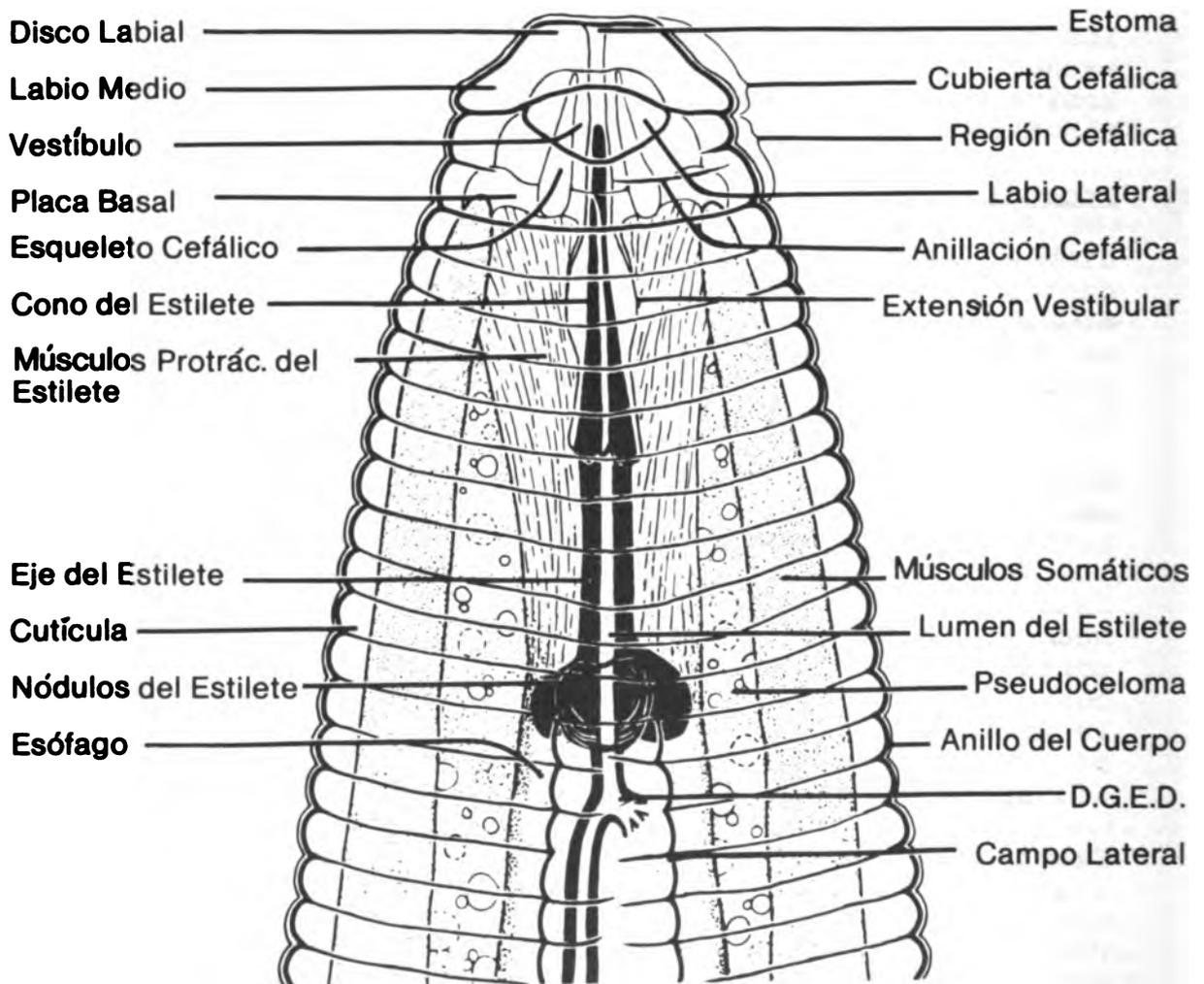


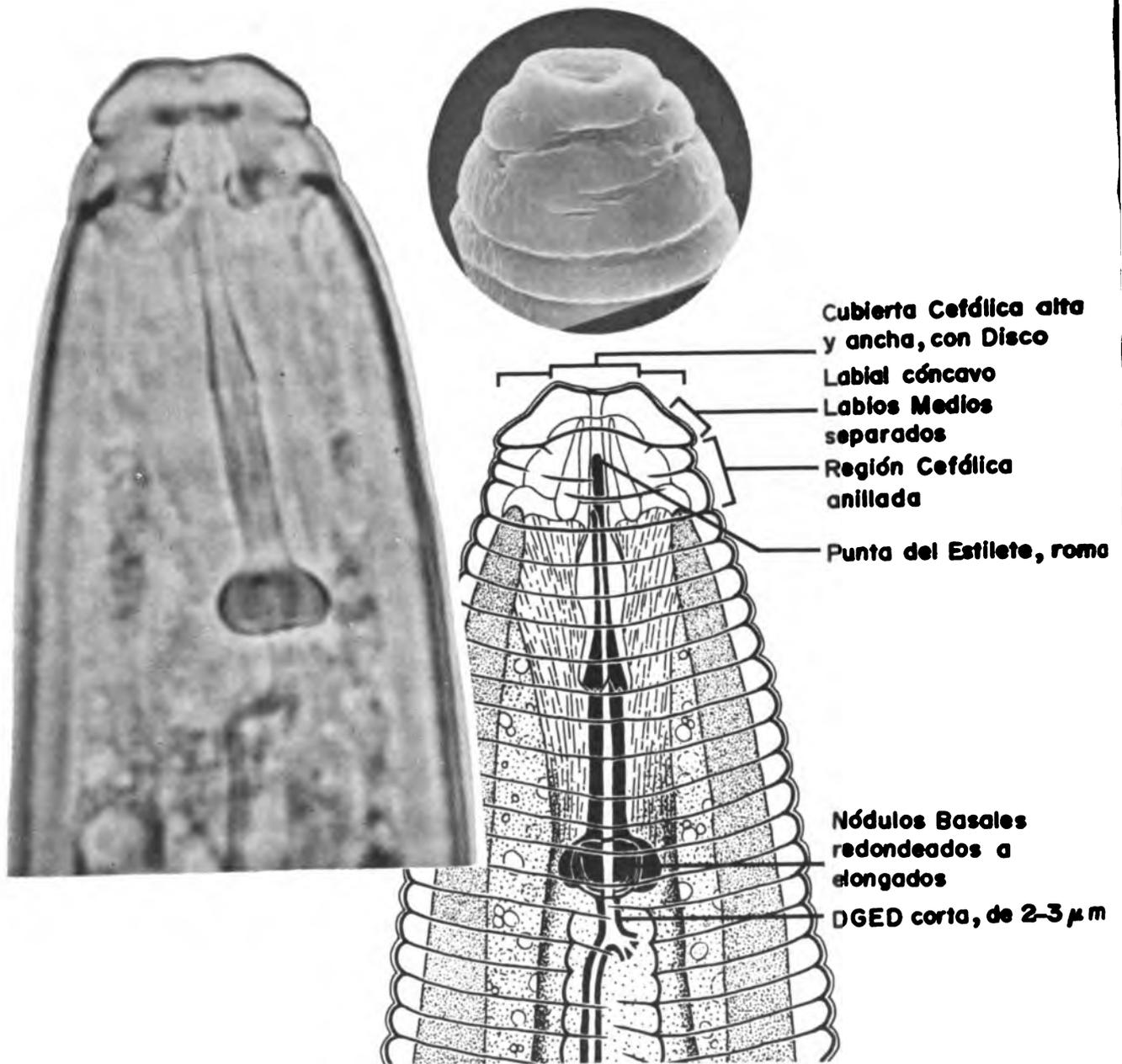
Fig 1. Ilustración de la morfología básica de la cabeza y el estilete del macho de Meloidogyne sp, observada con el microscopio de luz y el electrónico (según Eisenback, 1985).

#### A. Meloidogyne incognita

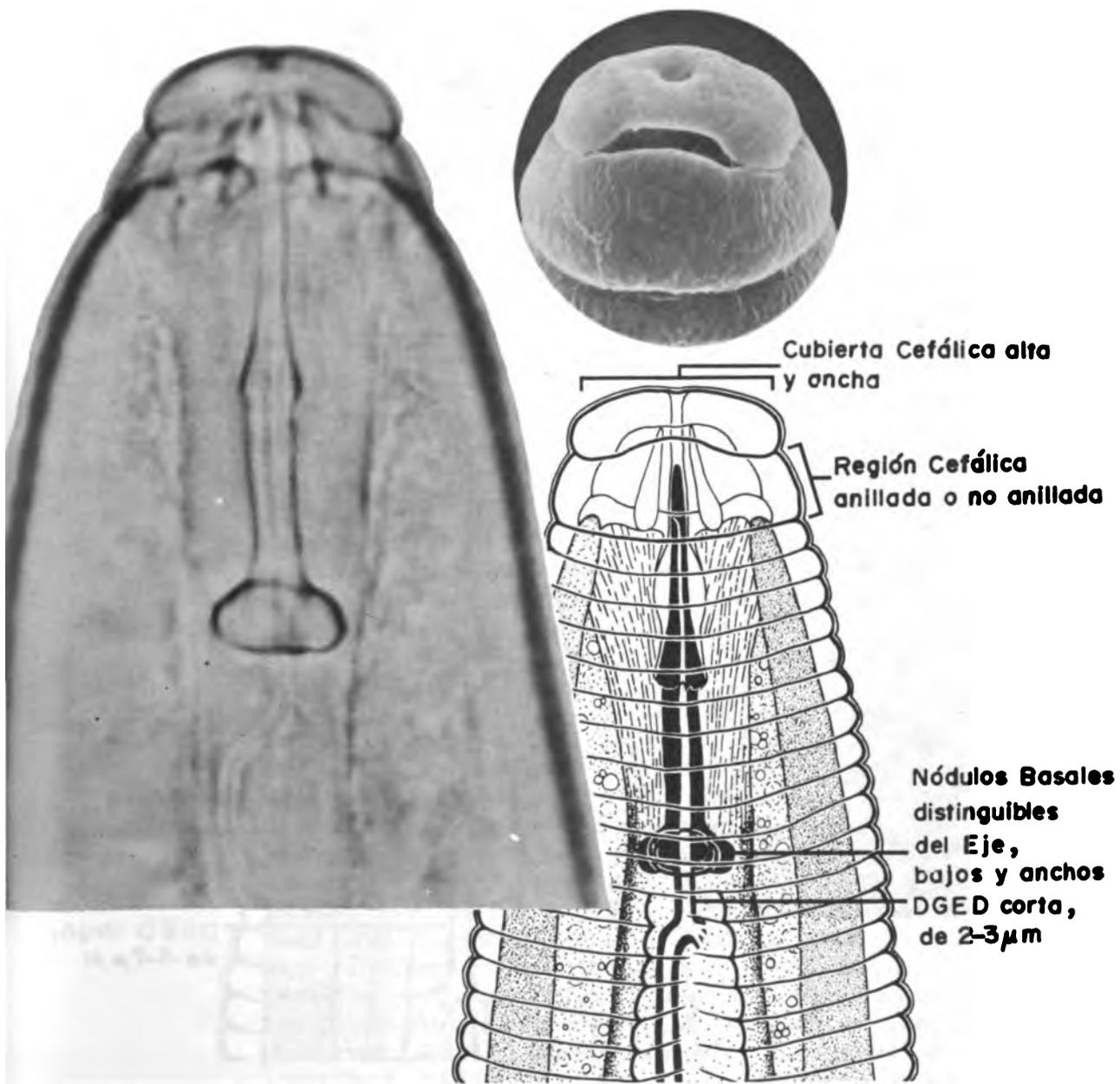
1. Morfología de la cabeza: La forma de la cabeza de los machos de M. incognita (Fig. 2) es muy característica y no debe confundirse con la de las otras especies. El disco labial es grande y redondo, frecuentemente cóncavo en la región central y se levanta por encima de los labios medianos. La anchura de éstos últimos es igual a la de la región cefálica, que por lo general, contiene las marcas de 2 o 3 anillos incompletos.
2. Estiletos: La punta del estilete de los machos (Fig. 2) de M. incognita es roma y más ancha que la porción media del cono del estilete. Aproximadamente a un cuarto de la longitud total del cono se observa una proyección en su lado ventral indicando la abertura del lumen del estilete. El eje o astil, es por lo general cilíndrico, con frecuencia angostándose en su proximidad con los nódulos basales. Estos, además de ser distinguibles del eje, están dentados en su parte anterior y son de forma alargada o redonda.

#### B. M. javanica

1. Morfología de la cabeza: En M. javanica (Fig. 3), el disco labial, grande y liso, está fusionado con los discos medios. La cubierta cefálica es alta y casi tan ancha como la región cefálica. En esta población en particular, la región cefálica no es anillada; sin embargo, en otras poblaciones se pueden observar dos o tres anillos.
2. Estiletos: El cono del estilete de los machos de M. javanica (Fig. 3) es angosto en su parte anterior y muy ancho en el extremo opuesto. El eje es cilíndrico; con frecuencia angostándose cerca de su unión con los nódulos basales. Los nódulos basales, bajos y anchos, son distinguibles del eje.



**Fig. 2. Morfología de la cabeza y del estilete del macho de *Meloidogyne incognita* (según Eisenback et al., 1981).**



ig. 3. Morfología de la cabeza y del estilete del macho de *eloidogyne javanica* (según Eisenback et al., 1981).

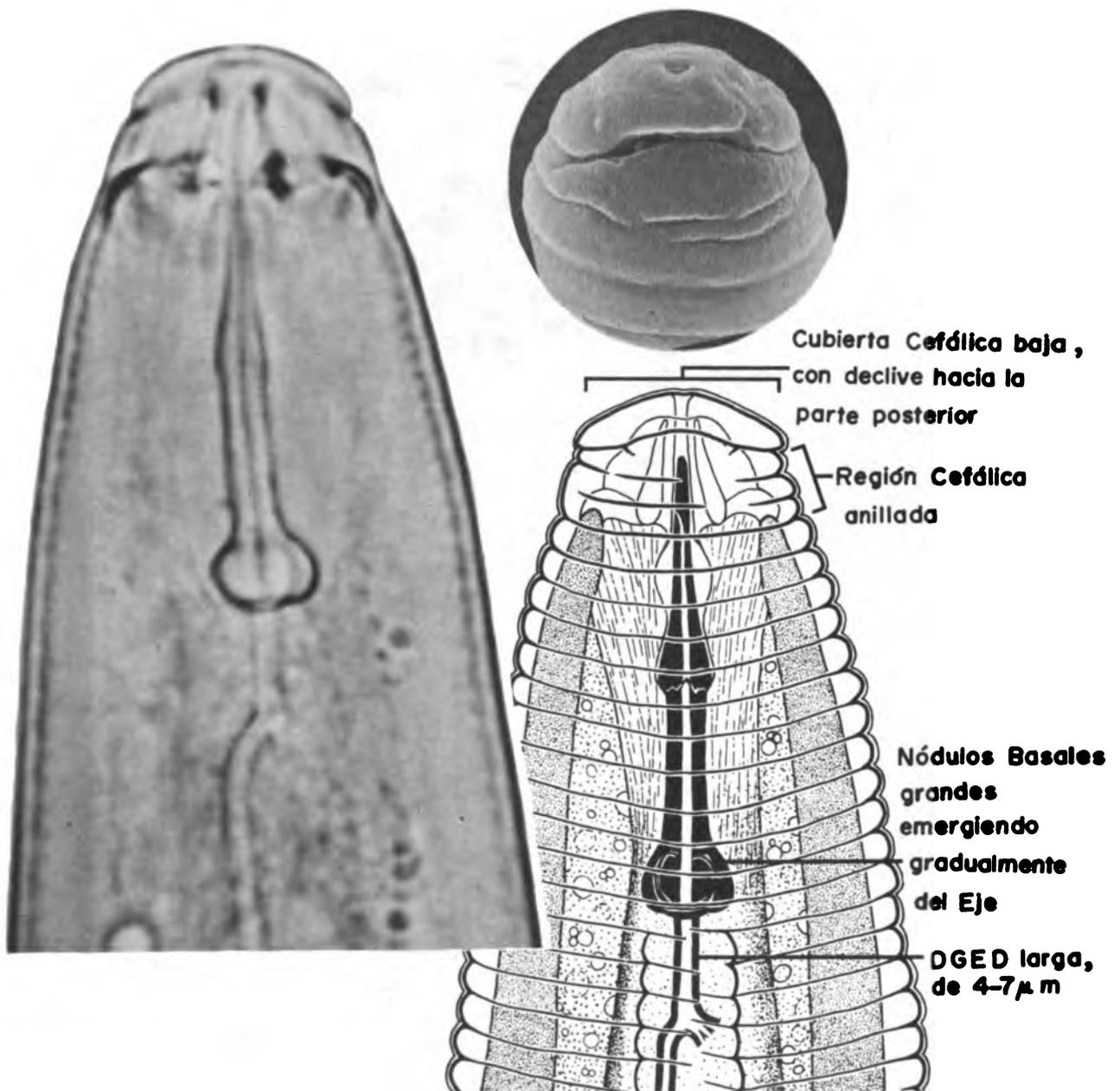


Fig. 4. Morfología de la cabeza y del estilete del macho de Meloidogyne arenaria (según Eisenback *et al.*, 1981).

### C. M. arenaria

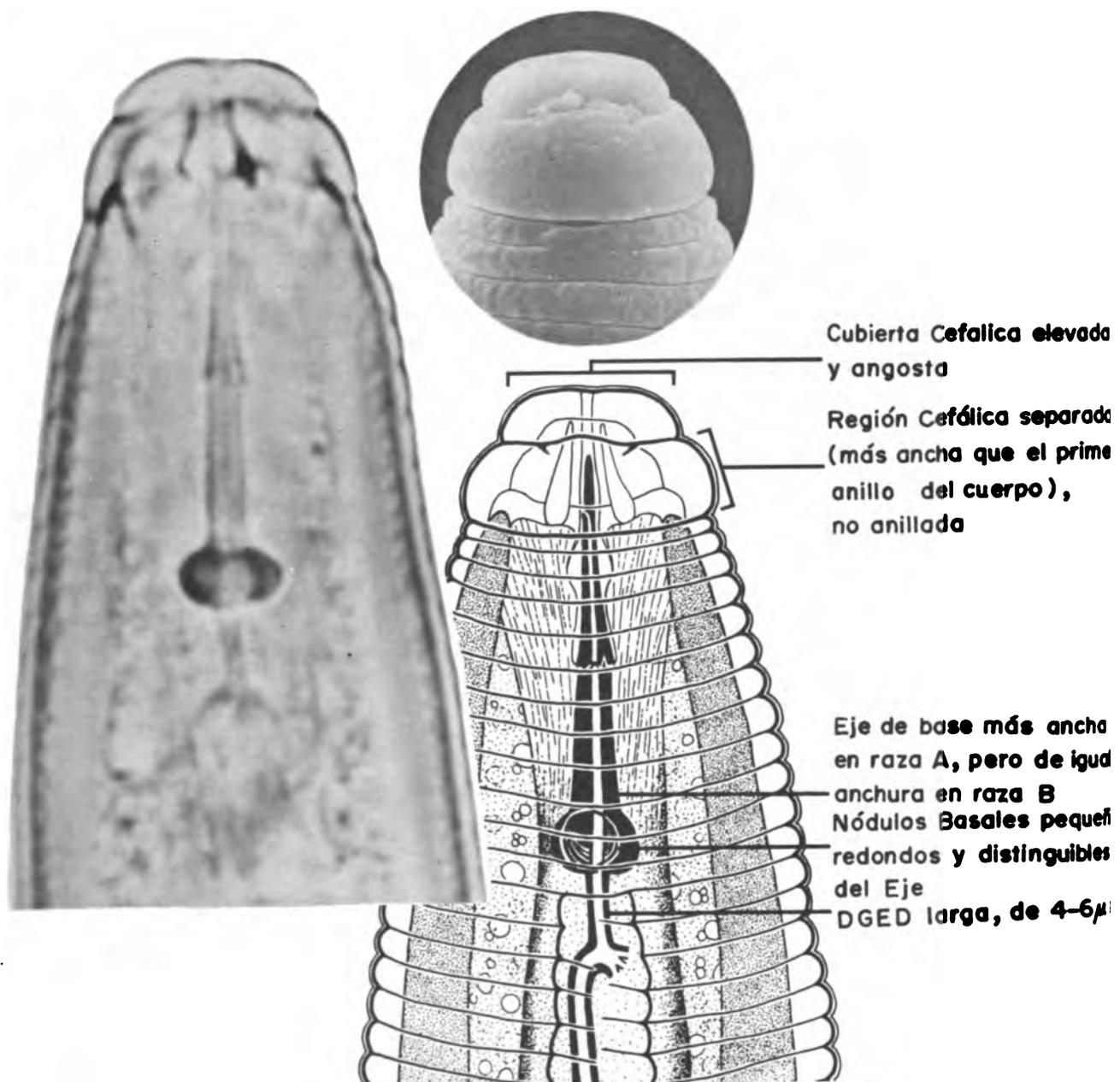
1. Morfología de la cabeza: La cubierta de la cabeza de los machos de M. arenaria (Fig. 4) es baja y en declive hacia atrás; constituye una estructura

lisa y continua que es casi tan ancha como la región cefálica. La región cefálica es por lo general lisa y rara vez, con uno o dos anillos incompletos (en algunas poblaciones).

2. **Estiletes:** El cono del estilete de los machos de M. arenaria (Fig. 4) es puntiagudo y la abertura del lumen se distingue por la presencia de una pequeña protuberancia en el lado ventral. La parte posterior del cono es mucho más amplia que la región anterior del eje. Por lo general, el eje es cilíndrico aunque en ocasiones su diámetro puede ser ligeramente más grande en la parte media. Los nódulos son grandes y emergen gradualmente del estilete, poseen dientes en su región anterior.

#### D. M. hapla

1. **Morfología de la cabeza:** Los machos de M. hapla poseen una cubierta cefálica alta, mucho más angosta que la región cefálica. Esta última región carece de anillos y se distingue de los anillos de la región del cuerpo, porque su diámetro es mayor, particularmente que el del primer anillo. Además, la anchura y la altura de los anillos del cuerpo se reducen a medida que se aproximan a la región cefálica.
2. **Estiletes:** El estilete de los machos de M. hapla (Fig. 5), es mucho más delgado y corto que el de las otras tres especies comunes de Meloidogyne. El cono aumenta su diámetro gradualmente hacia atrás, pero su base no es más ancha que la porción anterior del eje. En los individuos de la población pertenecientes a la raza A, el eje del estilete se ensancha a medida que se aproxima a los nódulos basales del estilete; éstos son redondos y distinguibles del eje. El estilete de la población raza B, es diferente al de la raza A, pues es más largo, siendo el cono en toda su longitud cilíndrico y con frecuencia provisto de dientes en la unión con los nódulos basales del estilete; los cuales también son más grandes. Por consiguiente, las dos razas pueden separarse con base en la morfología del estilete



**Fig. 5. Morfología de la cabeza y del estilete del macho de *Meloidogyne hapla* (según Eisenback et al., 1981).**

### Referencias Recomendadas

- Eisenback, J. D., Hirschmann, H., Sasser, J. N., and Triantaphyllou, A. C. 1981. A Guide to the Four Most Common Species of Root-knot Nematodes (Meloidogyne species) with a Pictorial Key. A Coop. Publ. Depts. of Plant Pathol. and Genetics, NC State Univ. and the U. S. Agency for Intl. Dev. Raleigh, NC 48 pp.
- Eisenback, J. D. 1985. In "An Advanced Treatise on Meloidogyne, Vol. I, Biology and Control". (J. N. Sasser and C. C. Carter, eds.), pp. 47-77. A Coop. Publ. of the Dept. of Plant Pathol., NC State Univ., and the U. S. Agency for Intl. Dev. NC State Graphics. Raleigh, NC.

## Ejercicio 5

### Clave Ilustrada para la Identificación de 16 Géneros de Nematodos Fitoparásitos

M. B. Harrison y W. F. Mai  
Department of Plant Pathology  
Cornell University  
Ithaca, NY 14853

#### 1. Objetivos

Se pretende introducir al estudiante al uso de una clave para identificar nematodos fitoparásitos. Con la práctica, el estudiante podrá familiarizarse también con algunos aspectos anatómicos y morfológicos de los nematodos que le darán los fundamentos necesarios para utilizar otras claves más elaboradas.

La clave siguiente, diseñada para identificar 16 géneros selectos de nematodos fitoparásitos, es una herramienta de instrucción para iniciar a los estudiantes en la identificación de nematodos. Estos géneros incluyen especies fitopatógenas muy importantes que poseen amplia distribución, encontrándoseles en distintos hábitats muy comunes en una o varias regiones geográficas y, por ende, relativamente fáciles de identificar por los estudiantes, mediante la observación de uno o varios aspectos morfológicos, bajo el microscopio compuesto correctamente calibrado.

No se hizo ningún intento para elaborar una clave natural o filogenética de los géneros. Esta clave es fundamentalmente una ayuda para la enseñanza y no intenta mostrar relaciones evolutivas o naturales entre los géneros, de acuerdo con la posición que ocupan en la clave.

De los cuidados que se tengan con los especímenes antes y después de ser extraídos de las partes vegetales o del suelo, así como durante la elaboración de los montajes semipermanentes, dependerá la calidad final de su apariencia. Para lograr los mejores resultados al respecto, se sugiere que los estudiantes sigan las indicaciones sobre el manejo y procesamiento de muestras, indicadas en otros ejercicios del presente manual. Se van a observar variaciones morfológicas entre los individuos de una misma población y también se tendrán dificultades en observar las características taxonómicas de ciertos especímenes, por lo tanto, será conveniente utilizar un mínimo de seis especímenes antes de intentar

llevar a cabo la identificación. Los caracteres que se utilizan en esta clave para separar a los géneros, son los que hemos encontrado que los estudiantes pueden reconocer más fácilmente y algunos de los términos que utilizamos, se definen brevemente en un glosario exprofeso al final del presente ejercicio.

## **2. Tiempo Requerido**

Dos periodos de laboratorio de 3 h cada uno será suficiente, si se incluye en la práctica la extracción de los nematodos a partir de muestras de suelo o de tejido vegetal, y si también los estudiantes han tenido ya la oportunidad de haber observado en montajes de nematodos, algunas de sus características morfológicas básicas. Si el grupo está familiarizado con la anatomía de los nematodos y si ya se tienen especímenes montados, entonces bastará solamente con un ejercicio de 3 h de laboratorio.

En caso que se vaya a incluir la mayoría de los 16 géneros, se tenga que procesar muestras y se pretenda enseñar a hacer los montajes de nematodos, entonces se necesitarán tres sesiones de laboratorio de 3 h cada una.

## **3. Procedimiento**

A. El profesor se asegurará de obtener muestras de suelo o de porciones vegetales que contengan uno o varios de los géneros incluidos en la clave. También deberá de examinar la muestra para determinar la presencia de otros géneros no incluidos en la clave y que pudieran confundir a los estudiantes. De ser ésta la situación, se tiene que desechar el material, o procesarlo para extraer a los nematodos y coleccionar en forma individual, solamente a los representantes de los géneros designados\*. Los especímenes pueden conservarse en frascos para su uso posterior en las prácticas de laboratorio.

\*

Independientemente de cuáles sean las precauciones que se tomen para limitar el material a los 16 géneros de interés, en muchas ocasiones las muestras contienen otros géneros de nematodos parásitos y no parásitos. Esto es perfectamente normal, ya que ambos tipos de nematodos son componentes de la mayoría de las faunas edáficas.

El ejercicio puede realizarse con un mínimo de 5 géneros, pero sería preferible si se pudiese tener el doble.

Los suelos o porciones vegetales que contengan nematodos (plantas completas o cultivos axénicos), deben prepararse para la práctica cuando menos con dos meses de anticipación, con el propósito de facilitar el incremento poblacional y verificar la identificación de los especímenes, antes de que sean dados a los estudiantes.

### Opción para 3 semanas

Preparar un recipiente para cada estudiante o grupo de estudiantes, conteniendo una muestra procedente de la mezcla de suelos infestados y porciones vegetales infectadas con nematodos.

Enseguida, los estudiantes deben procesar la muestra para extraer los nematodos mediante la utilización de las técnicas de centrifugación y flotación con azúcar, embudo de Baermann (o alguna variación del mismo), y la de Young para procesamiento de raíces.

Examinar el material extraído con el microscopio estereoscópico y practicar la elaboración de montajes semipermanentes con especímenes frescos y relajados, de acuerdo con las indicaciones de las técnicas explicadas en el Ejercicio 32.

Para proceder a utilizar la clave durante la segunda y tercera sesión del laboratorio, seleccionar aquellos especímenes que tengan estilete y que sean hembras maduras. Hacer algunos montajes semipermanentes como se indicó en la semana anterior. Para identificar los géneros con la clave, utilizar los objetivos 40X o 100X de un microscopio compuesto con la iluminación de Kohler correctamente ajustada.

Cuando haya hecho una identificación, el estudiante debe consultar la descripción, las fotografías y dibujos del género en cuestión para auxiliarse en la verificación de dicha identificación.

### Opción para una semana

Los especímenes a utilizar en esta opción, se pueden obtener a partir de suelos, partes vegetales o cultivos axénicos. El profesor o ayudante de laboratorio, debe capturar con la ayuda del pescador a diversos especímenes y colocarlos en uno o varios

frascos conteniendo agua de la llave. Cada frasco debe contener una mezcla de todos los nematodos que se vayan a usar en este ejercicio. El estudiante debe obtener de cada frasco una o dos gotas representativas y proceder a trabajar con los montajes de especímenes frescos y relajados, como se indicó previamente en la opción para las tres semanas.

**Opción simplificada**

Extraer los nematodos fitopatógenos a partir de suelos, partes vegetales o cultivos monoxénicos, como se indicó antes en la opción para las tres semanas. Antes de iniciar la sesión, el profesor o el ayudante, debe capturar individualmente los especímenes representativos de cada género y colocarlos dentro de frascos separados conteniendo agua. Los frascos deben de marcarse con números clave guardando su identidad. Enseguida, el estudiante procederá a relajar los especímenes calentando gradualmente a la suspensión en que se encuentran; hará montajes semipermanentes y procederá a utilizar la clave y las ayudas complementarias para identificar los géneros.

**Clave Descriptiva para 16 Géneros de Nematodos Fitoparásitos**

1. Estilete ausente.--(Lámina I C,D,E) no fitoparásito.
- 1a. Estilete presente.-----2.
2. Nódulos basales del estilete ausentes; esófago de dos partes y desprovisto de válvulas, porción anterior esbelta, porción posterior glandular y muscular. (I A) DORYLAIMOIDEA-----3.
- 2a. Nódulos basales del estilete por lo general presentes; esófago de tres partes con el metacorpus (bulbo medio) valvulado, seguido del istmo esbelto y el bulbo basal glandular. (I B) TYLENCHIDA-----4.
3. Estilete corto y curvo; cuerpo corto y grueso (menos de 1.5 mm de largo).----- (II A) Trichodorus.
- 3a. Estilete recto, muy adelgazado, provisto de largas extensiones; cuerpo largo y esbelto, que adopta postura en forma de C abierta cuando se relaja con calor. ----- (II B,C) Xiphinema.
4. La desembocadura de la glándula dorsal en el procorpus; metacorpus moderado o reducido de tamaño (menos de 3/4 del ancho del cuerpo). TYLENCHOIDEA -----5.

- 4a. La desembocadura de la glándula dorsal no se encuentra en el procorpus; metacorpus muy grande (3/4 o más del ancho del cuerpo).----- (II E) APHELENCHOIDEA. Cola de la hembra usualmente conoide, por lo general provista de un terminus con una o más puntas afiladas (cola mucronada); nódulos del estilete muy pequeños (en algunas especies).----- (II D) Aphelenchoides.
5. Hembra madura muy grande (de forma de limón, pera o piriforme, riñón o reniforme saco o sacciforme) localizada en la raíz de la planta, embebida en los tejidos o simplemente adherida con el cuello; algunas se presentan en forma de quistes en el suelo.-----6.
- 5a. Hembra madura vermiforme, esbelta o ligeramente hinchada. -----9.
6. Cuerpo de la hembra madura sacciforme o reniforme.----7.
- 6a. Cuerpo de la hembra madura piriforme, globoso o con forma de limón.-----8.
7. Cuerpo de la hembra madura reniforme, posición de la vulva al 60% o menos del largo total, a partir de la cabeza.----- (III B) Rotylenchulus.
- 7a. Parte posterior del cuerpo de la hembra madura protruida y sacciforme, pero conservando la cola puntiaguda; posición de la vulva al 90% del largo total del cuerpo; parásitos de cítricos y olivos.---- (III A) Tylenchulus.
8. Cuerpo de la hembra madura piriforme, de color blanco perlado y embebido total o parcialmente en el tejido radical u otro tejido vegetal; casi siempre dentro de agallas distinguibles o "nódulos de la raíz".----- (III F,G,H,I) Meloidogyne.
- 8a. Cuerpo de la hembra madura globoso o en forma de limón, de color blanco, amarillo o pardo según la edad; adherida a la raíz por el cuello o libre en el suelo en forma de quiste obscuro.----- (III C,D,E) Heterodera.
9. Hembra madura con cutícula o vaina extra, istmo del esófago corto o ausente.----- (IV A,B) Hemicycliophora.
- 9a. Hembra madura sin cutícula o vaina extra.-----10.
10. Cuerpo con anillos prominentes orientados hacia atrás.----- (IV C) Criconemella.
- 10a. Cuerpo sin anillos prominentes orientados hacia atrás.-----11.

11. Estilete corto (15  $\mu$ m o menos de longitud) con nódulos esféricos y finos. La hembra madura generalmente larga, esbelta y activa; presente en bulbos, tallos, hojas y tubérculos, así como en los suelos.-----  
------(IV D,E) Ditylenchus.
- 11a. Estilete robusto (por lo general de más de 15  $\mu$ m de largo), cola gradualmente adelgazada o abruptamente redondeada.-----12.
12. Abertura de la glándula esofágica dorsal localizada por detrás de los nódulos del estilete, a una distancia mayor de 1/4 del largo total de éste; postura en forma espiralada cuando expuestos al calor.-----  
------(IV F) Helicotylenchus.
- 12a. Abertura de la glándula esofágica dorsal por detrás de los nódulos, a una distancia menor de 1/4 del largo del estilete.-----13.
13. Longitud total del cuerpo por lo menos de 2 mm, delgados (a = 45 o más), estilete muy largo; seis veces o más que el ancho de la región labial.------(V D) Belonolaimus.
- 13a. Longitud total del cuerpo menor de 1.5 mm; tamaño del estilete no mayor que 5 veces el diámetro de la región labial.-----14.
14. Nódulos del estilete masivos, provistos de proyecciones anteriores conspicuas semejando un tulipán, fasmidios agrandados. ------(V C) Hoplolaimus.
- 14a. Nódulos del estilete bien desarrollados, de forma esférica y sin proyecciones anteriores conspicuas.---15.
15. El esófago traslapa al intestino ventralmente.-----  
------(V A,B) Pratylenchus.
- 15a. El esófago traslapa al intestino dorsalmente, o no lo traslapa.-----16.
16. El esófago sin traslapar, hembra de cola cilíndrica y parte terminal abruptamente redondeada, no puntiaguda.-----  
------(V E,F,G) Tylenchorhynchus.
- 16a. El esófago traslapa al intestino dorsalmente; cola delgada a ligeramente redondeada o con la parte terminal puntiaguda.------(V H) Radopholus.

## Ilustraciones\* y Material Complementario

### Lámina I

- A. Nematodo fitoparásito tipo Dorilaimoideo, con odontoestilete y esófago de 2 partes sin región valvular.
- B. Nematodo fitoparásito tipo Tilencoideo, con estomatoestilete, esófago de tres partes y metacorpú valvulado.
- C. Nematodo no fitoparásito tipo Panagrolaimoideo, estoma poco profundo en lugar de estilete; esófago de dos partes con región basal valvulada.
- D. Nematodo no fitoparásito tipo Rhabditoideo, estoma profundo en lugar de estilete; esófago de dos partes con región basal valvulada.
- E. Nematodo no fitoparásito tipo Mononcoideo, con estoma en lugar de estilete; esófago de dos partes sin región basal valvulada.

### Lámina II

- A. Trichodorus sp. Estilete curvo, esófago de dos partes sin aparato valvular, cuerpo corto y grueso (480X).
- B. Xiphinema sp. Hembras maduras (198X).
- C. Xiphinema sp. Porción anterior de la hembra (457X).  
a: Anillo guía; b: Rebordes o "flanges" (Nt: tipo de molduras redondeadas).
- D. Aphelenchoides sp. Estilete de la hembra con nódulos basales sumamente pequeños y metacorpú abultado (425X).  
a: Mucro.
- E. Aphelenchoidea (Aphelenchus sp). Sección anterior de la hembra con el metacorpú abultado y los nódulos basales pequeños. (645X).

\* Las fotografías y dibujos son de Mai y Lyon, 1975. Cortesía de "Cornell University Press". Las fotografías fueron tomadas y montadas en las láminas por H. H. Lyon.

### Lámina III

- A. Tylenchulus sp. Hembra de cola aguzada, vulva al 90% del largo total del cuerpo.
- B. Rotylenchulus sp. Hembra madura reniforme y vulva al 60% o menos del largo total del cuerpo.
- C. Heterodera sp. Quistes conteniendo huevecillos (76X).
- D. Heterodera sp. Macho (219X).
- E. Heterodera sp. Larva (219X).
- F. Meloidogyne sp. Hembra madura (233X).
- G. Meloidogyne sp. Larva (211X).
- H. Meloidogyne sp. Larva en forma de salchicha procedente de la raíz de la planta. (277X).
- I. Meloidogyne sp. Macho (182X).

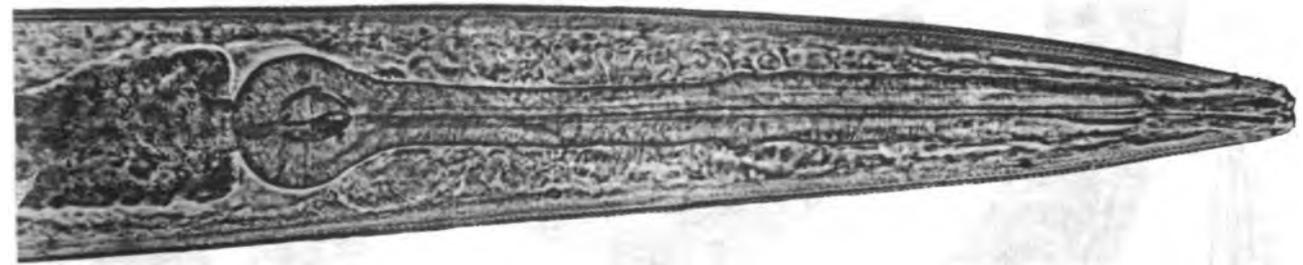
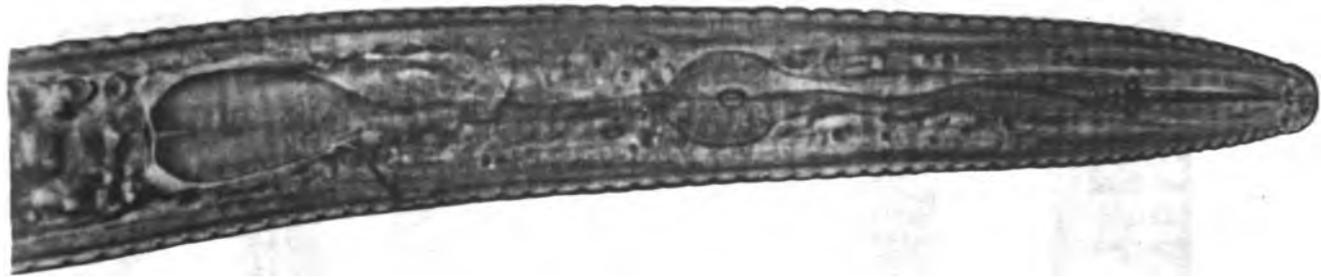
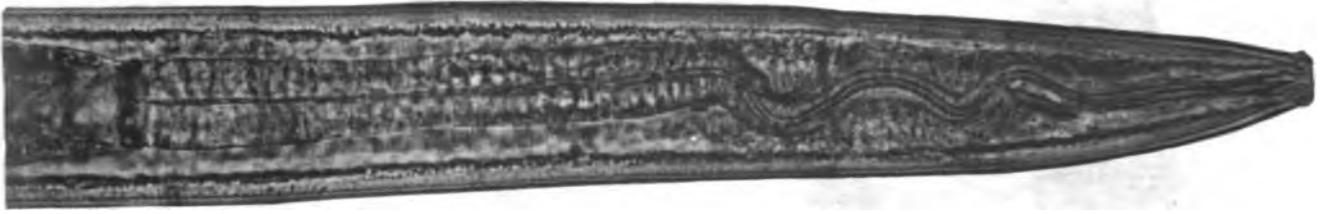
### Lámina IV

- A. Hemicycliophora sp. Porción anterior de la hembra (613X).
- B. Hemicycliophora sp. Porción posterior de la hembra (613X).
- C. Criconemella sp. Hembra madura (429X).
- D. Ditylenchus sp. Porción anterior de la hembra (248X).
- E. Ditylenchus sp. Hembra madura (146X).
- F. Helicotylenchus sp. Hembra madura (650X).

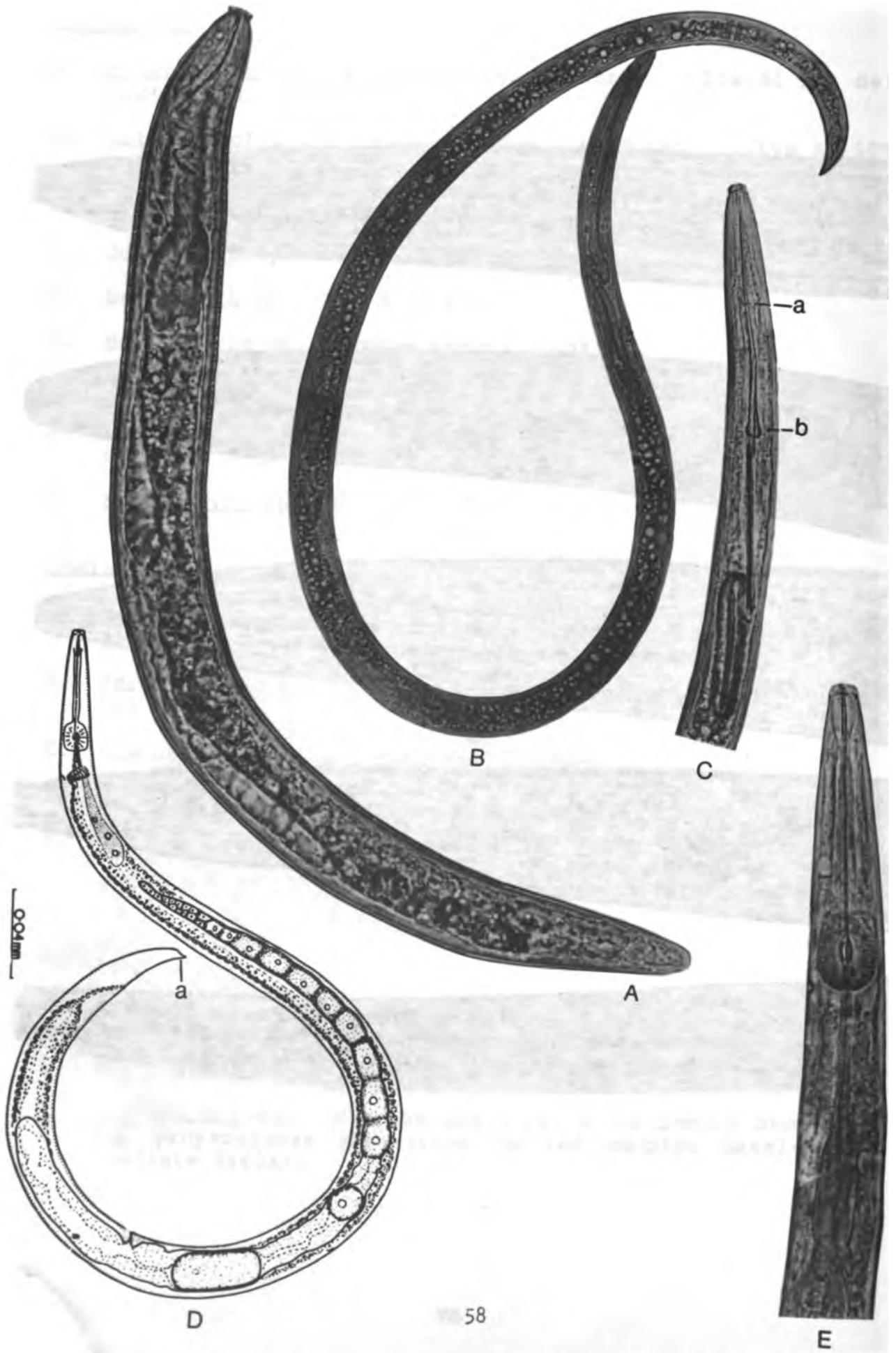
### Lámina V

- A. Pratylenchus sp. Hembra madura, con el esófago traslapando al intestino ventralmente (605X).
- B. Pratylenchus sp. Porción anterior de la hembra (903X).
- C. Hoplolaimus sp. Porción anterior de la hembra mostrando las proyecciones anteriores de los nódulos basales del estilete (462X).

LAMINA I



LAMINA II



B

C

A

D

E

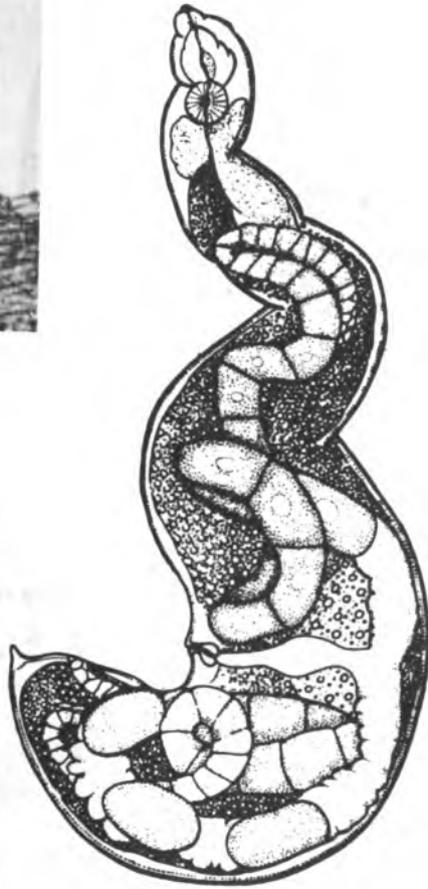
LAMINA III



A



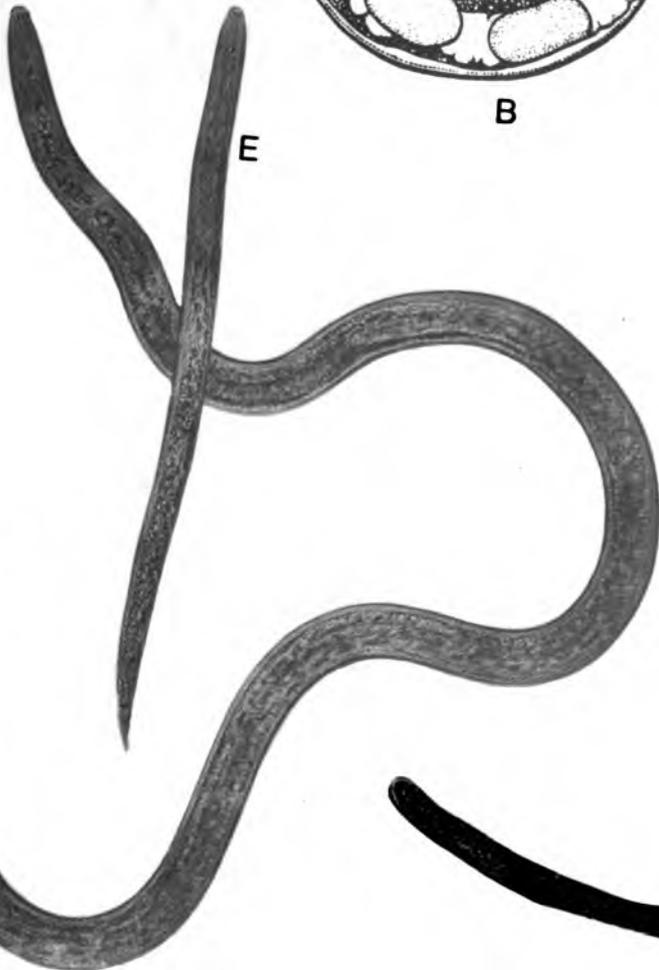
C



B



F



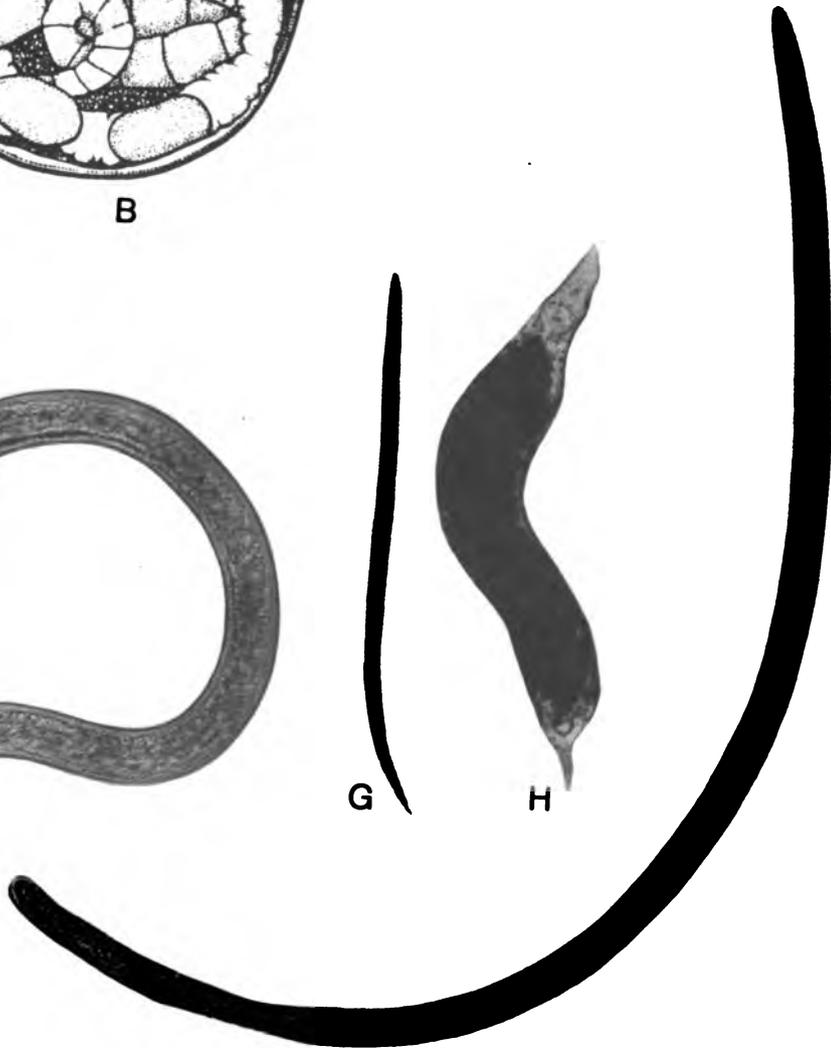
D

E



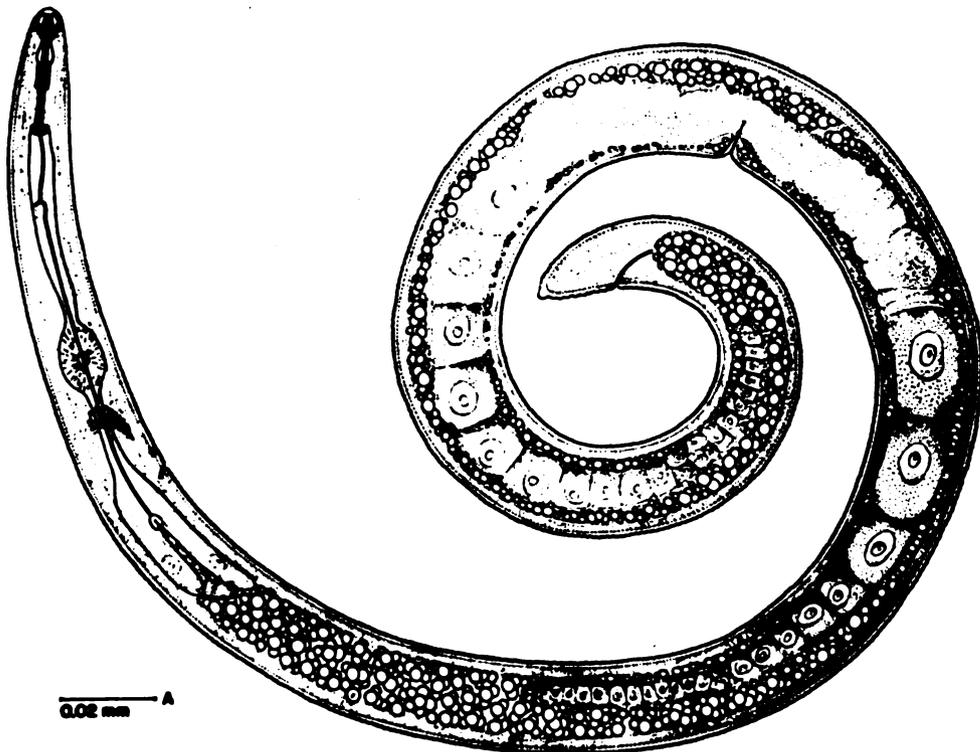
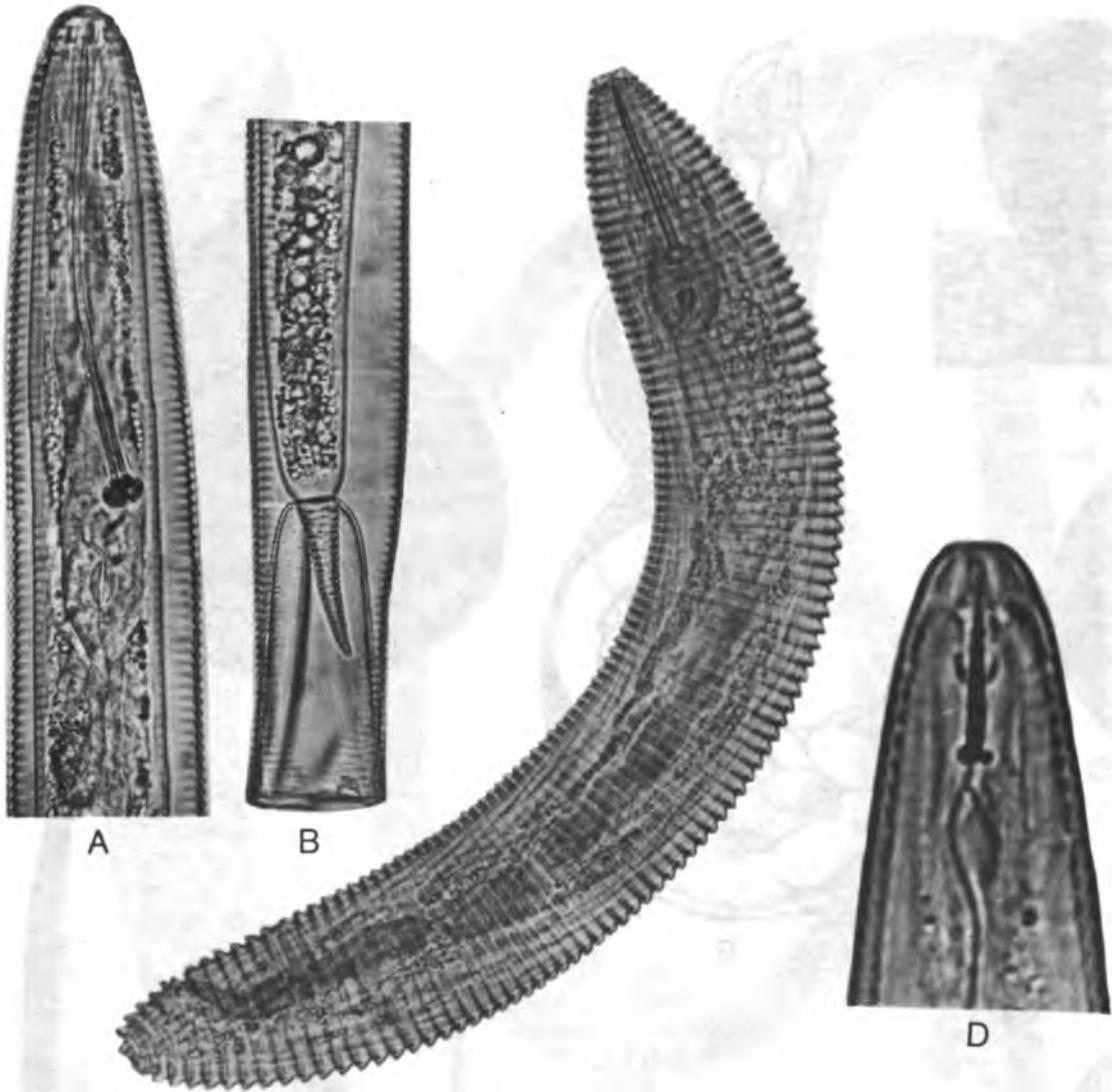
G

H

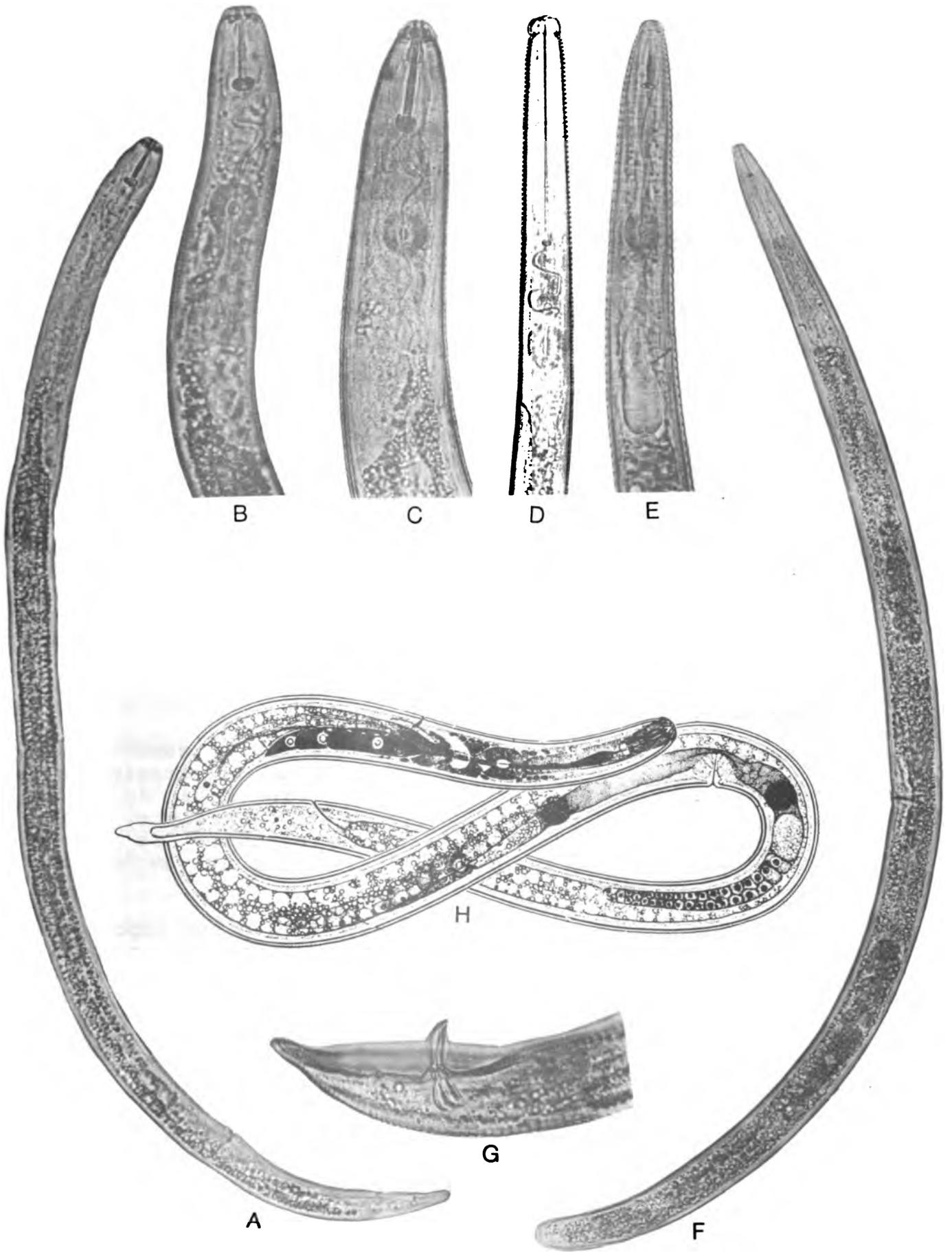


I

LAMINA IV



LAMINA V



- D. Belonolaimus sp. Porción anterior de la hembra (321X).
- E. Tylenchorhynchus sp. Porción anterior de la hembra (581X).
- F. Tylenchorhynchus sp. Hembra madura sin esófago traslapando (278X).
- G. Tylenchorhynchus sp. Cola del macho (605X).
- H. Radopholus sp. Hembra joven (501X).

### Información Descriptiva y Económica Complementaria

#### Trichodorus

Nematodos de aspecto rollizo (0.4-1.5 mm de largo) con cutícula gruesa, cola abruptamente redondeada y odontoestilete curvo desprovisto de nódulos basales. Las hembras por lo general poseen dos ovarios y la vulva se localiza casi a la mitad del cuerpo.

Las poblaciones más abundantes de estos nematodos ocurren en suelos ligeros y pueden encontrarse hasta profundidades de 100 cm. Posiblemente sean muy sensibles al estrés hídrico. Son extremadamente importantes en la remolacha, el apio, el maíz dulce y cultivos hortícolas. También son vectores de virus fitopatógenos.

#### Xiphinema

Nematodos de cuerpo largo (1.5-5.0 mm) y esbelto, con odontoestilete provisto en su base de engrosamientos o molduras ("flanges"). El anillo guía se ubica aproximadamente a la mitad del estilete. Son ectoparásitos cuyos diferentes estadios se pueden recuperar de los suelos, no obstante; a los machos rara vez se les encuentra.

Las especies pertenecientes a este género son importantes porque, además de los daños que por sí mismas provocan a las plantas hospedantes, son también vectoras de un gran número de virus fitopatógenos. Algunas especies inducen la formación de agallas características en las puntas de las raíces atacadas.

De gran distribución en los Estados Unidos, América Central, India, Sri Lanka, Australia y Europa y amplio rango de hospedantes. En ausencia de hospedantes algunas especies son capaces de sobrevivir en los suelos hasta por 4.5 años.

## Aphelenchoides

Nematodos esbeltos (de 0.5-1.2 mm de largo), provistos de un metacarpus característicamente abultado que ocupa cuando menos 3/4 del ancho del esófago. El estilete es fino y provisto de nódulos pequeños. El intestino se une directamente al metacarpus y el ovario es extendido. Los machos carecen de bursa y las colas en ambos sexos pueden terminar con una estructura puntiaguda llamada mucro.

Aphelenchoides es uno de los pocos géneros cuyas especies atacan al follaje de las plantas. Su movimiento depende de la presencia de una película de agua sobre la superficie de la planta, por consiguiente; es el microclima quien determina la magnitud del daño. La supervivencia de estos nematodos es muy baja en ausencia de hospedantes, por lo que la rotación de cultivos es con frecuencia un buen método para controlarlos. Los mayores daños económicos se presentan en arroz, fresa y cultivos ornamentales.

## Rotylenchulus

Las hembras maduras (de 0.3-0.5 mm de longitud) hinchadas, tienen la apariencia de riñón y poseen dos ovarios. Son endoparásitos cuyos sitios establecidos de alimentación lo constituyen "células gigantes" en la corteza radical. Se encuentran principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, en cultivos como piña, algodón, papaya, plátano o banano, té y tomate (Nt: en México, "jitomate"). Sus poblaciones son difíciles de controlar, porque se incrementan de una manera muy rápida.

## Tylenchulus

La parte posterior de la hembra es hinchada y protruye de los tejidos radicales presentando una masa de huevecillos. Aquí se observan la vulva que es muy conspicua y el poro excretor, un poco anterior a aquélla. Esto es raro, pues en la mayoría de los Tylenchidae, éste último se encuentra por arriba del plano ecuatorial. Los machos carecen de bursa.

Nematodo endoparásito de gran importancia económica en todas las regiones citricolas del mundo; es el responsable de la enfermedad conocida como "decaimiento lento". Las elevadas poblaciones de estos nematodos interfieren con el desarrollo de las raíces alimenticias, lo cual puede provocar que las plantas sufran de estrés hídrico y/o de deficiencias nutricionales.

## Meloidogyne

La hembra hinchada de color blanco perlado, posee aspecto piriforme (0.45-1.3 mm de longitud) y cuello largo. Son nematodos endoparásitos que se encuentran embebidos en los tejidos radicales, dentro de las agallas o "nódulos", alimentándose de las "células gigantes". En la región posterior del cuerpo que sobresale de los tejidos de la raíz, se encuentra la masa gelatinosa con los huevecillos. Machos vermiformes (1.0-1.5 mm de largo) con región labial en forma de gorro, estilete y nódulos bien desarrollados. Carecen de bursa y muy rara vez se les encuentra, con excepción de los períodos en que el alimento es escaso. Las larvas (0.3-0.6 mm de largo) poseen estilete delicado y son frecuentes en los suelos.

Las especies de este género atacan a un amplio espectro de plantas hospederas, son muy conocidas y constituyen el grupo de nematodos de mayor importancia económica mundial. Las densidades poblacionales más grandes y los daños más severos, se presentan en las regiones de clima cálido de todo el mundo. Pueden causar daño a las plantas hospedantes en forma directa o indirecta; en este caso, alterando la capacidad de resistencia contra otros fitopatógenos.

## Heterodera

La hembra hinchada (0.4-0.8 mm de largo) tiene por lo general forma de limón cuando todavía conserva el cuello y la vulva protruidos. Puede ser de color blanco o amarillo cuando están inmaduras, pero al madurar se oscurece en distintos matices de pardo o moreno. El estilete bien desarrollado posee prominentes nódulos basales. Los huevos pueden retenerse dentro del cuerpo o bien fuera del mismo en una masa gelatinosa producida por el organismo. El cuerpo endurecido de la hembra, o "quiste", funciona como estructura protectora de los huevos. Los machos (0.6-1.6 mm de largo) son comunes en la mayoría de las especies. Las larvas (0.35-0.5 mm de largo) poseen estiletes robustos y se encuentran en forma abundante en los suelos.

Los elevados niveles poblacionales de estos nematodos endoparásitos, causan importantes enfermedades en las plantas que crecen en los climas particularmente templados, como muchas herbáceas y ciertos cultivos anuales como trigo, avena, frijol soya, remolacha, col, etc. Son muy difíciles de controlar, debido a la pared del quiste que los protege contra la desecación y la acción de los nematicidas.

## Hemicycliophora

El cuerpo de las hembras está cubierto por dos cutículas, la externa semeja a una vaina y protege a la cutícula interna. Las hembras (0.8-2.0 mm de longitud) poseen estilete muy largo (80-120  $\mu\text{m}$ ) y bien desarrollado. El metacarpus se encuentra fusionado con la parte anterior del esófago, de la misma manera que en Criconemella. Tienen un ovario y la vulva se encuentra en la parte posterior del cuerpo.

Este género es un ectoparásito que al alimentarse de las plantas es capaz de inducir agallas pequeñas en la raíz y estimular la formación de raíces laterales.

## Criconemella

Nematodo típicamente corto (0.3-0.8 mm), ectoparásito, provisto de un robusto y bien desarrollado estilete. Su extracción del suelo es más eficiente con la utilización del método de centrifugación y flotación con azúcar, que el pasarlos a través de filtros. El metacarpus se une a la región anterior del esófago. Posee un ovario y la vulva se encuentra cerca de la parte terminal del cuerpo.

Las células individuales de la raíz, aun las más profundas, pueden morir directamente por la acción del estilete durante el proceso de alimentación. Se han reportado daños significativos en las plantas hospedantes en presencia de niveles poblacionales muy altos. Puede haber invasiones secundarias de otros fitopatógenos del suelo en las zonas de daño. Son patógenos de una gran variedad de cultivos incluyendo vid, durazno, ciertas plantas ornamentales y césped.

## Ditylenchus

Nematodo vermiforme de hasta 2 mm de largo, localizado dentro de los tejidos de las plantas. Posee estilete muy pequeño, esófago largo con metacarpus bien desarrollado y glándulas esofágicas que no se traslapan con el intestino. Tiene un solo ovario y la vulva se localiza en la región posterior del cuerpo, en donde puede estar presente el prominente saco postvulvar. Los machos presentan bursa bien formada.

Varias de sus especies son patógenos importantes ya que dañan a una amplia variedad de cultivos; principalmente en las regiones templadas. Sobreviven períodos considerablemente prolongados, gracias a que son capaces de adquirir un estadio resistente a la desecación en el que tienen aspecto "lanudo".

### Pratylenchus

Nematodo endoparásito migratorio (menos de 1 mm de largo), que puede obtenerse tanto del suelo como de las raíces. De estilete bien desarrollado y provisto de grandes nódulos basales. Con un solo ovario y vulva localizada en el último cuarto del cuerpo del animal.

Fitoparásito muy importante que se encuentra frecuentemente asociado a árboles perennes, así como a ciertos cultivos herbáceos, en una amplio rango de localidades geográficas. Las pudriciones radicales asociadas a la infección del nematodo son responsables, con frecuencia, de los crecimientos débiles y las pérdidas en las cosechas.

### Belonolaimus

Nematodo ectoparásito muy largo y esbelto (2.0-3.0 mm), con la región labial distinta del resto del cuerpo y un estilete muy largo. La cola de las hembras termina en punta redondeada, mientras que la de los machos es aguzada y presenta bursa conspicua.

Los daños más severos inducidos por estos nematodos se han reportado en cultivos como el algodón, maíz, cacahuate o maní, pastizales y césped; particularmente cuando éstos crecen en suelos arenosos. Con frecuencia, otros fitopatógenos del suelo son favorecidos para expresar su virulencia, como resultado de la actividad de este nematodo. Puede destruir los sistemas radicales o reducirlos de tamaño.

### Radopholus

Menos de 1 mm de largo. Las hembras poseen estilete corto, región labial redondeada, dos ovarios y vulva aproximadamente a la mitad del cuerpo. Los machos tienen estilete rudimentario y esbelto y la región labial es de aspecto nudoso. Las glándulas esofágicas son grandes y traslapan dorsalmente al intestino en ambos sexos.

Son endoparásitos migratorios que se encuentran tanto en el suelo como dentro de los tejidos radicales. Son de importancia económica en el cultivo del plátano y banano y en el de los cítricos. Existen dos patotipos morfológicamente parecidos: uno de ellos ataca al banano y plátano, y el otro a cítricos pero no al banano y plátano. Ambos tienen amplia gama de hospedantes. Los árboles enfermos carecen de las raicillas encargadas de la absorción de nutrientes y del anclaje de las plantas, por ello; en el caso de las plantas de banano

infectados, éstas se "vuelcan" fácilmente. Los cítricos manifiestan decaimiento lento, presentando reducciones del follaje y baja productividad.

### Tylenchorhynchus

Ectoparásitos (0.6-1.4 mm de largo) que algunas veces se comportan como endoparásitos. Su estilete es esbelto, provisto de nódulos basales bien desarrollados. Las glándulas esofágicas no se traslapan con el intestino. Tienen dos ovarios y la vulva se localiza cerca de la mitad del cuerpo. La longitud de la cola es dos veces o más grande que el diámetro del cuerpo a la altura del ano, pudiendo terminar en forma redondeada o adelgazada. La cola de los machos presenta bursa.

Poco se sabe respecto a los daños inducidos por estos nematodos; sin embargo, existen algunos reportes de serios achaparramientos en algunos cultivos atacados por algunas especies de este género.

### Hoplolaimus

Estos nematodos (1.1-1.6 mm de largo) se encuentran presentes en las raíces y el suelo. Cuando se les relaja por medio de calor, el cuerpo adopta una postura ligeramente curvada. La abertura de la glándula esofágica dorsal está cerca de la base del estilete, los fasmidios son muy grandes, uno de los cuales se puede presentar por delante de la vulva, la que tiene una posición central en el cuerpo. Cola corta y redonda, y glándula esofágica provista de un lóbulo corto.

Las altas densidades poblacionales de este nematodo pueden causar daños a una gran variedad de cultivos como el maíz, alfalfa, trébol rojo, caña de azúcar y césped. El daño y muerte del tejido vascular o cortical de la raíz, provoca síntomas de daño radical.

### Helicotylenchus

Por lo general son ectoparásitos (0.6-1.1 mm de largo) pero a veces se les puede encontrar dentro de los tejidos de la corteza radical. Su cuerpo adopta una postura en espiral cuando se relaja con calentamiento lento. Poseen un estilete bien desarrollado y de tamaño moderado. Los fasmidios son pequeños y se les encuentran cerca del ano.

Uno de los problemas económicos más serios que causan, ocurre en el cultivo del banano. La invasión secundaria por otros microorganismos, puede dar origen a pudriciones radicales de naturaleza compleja. Además, afectan una

amplia gama de hospedantes en climas tropicales y templados.

## Glosario

**Arqueado.** Ventralmente curvo.

**Bulbo esofágico basal (también bulbo basal).** Parte posterior del esófago, el cual puede constituir un bulbo bien definido o un lóbulo que traslapa al intestino tanto en el lado ventral como en el dorsal.

**Bursa.** Extensión de la cutícula en la cola de los machos que sirve para sujetar a la hembra u orientarse durante la cópula.

**Desembocadura de la glándula dorsal (u orificio dorsal esofágico).** Lugar donde la glándula dorsal vierte su contenido dentro del lumen del esófago. Se observa como un dobléz del lumen del esófago en los Tylenchida. En los géneros de Aphelenchida (Aphelenchoides), dicha salida está en el metacarpus, por lo que no hay dobléz del lumen del esófago y tampoco puede vérsese con claridad.

**Esófago.** Parte del canal alimenticio, por lo general va de la base del estilete hasta la porción anterior del intestino.

**Poros excretor.** Abertura cuticularizada sobre el lado ventral del cuerpo; localizada por lo general, a la mitad de la región posterior del esófago.

**Flanges.** Engrosamientos o molduras en la base de las extensiones del estilete en Xiphinema.

**Anillo guía.** Estructura en forma de manga que rodea y sirve de guía al estilete en los miembros de Dorylaimoidea. Puede localizarse cerca de la punta o en la parte posterior del estilete.

**Metacarpus.** Es la porción media del esófago, voluminosa y muscular, que también se le conoce como el bulbo medio.

**Mucro.** Es una estructura puntiaguda e inflexible, que se localiza en la porción terminal de la cola de algunos nematodos.

**Fasmidio.** Estructura en forma de poro, que probablemente funciona como quimiorreceptor. En algunos nematodos se encuentra en los campos laterales en la región posterior del cuerpo.

**Estilete.** Estructura en forma de lanza localizada en el extremo anterior de los nematodos fitoparásitos, los cuales la utilizan para perforar a las células vegetales.

**Nódulos del estilete.** Engrosamientos protuberantes en la base del estilete, por lo general presentes en número de tres.

**Vulva.** Región del sistema reproductor femenino, que por lo general aparece como una incisión transversal en el lado ventral del cuerpo de la hembra.

### Referencias Recomendadas

**Anderson, R. V., and R. H. Mulvey.** 1979. Plant Parasitic Nematodes in Canada. Canadian Gov't. Publ. Center. Hull, Canada.

**Dropkin, V. H.** 1980. Introduction to Plant Nematology. John Wiley & Sons, New York.

**Mai, W. F., and H. H. Lyon.** 1975. Pictorial Key to Genera of Plant Parasitic Nematodes. Cornell University Press, Ithaca, NY.

## Ejercicio 6

### Identificación de Especies y Razas de Meloidogyne Mediante la Prueba con Hospedantes Diferenciales

Ronald F. Myers  
Plant Pathology Department  
Cook College, Rutgers University  
New Brunswick, NJ 08903

El noventa y ocho por ciento de los nematodos agalladores de la raíz encontrados en diversos suelos agrícolas, son identificados como Meloidogyne incognita, M. arenaria, M. javanica o M. hapla; responsables de las mayores pérdidas agrícolas a nivel mundial (Sasser, 1980).

#### 1. Objetivos

El propósito del presente ejercicio es identificar, en forma tentativa, a las especies más comunes de Meloidogyne mediante la utilización de la prueba con hospedantes diferenciales, modificada en Carolina del Norte. La especie M. chitwoodi, parásita de la papa, maíz, trigo y otros cultivos podría también incluirse si se encuentra presente en el área en donde se pretenda llevar a cabo este ejercicio. La confirmación de las identificaciones respectivas, debe hacerse en combinación con la observación de los patrones perineales y la consulta de la información disponible (ver el Ejercicio 35). Las razas de M. incognita y M. arenaria poseen preferencias distintas de hospedantes y pueden también ser identificadas con el presente ejercicio.

#### 2. Tiempo Requerido

Si los estudiantes trabajan en grupos de tres y si todos los materiales para la práctica se encuentran disponibles, el ejercicio puede llevarse a cabo en una sola sesión de laboratorio. Sin embargo, se requiere un periodo previo de seis a ocho semanas para permitir el crecimiento de las plantas en condiciones de invernadero (24-30 C.) Además, se necesita otra sesión de tres horas para examinar y evaluar las raíces de las plántulas y poder concluir el ejercicio.

#### 3. Procedimiento

Para este ejercicio, los profesores deben obtener con la debida antelación, las poblaciones identificadas de las distintas especies de Meloidogyne, las cuales serán dadas

a los estudiantes, en forma codificada, para que intenten identificarlas mediante varios ensayos con las plantas diferenciales.

#### Paso I

Incrementar las poblaciones iniciales de Meloidogyne en plántulas de tomate (Rutgers), cuatro meses antes de que se inicie el ejercicio, con el propósito de contar con el inóculo suficiente para la prueba con las diferenciales. Aproximadamente cinco sistemas radicales totalmente agallados, procedentes de las plantas previamente inoculadas en macetas de 12.7 cm de diámetro, serán suficientes para cada una de las especies que se incluyan en el ejercicio. Mientras que M. hapla produce agallas pequeñas en las raíces del tomate, M. chitwoodi; prácticamente no induce agallamiento.

#### Paso II

Sembrar las semillas de las plantas diferenciales en macetas de 5 cm de diámetro, conteniendo la mezcla de suelo, (1:1) limo arenoso y arena de cuarzo esterilizada en autoclave; sembrar de acuerdo con la calendarización sumariada en el cuadro siguiente. Primero las semillas de tabaco (NC95) se germinan en una maceta conteniendo vermiculita finamente fraccionada y después, las plántulas se trasplantan a macetas de 5 cm de diámetro conteniendo la mezcla de suelo limo arenoso y arena de cuarzo. Las semillas de algodón, antes de sembrarse, deben rasparse con la ayuda de una lima.

#### Paso III

Obtener las larvas de Meloidogyne de las raíces de tomate utilizadas como fuente de inóculo, para infectar a los sistemas radicales de las plantas diferenciales.

Para remover las raíces de las macetas, sumergirlas en el agua contenida en un recipiente apropiado por 10 min. Enseguida, eliminar el resto de las partículas utilizando un chorro lento de agua corriente. Sacudir las raíces vigorosamente dentro de un volumen de 200 ml de NaOCl al 1% (se puede utilizar blanqueador comercial diluido), por espacio de 4 min. Pasar la suspensión a través de dos tamices empotrados entre sí, mallas 200/500 y terminar de lavar las raíces con agua de la llave, colocándolas sobre una malla 200, hasta lograr la máxima recuperación de huevecillos y eliminar, al mismo tiempo, el exceso de cloro.

Cuadro de Calendarización de Actividades:

Días Previos al Inicio del Ejercicio

120	90	42	24	0
Iniciar el inóculo de <u>Meloidogyne</u> en tomate (Rutgers)	Germinar semillas de tabaco en vermiculita (fina) y las del algodón en las macetas de 5 cm de diámetro con arena	Sembrar semillas de tomate, pimiento, sandía y cacahuete. Trasplantar las plántulas de tabaco a las macetas con arena	Sembrar el maíz	Obtener nematodos de raíces infectadas e inocular las plantas diferenciales en las macetas de 12.7 cm de diámetro

Variedades de plantas diferenciales:

Tomate - Rutgers  
 Pimiento - California Wonder  
 Sandía - Charleston Gray  
 Tabaco - NC95  
 Cacahuete - Florunner  
 Algodón - Delta Pine 16  
 Maíz - Field

Utilizar siempre suelo esterilizado en autoclave. Asegurarse de contar con dos o tres veces más de plantas de tal suerte que se puedan seleccionar por el porte para las repeticiones.

Colectar los huevecillos retenidos sobre la malla 500, ajustando el nivel final de inóculo a 1000 huevos y larvas por ml. Mantener la suspensión en un recipiente de acero inoxidable ya que, como se sabe, en los de plástico o vidrio, los huevecillos tienden a adherirse a la superficie.

#### Paso IV

Inocular cada uno de los sistemas radicales de las plantas diferenciales con 5000 huevos y larvas, aplicando un volumen de 5 ml de la suspensión sobre la superficie de las raíces removidas de las macetas de 5 cm de diámetro. Establecer nuevamente dichas plantas en macetas de 12.7 cm, utilizando como substrato arena de cuarzo esterilizada en autoclave. Poner 5 repeticiones por cada hospedante. Permitir crecer a las plantas por un período adicional de 40-60 días a 24-30 C, suministrando el riego suficiente para mantener las condiciones de humedad del suelo próximas a la capacidad de campo. Procurar no excederse en los riegos para evitar los problemas de pudrición radical. Fertilizar a las plantas cada semana, empleando fertilizantes solubles en agua; también de ser necesario, solamente utilizar insecticidas no sistémicos.

#### 4. Fuente de los Materiales

- a. Especies de Meloidogyne (ver Apéndice 2).
- b. Semillas de algodón, Delta Pine 60. Delta Pine Land Co. of Mississippi. P. O. Box 157, Scott, MS 38772.
- c. Cacahuate Florunner. Woodroe Fugate and Sons, Williston, FL 32696.
- d. Tabaco NC95. McNair Seed Co., P. O. Box 706, Laurinburg, NC 28352.

#### 5. Observaciones que Deben Hacerse

Las raíces de todas las plantas deben examinarse para determinar el índice de agallamiento y la presencia de masas de huevecillos. Para ello, primeramente sumergir en agua a las macetas con las plantas por espacio de 10 min, con el propósito de remover el suelo de las raíces. Terminar de limpiar las raíces, lavándolas cuidadosamente con agua corriente. Enseguida, hacerlas flotar en un recipiente conteniendo poca agua y expandirlas

apropiadamente para lograr observarlas con la máxima precisión. Las observaciones pueden facilitarse si se usa una lupa de tamaño conveniente y se les pone en un fondo oscuro para contrastarlas. Contar y promediar las agallas y las masas de huevecillos de la manera siguiente: Sin agallas ni masas de huevos = 0; de 1-2 agallas o masa de huevos = 1; 3-10 = 2; 11-30 = 3; 31-100 = 4 y más de 100 = 5 (Taylor y Sasser, 1978).

Anotar por separado las lecturas de los números de agallas y las masas de huevecillos para cada repetición. Calcular los promedios de ambas observaciones para cada planta diferencial. Los promedios de 1-2 se designan como negativos (-) y los de 4-5 como positivos (+). Comparar los resultados con el Cuadro 1 e identificar tentativamente a las especies o razas de Meloidogyne.

#### 6. Variación para Cambiar el Nivel de Intensidad del Ejercicio

Una serie de plantas creciendo en forma simultánea en un suelo no infestado, puede incluirse en el ejercicio para demostrar la influencia de las especies de Meloidogyne en el crecimiento de las plantas. Se pueden utilizar mediciones cuantitativas para determinar el grado de influencia que cada especie tiene en cada una de las plantas diferenciales.

#### 7. Consideraciones Importantes

Existen cuando menos 18 especies de Meloidogyne en Norte America. Es probable que estas especies también tengan razas como las que se indican para las especies comprendidas en el Cuadro 1. Si el presente ejercicio se lleva a cabo con una especie desconocida o con una diferente raza de las especies conocidas, los resultados obtenidos pueden ser confusos y contradictorios.

#### Referencias Recomendadas

Santo, G. S., O'Bannon, J. H., Finley, A. M., and Golden, A. M. 1980. Plant Disease 64:951-952.

Sasser, J. N. 1980. Plant Disease 64:35-41.

Taylor, A. L., and Sasser, J. N. 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes. (Meloidogyne species). Int. Meloidogyne Project. NC State Univ. and USAID. pp. 111.

Cuadro 1. Reacciones con la Prueba de Hospedantes Diferenciales (Sasser, 1980)

Especies de Meloidogyne	Algodón	Tabaco	Pimiento	Sandía	Cacahuete	Maíz	Porcentaje de Poblaciones Identificadas
<b>M. incognita</b>							
Raza 1	- <sup>1</sup>	-	+	+	-	+	37
Raza 2	-	+	+	+	-	+	10
Raza 3	+	-	+	+	-	+	6
Raza 4	+	+	+	+	-	+	2
<b>M. arenaria</b>							
Raza 1	-	+	+	+	+	+	1
Raza 2	-	+	-	+	-	+	6
<b>M. javanica</b>							
	-	+	-	+	-	+	30
<b>M. hapla</b>							
	-	+	+	-	+	-	7
<b>M. chitwoodi</b> <sup>2</sup>							
	-	-	-	-	-	+	>1

<sup>1</sup> (-) Indica reacción negativa o de no hospedante, valor 1-2.  
 (+) Indica reacción positiva, valor de 4 o mayor.

<sup>2</sup> Santo et al., 1980.

## Ejercicio 7

### Identificación de Familias de Nematodos Entomógenos con los Estadios de Vida Libre

George O. Poinar, Jr.  
Department of Entomological Sciences  
University of California  
Berkeley, CA 94720

#### 1. Objetivos

El propósito de la clave, es ayudar al estudiante a identificar aquellos estadios de nematodos entomógenos que se encuentran en distintos medios ecológicos (v.gr. suelo, fondos de charcas, arroyos y ríos, materia orgánica, excretas de origen diverso y maderas). Es muy fácil identificarlos cuando se encuentran en asociación con los insectos, ya que, en estas circunstancias, el diferenciarlos de los de vida libre, los bacteriófagos, los zooparásitos y los fitoparásitos, no es muy problemático. También existen otros estadios, incluyendo los sexuales. En el Cuadro 1, podemos observar que en algunos grupos, especialmente en Tylenchida, Aphelenchida y Rhabditida, solamente sus formas libres infectivas se encuentran en el medio ecológico donde viven. Ya se han publicado claves para nematodos asociados a insectos (Poinar, 1975, 1977; Poinar y Thomas, 1984).

Con excepción de los Oxyurida, los estadios de vida libre de los nematodos parásitos de insectos, pueden recuperarse con cualquiera de las técnicas que se utilizan en forma rutinaria para extraer nematodos fitoparásitos del suelo (ver el Ejercicio 34). Ya que los huevos son las únicas formas libres de Oxyuridos parásitos de invertebrados y, por lo mismo, extraordinariamente difíciles de reconocer, hemos decidido excluirlos de la clave. La mejor manera de coleccionar a los Oxyuridos consiste en disectar los insectos que normalmente se encuentran infectados, como las cucarachas y larvas de escarabajos, y examinar sus contenidos intestinales.

Con excepción de los mermitidos que son nematodos muy grandes y esbeltos, la mayoría de las formas libres de nematodos parásitos de insectos, presentan aproximadamente el mismo tamaño que las especies bacteriófagas y por lo tanto, deben identificarse bajo el microscopio compuesto. Después de extraerse, se pueden mantener en agua en condiciones de temperatura templada (10-15 C).

Para conveniencia de los estudiantes, las categorías taxonómicas superiores de las familias incluidas, se enlistan en el Cuadro 2.

**Cuadro 1. Estadios de Nematodos Entomógenos Presentes en el Medio Ambiente y Dentro del Insecto Hospedante.**

<b>Grupo de Nematodo</b>	<b>Estadios Presentes en el Medio Ambiente (suelo, humus, excretas, etc).</b>	<b>Estadios Presentes Dentro de los Insectos</b>
Mermithidae (Fig. 1)	Juveniles, postparasíticos, adultos, huevos, estadios infectivos	Juveniles
Tetradonematidae	Adultos, huevos, estadios infectivos	Juveniles, adultos, huevos
Neotylenchidae ( <u>Deladenus</u> )	Todos los estadios que se alimentan de hongos, hembras infectivas de las formas insectiles	Hembras parasíticas, huevos, juveniles
Allantone- matidae (Figs. 2, 3c)	Hembras infectivas, machos	Hembras parasíticas, huevos, juveniles
Sphaerulari- idae (Fig. 3b)	Hembras infectivas, machos	Hembras parasíticas, huevos, juveniles
Aphelenchoi- didae	Adultos, huevos, estadios juveniles 1, 2 y 3	Estadios juveniles 3-4
Parasitaph- elenchidae	Adultos, huevos, estadios juveniles 1, 2 y 3	Estadios juveniles 3-4 (algunas veces adultos)
Entaphelen- chidae (Fig. 3a)	Hembras infectivas, algunas veces machos (de vida corta)	Hembras y machos parasíticos, huevos y juveniles
Diplogaster- idae	Todos los estadios o juveniles infectivos	Adultos, huevos, juveniles
Steinernema- tidae	Juveniles infectivos	Adultos, huevos, juveniles
Heterorhab- ditidae	Juveniles infectivos	Adultos, huevos, juveniles
Oxyurida (muchas familias)	Huevos, rara vez juveniles de 1 o 2 estadios	Adultos, huevos, juveniles

**Cuadro 2. Categorías Taxonómicas Superiores de  
Nematodos Parásitos de Insectos Mencionados  
en la Clave para las Familias**

**Clase Adenophorea**

**Orden Mermithida**

**Suborden Mermithina**

**Superfamilia Mermithoidea**

**Familia Mermithidae**

**Familia Tetradonematidae**

**Clase Secernentea**

**Orden Rhabditida**

**Suborden Rhabditina**

**Superfamilia Diplogasteroidea**

**Familia Diplogasteridae**

**Superfamilia Rhabditoidea**

**Familia Steinernematidae**

**Familia Heterorhabditidae**

**Orden Tylenchida**

**Suborden Hexatylinea**

**Superfamilia Neotylenchoidea**

**Familia Neotylenchidae**

**Superfamilia Allantonematoidea**

**Familia Allantonematidae**

**Superfamilia Sphaerularioidea**

**Familia Sphaerulariidae**

**Orden Aphelenchida**

**Suborden Aphelenchina**

**Superfamilia Aphelenchoidea**

**Familia Aphelenchoididae**

**Familia Entaphelenchidae**

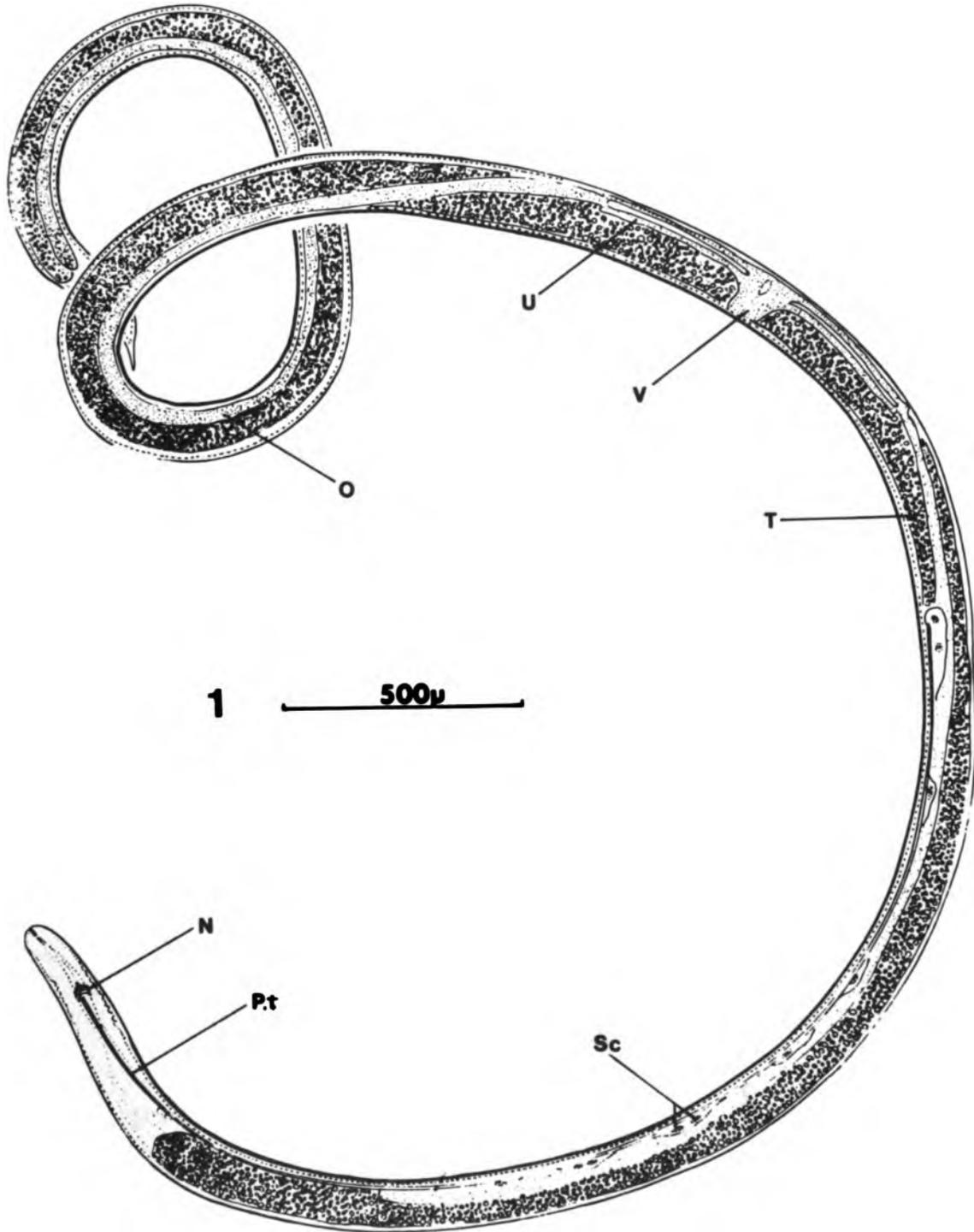
**Familia Parasitaphelenchidae**

**Orden Oxyurida**

**Clave para los Estadios de Nematodos Entomógenos  
Presentes en el Medio Ambiente**

1. Nematodos largos y esbeltos de 3 mm - 15 cm de longitud; con frecuencia opacos, usualmente blancos pero en ocasiones de color rosa, amarillo o verde; el esófago consiste en un tubo simple desprovisto de musculatura pero con estructuras accesorias; con o sin ano, cuando presente, éste no es funcional; dos testículos o dos ovarios opuestos entre sí; adultos y/o juveniles post-parasíticos, similares en tamaño y conspicuos en el suelo y medios dulceacuícolas - 2.
1. Nematodos inconspicuos, menos de 3 mm de largo, transparentes, esófago variable musculoso y nunca tubular; ano presente y funcional, uno o dos ovarios, siempre un solo testículo; los juveniles y hembras infectivas ocurren en el medio ambiente, en ocasiones en asociación con los estadios en desarrollo - 3.
2. Estadios de vida libre (adultos y juveniles postparasíticos) usualmente mayores de 8 mm de longitud; cabeza de los adultos con papilas cefálicas conspicuas; machos normalmente con dos espículas (algunos géneros acuáticos poseen una sola espícula); comúnmente Mermithidae (Fig. 1).
2. Estadios de vida libre (adultos) por lo general de menos de 8 mm de longitud; cabeza de los adultos provista de papilas cefálicas inconspicuas; machos con una espícula, poco frecuentes - Tetradonematidae.
3. El tercer estadio juvenil libre e infectivo, cubierto todavía con la cutícula del segundo estadio; con estilete de naturaleza frágil, cuando presente; glándulas del esófago sin traslaparse; estos juveniles con frecuencia se presentan en el mismo hábitat que los estadios en desarrollo - 4.
3. Hembras libres e infectivas, en ocasiones aún cubiertas con la cutícula del cuarto estadio; con estilete bien desarrollado, glándulas del esófago traslapadas, útero prominente y con oocitos sin desarrollar (Figs. 2A-C)- 6.
4. Estilete presente (puede ser muy fino) - 5.
4. Estilete ausente - 9.
5. Espículas fusionadas - Parasitaphelenchidae.

5. Espículas separadas - Aphelenchoididae.
6. Hembras infectivas provistas de un bulbo medio esofágico que contiene las desembocaduras de las glándulas dorsal y subventral (Fig. 3A) - Entaphelenchidae.
6. Hembras infectivas desprovistas del bulbo medio esofágico - 7.
7. Dos clases de hembras ocurren en la población de vida libre; una con estilete pequeño que se alimenta de plantas o de hongos y la otra con estilete grande que infecta a los insectos - Neotylenchidae (Deladenus).
7. Solamente las hembras infectivas provistas de un gran estilete - 8.
8. Hembras infectivas con dos glándulas esofágicas muy grandes y traslapadas; las desembocaduras de ambas normalmente ocurren atrás del estilete, a una distancia equivalente a un tanto de la longitud de éste (Fig. 3B) - Sphaerularidae.
8. Hembras infectivas con 3 grandes glándulas esofágicas traslapadas; la desembocadura de la glándula dorsal normalmente se encuentra atrás del estilete a una distancia equivalente a dos veces la longitud de éste (Fig. 2A y 3C) - Allantonematidae.
9. Estadios juveniles infectivos cubiertos con un precipitado aceitoso; bulbo medio valvulado, bulbo basal simple - Diplogasteridae (la mayoría de los Diplogasteridos del suelo se separan aquí).
9. Juveniles infectivos no cubiertos con un precipitado aceitoso; bulbo medio reducido desprovisto de válvulas, bulbo basal alargado con una válvula vestigial - 10.
10. Cabeza de los juveniles infectivos con una espina o protuberancia (más notoria bajo inmersión); cola larga y aguzada; poro excretor localizado antes del anillo nervioso - Heterorhabditidae (Heterorhabditis).
10. Cabeza de los juveniles infectivos desprovista de una espina o protuberancia; cola corta, generalmente más cuneiforme que terminada en punta - Steinernematidae (Neoplectana y Steinernema).



**Fig. 1. Nematodo Mermítido. Notar el tubo esofágico (P.t):  
 N = anillo nervioso; Sc = esticocistos; T = trofosoma  
 (intestino modificado); V = área vaginal; U = útero en  
 desarrollo; O = ovario.**

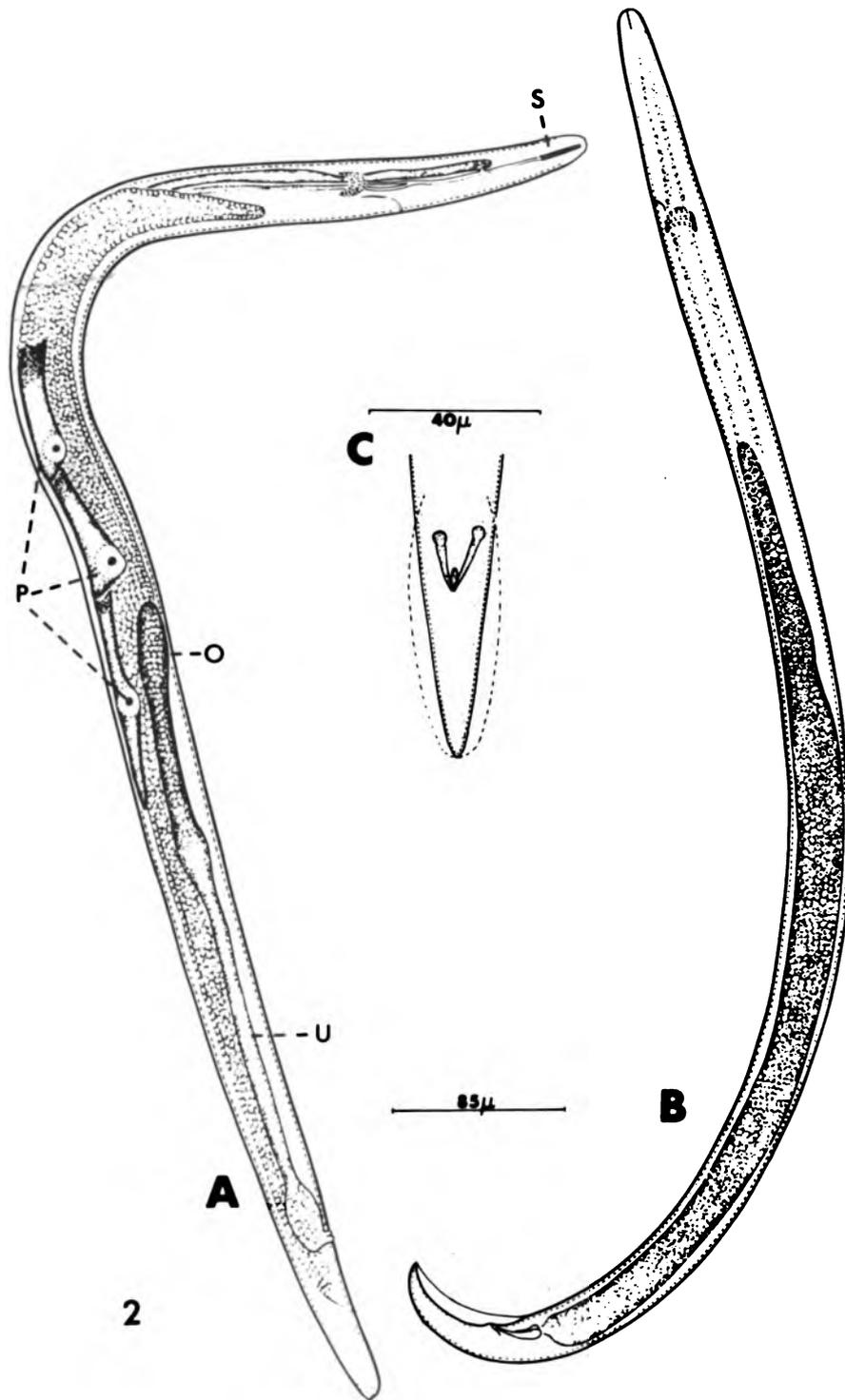
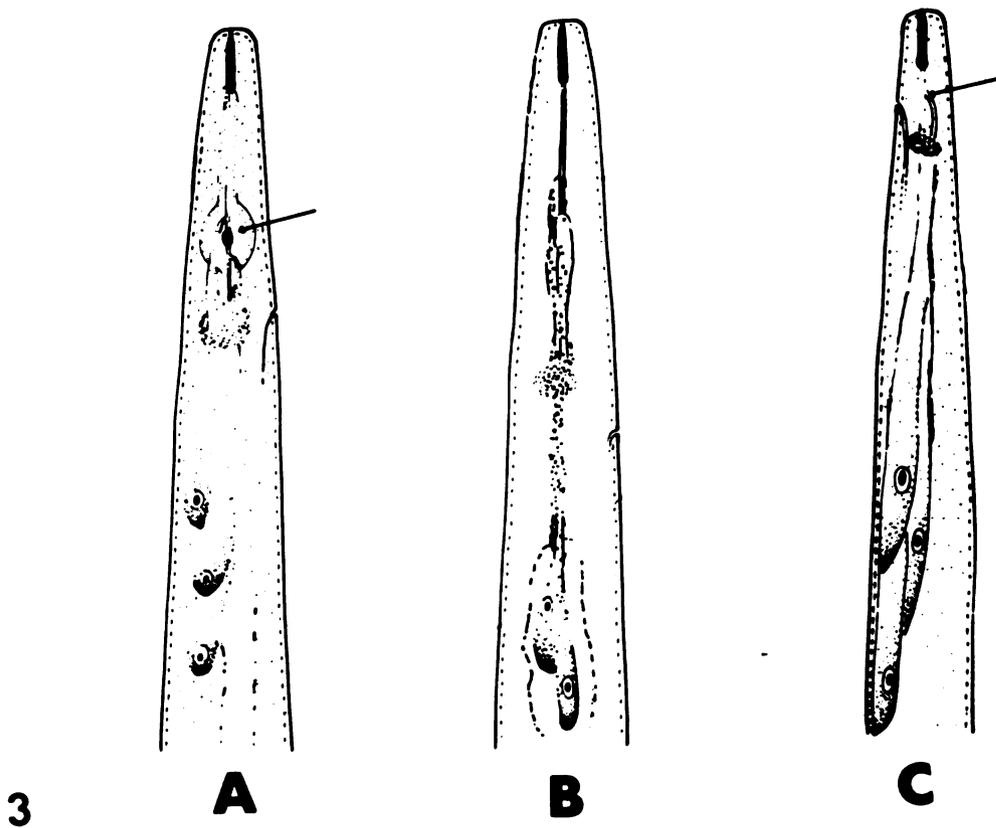


Fig. 2 Vista general de una hembra infectiva (A) y un macho de vida libre (B) de un Tylenchida parásito de insectos, mostrando el estilete (S), las glándulas esofágicas traslapantes (P), el oocito sin desarrollar (O) y el útero (U) expandido mostrando el esperma en su región posterior. En la Fig. 2C se ilustra el lado ventral de la cola del macho mostrando el par de espículas, el gobernáculo y la bursa.



**Fig. 3. Diferentes tipos de hembras infectivas en Tylenchida. A. Hembra infectiva, con el bulbo medio conteniendo las desembocaduras de las glándulas dorsal y subventral. B. Hembra infectiva provista de dos glándulas esofágicas traslapantes. Las desembocaduras se encuentran antes del estilete a una distancia mayor que la longitud total del mismo. C. Hembra infectiva con 3 glándulas esofágicas traslapantes. La desembocadura de la glándula dorsal (ver flecha), normalmente se encuentra antes del estilete a una distancia igual o menor a la longitud del mismo.**

**Referencias Recomendadas**

- Poinar, Jr. G. O. 1975. Entomogenous nematodes. E. J. Brill, Leiden. 317 pp.
- Poinar, Jr. G. O. 1977. CIH key to the groups and genera of nematode parasites of invertebrates. Farnham Royal: Commonwealth Agr. Bur. 43 pp.
- Poinar, Jr. G. O., and G. M. Thomas. 1984. Laboratory guide to insect pathogens and parasites. Plenum Press, NY 392 pp.

## **Ejercicio 8**

### **Identificación del Nematodo Enquistado de la Soya Mediante Ensayos con Plantas Diferenciales**

**R. D. Riggs  
Department of Plant Pathology  
University of Arkansas  
Fayetteville, Arkansas 72701**

#### **1. Objetivos**

El objetivo del presente ejercicio es identificar las razas del nematodo enquistado de la soya.

#### **2. Tiempo Requerido**

Un mínimo de cuatro semanas.

#### **3. Procedimiento**

##### **A. Preparativos previos al ejercicio**

1. Asegurar una producción abundante de inóculo de cada una de las razas a ensayar, mediante su reproducción en cultivares susceptibles (Lee, Essex, Bragg) y bajo condiciones de invernadero.
2. Aproximadamente 4-7 días antes del ejercicio, sembrar las semillas de las plantas diferenciales de la soya (Lee, Pickett, Peking, P. I. 88788 y P. I. 90763), en vermiculita u otro sustrato apropiado.

##### **B. Establecimiento del ensayo**

1. Llenar tres macetas con suelo para cada diferencial (15 en total) y trasplantar dos plántulas por maceta (30 min).
2. Si el sustrato lo constituye un suelo donde se haya logrado incrementar la población de quistes, mezclarlo apropiadamente para asegurar que el inóculo se distribuya uniformemente.
3. Proveerse de suelo esterilizado adicional para un total de 15 macetas de 7.5 cm de diámetro.

**C. Toma de datos (aproximadamente 1 h para cada raza)**

1. Después de 4-5 semanas, extraer las hembras maduras de cada maceta.
  - a. Quitar el suelo de las raíces sumergiendo las macetas en agua contenida en un recipiente apropiado.
  - b. Restregar las raíces para desalojar las hembras dentro del recipiente.
  - c. Agitar la suspensión que contiene a las hembras.
  - d. Pasarla a través de dos tamices empotrados entre sí, mallas 20 y 60, respectivamente.
2. Las hembras son retenidas sobre la malla 60.
  - a. Transferir a las hembras en una caja para contar.
  - b. Contarlas con la ayuda del microscopio estereoscópico.

**D. Método alternativo para determinaciones más precisas de las razas**

1. Separar los quistes y las hembras como se indica en el inciso C, para usarse como fuente de inóculo.
2. Transferir con agua a los quistes y hembras del tamiz malla 60 a otro de malla 80 o 100.
3. Romper los quistes y las hembras con los dedos o cualquier implemento adecuado.
4. Pasar el inóculo de huevecillos y juveniles así obtenido a través de un tamiz de malla fina.
5. Esterilizar los tamices cada vez que se termine de trabajar con una raza.
6. Calibrar la suspensión que contiene los huevecillos y juveniles.
  - a. Agitar la suspensión.
  - b. Tomar 1 ml.

c. Ponerlo en la caja para contar y proceder a contar los huevos y juveniles.

7. Utilizar el volumen necesario de la suspensión para inocular de 2000-4000 huevos y juveniles por maceta.

#### 4. Fuente de los Materiales

##### A. Nematodos

1. Existen a la fecha 3 razas del nematodo enquistado de la soya (ver el Apéndice 2).

2. Se requiere de un permiso especial para poder transportar quistes viables de un Estado a otro.

B. Tamices: Se pueden adquirir en la mayoría de las casas comerciales de productos científicos.

#### 5. Observaciones a Realizar

A. Contar el número de hembras recuperadas en cada planta diferencial.

#### 6. Resultados Esperados

El cuadro 1 resume las diferencias entre las razas.

#### Índice<sup>1</sup> de Reproducción por Diferenciales

Raza	Pickett 71	Peking	P.I. 88788	P.I. 90763
1	<10	<10	10+	<10
2	10+	10+	10+	<10
3	<10	<10	<10	<10
4	10+	10+	10+	10+
5	10+	<10	10+	<10

<sup>1</sup>Índice de Reproducción=  
 $\frac{\text{Número de hembras recuperadas de las diferenciales}}{\text{Número de hembras recuperadas del cultivar Lee}} \times 100$

## **7. Consideraciones Importantes**

- A. Si se utiliza suelo infestado, realizar el conteo dentro de los primeros 30 días.**
  - 1. Contar solamente a las hembras blancas y amarillas.**
  - 2. Los quistes de color pardo serán utilizados para el inóculo.**
- B. Siempre asegurarse de limpiar los tamices cada vez que se termine de usarlos con cada raza.**

## **Referencias Recomendadas**

**Golden A. M., J. M. Epps, R. D. Riggs, L. A. Duclos, J. A. Fox, and R. L. Bernard. 1970. Plant Disease Reporter, 54:544-546.**

## Ejercicio 9

### Comportamiento en la Búsqueda de Hospedantes: Quimiotaxia

A. Jeyaprakash  
Department of Plant Pathology  
University of Massachusetts  
Amherst, MA 01003

#### 1. Objetivos

Demostrar que la quimiotaxia se encuentra asociada a la habilidad de los nematodos para localizar sus fuentes alimenticias.

#### 2. Tiempo Requerido para Cada Paso del Ejercicio

Crecimiento de Caenorhabditis elegans en cultivo monoxénico: De 7-8 días.

Preparación de las cajas de Petri para los ensayos quimiosensoriales "in vitro": Un día.

Extracción de los nematodos con el embudo de Baermann: Una h. Ensayo quimiosensorial: 1 1/2 h.

#### 3. Procedimientos

##### A. Preparación de los materiales vivos antes de iniciar el ejercicio

Cultivar monoxénicamente a C. elegans (ver Ejercicio 12). Para el ensayo de quimiotaxia, Escherichia coli OP-50 debe cultivarse en un medio NG sin agar por 2-3 días (Brenner, 1974). Se sabe que C. elegans es atraído fuertemente por los exudados de E. coli. Para propósitos comparativos, en la quimiotaxia con bacterias vivas, la mitad de dichas bacterias deben matarse sumergiéndolas en un baño de agua caliente (100 C) durante 5 min.

Antes del ensayo, los nematodos deben obtenerse con el embudo de Baermann (1 h), el cual debe llenarse con agua estéril. Los nematodos así colectados deben lavarse tres veces en forma sucesiva con agua estéril, utilizando una centrifuga (5000 g) para eliminar los residuos del medio de crecimiento.

El comportamiento para encontrar el alimento, será evaluado permitiendo que C. elegans escoja entre bacterias muertas o vivas, anotando las diferencias en porcentaje entre las poblaciones acumuladas en los trayectos de ambas fuentes alimenticias. Para establecer el ensayo, las cajas de Petri de 5 cm de diámetro y provistas con agua estéril-agar al 1.5%, son marcadas cuidadosamente en su superficie externa con 4 puntos equidistantes a 18 mm del centro. Antes de agregar la alícuota con el inóculo de bacterias en los puntos, la humedad de la superficie del agar debe reducirse, evaporándola con el aire de una cámara de flujo laminar. Enseguida, 8  $\mu$ l del medio que contiene a las bacterias vivas, se aplican en cada uno de los dos puntos opuestos entre sí en el cuadrante y otros 8  $\mu$ l de las bacterias muertas, se colocan de manera similar, pero en los puntos del eje contrario. El líquido se deja secar y enseguida se cubre con los discos de agua (estéril)-agar de 7 mm de diámetro. El procedimiento se ilustra de manera general en la Fig. 1. Es conveniente permitir la formación de un gradiente, dejando reposar las cajas en estas condiciones, por espacio de 12-18 h. Preparar suficientes cajas para 4 repeticiones.

#### 4. Fuente de los Materiales

##### A. Organismos

C. elegans y E. coli (ver Apéndice 2).

B. Cajas de Petri (5 cm de diámetro), micropipetas, microscopio estereoscópico y de observación, cámara de flujo laminar y medios para conservar a las bacterias en condiciones monoxénicas.

#### 5. Observaciones a Realizar

Con la ayuda de una pipeta Pasteur, depositar en el centro de la Caja de Petri una gota de agua estéril conteniendo aproximadamente 100 nematodos. Permitir que el líquido se seque completamente, manteniendo la caja abierta por unos minutos; enseguida, proceder a incubar en ausencia de luz, a la temperatura de 22 C. Los nematodos que se acumulen bajo el volumen cubierto por cada uno de los discos de agar, serán contados a intervalos de 15 min, hasta cubrir un periodo total de 1 1/2 h. Los porcentajes de nematodos que respondan tanto a las células vivas de E. coli, como a las muertas serán tabulados y graficados.

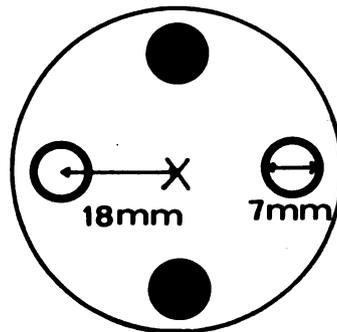
Formato sugerido para la anotación de datos.

Tiempo (min)

15	30	45	60	75	90
----	----	----	----	----	----

Bacterias Vivas  
Bacterias Muertas

Estos datos deben graficarse



O Discos de agar encima de una gota de 8  $\mu$ l conteniendo bacterias vivas

● Discos de agar encima de una gota de 8  $\mu$ l conteniendo bacterias muertas

X inocular los nematodos

Fig. 1. Espaciamiento de los elementos experimentales en una caja de Petri de 5 cm de diámetro.

## 6. Resultados Esperados

El porcentaje de nematodos atraídos a los sitios conteniendo a las células vivas de *E. coli*, será mayor que el de los sitios conteniendo a las bacterias muertas. Esto indicará que el comportamiento de *C. elegans* para buscar hospedantes se encuentra mediado por quimioatrayentes secretados por las células vivas de *E. coli*.

## 7. Variación del Ejercicio para Cambiar Niveles de Intensidad

El número de nematodos que se acumulan debajo de los discos de agar-agua de 7 mm de diámetro, por movimiento al azar, puede medirse al substituir los controles de 8  $\mu$ l de medio con bacterias muertas por calor, por controles que contengan solamente 8  $\mu$ l de medio.

## **8. Consideraciones Importantes**

### **A. Cosas por hacer**

Mantener siempre el sitio de trabajo estéril, para evitar la competencia de atrayentes procedentes de las posibles contaminaciones con otros microorganismos.

### **B. Cosas que no deben de hacerse**

Nunca utilizar cultivos viejos de nematodos ya que contienen gran cantidad de nematodos muertos.

### **C. Precauciones y medidas de seguridad**

Siempre usar guantes cuando se manipulen cultivos de E. coli.

## **Referencias Recomendadas**

Brenner, S. (1974). Genetics 77: 71-94.

## Ejercicio 10

### La Alimentación "in vitro" de Nematodos Parásitos de la Raíz

U. Wyss and U. Zunke  
Institut fur Phytopathologie  
Universitat Kiel  
D-2300 Kiel 1, W. Germany

#### 1. Objetivos

El comportamiento durante la alimentación de tres géneros de nematodos parásitos de la raíz: Heterodera, Trichodorus y Tylenchorhynchus, será estudiado con detalle a gran aumento (400X). Se pondrá especial atención a los diversos aspectos del comportamiento como: La orientación hacia las raíces; la exploración de las superficies celulares; la perforación de las paredes celulares y el fenómeno de salivación e ingestión de alimento, así como las funciones globales del aparato alimenticio y de las respuestas celulares de la raíz. El desarrollo de los nematodos durante el proceso de alimentación debe estudiarse con base en observaciones a largo plazo.

#### 2. Tiempo Requerido

Este ejercicio puede completarse en una sola sesión de laboratorio; sin embargo, de ser necesario, podría también prolongarse por varias sesiones.

#### 3. Procedimiento

##### A. Desinfección superficial y germinación de las semillas

Se necesitarán semillas de Brassica napus var. oleifera (Nabo silvestre), para los estudios sobre la alimentación de Heterodera schachtii, Trichodorus sp, y Tylenchorhynchus sp.

Las semillas de B. napus se desinfectan con una solución de cloramina T al 4% y sulfato de estreptomycin al 1% por espacio de 60 min. Una vez transcurrido este tiempo, los excesos de los esterilizantes se eliminan, lavando las semillas varias veces con agua destilada estéril. Después, las semillas se dejan germinar en un substrato de agua destilada-agar al 0.8%, el cual se mantiene en la

obscuridad por espacio de 3-4 días a la temperatura de 25 C.

## B. Transferencia de semillas germinadas a las cámaras de observación

Todos los pasos deben llevarse a cabo bajo condiciones asépticas.

1. Preparar a la cámara de observación como se ilustra en la Fig. 1a, colocando el cubreobjetos de 8 cm de diámetro (0.13 mm de grueso) en una caja de Petri de plástico (14 cm de diámetro).

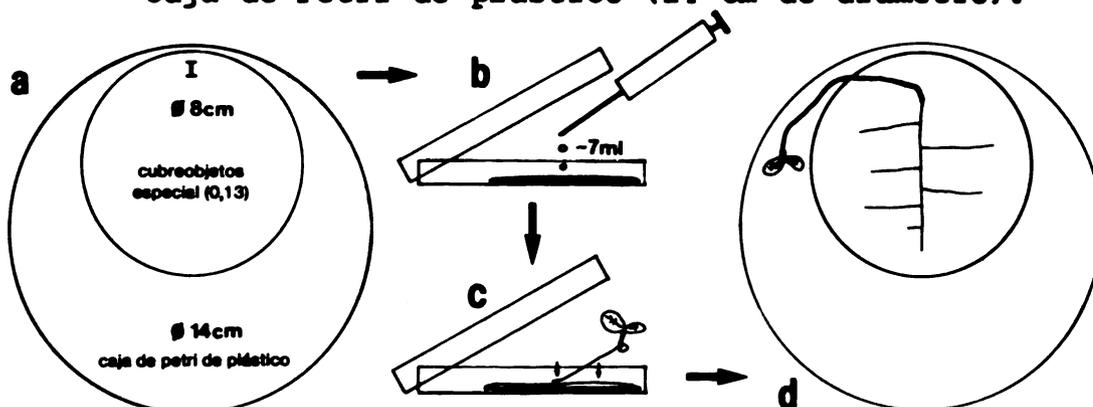


Fig. 1. Transferencia de semillas germinadas a las cámaras de observación.

2. Para los estudios con *Trichodorus* y *Tylenchorhynchus*, agregar cerca de 7 ml de agua destilada-agar al 0.8% sobre el cubreobjetos especial (Fig. 1b), hasta cubrirlo con una capa delgada. Para el caso de *H. schachtii*, utilizar la misma cantidad de agar con nutrientes como lo indica Dropkin y Boone (1966).
3. Transferir una plántula (con radícula de 1-2 cm de largo) al agar sobre el cubreobjetos (Fig. 1c). Agregar al agua destilada-agar unas gotas de la solución nutritiva de Hoagland (#2) esterilizada.

Transferir a la luz (25 C) las cajas de Petri, sellarlas apropiadamente con "parafilm" y dejarlas hasta que se desarrollen las raíces secundarias (Fig. 1d).

## C. Inoculación de las plántulas con nematodos

1. Para las observaciones a corto plazo (pocos días), obtener los nematodos a partir de muestras de suelo o de plantas infectadas creciendo en el

invernadero (Fig. 2a). Colocar el volumen de la suspensión en una caja de Siracusa y lavar repetidamente con agua destilada. De los nematodos lavados que permanecen en el centro de la caja, recolectar individualmente a 30 e inocularlos en la vecindad de las raíces de las plántulas.

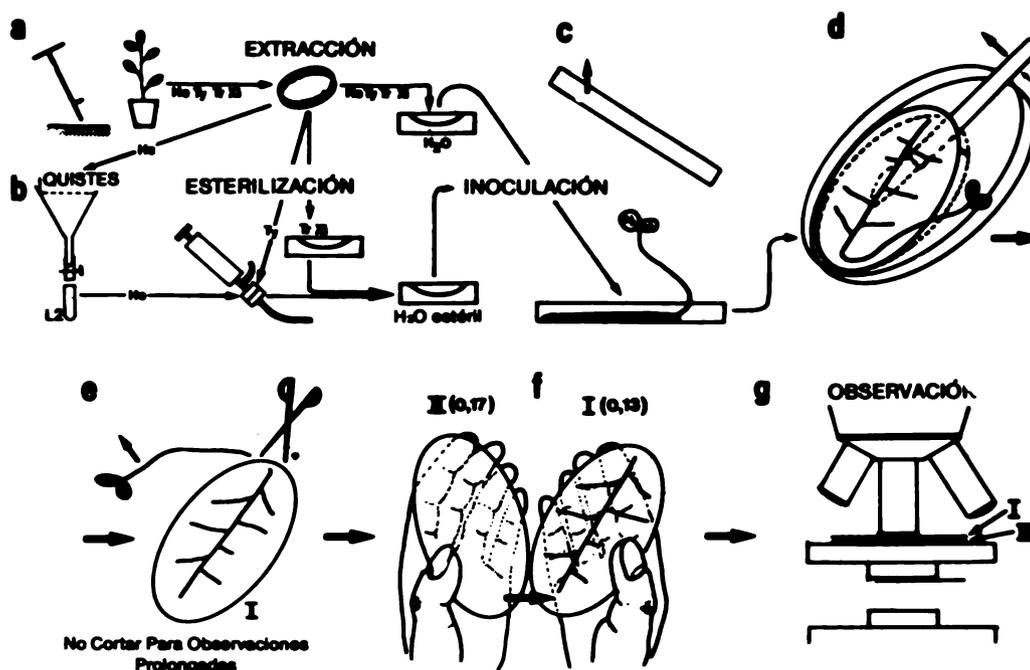


Fig. 2. Inoculación de plántulas y preparación de las cámaras de observación.

2. Para las observaciones a largo plazo (varias semanas), se van a necesitar nematodos axenizados superficialmente. Los nematodos *H. schachtii* y *Tylenchorhynchus* spp pueden axenizarse en  $HgCl_2$  por 4 min. *Trichodorus* puede axenizarse en  $NaN_3$  al 0.03% en cajas de Siracusa y lavarse sucesivamente antes de inocularse.
3. Transferir las plántulas inoculadas (*H. schachtii* en agar nutritivo) a la oscuridad o a la luz (no más de 100 lux), cuando crezcan en agua destilada-agar enriquecida con la solución nutritiva de Hoagland esterilizada.

#### D. Observaciones a gran aumento

Cuando los nematodos empiecen a alimentarse (observándolos bajo el microscopio estereoscópico),

levantar cuidadosamente el cubreobjetos de la cámara de observación, con la ayuda de un escalpelo (Fig. 2d), y presionando ligeramente con los dedos el fondo de la caja.

Para las observaciones a corto plazo, debe cortarse el vástago de la plántula (Fig. 2e) antes de colocar otro cubreobjetos especial de 8 cm de diámetro por 0.17 mm de grueso (II) sobre el sistema radical (Fig. 2f), evitando la formación de burbujas. El resultado será la obtención de un "sandwich de observación", el cual se colocará sobre la platina del microscopio con el cubreobjetos I inmediatamente por debajo de los objetivos (Fig. 2g). Esto permitirá observar bajo el aceite de inmersión.

Para las observaciones a largo plazo, especialmente con H. schachtii, se puede estudiar el desarrollo de sus distintos estadios en una caja de Petri, con el microscopio estereoscópico. Si se desean hacer estudios en detalle a gran aumento, entonces debe hacerse el "sandwich de observación" pero sin cortar el vástago de la plántula. Hechas las observaciones, pueden regresarse las plántulas a las cajas, previa separación del cubreobjetos II. Con el objeto de prevenir la desecación, colocar algodones húmedos dentro de las cajas de Petri.

#### 4. Fuentes de los Materiales

##### A. Material vivo

Nematodos - Ver el Apéndice 2. Otras especies locales podrían también ser utilizadas. Por ejemplo: Hemicycliophora, es excelente para observar la alimentación de un nematodo sedentario ectoparásito.

Semillas de nabo (Brassica napus var. oleifera). Las plantas de tomate (Lycopersicon esculentum) sirven también para estudios de Trichodorus y Tylenchorhynchus.

B. Químicos: Cloramina T, cloruro de mercurio; solución de Hoagland; sulfato de estreptomycin y azida de sodio.

C. Materiales: Las cajas de Petri estándares (9 cm de diámetro) etc, disponibles en los Estados Unidos, pueden substituirse por las de 14 cm.

## 5. Observaciones a Realizar

La descripción detallada del proceso alimenticio de Tylenchorhynchus y Trichodorus, incluyendo sus asociaciones con la raíz y las respuestas celulares, ya han sido previamente publicadas y revisadas (Wyss, 1981). También se encuentran disponibles las películas sobre el tema, hechas en el Institut fur den Wissenschaftlichen Film (IWF), Gottingen, FRG. Se recomienda revisar y analizar las publicaciones y las películas, antes de efectuar el ejercicio.

### A. Tylenchorhynchus

La Fig. 3 muestra a T. dubius alimentándose de un pelo radical. Debe ponerse especial cuidado en la función del aparato alimenticio durante las diferentes fases del proceso (Wyss, 1973), ilustradas en la película E 1902 (Wyss e IWF, 1973).

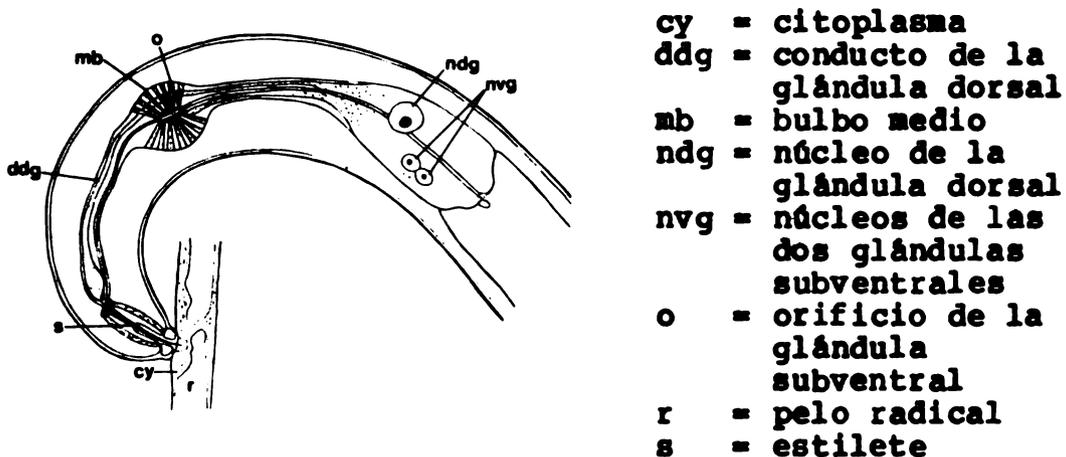


Fig. 3. Tylenchorhynchus dubius alimentándose de un pelo radical.

### B. Trichodorus

La Fig. 4 ilustra a T. similis alimentándose a partir de una célula epidérmica. Además de observar las funciones del aparato alimenticio (Wyss, 1971; película E 1763, Wyss e IWF, 1972), deberán también anotarse las respuestas celulares del fenómeno. (Película E 2045, Wyss e IWF, 1974).

La Fig. 4a-d ilustra las respuestas típicas del protoplasto en el interior de las células epidérmicas o los pelos radicales.

- a. Corriente normal citoplasmática durante la exploración del nematodo sobre la pared celular.
- b. Agregación del citoplasma durante la salivación en el sitio de perforación, observense los cambios rápidos del núcleo celular.
- c. Acometidas profundas del estilete sobre la masa de agregados, antes de la ingestión.
- d. Después de abandonar el sitio de penetración, observe el tubo de alimentación (saliva endurecida) a la izquierda de la pared celular y la súbita desintegración del citoplasma que no fue ingerido.

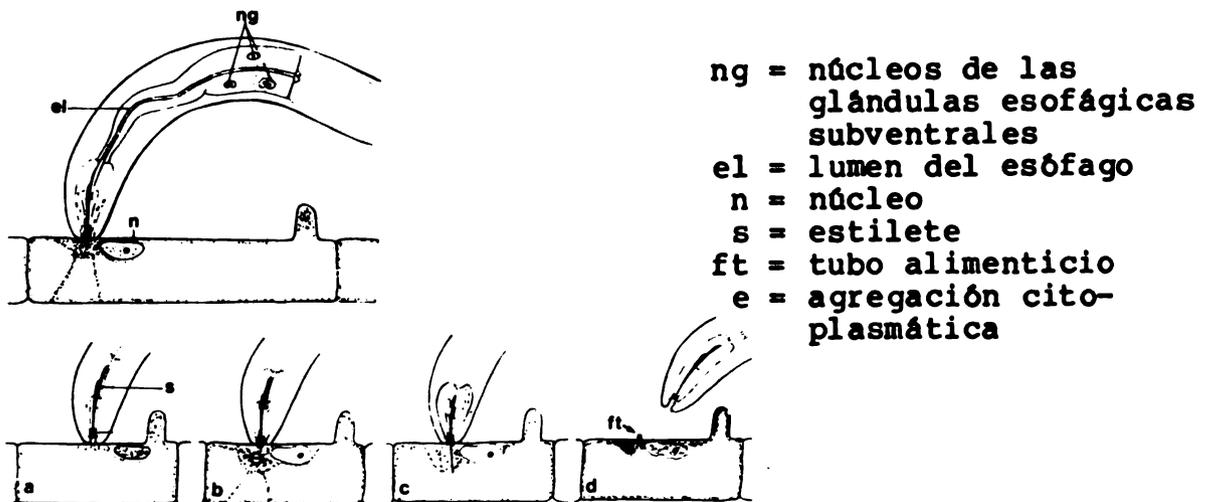


Fig. 4. Trichodorus similis alimentándose de una célula epidérmica. (Ver texto de a-d).

### C. Heterodera schachtii

A la temperatura constante de 25 C, el período comprendido desde la invasión de los estadios infectivos (J2) hasta la aparición de las hembras jóvenes, toma aproximadamente 2 semanas. Las respuestas de la raíz a la invasión de los juveniles así como su subsecuente desarrollo hasta hembras o machos, pueden estudiarse a bajo aumento. Si se requiere observar fenómenos específicos como la diferenciación sexual (desarrollo de las gónadas) después de la segunda muda (J2-J3), el fenómeno de la muda, la defecación, la formación de la capa subcristalina, etc, entonces se necesitará preparar los "sandwiches de observación".

La película C 1387 (Muller et al., 1981) en cinematografía espaciada, ilustra el ciclo de vida completo de H. schachtii en raíces de Nabo.

**Referencias Recomendadas**

Dropkin, V. H., and Boone, W. R. 1966. *Nematologica* 12, 225-236.

Muller, J., Wyss, U., and IWF. 1981. Film C 1387 des IWF, Gottingen, 20 pp.

Wyss, U. 1971. *Nematologica* 17, 508-518.

Wyss, U. 1973. *Nematologica* 19, 125-136.

Wyss, U. 1981. In 'Plant Parasitic Nematodes' (B. M. Zuckerman and R. A. Rohde, eds.), Vol. III, pp. 325-351. Academic Press, New York.

Wyss, U., and IWF. 1972. Film E 1763 der Enc. Cin., Gottingen, 12pp.

Wyss, U., and IWF. 1973. Film E 1902 der Enc. Cin., Gottingen, 14 pp.

Wyss, U., and IWF. 1974. Film E 2045 der Enc. Cin., Gottingen, 19 pp.

## Ejercicio 11

### Ciclo de Vida y Diseminación de Aphelenchoides fragariae en Begonia Rieger

Richard M. Riedel  
Plant Pathology Department  
Ohio State University  
Columbus, OH 43210

#### 1. Objetivos

Los objetivos del presente ejercicio son:

- A. Determinar el sitio de penetración del nematodo en el hospedante.
- B. Determinar la tasa y el patrón de desarrollo de síntomas en las plantas infectadas.
- C. Determinar los medios de diseminación del nematodo entre las plantas.

#### 2. Tiempo requerido

Todos los objetivos pueden cumplirse en 6 semanas.

#### 3. Procedimiento

- A. Preparación del material vivo antes de iniciar el ejercicio

Dejar crecer a 18 plántulas de begonia Rieger, cultivar rojo Schwabenland, en macetas (10 cm de diámetro) hasta alcanzar el estado de 4 hojas. Realice la siembra con 3 semanas de anticipación.

- B. Seguimiento Experimental

1. Extraer a A. fragariae de los cultivos axénicos con el embudo de Baermann, 24 h antes de utilizarse (ver Ejercicio 34).
2. Colectar los nematodos del embudo, filtrando la suspensión a través de papel filtro Whatman #1 colocado sobre un embudo Büchner.

3. Cortar el papel filtro en 8 trozos de tamaño idéntico y colocarlos dentro de cajas de Petri para impedir su desecación.
4. Asperjar con agua de la llave a dos plantas de begonia hasta escurrir.
5. Colocar un trozo de papel filtro con los nematodos, sobre cada una de las hojas de las begonias.
6. Mantener las plantas inoculadas en la obscuridad por 24 h y cubrirlas con bolsas de plástico.
7. Quitar las bolsas de plástico y poner las plantas inoculadas en medio de un bloque de 8 plantas de begonias libres de nematodos. Asegurar que las hojas de plantas vecinas estén en contacto entre sí.
8. Regar a un bloque con regadera o manguera, aplicando el agua sobre el follaje. Regar al otro bloque aplicando el agua exclusivamente en el suelo.
9. Mantener el régimen de riego por 6 semanas. Nota: Si se tienen las facilidades necesarias, incluir otro tratamiento inoculando a los tallos. De ser así, vea los incisos 7 A, B, y C.

#### 4. Fuente de los Materiales

- A. Las begonias Rieger cultivar rojo Schwabenland, pueden comprarse en Mikkelsens Inc., Box 1536, Ashtabula, OH 44004.
- B. Los cultivos frescos de *A. fragariae* pueden obtenerse escribiendo a R. M. Riedel (ver Apéndice 2).

#### 5. Observaciones a Realizar

- A. Comparar fechas y patrones de aparición de síntomas entre las plantas sujetas a los dos diferentes regímenes de riego.
- B. Comparar las tasas y patrones de desarrollo de síntomas entre las plantas inoculadas en el tallo (si quedaron incluidas), y las inoculadas en el follaje.

- C. Comparar las poblaciones de nematodos obtenidas de diferentes partes vegetales, v.gr. hojas, peciolo, tallos, etc, tanto en las plantas inoculadas en el follaje como en el tallo.

## 6. Resultados Esperados

- A. A. fragariae induce enrojecimiento de las hojas el cual se inicia en las nervaduras. La diseminación de los nematodos es facilitada por el salpique del agua durante el riego, por lo que las plantas regadas sobre el follaje, serán más fácilmente infectadas a partir de la fuente de inóculo. Las hojas de color rojo, indican diseminación del nematodo.
- B. Este nematodo foliar penetra en sus hospedantes principalmente a través de la lámina foliar. Las plantas inoculadas en las hojas, mostrarán desarrollo de síntomas durante las 6 semanas que consta el ejercicio.
- C. A. fragariae se reproduce más en las hojas, menos en los peciolo y mucho menos en los tallos. Su actividad endoparasítica es muy limitada. En todos los casos, los números de nematodos recuperados a partir de plantas inoculadas en los tallos, serán muy bajos.

## 7. Variación del Ejercicio para Cambiar el Nivel de Intensidad

- A. Después del paso 3 indicado previamente, aplicar gelatina de petróleo alrededor del tallo de las 8 plantas, aproximadamente 2 cm arriba del nivel del suelo.
- B. Asperjar con agua a las plantas hasta el punto de escurrimiento.
- C. Colocar un trozo de papel con nematodos alrededor del tallo de 4 plantas, por debajo de la gelatina de petróleo. Hacer lo mismo con las 4 plantas restantes, pero colocando la fuente de inóculo (trozos de papel filtro) sobre las hojas.
- D. Cubrir las plantas con bolsas de plástico por 48 h y dejarlas en la obscuridad.

- E. Quitar las bolsas de plástico y colocar las plantas, bajo sombra, en las mesas de un invernadero, durante 6 semanas procurando que queden muy separadas entre sí. Regar solamente el suelo de las macetas.
- F. Colectar porciones de hojas de todos los tratamientos. Incubar las porciones de hojas, pecíolos y tallos con el método de Young, por 24 h y por separado.
- G. Contar los nematodos extraídos de las diferentes partes de plantas de cada tratamiento.

## 8. Consideraciones Importantes

### A. Cosas por hacer

1. Proteger las begonias de la luz directa del sol. Las quemaduras en las hojas pueden enmascarar la expresión de los síntomas.
2. Mantener las plantas por debajo de los 27 C para evitar reprimir la reproducción de los nematodos.

## Ejercicio 12

### Embriología y Desarrollo de Nematodos

Bert M. Zuckerman  
Department of Plant Pathology  
University of Massachusetts  
Amherst, Massachusetts 01003

#### 1. Objetivos

Esta práctica de laboratorio examina la embriología y desarrollo de nematodos, utilizando al nematodo bacteriófago Caenorhabditis elegans como modelo de estudio. Este nematodo ha sido objeto de gran variedad de estudios experimentales sobre diversas facetas de su desarrollo y genética, por lo que existe una gran información sobre muchos de sus aspectos biológicos. El ciclo de vida completo toma cerca de 3.5 días a 20 C, a través del cual el huevo completa su desarrollo y eclosiona, la larva emerge, muda cuatro veces y alcanza finalmente el estado adulto. Los machos son escasos (cerca de 1 por cada 1200-1500 individuos), y la reproducción es por lo general a través de la autofecundación de individuos hermafroditas.

El propósito del presente ejercicio, es permitir que el estudiante siga las diferentes etapas de desarrollo del huevo y que distinga los 4 estadios juveniles y el adulto. Se dan caracteres claves como guía para seguir las secuencias del desarrollo.

#### 2. Tiempo Requerido

El estudiante deberá de ser capaz de observar y medir a todos los estadios mencionados en los cuadros, en un tiempo aproximado de 2.5 h. Cualquier tiempo adicional de la sesión de laboratorio, deberá dedicarse a discutir los resultados obtenidos y a esclarecer cualquier aspecto que no haya sido entendido.

#### 3. Procedimiento

A. Preparación de materiales vivos antes de iniciar el ejercicio

Siete días previos a la sesión de laboratorio, transferir la cepa de Escherichia coli a las cajas de Petri con el medio de cultivo NG-agar. Dos días

después, inocular las cajas con C. elegans en condiciones asépticas. Cinco días después, coleccionar los nematodos de las cajas mediante lavados sucesivos con agua estéril. El volumen final se succiona con una pipeta Pasteur, con la cual se aplicará un gota en cada una de las cajas que vayan a utilizarse en el ejercicio. Se sugiere preparar una caja por estudiante, dejando algunas adicionales como medida de precaución.

- B. En todas las observaciones del ejercicio es necesario matar algunos nematodos. Esto se logra calentando sobre un plato caliente (60 C), un portaobjetos conteniendo una gota de la suspensión o simplemente fijándolos en formalina al 2%.

Las observaciones de especímenes muertos hechas bajo el microscopio estereoscópico deben intercalarse con las observaciones de organismos vivos.

#### 4. Fuente de los Materiales

##### A. Organismos y mantenimiento

1. Cultivo monoxénico de Caenorhabditis elegans (tipo silvestre), cultivado con la cepa E. coli OP-50 dependiente del uracilo, en medio NG (Brenner, 1974). Ver Apéndice 2.
2. Mantenimiento de los cultivos: Los cultivos de nematodos se mantienen en cajas de Petri con E. coli a 22 C. Transferir cada 10 días.

##### B. Materiales y equipo necesario

Cajas de Petri de 9 cm de diámetro.

Medio NG (Brenner, 1974).

Microscopio de disección y compuesto.

#### 5. Observaciones a Realizar

Observar a bajo (100X) y a alto (430X) aumento, utilizando cada vez que sea necesario el ocular micrométrico.

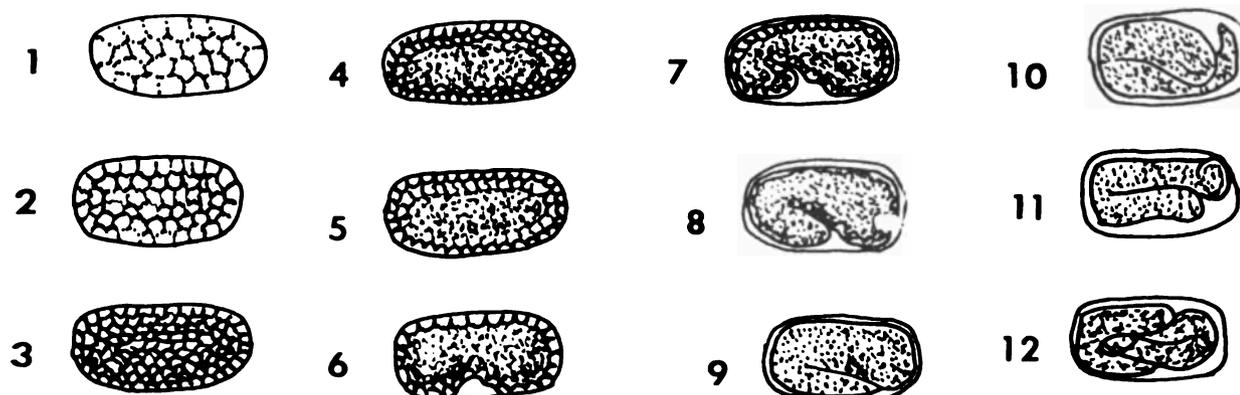
- A. Montar y medir los diferentes estadios de nematodos. Separar los 4 estadios y los adultos con base en las dimensiones citadas en el Cuadro 2.

1. Observar la vulva y gónadas del adulto hermafrodita. Muchos adultos contendrán huevos en desarrollo dentro de la gónada.
2. Buscar a los machos. Estos se distinguen por poseer bursa y espículas justamente antes de la cola (ver Ejercicio 5).
3. Observar la alimentación. Las válvulas del bulbo basal del esófago se mueven conforme el nematodo ingiere a las bacterias.

**Cuadro 1: Estadios del Desarrollo Embrionario de *C. elegans***  
(Ver Ilustraciones Abajo)

Dibujo	# Células	Tiempo ( $\pm$ 10 min)	Estadio
1	1-26	0-1.5 h	pregastrulación
2	26-44	1.5-2 h	gastrulación
3	46-93	2.0-3.25 h	periodo celular 4E
4	99-204	3.25-4.25 h	periodo celular 8E
5	224-Ca500	4.25-5.5 h	periodo celular 16E
6	500-550	5.5-6.25 h	forma de frijol
7	550	6.25-6.75 h	forma de coma
8	550	6.75-7 0 h	forma de renacuajo
9	550	7.0-7.25 h	forma de ciruela
10	550	7.25-8.0 h	forma de nudo
11	550	8.0-10.5 h	(ver dibujo)
12	550	10.5-eclosión (ca 11.25 h)	(ver dibujo)

0 Min = Fertilización a 25 C



Cuadro 2: Guía para Caracterizar los Estadios de *C. elegans*.\*

Estadio	Número de Células no Gonadales	Tiempo Después de eclosionar (h)	Largo ( $\mu$ m)
Larva 1 Muda 1	ca 550	13	350
Larva 2 Muda 2		21.5	470
Larva 3 Muda 3		29.5	640
Larva 4 Muda 4		41	890
Adulto	ca 935		

\* = Tomado de Cassada y Russell (1975)

B. Embriología (ver las ilustraciones que acompañan al Cuadro 1)

Observar los estadios del desarrollo embrionario. Observar la muesca o concavidad del estadio con forma de frijol, que es donde termina la división celular. En la forma de coma, empieza la invaginación de la boca, se manifiestan los contornos de los órganos internos y se presentan los primeros movimientos bruscos del organismo. La cavidad bucal se completa en la forma de renacuajo. En la forma de ciruela, la longitud del embrión es dos veces mayor que la del huevo. A partir de esta forma embrionaria, todas las restantes se mueven en forma continua. La cabeza se mueve de manera independiente al inicio de la forma "pretzel" (dibujo 11). El tamaño del embrión es cuatro veces más grande que el tamaño del huevo, en la forma tardía "pretzel" (dibujo 12).

6. Variación y Nivel de Intensidad del Ejercicio

Este ejercicio puede ampliarse para hacer importantes observaciones sobre la morfología de los nematodos bacteriófagos. Se puede aprovechar para resaltar las diferencias morfológicas entre los nematodos

bacteriófagos y los fitoparásitos. La mayoría de los bacteriófagos poseen esófago Rhabditoideo caracterizado por el estoma tubular (abertura bucal) y el bulbo esofágico conteniendo una válvula conspicua en forma de "Y". Esta válvula puede observarse abriendo y cerrando cuando el animal se alimenta. Por el contrario, el estoma de los fitoparásitos lo constituye un estilete en forma de aguja y cuyo bulbo basal está desprovisto de una válvula conspicua (ver las ilustraciones del Ejercicio 5).

Otros aspectos morfológicos fáciles de observar lo constituyen la abertura de la vulva y las gónadas expandidas mostrando en su interior a los huevecillos.

## 7. Consideraciones Importantes

### A. Precauciones

Los cultivos contaminados con hongos o bacterias pueden no sobrevivir. Trabajar en condiciones de rigurosa asepsia cuando se preparen los medios de cultivo.

B. Usar guantes protectores cuando se trabaje con E. coli.

## Referencias Recomendadas

Brenner, S. 1975. Genetics 77: 71-94

Cassada, R., and R. Russell. 1975. Dev. Biol. 46: 326-342.

Von Ehrenstein, G., and E. Schierenberg. 1980. In "Nematodes as Biological Models" (B. M. Zuckerman, Ed.) Vol. 1 pp. 1-71. Academic Press, NY.

## Ejercicio 13

### Diseño de Experimentos en Invernadero y Microparcels para Evaluar Resistencia a Nematodos

K. R. Barker  
Department of Plant Pathology  
North Carolina State University  
Raleigh, NC 27695

#### 1. Objetivos

En este ejercicio se discuten las consideraciones básicas y procedimientos necesarios para evaluar, a nivel de invernadero y microparcels, el potencial de resistencia contra nematodos fitoparásitos. Con la pérdida continua de los nematicidas más eficaces, los nematólogos deben dedicar sus mejores esfuerzos a buscar fuentes de resistencia adicionales contra estas importantes plagas agrícolas. El objetivo secundario es hacer hincapié en la variabilidad genética intraespecífica como en el caso de Meloidogyne incognita. Desde hace varios años la resistencia a este nematodo se encuentra disponible en varios cultivos como la soya, tomate, tabaco, durazno, etc, (Sasser, 1979). Los resultados que se tengan con el presente ejercicio; deberán mostrar que la resistencia hacia M. incognita disponible en la soya, es efectiva solamente para ciertas poblaciones de sus cuatro razas.

#### 2. Tiempo Requerido

El tiempo que se necesitará para el presente ejercicio, dependerá de las condiciones en que se lleve a cabo: Invernadero o microparcels. En el primer caso, diez semanas serán suficientes para evaluar el crecimiento de las plantas, el desarrollo de agallas y la reproducción del nematodo. En el caso de las microparcels, también podría darse por terminado en el mismo período, sin embargo; en este caso pudiera convenir dejar crecer a las plantas hasta completar su desarrollo y obtener datos de producción.

#### 3. Procedimientos

##### A. Preparativos para el ejercicio

Cada una de las poblaciones de M. incognita (MI),

debe incrementarse en una variedad susceptible de tomate como el cultivar "Floradel". Para ésto, se colocan plántulas individuales (15-20 cm de altura), en macetas de barro (15 cm de diámetro) conteniendo suelo arenoso o franco arenoso, el cual se inocula con 10,000 huevos de una población determinada de MI.

El procedimiento con hipoclorito de sodio (NaOCl) para disolver las masas de huevecillos de Meloidogyne o Heterodera spp, ha sido modificado para preparar inóculos con los mismos (Barker, 1985a). Sin embargo, es necesario tomar las debidas precauciones con este método, para minimizar la exposición de los organismos al cloro. Aún así, sólo cerca del 20% de los huevos extraídos con cloro dan origen a juveniles infectivos.

A continuación, se señala el procedimiento para obtener huevecillos como inóculo.

1. Para Meloidogyne spp, coleccionar raíces de tomate de 6-12 semanas de edad y fraccionarlas en segmentos de 1-2 cm, de largo.
2. Sacudir vigorosamente en forma manual los segmentos de raíz, o agitarlos en vasos de precipitado de 600 ml, conteniendo 200 ml de hipoclorito de sodio al 0.5-1.0%, por 2-4 min.
3. Pasar rápidamente la suspensión con hipoclorito a través de un tamiz malla 200 (abertura de 75  $\mu$ m), empotrado sobre otro malla 500 que retendrá los huevecillos.
4. Inmediatamente proceder a colocar el tamiz de 500 en una corriente de agua fría para eliminar los residuos de cloro (lavar por varios minutos).
5. Enjuagar los remanentes de las raíces para obtener más huevecillos y recolectar éstos en tamices.
6. Calibrar el número de huevos por unidad de volumen e inocular las plantas directamente, pipeteando alrededor de las mismas. Una vez inoculadas, agregar una capa de suelo adicional a las macetas de 1-2 cm de grosor. Tener presente que el experimento consistirá de: Dos variedades; 4 razas de nematodos; testigo y 6 repeticiones por tratamiento, por lo que se necesitarán en total 60 macetas.
7. Para lograr la máxima precisión en los experimentos, los huevos pueden dejarse eclosionar

directamente sobre la malla de nylon del tamiz 500, sumergida en 1-2 cm de agua desclorinada. (La utilización de agua de la llave hervida en recipientes descubiertos y dejados a reposar por 12 h, incrementa la eclosión de los huevos y la infectividad de las larvas; A. C. Triantaphyllou, comunicación personal).

Este mismo procedimiento puede utilizarse para remover los huevos de los quistes de Heterodera o Globodera, solamente que aquí, el tiempo de exposición al cloro, debe incrementarse de 8-10 min.

El procedimiento con NaOCl utilizado para determinar números de nematodos (por gr de raíz), es parecido a la técnica utilizada para preparar inóculo de huevecillos de Meloidogyne (Barker, 1985a). El equipo y los productos químicos son los mismos en ambos. Esta técnica es muy útil para evaluar la resistencia relativa de plantas a Meloidogyne spp, particularmente hacia mediados y finales de la estación de cultivo.

El procedimiento es como sigue:

1. Tomar muestras de raíces ya sea extrayendo sistemas radicales completos o mediante el uso de un tubo muestreador de suelos (campo o microparcela), cortar hasta obtener cantidades suficientes de fragmentos de 1-2 cm, y hacer muestras representativas de 5-10 gr.
2. Agitar (agitador motorizado) por 10 min a cada una de las muestras en recipientes apropiados, conteniendo hipoclorito de sodio al 0.5%. Efectuar este paso dentro de la campana de extracción utilizando una o dos veces agente antiespumante.
3. Utilizar un cedazo casero para retener los desechos y con un cucharón, tomar una muestra de 5 ml del filtrado y lavarla dentro de un vaso de precipitado de 150 ml.
4. Pasar esta submuestra a través de un tamiz malla 500 y transferir con agua los huevecillos retenidos a un vaso limpio de precipitado de 150 ml. No exceder el volumen final de 20-25 ml.
5. Agregar en la suspensión dos gotas de fuscina ácida al 0.35% en ácido láctico al 25% y hervir 1 min dentro de la campana de extracción. En este paso se puede tomar ventaja del horno de microondas, de ser así, dejarlo trabajar hasta que

empiece a hervir el agua.

6. Dejar que la suspensión se enfríe antes de iniciar el conteo de los huevecillos teñidos. Calcular su número por gramo de raíz.

## B. Diseño experimental

Ambos niveles de experimentación, invernadero y microparcela, deben establecerse bajo un diseño estadístico estándar, con 5 repeticiones por tratamiento. El diseño de bloques completamente al azar, que involucra una repetición por tratamiento en cada uno de los bloques, es aconsejable para estos propósitos (Nelson, 1985). Ya se encuentran disponibles excelentes tratados sobre el análisis estadístico de este diseño (Noe, 1985; Nelson, 1985).

## C. Manejo y cuidado del experimento

El suelo usado en ambas situaciones, invernadero o microparcela, debe fumigarse con bromuro de metilo (0.5-1.0 kg/30 m<sup>2</sup>), aproximadamente 30-60 días antes de utilizarse. Suelo esterilizado en autoclave puede también utilizarse para el caso de invernadero. El pH del suelo debe estar entre 5.6-6.7 cuando vaya a utilizarse soya.

Las plantas de invernadero deben manejarse normalmente incluyendo la aplicación de solución nutritiva de Hoagland (sin nitrógeno) dos o tres veces por semana. Las plantas en maceta de 15 cm de diámetro, deben regarse dos o tres veces al día, conforme vayan creciendo.

El experimento con microparcels requiere de menos cuidado, aunque las plantas deben mantenerse libres de malezas y también vigilarse periódicamente para impedir daño por insectos. Cuando esto suceda, las plantas deben asperjarse en forma conveniente, (Nt: evitar productos sistémicos; cubrir el suelo al aplicar). En caso que no llueva con regularidad, se deben suministrar riegos a las microparcels para que las plantas se desarrollen normalmente. También deben aplicarse varias fertilizaciones conforme se requieran.

El inóculo para este ejercicio debe extraerse con hipoclorito de sodio, ajustándolo apropiadamente para mantener un número uniforme de huevecillos por unidad de volumen. Cada plántula de soya debe inocularse con 20,000 huevecillos. La estandarización del proceso de inoculación podría facilitarse utilizando a una pipeta

como dispensador. En este caso, se necesitan 48 vasos de precipitado, cada uno de los cuales conteniendo un inóculo individual de 20,000 huevecillos. Para ello, en cada vaso transferir con la pipeta y por separado, 3 alicuotas a cada vaso, cada alicuota equivalente a un tercio del volumen final necesitado. En forma adicional, preparar 12 vasos conteniendo inóculo de Rhizobium japonicum, con el propósito de utilizarlo como el testigo sin nematodos.

#### 4. Fuente de los Materiales

Deben obtenerse (ver Apéndice 2) cuando menos cuatro poblaciones de M. incognita representando las razas 1, 2, 3 y 4, (Sasser, 1979). Pero también pueden utilizarse razas o poblaciones desconocidas. Los cultivares de soya que se sugieren para este ejercicio, incluyen al "Coker 156" y al altamente resistente "Centennial". El inóculo de R. japonicum puede obtenerse en la mayoría de los establecimientos comerciales de fertilizantes agrícolas.

##### A. Equipo para los experimentos en invernadero

Sesenta macetas de barro de 15 cm de diámetro, suelo arenoso (70% de arena), espacio suficiente en el invernadero y el laboratorio. Solución nutritiva, de preferencia se sugiere la de Hoagland sin nitrógeno, la cual permite el desarrollo normal de las plantas de soya.

##### B. Microparcels

Se pueden utilizar diversos tipos de microparcels cuando se busquen fuentes de resistencia a nematodos. Las microparcels más comunes utilizadas en diversas investigaciones nematológicas oscilan desde 25 X 35 cm hasta 5 X 5 m. Estas microparcels pueden hacerse de varios materiales como: Fibra de vidrio, barro vidriado o sin vidriar, y cubetas de plástico para pinturas de 18 litros, (estas cubetas son convenientes, Dr. Jack Pinkerton, comunicación personal). Se debe perforar ( $\pm$  10-19 cm) el fondo de las mismas, para facilitar su drenaje antes de colocarse en el suelo con la ayuda del azadón. Cuando se vaya a cosechar, deben removerse totalmente con el propósito de facilitar el examen de los sistemas radicales. Para los estudios a largo plazo, los recipientes de fibra de vidrio de 80-100 cm de diámetro, son los ideales (Barker, 1985b).

### C. Extracción de huevos de M. incognita

El equipo incluye cubetas de 10 litros y un lavabo lo suficientemente grande para quitar las partículas de suelo de las raíces. También se requerirá de: Vasos de precipitado de plástico de 150 y 600 ml; agitador motorizado; cedazo casero de 15 cm de diámetro; tamices mallas 30, 200, y 500; cucharón de 5 ml y campana de extracción (o trabajar al aire libre).

Los químicos necesarios son: Hipoclorito de sodio (NaOCl); antiespumante comercial; fucsina ácida y ácido láctico. Otros equipos necesarios son: Microscopio estereoscópico (60X); contadores para nematodos; pipetas dispensadoras y los utensilios comunes para trabajar en el invernadero.

### 5. Resultados Esperados

Deben evaluarse los índices de crecimiento de las plantas con la escala 0-10, en donde 10 significa crecimiento máximo. Se procederá también a tomar datos de la altura y diámetro de plantas a las 4 y 8 semanas después de inocularse, así como al finalizar el experimento. Cualquier síntoma foliar (color, necrosis, etc), debe anotarse utilizando también la escala subjetiva de 0-10. El peso de la parte aérea, así como el de las raíces, también deben anotarse. Los índices de agallamiento radical son esenciales para evaluar la resistencia relativa de las plantas a nematodos. Aquí, puede utilizarse una escala arbitraria de 0-100, donde cero corresponde a la ausencia de agallas mientras que 100 al agallamiento total. En el cuadro 1 se incluye el nomógrafo con varios sistemas para evaluar el agallamiento radical, (Barker, 1985a). El número de huevecillos debe realizarse con el método del hipoclorito de sodio como lo mencionamos en líneas atrás.

Todos los datos obtenidos, deben analizarse estadísticamente, incluyéndose el análisis de varianza y las pruebas de comparación de medias ortogonales, y/o de contraste lineal. En algunas ocasiones, los datos obtenidos deben transformarse, (ejem: En  $\log_{10}$ ) con el propósito de analizarse estadísticamente, (Noe, 1985).

**Cuadro 1. Nomograma de Indices de Agallamiento Radical por Meloidogyne spp.**

Sistemas de Indices de Agallamiento				Porcentaje de Agallamiento Radical del total del sistema
0-4	0-5	1-6**	0-10	
0	0	1	0	0
	1	2	1	10
	2	3	2	20
1			3	30
			4	40
2		4	5	50
	3		6	60
			7	70
3		5	8	80
	4		9	90
4	5	6	10	100

\* Las raíces son evaluadas por grado de agallamiento, utilizándose uno de los varios índices de agallamiento disponibles, los que son comparables y relativamente intercambiables entre sí. Un mínimo de 10 sistemas radicales debe ser evaluado por tratamiento.

\*\* Este método se recomienda cuando se evalúan nematocidas o plantas resistentes a nematodos (Barker, 1978).

### Referencias

- Barker, K. R. [Chairman]. 1978. In "Methods for Evaluating Plant Fungicides, Nematicides, and Bactericides." (E. Zehr, ed.), pp. 114-125. Am. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN
- Barker, K. R. 1985a. In "An Advanced Treatise on Meloidogyne Vol. II. Methodology" (K. R. Barker, C. C. Carter, and J. N. Sasser, eds.), pp. 19-35. A Coop. Publ. of the Department of Plant Pathol. North Carolina State University, and the U.S. Agency for Intl Dev., Raleigh, NC.
- Barker, K. R. 1985b. In "An Advanced Treatise on Meloidogyne Vol. II. Methodology" (K. R. Barker, C. C. Carter, and J. N. Sasser, eds.), pp. 127-134. A Coop. Publ. of the Dept. of Plant Pathol. North Carolina State Univ., and the U.S. Agency for Intl. Dev., Raleigh, NC.

- Nelson, L. A. 1985. In "An Advanced Treatise on Meloidogyne Vol. II Methodology" (K. R. Barker, C. C. Carter, and J. N. Sasser, eds.), pp. 177-186. A Coop. Publ. of the Dept. of Plant Pathol., North Carolina State Univ. and the U.S. Agency for Intl. Dev., Raleigh, NC.
- Noe, J. P. 1985. In "Advanced Treatise on Meloidogyne Vol. II Methodology" (K. R. Barker, C. C. Carter, and J. N. Sasser, eds.), pp. 187-196. A Coop. Publ. of the Dept. of Plant Pathol., North Carolina State Univ. and the U.S. Agency for Intl. Dev., Raleigh, NC.
- Sasser, J. N. 1979. In "Root-knot Nematodes (Meloidogyne species) Systematics, Biology and Control" (F. Lamberti and C. E. Taylor, eds.). pp. 257-268. Academic Press, NY.

## Ejercicio 14

### Efecto de los Niveles Graduales de Inóculo en las Plantas: Heterodera glycines en Soya

Victor H. Dropkin  
Department of Plant Pathology  
University of Missouri  
Columbia, MO 65211

#### 1. Objetivos

Evaluar y comparar el grado de patogenicidad de diferentes niveles poblacionales de H. glycines en la soya.

#### 2. Tiempo Requerido

A. Para lograr obtener gran número de quistes de H. glycines a partir de suelo con plantas infectadas en condiciones de invernadero, se requieren cuando menos 6 meses.

B. La evaluación de síntomas inducidos por los distintos niveles de inóculo requiere de 60 días, durante los cuales, deben hacerse observaciones a intervalos semanales o quincenales.

#### 2. Procedimiento

##### A. Incremento del inóculo

Debe mantenerse la fuente de inóculo del nematodo enquistado de la soya en el laboratorio. Diez semillas de variedades susceptibles al nematodo (v.gr. Williams, Essex, Corsoy) deben sembrarse en macetas de 25 cm de diámetro, conteniendo una mezcla de suelo ligero con 20-25 quistes viables. La temperatura óptima para esta fase es de 25-30 C. Cuando las plantas estén envainando, removerlas cuidadosamente del suelo para desprender los quistes de las raíces y dejarlos libres en el suelo. Mezclar el suelo desechando los remanentes de las raíces. Conservar cuando menos a dos macetas. Repetir el proceso hasta que el suelo esté tan severamente infestado que el crecimiento de las plantas de soya se vea seriamente afectado. Mezclar en partes iguales este suelo con otro libre de nematodos y probar la intensidad infectiva, utilizando a 10 plantas susceptibles como se indicó previamente. Con el propósito de establecer el tiempo necesario para obtener quistes maduros (los que permanecen adheridos a las raíces durante el manejo), a

partir del día 25 iniciar la observación de raíces, sacando dos plantas cada dos días.

#### B. Procedimiento para inocular

Preparar suelo suficiente para establecer 4 repeticiones con 4 niveles de inóculo, en macetas de 10 cm de diámetro. Colectar quistes frescos de plántulas infectadas, lavando cuidadosamente las raíces para quitarles el suelo sin desprender los quistes. Para ello, humedecer el suelo y enseguida lavarlo al chorro débil de agua corriente. Poner las raíces en un tamiz de cuarzo, colocado sobre otro de metal malla 60 (abertura de 250  $\mu\text{m}$ ). Desprender los quistes de las raíces por medio de rocío fuerte o al chorro de agua. Colectar los quistes para que los estudiantes procedan a separarlos en tres grupos con 4 repeticiones de 4, 16 y 64 quistes, respectivamente. Colocarlos separadamente en recipientes apropiados para facilitar su transferencia por medio de una pipeta. Proceder a romper por separado los quistes de cada repetición (conjunto de quistes), presionándolos entre dos portaobjetos con un poco de agua y colocando entremedio un separador (el cubreobjetos podría ser útil). Llenar la mitad de las macetas con suelo y transferir los quistes rotos y sus contenidos a cada una de ellas. Incluir el control con 4 macetas donde solamente el agua que resbale de los portaobjetos sea aplicado. De ser necesario, agregar también una cantidad estándar de inóculo de Rhizobium a cada maceta. Mezclar el suelo correctamente, terminar de llenar las macetas y trasplantar una plántula de la variedad susceptible de soya.

#### 4. Fuente de los Materiales

- A. Nematodos enquistados de la soya, (ver Apéndice 2).
- B. Inóculo de Rhizobium. Disponible en establecimientos comerciales de productos agrícolas.

#### 5. Observaciones

- A. Llevar registros semanales o quincenales de cada planta con respecto a lo siguiente:
  - 1. Número de nudos.
  - 2. Largo y ancho de una hoja estándar.

3. Altura de la planta.

4. Color de las hojas.

B. Al finalizar el experimento (cuando menos 60 días después), remover las plantas y coleccionar los quistes de raíces y suelo, anotando:

1. Número de quistes por maceta.

2. Peso seco de las raíces.

3. Número de nódulos de bacterias nitrificantes.

4. Peso seco del follaje.

## 6. Resultados

Graficar los resultados colocando la magnitud del inóculo en la abscisa (escala log) y los datos de cualquier otro parámetro en la ordenada (escala aritmética).

## Referencias Recomendadas

Hesling, J. J. 1957. Nematologica 2: 285-299

## Ejercicio 15

### Respuesta Vegetal a la Infección de Nematodos en Condiciones Axénicas

David T. Kaplan  
USDA-ARS, U.S. Horticultural Research Laboratory  
2120 Camden Road  
Orlando, FL 32803

#### 1. Objetivos

El propósito de este ejercicio es familiarizar al estudiante con un método sencillo, para estudiar la interacción nematodo-planta en un sistema axénico.

#### 2. Tiempo Requerido

El tiempo requerido para este ejercicio dependerá de la disponibilidad de cultivos monoxénicos de nematodos, y de semillas libres de contaminantes internos como hongos y bacterias. Idealmente, este ejercicio debe instrumentarse, una vez que el estudiante logre obtener cultivos monoxénicos de nematodos en discos de zanahoria o con explantes radicales, (Huettel, 1985; Huettel y Rebois, 1985).

Desinfección superficial de la semilla      30 min.

Preparación de las placas de observación      30 min.

Observación de las placas      15 min/día.

#### 3. Procedimiento

El ejercicio consta de cuatro pasos:

A. Desinfección y germinación de la semilla.

B. Construcción de las cámaras de observación e inoculación de las mismas.

C. Transferencia de plántulas a las cámaras de observación.

## D. Observación

### Paso I. Desinfección y germinación de semillas

Cualquier especie de planta que germine pronto y produzca plántulas de rápido desarrollo, puede utilizarse en este ejercicio. El tomate, pimiento y soya, constituyen una buena elección. Las semillas pueden desinfectarse como se indica en el Ejercicio 25, pasos A-D (Huettel y Rebois). Para la germinación, es preferible incubar las semillas a 25 C durante 5-7 días o dejar hasta que la raíz primaria alcance la longitud de 7 cm. Deben evitarse incubaciones por arriba de 30 C, ya que podría alterarse la respuesta de las plantas a la infección o a la alimentación de los nematodos.

### Paso II. Elaboración de las cámaras de observación

Obtener nematodos de cultivos monoxénicos como se describe en los Ejercicios 24 y 25. Preparar agua-agar (1.0% de agua y 0.5% de solución nutritiva de Hoagland de acuerdo con Atilano, 1977), dejando que el agar se enfríe hasta que empiece a solidificar.

Inocular los nematodos al agar tibio en pequeños volúmenes de agua, mezclar correctamente y tomar una alícuota de esta suspensión con el volumen suficiente para formar una capa delgada (10-15 mm) en las cajas de Petri. Permitir que el agar se solidifique y observar la actividad de los nematodos (movimiento).

### Paso III. Transferencia de plántulas a las cámaras de observación

Transferir plántulas intactas a las cámaras de observación bajo condiciones de asepsia.

Colocarlas de tal manera que sus raíces siempre estén en contacto con la superficie del agar (podrían dejarse también las hojas y cotiledones). Enseguida, colocar sobre las puntas de la raíz seleccionada, un cubreobjetos (22 X 80 mm) previamente esterilizado, con el propósito de facilitar la observación al máximo aumento del microscopio compuesto.

#### **Paso IV. Observación**

Estudiar la interacción del nematodo con las plantas, observando la cámara bajo un microscopio estereoscópico (10X - 80X) o a mayor aumento por medio del cubreobjetos.

Las interacciones planta-nematodo pueden estudiarse para determinar los siguientes aspectos:

Sitios de alimentación del nematodo.

Comportamiento del nematodo.

Respuesta de los tejidos vegetales en relación al tiempo.

Desarrollo individual de los nematodos (sedentarios).

Duración de los estadios en los ciclos de vida.

Identificación de partes vegetales infectadas por nematodos.

Comparar las relaciones parásito-hospedante con el desarrollo de nematodos en raíces de variedades de plantas compatibles e incompatibles.

#### **4. Fuente de los Materiales**

Cultivos monoxénicos de nematodos fitoparásitos (ver Apéndice 2).

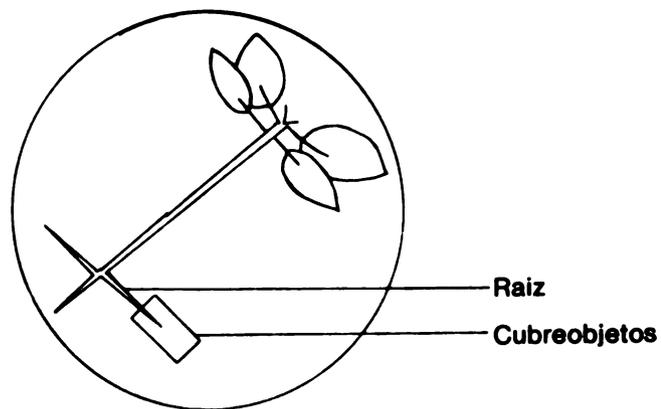
Semillas de un cultivo de interés que germine rápido y produzca plántulas de crecimiento también acelerado (v. gr. tomate, pimiento, soya).

#### **5. Equipo**

Cajas de Petri estériles, pipetas estériles, baño maría, cámara de transferencia. Agar: agua-agar al 1.5% para las cámaras de germinación; agua-agar al 1.0% y 0.5% de solución nutritiva de Hoagland, microscopios de disección y compuesto e incubadora (opcional).

## 6. Resultados Esperados

El estudiante utilizará las técnicas gnotobióticas para comprender mejor el comportamiento de los nematodos y sus interacciones con raíces de plantas.



**Fig. 1.** Localización del cubreobjetos en relación al ápice radical.

### Referencias Recomendadas

- Atilano, R. A. 1977. Systemic effects of oxamyl on Meloidogyne javanica and Tylenchulus semipenetrans and the interaction between Meloidogyne arenaria and Glomus fasciculatus, PhD. Thesis, University of California, Riverside. 102 pp.
- Huettel, R. N. 1985. Culturing nematodes: Exercise 24, In: Laboratory Manual for Plant Nematology, eds., Zuckerman, B. M., W. F. Mai, and M. B. Harrison.
- Huettel, R. N., and R. V. Rebois. 1985. Culturing nematodes: Exercise 25, In: Laboratory Manual for Plant Nematology eds., Zuckerman,, B. M., W. F. Mai, and M. B. Harrison.

## Ejercicio 16

### Infeción de Insectos por Nematodos Entomógenos de los Géneros Neoplectana y Heterorhabditis (Rhabditida: Rhabditoidea)

George O. Poinar Jr.  
Department of Entomological Sciences  
University of California  
Berkeley, CA 94720

#### 1. Introducción

Existen más de 3000 asociaciones naturales entre insectos y nematodos, 8 de cuyos ordenes, comprenden a diversos representantes capaces de parasitar insectos sanos (Poinar, 1975). Una de las tres principales líneas del parasitismo de los insectos, ha dado origen a formas como Neoplectana (Steinernema) (Steinernematidae) y Heterorhabditis (Heterorhabditidae), a partir de Rhabditoides microbiontróficos y bacteriófagos. Estos dos géneros son interesantes porque aún dependen de bacterias como fuente alimenticia y han desarrollado mecanismos para transportar e introducir a insectos, bacterias del género Xenorhabdus. Estas bacterias son capaces de matar a los insectos en 48 h, convirtiendo los cadáveres en un hábitat conveniente para el crecimiento y reproducción de nematodos. Las bacterias que ocurren en el género Neoplectana se han clasificado como X. nematophilus y las asociadas a Heterorhabditis pertenecen a la especie de X. luminescens (Akhurst, 1983). Consecuentemente, estos nematodos pueden utilizarse como agentes de control biológico y de hecho ya se encuentran disponibles en forma comercial, utilizándose exitosamente contra picudos (escarabajos) de la raíz y larvas de insectos perforadores de tallo. El estado infectivo de los nematodos es el tercero, el cual en ocasiones presenta todavía la cutícula del segundo estadio. Estos estadios infectivos no se alimentan más que del hospedante, por lo que están muy bien adaptados para localizar a los insectos en el medio ecológico. Una vez que el nematodo encuentra al hospedante, lo penetra, liberando enseguida la bacteria simbiótica que es transportada dentro del tracto digestivo. El nematodo se desarrolla hasta el estado adulto en aproximadamente 5 días a 20 C. En el caso de Neoplectana, los juveniles infectivos se desarrollan y dan origen a una generación amfimictica de machos y hembras; pero en Heterorhabditis, dan origen a hembras hermafroditas. La segunda generación de ambos géneros consiste de machos y hembras. Cuando los recursos alimenticios se agotan, los juveniles en

desarrollo se transforman en una larva "Dauer" o estadio infectivo, que por lo general abandona el cadáver del insecto (usualmente después de 3 semanas a 20 C), (Fig. 1).

## 2. Objetivos

Demostrar la patogenicidad en insectos como consecuencia de la actividad de nematodos. Examinar los diversos estadios del desarrollo de Neoaplectana y Heterorhabditis.

## 3. Tiempo Requerido

Los insectos deben infectarse con los nematodos una semana antes que el ejercicio de laboratorio se lleve a cabo. Esto toma de 30-60 min. Las disecciones de los insectos y las observaciones de nematodos requerirán de 2-4 h.

## 4. Procedimiento

### A. Una semana antes del ejercicio

1. Se van a necesitar insectos para el proceso de infección. Las larvas de Lepidópteros como la "palomilla de la cera" Galleria mellonella, son ideales para estos propósitos y si no se pueden adquirir de manera directa, se pueden obtener de productores comerciales. Una de tales compañías es la "Northern Bait" en Chetek, Wisconsin 54728. Si se va a ordenar, pedir el último instar de la larva. También se puede tener un cultivo propio de la palomilla, cuyos procedimientos se encuentran disponibles en Poinar y Thomas (1984).
2. Los nematodos de los géneros Neoaplectana (Steinernema) y Heterorhabditis se pueden obtener a partir de cualquiera de los distribuidores comerciales tal como "Biosis", 1057 E. Meadow Circle, Palo Alto, CA 94303. Estos nematodos se suministran con las formas juveniles infectivas, las cuales permanecen vivas por lo menos tres meses a 8 C (Neoaplectana) y a 12 C (Heterorhabditis).
3. La infección puede ocurrir bajo diversas circunstancias, sin embargo, ésta puede lograrse rápida y fácilmente utilizando cajas de Petri de tamaño estándar. Para ello, primero habrá que  
c o l o c a r

dos círculos de papel filtro sobre la superficie interna de una de las tapas. Enseguida, obtener los nematodos y mezclarlos con agua hasta obtener una suspensión de 2000 nematodos por ml de agua. Pipetear 3 ml de la suspensión (6000 nematodos) sobre los papeles filtro previamente humedecidos e inmediatamente, introducir 20 larvas del último instar de la "palomilla de la cera" (Galleria). Cubrir las cajas y dejarlas en la obscuridad por una semana a la temperatura de 20-25 C para facilitar la infección y muerte de larvas del insecto, así como la reproducción y el desarrollo del nematodo a partir de los cadáveres.

#### B. Una semana después de la infección de insectos

1. Transferir las larvas muertas de insectos a cajas de Siracusa o cajas de Petri pequeñas, cuyos fondos deben cubrirse con solución Ringer. Abrir al insecto desprendiendo la cutícula a lo largo del cuerpo de la larva. Obtener los diferentes estadios de desarrollo del nematodo.
2. Si se quiere obtener una segunda generación de estadios infectivos, mantener los insectos por otros 10-12 días a 20-25 C para que se complete otro ciclo reproductivo y se formen los estadios juveniles. Mediante el humedecimiento de los papeles filtro que para estas alturas deben estar secos, se puede observar la emergencia de estadios infectivos de nematodos a partir de los insectos muertos, así como el movimiento de algunos sobre el fondo y paredes de la caja, en clara búsqueda de otro insecto.

#### 5. Equipo Requerido

Cajas de Petri estándar, papel filtro; cajas de disección (cajas de Petri pequeñas); pipetas de 10 ml; equipo de disección; microscopios compuestos y de disección; larvas de insecto (de preferencia algún tipo de oruga) y estadios infectivos de Neoplectana o de Heterorhabditis.

#### 6. Observaciones

- A. Obtener hembras adultas de la primera generación y hacer montajes temporales en solución Ringer. Observar bajo el microscopio a 100-400 aumentos. Distinguir y dibujar las estructuras del cuerpo, el

esófago y la cola corta, el intestino alargado (oscuro a la luz transmitida) y el sistema reproductor (claro a la luz transmitida). En las hembras viejas, notar que algunos huevos han eclosionado dentro del cuerpo y que algunas hembras jóvenes se mueven alrededor. Distinguir la posición de la vulva, el ano y el poro excretor. Observar la estructura del estoma, así como la ausencia de estilete y dientes.

- B. Obtener uno de los machos más pequeños (esto no será posible con la primera generación hermafrodita de Heterorhabditis) y efectuar otro montaje temporal con la solución Ringer. Observar bajo el microscopio a 100-400 aumentos. Observar y dibujar las estructuras del cuerpo del animal, como su curvatura en la región de la cola y los testículos reflejados. También distinguir el poro excretor, las espículas, el gobernáculo y las papilas genitales.
- C. El insecto podrá disectarse después de 8-12 días a 20-25 C, pudiendo observarse la segunda generación de nematodos adultos. En este instante, los machos pequeños de Heterorhabditis podrán distinguirse. Los adultos de la segunda generación de Neoplectana difieren, en relación con los de la primera generación, solamente por su menor tamaño.
- D. Examinar los estadios juveniles infectivos haciendo montajes temporales en agua y observar a 200-1000 aumentos. Observar la cutícula del segundo estadio aún sin eliminar (algunas veces se pierde), el poro excretor, el ano, el anillo nervioso y la cola puntiaguda. Observar el gancho pequeño sobre la cabeza de la mayoría de los Heterorhabditis infectivos.
- E. Si se desea montar en forma definitiva cualquiera de los estadios, entonces los nematodos deben matarse con calor, fijarse en TAF o formalina al 3%, procesarse en glicerina y montarse en portaobjetos o laminillas apropiadas.

## 7. Observación de la Bacteria Simbiótica

En términos generales, cuando se extraen nematodos del interior del cuerpo de los insectos, muchas bacterias del género Xenorhabdus también son arrastradas al portaobjetos donde se pretende montar al nematodo. De no llevarse a cabo esto, entonces una muestra pequeña de los contenidos del insecto pueden transferirse a una gota de

Ringer colocada sobre un portaobjetos. La observación a 400-1000 aumentos, revelará las varillas largas de las bacterias simbióticas *X. nematophilus* (asociada con *Neoplectana* spp), o *X. luminescens* (asociada con *Heterorhabditis* spp). Ambas bacterias pueden cultivarse en medios bacteriológicos estándares. Resulta curioso destacar, como lo implica el nombre de *X. luminescens*, la luminiscencia exhibida por los cultivos jóvenes, la cual se manifiesta como un resplandor, a los pocos minutos de observar los cultivos en un cuarto completamente oscuro.

## 8. Consideraciones Importantes

### A. Areas problema

El desarrollo de los nematodos depende fundamentalmente de la temperatura. El programa que se ha mencionado en líneas atrás funcionará solamente si se realiza bajo temperaturas de 20-25 C. Algunas cepas de nematodos se desarrollarán más rápido o más lento de lo que hemos mencionado, por lo tanto, se sugiere realizar los ajustes pertinentes (acortar o prolongar el tiempo de incubación por 1 o 2 días si se trabaja con otras cepas). En caso que la bacteria simbiótica esté ausente [cuando los nematodos se guardan por periodos muy extensos (6 meses - 3 años) o a temperaturas inapropiadas (muy calientes o frías)], entonces el desarrollo de los nematodos se bloquea o se reduce substancialmente, impidiendo que las secuencias referidas anteriormente se puedan cumplir. En estas circunstancias es mejor iniciar con nematodos frescos.

## 9. Seguridad

La infectividad de estos nematodos se limita a los artrópodos (principalmente insectos). No existe información alguna que ataquen a los vertebrados o a las plantas, tampoco hay evidencias de que induzcan reacciones alérgicas al hombre.

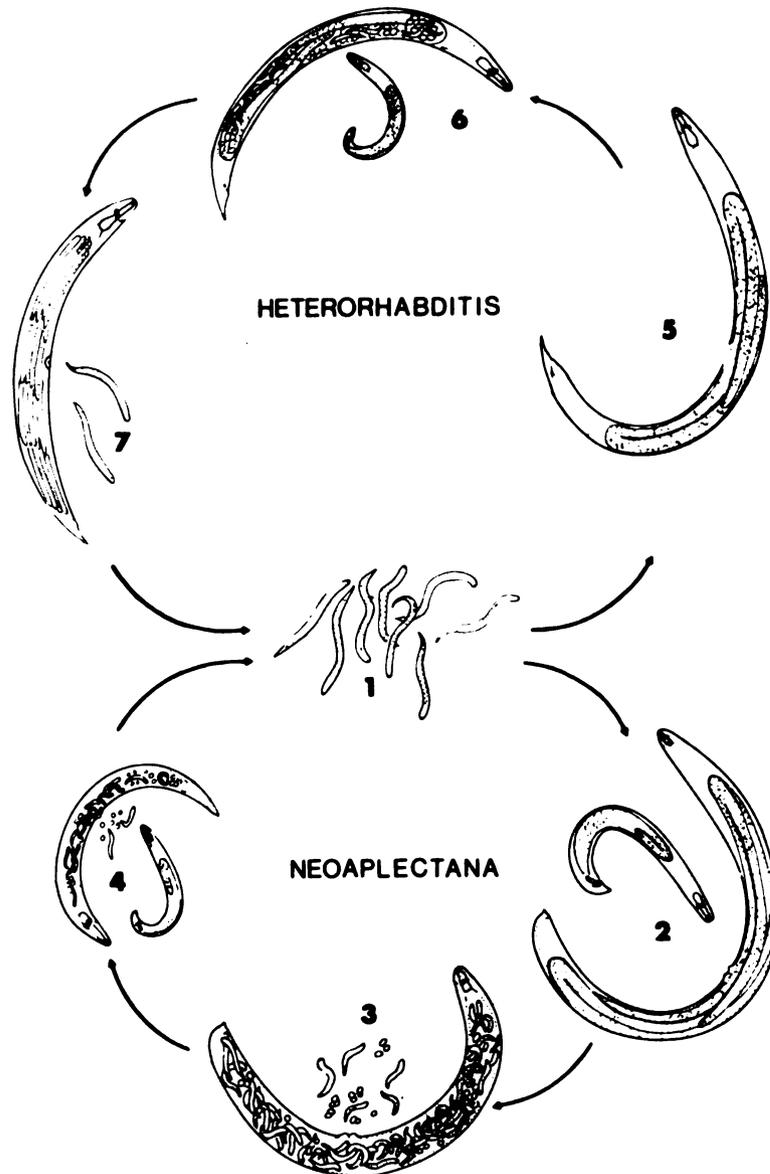
## Referencias Recomendadas

Akhurst, R. J. 1983. Int. J. Syst. Bacteriol. 33:38-45.

Poinar, Jr., G. O. 1975. Entomogenous nematodes. E. J. Brill, Leiden, the Netherlands, 317 pp.

Poinar, Jr., G. O., and G. M. Thomas. 1984. Laboratory guide to insect pathogens and parasites. Plenum Press, NY 392 pp.

Fig. 1. Ciclo de vida de Neoplectana y Heterorhabditis. Los estadios juveniles infectivos de ambos géneros son muy parecidos (1). Estos producen una primera generación amfimictica en Neoplectana (2) y una hermafrodita en Heterorhabditis (5). En Neoplectana, los juveniles se desarrollan internamente liberándose la primera generación de hembras (3), la cual si existen nutrimentos en forma adecuada, puede generar otra segunda generación amfimictica (4). La descendencia de estos adultos da origen a los estadios juveniles infectivos (1). En los Heterorhabditis, la progenie de las hembras hermafroditas da origen a una segunda generación amfimictica (con machos pequeños) (6); con frecuencia, los juveniles de estas hembras se desarrollan hasta el estado infectivo, antes de abandonar el cuerpo de las hembras (7) y dirigirse al medio ambiente (1).



## Ejercicio 17

### Patogenicidad y Reproductividad de Aphelenchoides ritzemabosi y A. fragariae en Begonia Rieger

R. M. Riedel  
Plant Pathology Department  
Ohio State University  
Columbus, OH 43210

#### 1. Objetivos

- A. Comparar los síntomas causados por dos especies de nematodos foliares en plantas de begonia Rieger.
- B. Comparar el potencial reproductivo de las dos especies de nematodos en un hospedante común.

#### 2. Tiempo Requerido

Este ejercicio podrá completarse en 4 semanas.

#### 3. Procedimiento

- A. Preparación del material vivo antes de dar inicio al ejercicio.

Cultivar 8 begonias Rieger cv "Schwabenland Red" hasta el estado de 4 foliolos. Esto se lleva a cabo en 3 semanas.

- B. Procedimiento

1. Extraer a A. fragariae y A. ritzemabosi de los cultivos de tejidos de callos, utilizando un tubo de cultivo para cada especie. Utilizar el embudo de Baermann por 24 h (ver Ejercicio 34).
2. Recolectar los nematodos extraídos de cada especie en un papel filtro Whatman #1 colocado sobre un embudo Büchner.
3. Cortar el papel en 8 piezas de igual tamaño y colocarlas por separado dentro de cajas de Petri hasta que se vayan a utilizar. Impedir la desecación de los papeles.

4. Para determinar la densidad de inóculo de cada papel, extraer los nematodos de 4 pedazos de papel para cada una de las especies, utilizando el embudo de Baermann por 24 h.
  5. Rociar con agua hasta escurrir, el follaje de 4 plantas de begonia.
  6. Inmediatamente colocar dos pedazos de papel sobre dos hojas en cada una de las dos plantas para cada especie. Marcar las hojas inoculadas.
  7. Cubrir las plantas inoculadas con bolsas de plástico, así como las testigo sin inocular y dejarlas en la obscuridad por 48 h.
  8. Al finalizar este período, quitar las bolsas de las plantas y pasarlas a un lugar sombreado en el invernadero.
  9. Regar el suelo y vigilar las plantas por 4 semanas.
  10. Después de las 4 semanas, obtener las hojas inoculadas y pesarlas.
  11. Extraer individualmente los nematodos de las hojas inoculadas, utilizando el método de Young (24 h) y anotar los pesos de las hojas en los frascos.
  12. Calcular las poblaciones de nematodos con base al número de nematodos/gramo de tejido fresco. Comparar los incrementos poblacionales en relación al nivel de inóculo inicial aplicado a las hojas.
- C. Variaciones del ejercicio para cambiar los niveles de intensidad

Se pueden inocular más hojas o más plantas para cada especie de nematodo, de tal suerte que se puedan llevar a cabo conteos de nematodos semanalmente, para medir la tasa de incremento poblacional de ambas especies.

#### 4. Fuente de los Materiales

##### A. Organismos

1. Las plantas de begonia Rieger cv "Schwabenland Red" pueden comprarse en Mikkelsens Inc., P. O. Box 1536, Ashtabula, OH 44004.

2. A. fragariae y A. ritzemabosi se pueden obtener solicitándolos a R. M. Riedel (ver Apéndice 2).

#### 5. Observaciones a Realizar

- A. Observar el color de las hojas de begonias inoculadas con cada especie. Anotar la cantidad de tejido necrótico observado.
- B. Calcular la población total de nematodos por hoja y por gramo de tejido fresco foliar, estimar el porcentaje de incremento en la población final con respecto a la población inicial.

#### 6. Resultados Esperados

- A. A. fragariae causará decoloración púrpura a rojo en las plantas de begonia y A. ritzemabosi de amarillo a oro. A. fragariae produce necrosis significativa al follaje en el período de las 4 semanas, incrementando su población cerca de 20 veces; A. ritzemabosi, por el contrario, sólo la incrementa 3 o 4 veces, habiendo significativamente menos nematodos por gr de peso fresco de follaje.

#### 7. Consideraciones Importantes

##### A. Cosas que hacer

1. Conservar a las plantas en un lugar sombreado en el invernadero. Las quemaduras de sol enmascararán los síntomas.
2. Mantenerlas por debajo de 27 C.

## Ejercicio 18

### Interacción de Meloidogyne incognita con el Hongo Fusarium oxysporum f. lycopersici en Plantas de Tomate

J. R. Bloom  
Department of Plant Pathology  
Pennsylvania State University  
University Park, PA 16802

#### 1. Objetivos

Demostrar que las plantas de tomate (cv. Rutgers) resistentes al marchitamiento por Fusarium, pueden ser atacadas por este hongo cuando el fitonematodo M. incognita se encuentra presente en el mismo suelo.

#### 2. Tiempo Requerido

Seis semanas, desde la siembra de las semillas hasta la aparición de síntomas de marchitez.

#### 3. Procedimiento

##### A. Preparación de materiales vivos antes de iniciar el ejercicio

1. Sembrar semillas de tomate "Rutgers" en arena o vermiculita. Dejar que se desarrollen hasta la obtención de plántulas con 1 o 2 pares de hojas. Fertilizar conforme se requiera.
2. Obtener raíces de tomate agalladas por M. incognita. Limpiarlas y cortarlas en secciones de 1-2 cm para ponerlas dentro de una licuadora con agua destilada estéril. Macerarlas por 10 segundos y pasar el macerado a través de un tamiz de cuarzo para separar los grandes desechos; contar el número de huevecillos y larvas por ml de filtrado.
3. Llenar las macetas con suelo esterilizado en autoclave. Hacer un hoyo en el centro de la superficie del suelo para inocular suficiente volumen del filtrado que contenga 250 huevos o nematodos, o la mezcla de ambos. Trasplantar una plántula de tomate en el hoyo e incubar a 23-27 C.

4. Nueve días después del trasplante, preparar el caldo de cultivo papa-dextrosa (colar el caldo de 250 grs de papas hervidas; agregar 20 grs de dextrosa; completar el volumen con agua a un litro). Vaciar el caldo en frascos convenientes para esterilizar en autoclave. Una vez que el medio se haya enfriado, inocularlo con *F. oxysporum* f. *lycopersici* y colocarlo en un agitador. Cinco días después, filtrar para separar las esporas, transferirlas con agua en el papel filtro hacia un recipiente apropiado y determinar la concentración de esporas/ml de la suspensión. Hacer 3 hoyos alrededor del tallo del tomate y agregar un total de 100,000 esporas por maceta. Incubar las plantas a 25-28 C.

#### B. Tiempo requerido

1. Crecimiento de las plantas de tomate; 3-4 semanas.
2. Preparación del inóculo de nematodos, infestación del suelo y trasplante de las plántulas; 3-4 semanas.
3. Preparación del inóculo de hongos; 2 h más 5 días de incubación.
4. Inoculación de plantas de tomate con el hongo; 1 h.
5. La inoculación del hongo deberá hacerse 14 días después de que las plantas hayan sido inoculadas con nematodos. Los síntomas se desarrollan entre 10-14 días después de la inoculación.

#### 4. Fuente de los Materiales

##### A. Organismos

1. *M. incognita* (ver Apéndice 2).
2. *F. oxysporum* f. *lycopersici* (Fusarium Research Center, 211 Buckhout Laboratory, University Park, PA 16802).

B. Equipo - No se requiere de alguno especializado.

#### 5. Observaciones a Realizar

El primer síntoma de marchitamiento que se observa es la epinastia (declinación de hojas). Enseguida ocurrirá el

amarillamiento de las hojas inferiores, lo cual puede afectar a los folíolos unilateralmente. Las hojas marchitas por lo general mueren y los síntomas gradualmente se manifiestan hacia arriba de la planta involucrando las hojas más jóvenes. Los síntomas también incluyen la decoloración vascular.

## 6. Resultados Esperados

La epinastia ocurrirá 6-8 días después de la inoculación con el hongo. El amarillamiento y marchitamiento serán visibles entre los 10-14 días después de que el hongo haya sido aplicado al suelo.

## 7. Variación del Ejercicio para Cambiar el Nivel de Intensidad

Ambos organismos se desarrollan mejor a temperaturas más elevadas. La manifestación de síntomas será más rápido a 28 C. Por debajo de 23 C, el desarrollo de los síntomas requerirá de 3-4 semanas.

## 8. Consideraciones Importantes

### A. Cosas por hacer

1. Los tratamientos serán: Nematodos solos; hongos solos; nematodos y dos semanas después hongos; control (libre de patógenos).
2. El inóculo de nematodos puede prepararse también mediante el procedimiento de Hussey y Barker (1973).

### B. Cosas que no hay que hacer

1. No utilizar plantas de tomate mayores de 15-20 cm de altura. El tiempo requerido para la manifestación de síntomas será mayor con las plantas viejas.
2. No acortar el período de inoculación entre los nematodos y el hongo a menos de 10 días.
3. Investigaciones recientes indican que, independientemente de la presencia o ausencia del nemátodo agallador, la fuente de resistencia contra el marchitamiento por Fusarium podrá influir en el desarrollo de los síntomas de marchitamiento en las plantas de tomate resistentes a Fusarium (Abawi y Barker, 1984).

**Referencias Recomendadas**

Abawi, G. S., and K. R. Barker, 1984. *Phytopathology*  
74:433-438.

Hussey, R. S., and K. R. Barker. 1973. *Plant Dis. Repr.*  
57:1025-1028.

## Ejercicio 19

### Hongos Nematófagos - Aislamientos del suelo

H-B. Jansson  
Department of Microbial Ecology  
University of Lund  
S-223 62 Lund, Sweden

#### 1. Objetivos

Los hongos nematófagos son habitantes muy comunes del medio edáfico que se encuentran en diversos tipos de suelos. El rango de temperaturas que toleran es muy amplio y de aquí que se les encuentre desde los polos hasta las regiones tropicales. Sin embargo, a pesar de su ubicua presencia, se desconoce el papel que juegan en el control de poblaciones de nematodos del suelo. Se han desarrollado varios métodos para aislarlos de diversos substratos, (Barron, 1982). El objetivo del presente ejercicio es demostrar la presencia de estos hongos en el suelo, mediante la utilización de uno de los métodos más simples y comunes para aislarlos con medio de cultivo sobre la que se esparce suelo.

#### 2. Procedimiento

##### A. Preparación de los materiales

Día 1: Vaciar en cajas de Petri (de 2-4 por estudiante) agua-agar al 1.5%. Después que el medio se haya solidificado, agregar de 500-1000 nematodos por caja y espolvorear de 0.5 a 1.0 gr sobre el medio. La mitad de las cajas serán rociadas sobre su superficie con agua estéril y las restantes quedarán intactas. Ambos grupos serán incubados 12 días a la temperatura de 20-25 C. Al finalizar este período, las cajas rociadas con agua contendrán las zoosporas de los hongos.

#### 3. Fuente de los Materiales

Muestras de suelo, agua-agar al 1.5%, cajas de Petri de 9 cm de diámetro, nematodos en cultivo o recién extraídos del suelo (ver Apéndice 2), microscopio de disección y compuesto.

#### 4. Observaciones a Realizar

Días 14 y 35: Examinar las cajas en busca de nematodos capturados y hongos nematófagos. Buscar además: (1) nematodos muertos; (2) estructuras atrapadoras (ver Fig. 1-4, Ejercicio 20) y (3) conidios. Los nematodos infectados aparecerán llenos de hifas. Para identificar los hongos nematófagos, consultar en Cooke y Godfrey (1964). Una forma sencilla de examinar a las placas de agar, es trazando varias líneas de referencia sobre la cara externa de la mitad de la caja que contenga el medio, para ésto, utilizar de 25-40 aumentos. Si es necesario destacar más detalles, entonces trabajar con 100-200 aumentos.

#### 5. Resultados Esperados

Las cajas con suelo sin humedecer, mostrarán el crecimiento del micelio de hongos en sucesión durante los primeros 2-4 días, en cambio, las incubadas con suelo humedecido pueden contener Chitridiomycetes u Oomycetes con zoosporas. Una semana más tarde, aparecerá Arthrobotrys sp, con su red adhesiva y enseguida se sucederán otros tipos de hongos atrapadores de nematodos (Fig. 1). A intervalos irregulares, otros diferentes tipos de hongos endoparásitos aparecerán por varias semanas (los hongos nematófagos endoparásitos infectan a nematodos con sus esporas, al contrario de los hongos nematófagos que utilizan estructuras como los anillos constrictores, nódulos pegajosos, etc).

#### 6. Variaciones del Ejercicio para Cambiar el Nivel de Intensidad

Aislar un gran número de hongos nematófagos y conservarlos para el ejercicio sobre "la captura de nematodos". Una manera de aislarlos consiste en recoger las conidiosporas directamente de los conidióforos erectos que crecen en los cultivos sin humedad; para ésto, se debe evitar tocar la superficie del agar o las partículas de suelo. Una manera de hacerlo es mediante la utilización de un tubo de vidrio de diámetro pequeño y de punta aguzada, que puede hacerse flameando y estirando la punta fundida de una pipeta Pasteur desechable. Al romper el filamento obtenido, se adquiere un instrumento ideal para atrapar los conidios mediante la simple aproximación de la punta de vidrio a los conidios, los cuales se adhieren (hacerlo bajo el microscopio de disección). De aquí pueden transferirse a una caja de Petri que contenga medio nutritivo, como harina de

maíz-agar, malta-agar, papa-dextrosa-agar, etc. Si el procedimiento se lleva a cabo con mucho cuidado, se pueden obtener cultivos puros de hongos desde el primer intento. Para la identificación de los hongos, utilizar la clave de Cooke y Godfrey (1964).

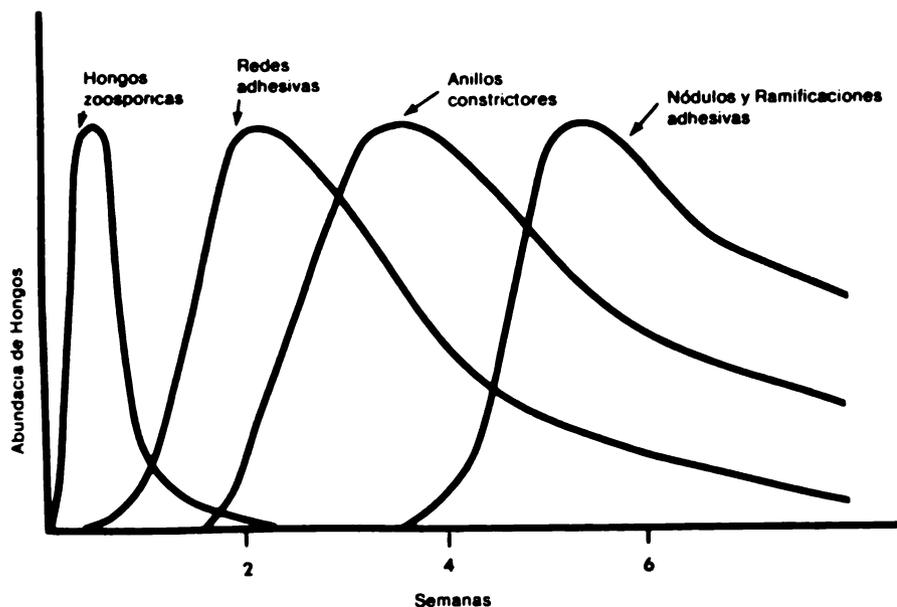


Fig. 1. Sucesión relativa de hongos nematófagos en cultivos con suelo espolvoreado sobre agua-agar. Los hongos endoparásitos pueden aparecer a intervalos irregulares durante todo el período de incubación.

#### Referencias Recomendadas

Barron, G. L. 1982. Nematode-destroying fungi. In *Experimental Microbial Ecology* (R. G. Burns and J. H. Slater, eds.), pp. 533-552. Oxford, Blackwell Scientific Publications.

Cooke, R. C., and Godfrey, B. E. S. 1964. A key to the nematode-destroying fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 47:61-74.

## Ejercicio 20

### Captura de Nematodos por Hongos Nematófagos

H-B. Jansson  
Department of Microbial Ecology  
University of Lund  
S-223 62 Lund, Sweden

#### 1. Objetivos

Los nematodos habitantes del suelo poseen muchos enemigos naturales. Entre éstos, destaca un grupo fascinante de hongos que tienen la capacidad de capturar, matar y digerir a nematodos (Barron, 1977). Estos hongos nematófagos capturan a sus presas de varias maneras; algunos producen hifas-trampa provistas de substancias pegajosas o con mecanismos especiales de funcionamiento (hongos formadores de trampas para nematodos, Figs. 1-3), mientras que otros los infectan con sus conidios (hongos endoparasíticos, Fig. 4). Independientemente del tipo de captura que posean, el resultado final será la digestión total del nematodo con las hifas, las cuales ocupan todo el contenido del animal entre las 6 y 72 h después de la infección, (la longitud del tiempo varía con la especie de hongo involucrada). El objetivo del presente ejercicio es observar los dramáticos eventos asociados a la captura de nematodos por diferentes hongos con distintos tipos de trampas.

#### 2. Procedimiento

##### A. Preparación de los materiales vivos antes de iniciar el ejercicio

1. Meria coniospora se desarrolla muy lentamente en todos los medios. Preparar de 5-6 cajas de Petri de 9 cm de diámetro con el medio HMA 1:10, e inocularlas con M. coniospora cuando menos con 6-8 semanas de anticipación. Antes del ejercicio, coleccionar los conidios inundando los cultivos con 1-2 ml de agua y esparciendo la suspensión de conidios con un sembrador de vidrio con punta en forma de "U". Pasar la suspensión a otras cajas conteniendo agua-agar al 1.5%. Antes de transferir los conidios, dejar secar el agar, exponiéndolo al aire de una cámara de flujo laminar por 1 h.
2. Arthrobotrys oligospora se desarrolla rápidamente. Inocular las cajas provistas con el

medio SPA por lo menos de 5-7 días antes del ejercicio. Con el propósito de obtener una gran cantidad de trampas, es aconsejable poner de 10-25 nematodos axenizados por cultivo, 24 h antes del ejercicio.

3. Otros hongos formadores de trampas como Dactylaria spp, requieren de 2-4 semanas para desarrollar (utilizar los medios SPA y HMA de 1:10).

### 3. Fuente de los Materiales

#### A. Organismos

Hongos: Meria coniospora (endoparásito con conidias adhesivas), Arthrobotrys oligospora (formador de trampas, redes adhesivas) y/u otros hongos formadores de trampas como por ejem: Dactylaria candida (nódulos adhesivos); Dactylella gracilis (anillos constrictores) y Monacrosporium cionapagum (ramificaciones adhesivas). Los cultivos de estos hongos se pueden obtener de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), en 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD. Los hongos pueden aislarse directamente del suelo (ver el Ejercicio 19).

Nematodos: Caenorhabditis elegans, Panagrellus redivivus o cualquier otra especie de nematodo cultivado axénica o monoxénicamente (para obtenerlos, ver el Apéndice 2). También se podrán utilizar nematodos fitoparásitos o de vida libre extraídos directamente del suelo.

#### B. Equipo

Cajas de Petri, microscopio de disección y microscopio compuesto, azul de lactofenol, medio diluido de harina de maíz agar (HMA 1:10): 0.17 gr de HMA + 1.35 gr de agar en 100 ml de agua. 0.05% de soya-peptona-agar (SPA): 0.05 gr de soya-peptona + 1.5 gr de agar en 100 ml de agua. Agua-agar al 1.5% (AA): 1.5 gr de agar en 100 ml de agua.

### 4. Observaciones a Realizar

Transferir varias gotas de la suspensión de nematodos (de 25-50 nematodos por gota) a cada una de las cajas que contenga una sola especie de hongo nematófago.

#### A. M. coniospora

Permitir que los nematodos y el hongo interactuen cerca de 1 h. Enseguida, pescar individualmente entre 10-15 nematodos infectados por el hongo y colocarlos en una gota de agua sobre un portaobjetos, en forma simultánea, los nematodos infectados en las cajas, podrían concentrarse lavando las cajas con agua y transfiriendo la suspensión a tubos de centrifuga (1000-2000 X g). Los nematodos concentrados en el precipitado podrán transferirse a un portaobjetos. En ambos casos, teñirlos con azul de lactofenol y observarlos al microscopio (100-200 X) para distinguir los conidios adheridos. Los conidios se pueden adherir a la boca, la cola o alrededor de todo el cuerpo, dependiendo de la especie y el sexo del nematodo. Si es posible, hacer observaciones de 3-7 días después de que los conidios se hayan adherido, para determinar si hubo infección y digestión del nematodo.

#### B. A. oligospora y otras especies formadoras de trampas

Observar la captura de nematodos en las trampas. Observar lo que sucede con el nematodo atrapado por lo menos durante los primeros 15 min. Si es posible, observar nuevamente las cajas después de 24-48 h, para ver la digestión total de los nematodos.

### 5. Resultados Esperados

En los hongos formadores de trampas de tipo adhesivo, v.gr. A. oligospora (Fig. 1), D. candida (Fig. 2), los nematodos son capturados inmediatamente al ponerse en contacto con las trampas. Estos nematodos tratan de liberarse de las trampas por espacio de 10 min pero enseguida son inmovilizados (se presume que una toxina del hongo está involucrada). Una hora después, el hongo penetra la cutícula del nematodo y a las 24 h el cuerpo ha sido consumido totalmente.

Los hongos poseedores de trampas en forma de anillos constrictores (Fig. 3), culminan su actividad de la misma manera que los hongos anteriores, solamente que aquí, el mecanismo de captura es diferente. Aquí, el nematodo introduce la cabeza o la cola dentro del anillo, lo que provoca que las tres células que lo forman se hinchen y aprisionen firmemente al nematodo. No se conoce el mecanismo por el cual el anillo es capaz de cerrarse. Después de quedar atrapado, el nematodo es inmovilizado y casi enseguida digerido. El hongo endoparásito M. coniospora muestra una alta especificidad en la adhesión

de sus conidiosporas comparado con los hongos formadores de trampas (Jansson & Nordbring-Hertz, 1983). Algunas especies de nematodos no son afectadas por los conidios, otras especies son atacadas en cualquier parte de su cutícula, pero en general, la mayoría adquiere los conidios a través de su cabeza. En Panagrellus redivivus los adultos y juveniles son infectados específicamente en la cabeza, aunque los machos también pueden ser infectados en la cola.

6. Variación del Ejercicio para Cambiar el Nivel de Intensidad

Utilizar a M. coniospora en el ejercicio pero aprovechando para realizar pruebas de adhesión de conidios con otras especies de nematodos. Observar la ausencia o presencia de conidios y si éstos se adhieren a regiones específicas como la cabeza, la cola o toda la cutícula. Comparar estos resultados con los obtenidos con otros hongos, como A. oligospora. De existir resultados diferentes, discutir las explicaciones posibles.

Referencias Recomendadas

- Barron, G. L. 1972. The Nematode-destroying Fungi. Topics in Mycobiology, No. 1. Canadian Biological Publications Ltd., Guelph.
- Jansson, H-B., and Nordbring-Hertz, B. 1983. J. Gen. Microbiol. 129:1121-1126.

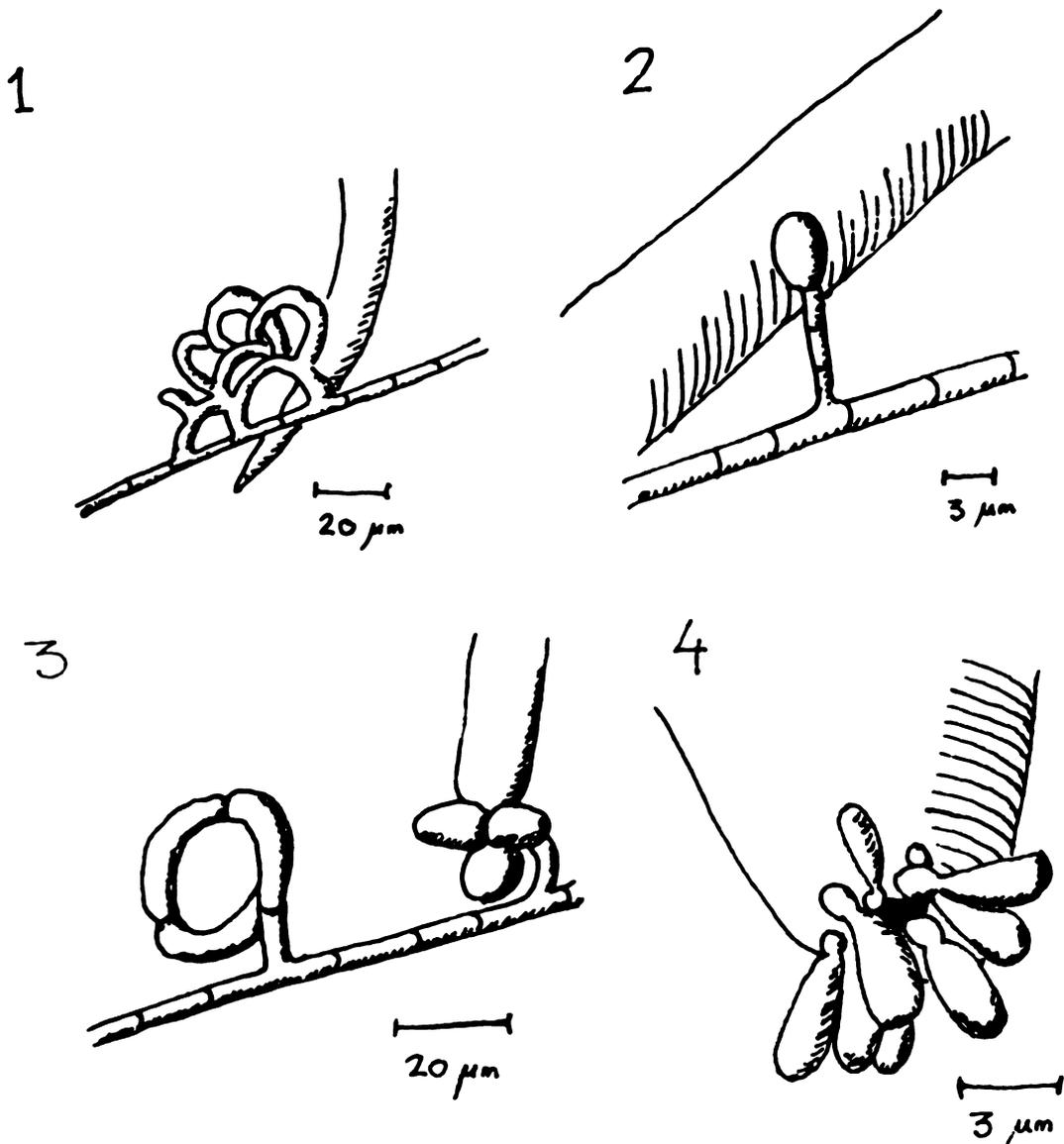


Fig. 1-3. Organos atrapadores de algunos hongos formadores de trampas. Se ilustra la porción de un nematodo para indicar el tamaño relativo de la trampa. Fig. 1: red adhesiva (v.gr. *Arthrobotrys oligospora*), donde el nematodo se enreda o se pega a la red. Fig. 2: nódulo adhesivo (v.gr. *Dactylaria candida*). Los nematodos son capturados frecuentemente por varios nódulos. Algunas veces los nódulos se desprenden del micelio pero aún así el nematodo será infectado y digerido por el hongo. Fig. 3: anillos constrictores (v.gr. *Dactylella gracilis*), se ilustra al anillo abierto y a otro más constrictiendo a un nematodo.

Fig. 4. Conidios de *M. coniospora* adheridos a la región cefálica de un nematodo. Los conidios se adhieren mediante una yema adhesiva. La región más grande de los conidios no tiene propiedades adhesivas.

## Ejercicio 21

### Aphelenchoides fragariae - Xanthomonas begoniae Interacciones en Begonia Rieger

Richard M. Riedel  
Plant Pathology Department  
Ohio State University  
Columbus, OH 43210

#### 1. Objetivos

Observar la relación del nematodo Aphelenchoides fragariae en el desarrollo del tizón o añublo bacteriano de la begonia, causado por Xanthomonas begoniae.

#### 2. Tiempo Requerido

El ejercicio puede completarse de 3 a 4 semanas.

#### 3. Procedimiento

##### A. Preparación del material vivo antes de iniciar el ejercicio

1. Transferir cultivos de X. begoniae a cuatro frascos Erlenmeyer conteniendo 50 ml de medio nutritivo Difco. Antes de utilizarse mantenerlos en agitación por 48 h a 21-24 C
2. Extraer a A. fragariae de dos cultivos monoxénicos 24 h antes de iniciar el ejercicio. Utilizar la técnica del embudo de Baermann para la extracción (ver Ejercicio 34).
3. Obtener 8 begonias Rieger cv Schwabenland Red, cada una con 4 hojas jóvenes completamente expandidas.

##### B. Procedimiento para la inoculación

1. Filtrar todos los nematodos extraídos de un solo tubo de cultivo de A. fragariae a través de un papel filtro Whatman #1 colocado sobre un embudo Büchner.
2. Cortar el papel filtro en 8 piezas de igual tamaño. Conservar individualmente estas piezas dentro de cajas de Petri, evitando su desecación.

3. Asperjar 4 plantas de begonia con un cultivo de bacterias de 48 h hasta escurrir. Inocular a cada una de las 4 hojas de dos plantas con los nematodos contenidos en los trozos de papel (uno para cada hoja). No infectar con nematodos a las 2 plantas restantes.
4. Asperjar con agua destilada hasta saturar otras cuatro plantas de begonia. Inmediatamente inocular a cada una de las 4 hojas expandidas de dos plantas, con los nematodos contenidos en trozos de papel (ver el Ejercicio 11). No infectar con nematodos a las dos plantas restantes.
5. Cubrir a cada planta con bolsas de plástico y mantenerlas en un invernadero provisto de sombra por espacio de 3-4 semanas.

#### 4. Fuente de los Materiales

- A. Xanthomonas begoniae (Takimoto) Dowson. Se puede obtener de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ver Apéndice 2).
- B. Aphelenchoides fragariae, para cultivos establecidos (ver el Apéndice 2).
- C. Medios de cultivo. Se pueden adquirir de los Laboratorios Difco, P.O. Box 1058A, Detroit, MI 48232.
- D. Begonia Rieger cv Schwabenland Red. Se puede obtener en Mikkelsens, Inc., Box 1536, Ashtabula, OH 44004.

#### 5. Observaciones a Realizar

Este ejercicio tiene 4 tratamientos: begonia inoculada solamente con agua; sólo con nematodos; sólo con bacterias, y con bacterias + nematodos. Estos tratamientos deben mantenerse separados para efectuar las observaciones pertinentes.

Durante el periodo de 3-4 semanas, efectuar observaciones diarias en las hojas inoculadas, para determinar tipos y patrones de síntomas.

#### 6. Resultados Esperados

Las plantas inoculadas solamente con la bacteria,

mostrarán manchas pequeñas y húmedas rodeadas por un halo de tejido clorótico. Estos síntomas se desarrollarán lentamente, por espacio de 3 semanas, en un patrón triangular iniciado en los bordes de la hoja. Las inoculadas con nematodos mostrarán un intenso enrojecimiento de hojas, iniciado a lo largo de las nervaduras. Lo rojizo se expandirá a toda la superficie foliar en 3 semanas. Las bacterias y nematodos juntos inducen en forma rápida (5-8 días), el aspecto húmedo y colapsado de hojas inoculadas.

Las hojas sin inocular, no desarrollarán síntomas. El desarrollo de síntomas similares a los de la inoculación simultánea, se obtienen cuando las bacterias se inoculan 2-7 días antes que los nematodos. La severidad y la velocidad en el desarrollo de síntomas se atenúan cuando los nematodos se inoculan antes que las bacterias.

## **7. Variaciones del Ejercicio para Cambiar el Nivel de Intensidad**

A. El efecto del tiempo sobre la inoculación de begonias con los distintos componentes patogénicos de la enfermedad, se puede observar comparando los siguientes tratamientos de inoculaciones simultáneas:

1. Inoculación de begonia con X. begoniae y, dos días después con A. fragariae.
2. Inoculación con X. begoniae y 7 días más tarde con A. fragariae.
3. Inoculación con A. fragariae y dos días después con X. begoniae.
4. Inoculación con A. fragariae y 7 días más tarde con X. begoniae.

## **8. Consideraciones Importantes**

A. Cosas por hacer

1. Mantener las plantas separadas en una mesa de invernadero con sombra.

B. Cosas que no deben hacerse

1. No regar las plantas sobre el follaje, esto facilita la dispersión de los patógenos.

2. No exponer las plantas a la luz directa del sol, pues las quemaduras de sol enmascararan los síntomas.
3. No intentar efectuar el ejercicio cuando las temperaturas del invernadero sean superiores a 27 C.

**Referencias Recomendadas**

Riedel, R. M., and Larsen, P. O. 1974. J. Nematol. 6:215-216.

## Ejercicio 22

### Cultivo de Nematodos Bacteriófagos

Ralph H. Estey  
Macdonald College of McGill University  
Ste-Anne-de-Bellevue, Que., Canada H9X 1C0

#### 1. Objetivos

Aprender a establecer cultivos monoxénicos de nematodos que se alimentan de bacterias. Aprender a identificar los nematodos cultivados.

#### 2. Tiempo Requerido

Seis horas, en 5 pasos, en un lapso de 5 semanas.

#### 3. Procedimiento

##### A. Antes del ejercicio

1. Tomar muestras del suelo de la rizósfera de plantas adultas creciendo en suelos naturales. Mantenerlas húmedas en recipientes apropiados y debidamente etiquetados. Tres muestras de diferentes suelos deben obtenerse para este ejercicio. Por cada cuatro estudiantes, distribuir un recipiente con cada suelo y dos espátulas.
2. Preparar suficiente medio papa-dextrosa diluido 1/10 en 1.5% de agar para proveer a cada estudiante con tres cajas de Petri, cada una con 10 ml de medio.
3. Antes de continuar, poner dentro de cajas de Petri de 9 cm de diámetro, cinco o más anillos de vidrio o de plástico (que resistan la esterilización en autoclave), de 15 mm de diámetro y 5 mm de altura (o de fondo).

Esterilizar en autoclave junto con varios portaobjetos excavados (3 por estudiante) y una aguja para transferir los huevecillos.

Vaciar cerca de 5 ml del medio nutritivo de agar dentro de las cajas con los anillos, asegurándose que cada uno de éstos quede lleno parcialmente.

Antes de que el medio se solidifique, acomodar los anillos dentro de la caja con la ayuda de la aguja. Proveerse de cantidades adicionales de agua estéril y soluciones frescas para las desinfecciones superficiales.

4. Antes del paso #4 del siguiente inciso (B), por cada estudiante preparar dos cajas de Petri con agar conteniendo nutrientes de tipo bacteriológico. Disponer de dos o más especies de bacterias conocidas, con las cuales se puedan hacer subcultivos.

#### B. Ejercicio para los estudiantes

1. En el centro de las cajas conteniendo al medio diluido de agar, poner una cantidad de suelo para cubrir el área equivalente a un círculo de 2.5 cm de diámetro y 2 mm de espesor. Preparar una caja por cada tipo de suelo. Etiquetar las cajas anotando la fecha e iniciales de los nombres de las personas responsables de la siembra. Con la ayuda de un gotero, agregar cuidadosamente agua no clorada al suelo de cada caja, hasta saturar.
2. Colocar horizontalmente las cajas dentro de bolsas de plástico y mantenerlas sin perturbar por espacio de 2 semanas.
3. Al finalizar este periodo de incubación, iniciar el establecimiento de cultivos monoxénicos de nematodos mediante la desinfección de varios huevecillos.

Nota: El ejercicio puede convertirse en un proyecto de grupo, para experimentar diversos métodos que permitan desinfectar a bacterias, hembras de nemátodos grávidas o sus huevecillos.

Un método consiste en transferir con la ayuda de un sembrador de punta espatulada huevecillos a agua estéril en portaobjetos excavados. Con mucho cuidado agitar los huevecillos y lavarlos una o dos veces con agua estéril, antes de sumergirlos por 8 min en una solución de NaOCl al 1%. Enseguida, volver a lavarlos dos veces y transferirlos al medio de cultivo confinado en los anillos dentro de las cajas de Petri. Colocar horizontalmente a las cajas de Petri dentro de bolsas de plástico con 3 ml de agua estéril, para mantener condiciones de humedad. Dejarlas incubar por espacio de una semana. No desechar las 3

cajas originales conteniendo los suelos. Observarlos 2 semanas después, ya que es probable que para estas fechas se puedan observar parásitos de nematodos, especialmente hongos atrapadores de nematodos.

4. Al finalizar la semana, observar al microscopio el contenido de cada uno de los anillos con huevos. Buscar nematodos juveniles en los anillos que no estén contaminados con bacterias. Los que se encuentren en estas condiciones, transferirlos asépticamente a las cajas con medio bacteriológico que se prepararon previamente. Procurar poner dos o más nematodos por caja. Enseguida, transferir inóculo de uno de los subcultivos con bacterias identificadas esparciéndolo cuidadosamente sobre la superficie del medio de cultivo. Colocar las cajas conteniendo a los nematodos y bacterias dentro de bolsas de plástico y dejar que los nematodos se alimenten y multipliquen por dos semanas o más, con el propósito de lograr establecer los cultivos monoxénicos.
5. Preparar uno o dos montajes temporales con nematodos adultos para identificarlos hasta nivel de género.

#### 4. Tiempo Necesario para Cada Paso

30 min para el uno,  
3 h para el tres,  
90 min para el cuatro,  
1 h para el cinco.

#### 5. Fuente de los Materiales

Los organismos, las sustancias y el equipo necesario para llevar a cabo el presente ejercicio, se encuentran disponibles en cualquier institución donde se enseñe microbiología y fitonematología. Los nematodos bacteriófagos son muy abundantes en la mayoría de los suelos.

#### 6. Observaciones a Realizar

Además de las observaciones citadas en el instructivo, los estudiantes deben buscar otros enemigos naturales de nematodos en las cajas sembradas con el suelo, como se indicó en el inciso anterior (A, 3).

## 7. Resultados Esperados

Aproximadamente el 50% de los huevos desinfectados superficialmente como se indicó en el inciso A3, deben eclosionar y dar origen a juveniles libres de bacterias.

## 8. Variaciones y/o Adiciones

A. Diversas variaciones son implícitas a partir de lo explicado en el paso #3.

B. El número inicial de nematodos bacteriófagos se puede obtener mediante el método fácil y rutinario del embudo de Baermann. Entonces, si siguiendo las instrucciones del paso #3, no se logra obtener ningún nematodo, se tiene todavía la opción de capturarlos poniendo suelo en los embudos por 14 h.

C. Diseñar una pequeña prueba para observar si las bacterias viables son capaces de pasar a través del tracto digestivo de nematodos.

D. Se puede intentar establecer cultivos adicionales monoxénicos si, por ejemplo, en el paso #3 antes citado, las hembras grávidas de nematodos son transferidas a un medio nutritivo con agar. Si estos nematodos no han sido correctamente desinfectados, llevarán en su interior un número de bacterias suficientes como para iniciar un nuevo cultivo. Diversas especies de nematodos bacteriófagos han sido utilizadas como alimento vivo para ciertas especies de peces tropicales. De ser posible, debe intentarse esto último con algunas especies locales de peces.

## 9. Consideraciones Importantes

Al estar efectuando lo señalado en los pasos #3 y #4, tener cuidado especial para prevenir que las cajas de los cultivos se contaminen. De pasar esto, uno terminaría por tener cultivos xénicos en lugar de monoxénicos.

## Referencias Recomendadas

Green, C. D., and Hornsey, Julia. 1983. *Nematologica* 29: 362-365.

Krusberg, L. R., and Sardanelli, S. 1984. *J. Nematol.* 16:348.

Zuckerman, B. M. 1971. In "Plant Parasitic Nematodes"  
Vol. 2 (B. M. Zuckerman, W. F. Mai, and R. A. Rohde.  
eds.) pp. 159-184. Academic Press, New York.

## Ejercicio 23

### Cultivo de Nematodos Micófagos

Ralph H. Estey  
Macdonald College of McGill University  
Ste-Anne-de-Bellevue, Que., Canada H9X 1C0

#### 1. Objetivos

Aprender a reconocer a Aphelenchus avenae, nematodo con estilete que se alimenta principalmente de hongos y se encuentra muy comunmente en la rizósfera de las plantas, particularmente de las que están infectadas de hongos patogénicos u hongos micorrícicos.

Aprender a cultivar una especie de nematodo micófago, su tasa reproductiva, la producción de machos y su comportamiento en general, afectado por diversos factores ambientales.

#### 2. Tiempo Requerido

Dos sesiones de 3 h cada una, separadas entre sí por espacio de un mes. El ejercicio complementario puede requerir un mes extra de intervalo.

Tiempos requeridos para cada paso en el inciso 3 B:

3 h para los pasos 1, 2 y 3,  
30 min para el 4, el cual debe hacerse un mes después que el 3,  
3 h para el 5, el cual debe hacerse 12-24 h después que el 4.

#### 3. Procedimiento

##### A. Antes del ejercicio

1. Cuando menos 3 semanas antes del ejercicio, iniciar los cultivos monoxénicos de A. avenae y Rhizoctonia solani en cajas de Petri (9 cm de diámetro) provistas del medio PDA (papa-dextrosa con 1.5% de agar y diluido a un quinto). Preparar un cultivo por estudiante e incubar a 20 C.
2. Tres días antes, iniciar los cultivos de R. solani en suficientes cajas de Petri, de tal suerte que cada cultivo sea compartido por un máximo de

dos estudiantes. También preparar cultivos con otros hongos, para que cada par de estudiantes pueda comparar con un hongo diferente a R. solani.

3. El día de la sesión de laboratorio, preparar 12 cajas de Petri por estudiante con 10 ml de medio PDA rebajado a 1/5 (agar al 1.5%). También esterilizar goteros, pipetas y un portaobjetos excavado por cada estudiante. Asegurarse de tener suficiente agua esterilizada.

#### B. Ejercicio para el estudiante

1. Transferir en condiciones asépticas, una porción de hifas de R. solani a cada una de las seis cajas de Petri con agar y hacer lo mismo con las otras 6 pero con el otro hongo.
2. Con la ayuda del microscopio, observar los cultivos monoxénicos de A. avenae con el propósito de estimar el número de hembras grávidas. Si cuando menos se encuentran 36, entonces proceder a separarlas individualmente y distribuirlas en grupos de 3 en portaobjetos excavados provistos de una gota de agua. Asegurar que solamente se encuentren 3 nematodos en buenas condiciones por portaobjetos. Transferir con gotero a 3 nematodos en cada cultivo fresco de hongo. Es muy importante que cada cultivo de hongos reciba la misma cantidad de nematodos y que sean manejados en forma idéntica.
3. Colocar dentro de una bolsa de plástico 3 de las cajas conteniendo cultivo de R. solani y nematodos. Cerrar la entrada de ésta torciendo el plástico restante. En otra bolsa de plástico, colocar los cultivos que contengan a los nemátodos con otras especies de hongos. Incubar ambos lotes por 4 semanas a 12 C (nunca por debajo de 10 C).

Repetir este procedimiento con las 6 cajas restantes incubándolas el mismo período que las anteriores pero a 30 C (nunca por arriba de 40 C). Si las bolsas se van a dejar en un ambiente relativamente seco, poner 3 ml de agua en cada bolsa de plástico, antes de sellar.

Nota: Antes de proceder con el siguiente paso (el #4), hacer rápidamente una revisión microscópica de cada cultivo, para determinar

en qué combinación de hongo-nematodo y en qué regímenes de temperatura, hay mayor número de nematodos y una proporción más grande de machos.

Este aspecto es importante, porque permitirá llevar a cabo una o más variaciones del ejercicio, como se indica enseguida.

4. Para estimar con mayor precisión el número de nematodos por cultivo (caja de Petri), dividir con una espátula o cuchillo la superficie del agar en varias proporciones y colocarlas para extracción en un embudo de Baermann o la modificación del mismo (ver Ejercicio 1).
5. Proceder a contar los nematodos utilizando para ello una caja de conteo tipo Doncaster, o simplemente una caja ordinaria con cuadros o rectángulos marcados en el fondo de una de sus tapas.
6. Anotar el número total de nematodos obtenidos por cada caja de cultivo, así como el número de machos.

El profesor debe concentrar los datos de todos los estudiantes para tener mejor idea sobre las combinaciones hongo-nematodo-temperatura que hayan inducido el mayor número de nematodos.

#### 4. Fuente de los Materiales

Los organismos y el equipo indispensable para trabajar lo especificado en el presente ejercicio, se encuentran por lo general, en las instituciones donde se enseña fito-nematología, fitopatología o micología (ver Apéndice 2).

#### 5. Observaciones a Realizar

Las observaciones a realizar se indican en el procedimiento o son obvias.

#### 6. Resultados Esperados

A. avenae, usualmente se reproduce más rápido con el hongo hospedante del cultivo original. Los resultados que se obtengan pueden confirmarlo o contradecirlo. La reproducción del nematodo siempre será más rápida en un

ambiente tibio que en uno frío. No obstante que la mayoría de las cepas de A. avenae pueden sobrevivir en un medio pobre de oxígeno, éstas se multiplicarán más rápido en un medio normalmente aireado. El nematodo tiende a emigrar cuando las poblaciones son muy numerosas, y cuando el ambiente es seco, adopta formas coloniales crespas u onduladas.

## 7. Variaciones y/o Adiciones

- A. Sellar una o dos cajas que contengan muchos nematodos para impedir que el aire penetre. Colocarlas dentro de una bolsa de plástico, junto con otras cajas similares pero sin sellar. Incubarlas por un mes adicional para ver el efecto que tiene el oxígeno en el desarrollo de los nematodos.
- B. Dejar que el agar se seque paulatinamente en una o dos cajas para observar la manera como A. avenae responde a tales condiciones.
- C. Pegar entre sí las tapaderas de una o dos cajas con cinta celulósica. El propósito de esto es impedir el movimiento de las tapaderas permitiendo a la vez el intercambio gaseoso. Poner a estas cajas separadas en un ambiente húmedo por lo menos dos semanas más. Bajo estas condiciones, es común que A. avenae emigre del agar a las tapaderas de las cajas.
- D. Incorporar algunos especímenes de Mononchus dentro de uno o varios cultivos de A. avenae. Estimar la población de A. avenae al inicio y una semana después de que Mononchus haya sido introducido al medio.

## 8. Consideraciones Importantes

- A. Llevar a cabo todas las manipulaciones en condiciones asépticas para reducir al mínimo la entrada de organismos extraños.
- B. Evitar incubar los cultivos en condiciones muy calientes o frías (ver el #3 en el ejercicio para el estudiante) y no dejar que se sequen; con excepción del B, en Variaciones y Adiciones.

**Referencias Recomendadas**

**Doncaster, C. C. 1962. Nematologica 7: 334-337.**

**Evans, A. A. F., and Fisher, J. M. 1970. Nematologica 16:  
295-304.**

**Soyza, K. de 1973. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 40: 1-10.**

## Ejercicio 24

### Cultivos en Discos de Zanahoria

R. N. Huettel  
USDA, ARS, BARC-W  
Nematology Lab., PPI  
Beltsville, MD 20705

#### 1. Objetivos

Establecer cultivos de nematodos endoparásitos migratorios, en discos de zanahoria desinfectados superficialmente.

#### 2. Tiempo Requerido

Este procedimiento consta de dos pasos. El primero involucra la preparación de discos de zanahoria para introducirse en tubos de cultivo o frascos de vidrio. Este paso requiere de 1-2 h. El segundo involucra la desinfección de nematodos para inocularse sobre los discos (ver Ejercicio 25).

#### 3. Procedimiento

Consta de dos pasos modificados a partir de Moody et al (1973).

I. Preparación de discos de zanahoria.

II. Desinfección de nematodos (generalmente se utiliza a Pratylenchus spp).

Paso I. Preparación de discos de zanahoria

Nota: Para lograr mejores resultados, utilizar zanahorias frescas que todavía tengan follaje. Evitar trabajar con zanahorias que hayan sido almacenadas a bajas temperaturas por mucho tiempo, ya que éstas son muy susceptibles a adquirir después de la cosecha infecciones de organismos asociados a enfermedades .

A. Sumergir las zanahorias en agua para quitarles el lodo y limpiarlas cuidadosamente. Eliminar aquellas zanahorias rotas, malformadas o golpeadas.

- B. Eliminar el extremo aguzado de la zanahoria y la primera porción roma (1-2 cm).
- C. Dentro de un vaso de precipitado de 500 ml, sumergir a las zanahorias en alcohol etílico al 95%, por espacio de 3-5 min y hasta 3/4 de su longitud (ocupar el resto para sujetarlas en los pasos siguientes).
- D. Con una lámpara de alcohol, flamear lo suficiente hasta que todo el alcohol del tejido se haya consumido.
- E. Pelar la epidermis en tiras finas de 0.5 mm de grosor mediante la utilización de un cuchillo estéril o un pelador para verduras. Solamente pelar el área de la zanahoria que haya sido flameada. Tener cuidado de flamear el pelador cada vez que se vaya a sacar una tira nueva de epidermis.
- F. Del área flameada y pelada, cortar discos de 2-3 cm de grosor y transferirlos a frascos de vidrio (120 ml) o hacer rebanadas de 2-3 mm para tubos de cultivo de 20 X 15 cm. Desechar el remanente de zanahoria.
- G. Los frascos y tubos se pueden mantener a 22-24 C hasta que se vayan a utilizar. Sellar la entrada de los tubos con parafilm para evitar la desecación.

#### **Paso II. Desinfección de nematodos**

- A. Cultivos nuevos. Los nematodos pueden obtenerse a partir de muestras de suelo o raíces y desinfectarse superficialmente como se describe en el Ejercicio 25.
- B. A partir de cultivos monoxénicos establecidos de Pratylenchus, los nematodos pueden recuperarse lavando las paredes de los recipientes (frascos o tubos) y/o burbujeando por 24-48 h los discos de zanahoria sumergidos en agua para removerlos. Los nematodos colectados deben desinfectarse superficialmente (axenizarse) e incubarse de la manera como se indica en el Ejercicio 25 para reinoculaciones.

#### **4 Fuente de los Materiales**

- A. Cultivos monoxénicos establecidos de Pratylenchus spp, (ver Apéndice 2).
- B. Autoclave, cámara de flujo laminar, incubadora, frascos de vidrio de 120 ml o tubos de cultivo, equipo para desinfectar nematodos, (ver Ejercicio 25).

## 5. Observaciones

Para establecer poblaciones relativamente numerosas en discos de zanahoria, se requieren aproximadamente 6-8 semanas. No obstante, los cultivos pueden mantenerse hasta 4 meses antes que los discos empiecen a secarse o romperse.

## 6. Resultados Esperados

Con este método se pueden producir grandes cantidades de nematodos limpios para llevar a cabo experimentos de diferentes propósitos. En general, es un método muy simple para cultivar nematodos, que requiere de poco mantenimiento.

## Referencias Recomendadas

Moody, E. H., B. F. Lownsbery, and J. M. Ahmed. 1973.  
J. Nematol. 5: 225-226.

## Ejercicio 25

### Cultivo de Nematodos Fitoparásitos en Explantes Radicales

R. N. Huettel y R. V. Rebois  
USDA, ARS, BARC-W  
Nematology Laboratory, PPI  
Beltsville, MD 20705

#### 1. Objetivos

Los objetivos del presente ejercicio son: (1) desinfectar y germinar semillas, (2) transferir explantes de ápices radicales a medio de crecimiento e (3) inocular los explantes radicales con nematodos fitoparásitos axenizados.

#### 2. Tiempo Requerido

Aproximadamente se necesita una semana para completar el ejercicio. Cada uno de los pasos requiere entre 1-3 h y cada uno de los mismos estará espaciado por un periodo de 2-3 días.

#### 3. Procedimiento

Consistirá de los siguientes pasos:

- I. Desinfección y germinación de semillas.
- II. Transferencia de ápices radicales al medio de crecimiento.
- III. Inoculación de explantes radicales con nematodos fitoparásitos axenizados (superficialmente desinfectados), v.gr. Meloidogyne spp, o Pratylenchus spp.

Paso I. Desinfección y germinación de semillas

Nota: El número de semillas que se vayan a desinfectar dependerá de su tamaño, el número de ápices radicales requeridos por caja de Petri y la tasa germinativa de las semillas a utilizar, ejem: semillas de soya con buena germinación, 6-7 por caja; de tomate, 15-20 por caja; etc.

- A. Se usarán cajas de Petri (15 X 100 mm) con 25 ml de agua-agar al 1.5% para germinar las semillas. (Esterilizar en autoclave 15 gr de agar en un litro de agua. Usar cajas estériles).
- B. Colocar las semillas en un vaso de precipitado y agregar suficiente alcohol etílico al 95% hasta cubrir las y tratarlas por 3 min. Las semillas hirsutas (v.gr. tomate) deben sonificarse en baño de agua durante el procesamiento.
- C. Eliminar el etanol y sustituirlo por una solución de clorox al 10%. Tratar las semillas por 10-15 min manteniendo el vaso cubierto con papel aluminio, dentro de la cámara de flujo laminar.
- D. Enseguida, transferir directamente las semillas a las cajas con agua-agar al 1.5%. Siempre trabajar en condiciones asépticas.
- E. Incubar las cajas con semillas a 31 C por 2 días. Las semillas estarán listas para que los ápices radicales sean cortados cuando alcancen una longitud de 2-3 cm.

**Paso II. Transferencia de ápices radicales al medio de crecimiento**

**Nota:** Estudios recientes, han demostrado que el medio B-5 de Gamborg sin citokininas o auxinas (Gamborg et al, 1976), es excelente en la mayoría de las especies de nematodos cultivables en explantes radicales (Rebois et al, 1984). Este medio puede hacerse en el laboratorio (ver las indicaciones enseguida) o comprarse ya preparado.

- A. Preparar el medio B-5 de Gamborg y vaciar 20 ml del mismo en cada una de las cajas de Petri previamente esterilizadas. Capas gruesas de medio se deshidratan menos que las capas delgadas.
- B. Cortar ápices radicales que sean rectos, con porte sano y que midan de 2-3 cm de largo. Utilizar para ello navajas de disección estériles y hacerlo en la cámara de flujo laminar.
- C. Transferir de 2-4 explantes al medio (dependiendo del tipo de raíz, v.gr. raíces delgadas como las de tomate, utilizar 4 por caja). Cubrir con parafilm los bordes de las cajas para reducir la desecación y la contaminación.

**D. Incubar a 28 C por lo menos 2 días, hasta que los ápices radicales cortados empiecen a crecer.**

**Paso III. Inoculación de explantes radicales con nematodos fitoparásitos axenizados**

**Nota: Existen dos formas de inocular nematodos fitoparásitos, dependiendo de sus hábitos alimenticios.**

**A. Fitoparásitos migratorios**

1. Los nematodos son aislados del suelo o de raíces mediante la aplicación de técnicas convencionales (como la de flotación y centrifugación con azúcar). Se requieren cuando menos 25 nematodos de cada especie por caja.
2. Concentrar los nematodos extraídos sobre la malla de un tamiz 500 y transferirlos con agua a una probeta graduada de 50 ml hasta un volumen de 5 ml. Incorporar 30 ml de una solución de Aretan<sup>R</sup> al 0.001% o de Hibitan<sup>R</sup> al 0.001%. Airear la suspensión por 2 horas a la temperatura de 22-24 C, utilizando una pipeta Pasteur esterilizada.
3. Separar la suspensión en dos volúmenes de 15 ml, en tubos cónicos para centrifuga esterilizados. Centrifugar 2 min a 1200 rpm.
4. Decantar el sobrenadante, agregar agua destilada estéril y repetir la centrifugación una vez más.
5. Decantar el sobrenadante, agregar sulfato de estreptomicina al 1% y repetir la centrifugación. Lavar una vez más con agua esterilizada (centrifugando).
6. Decantar el sobrenadante, agregar cloruro de mercurio al 0.001% y centrifugar. Lavar de la misma manera con agua estéril.
7. Colectar el "pelet" o precipitado con una pipeta Pasteur estéril, colocarlo en una caja de Siracusa y agregar un 1 ml de agua estéril. Con la ayuda de la pipeta, tomar una alícuota de 0.1 ml y contar el número de nematodos (inocular 25 nematodos por caja), dentro de la cámara de flujo laminar.

8. Envolver las cajas inoculadas apropiadamente para reducir la desecación e incubarlas a la temperatura óptima de desarrollo para cada especie de nematodo.

#### B. Nematodos sedentarios

1. Obtener los quistes viables y/o las masas de huevecillos, a partir de muestras de suelo o de raíces. Colocar de 25-30 quistes o masas de huevecillos en un tubo de centrifuga esterilizado. Lavarlos (centrifugando) dos veces con agua estéril.
2. Agregar cloruro mercúrico al 0.001% y esperar un min. Enseguida, proceder a lavarlos dos veces con agua estéril.
3. Inocular los explantes radicales de hospedantes adecuados, con 4-5 quistes o masas de huevecillos por caja.

#### C. A partir de cultivos establecidos

1. Tanto las masas de huevecillos como los quistes, pueden transferirse directamente a un cultivo fresco de explantes radicales.
2. Utilizar de 4 a 5 masas de huevecillos o quistes por caja.

#### 4. Fuente de los Materiales

- A. Nematodos: El ejercicio puede llevarse a cabo con nematodos axenizados después de ser extraídos del suelo (ver líneas atrás) o con los obtenidos a partir de cultivos monoxénicos (ver Apéndice 2).
- B. Equipo necesario: Autoclave; cámara de flujo laminar; centrifuga; incubadora; microscopio de disección; sustancias químicas para los medios; pipetas Pasteur; parafilm; semillas; cajas de Petri esterilizadas; alcohol; blanqueador y lámpara de alcohol. Medio de Gamborg sin auxinas o citokininas (Gamborg *et al*, 1976). Este medio puede adquirirse en los Laboratorios Gibco, 3175 Staley Road, Grand Island, NY. El procedimiento y los reactivos necesarios para hacer el medio B-5 de Gamborg son los siguientes:

### Solución Madre A

$\text{KNO}_3$	25.00 gr
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.50 gr
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.34 gr
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	1.30 gr
i-Inositol	1.00 gr

Disolver en un litro de agua destilada y desionizada.

### Solución Madre B

$\text{Na}_2\text{EDTA}$	0.74 gr	Disolver en 100 ml de $\text{H}_2\text{O}$ destilada calentando ligera- mente. Airear 1 h.
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.56 gr	

### Solución Madre C

(Micronutrientes)

KI	7.5 mg
$\text{H}_3\text{BO}_3$	30.0 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	100.0 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20.0 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.5 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.25 mg

Disolver en 100 ml de agua destilada y desionizada.

### Solución Madre D

(Vitaminas)

Acido nicotínico	10 mg	Disolver en 100 ml de $\text{H}_2\text{O}$ destilada.
Piridoxina HCl	10 mg	
Tiamina HCl	100 mg	

### Solución Madre E

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.5 gr
---	--------

Disolver en 100 ml de agua destilada y desionizada.

En un matraz Erlenmeyer de 1 litro seco y limpio, incorporar 100 ml de la solución madre A; 5 ml de la B; 10 ml de las soluciones C, D y E, más 20 gr de sucrosa. Aproximadamente se necesitarán 865 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada para aforar hasta un litro. En otro matraz de 2 litros, agregar de 650-700 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 6.2-6.4 utilizando

solución de KOH al 1N. Incorporar 15.0 gr de agar (Difco-Agar Noble), quitando los agregados de las paredes del recipiente con un poco de agua destilada. Tapar el recipiente y esterilizarlo en autoclave durante 15 o 20 min. Una vez enfriado el medio, medir el pH y ajustarlo al punto óptimo de 5.5-5.7 (el rango puede ser 5.2-6.0).

#### 5. Observaciones

Cuando menos se requieren 2 semanas para empezar a observar la formación de agallas y quistes de fitonematodos sedentarios en los explantes radicales y de 10-30 días para observar la reproducción e incremento poblacional de las formas migratorias. Una vez establecidos los cultivos, éstos deben transferirse bimestralmente a medios frescos.

#### 6. Resultados Esperados

Las siguientes son las ventajas de los cultivos en condiciones estériles: (1) se pueden obtener enormes cantidades de nematodos libres de partículas, contaminantes y otras especies de nematodos, y (2) se pueden efectuar observaciones "in vitro" sobre la reproducción, el desarrollo y el comportamiento de nematodos cultivados.

#### Referencias Recomendadas

Gamborg, O. L., T. Murashige, T. A. Thorpe, and I. K. Vasil. 1976. In Vitro 12:473-478.

Rebois, R. V., R. N. Huettel, and J. A. Lauritis. 1984. A comparison of media for the monoxenic culture of corn cyst, soybean cyst, reniform, root-knot, and lesion nematodes on root explants. First Int. Congr. of Nematol. Aug. 5-10, 1984. Guelph, Ont., Canada p. 85 (Abstract).

## Ejercicio 26

### Establecimiento de Pratylenchus spp en Cultivos Monoxénicos en Tejidos de Callo de Alfalfa (Medicago sativa)

Richard M. Riedel  
Plant Pathology Department  
Ohio State University  
Columbus, OH 43210

#### 1. Objetivos

Los objetivos del presente ejercicio son los siguientes:

- A. Desarrollar la habilidad para manejar técnicas asépticas necesarias para mantener cultivos monoxénicos de nematodos fitoparásitos.
- B. Establecer y mantener diversas poblaciones de Pratylenchus spp para propósitos de enseñanza.

#### 2. Tiempo Requerido

A partir del instante en que se reciben las semillas de alfalfa sin desinfectar, el ejercicio requerirá de 14 semanas para que las poblaciones de nematodos alcancen su máximo desarrollo; sin embargo, si los estudiantes cuentan con una reserva de semillas desinfectadas, entonces podrán terminar todas las técnicas en solamente 3 semanas. Pero aquí, en 3 semanas adicionales los niveles poblacionales de los nematodos serán relativamente bajos.

#### 3. Procedimiento

- A. Preparación del material vivo antes de dar inicio al ejercicio

Las semillas de alfalfa deben tratarse con agua caliente, antes que se les libere de las contaminaciones internas de bacterias. Seguir el siguiente procedimiento:

- 1. Tratar las semillas de alfalfa con agua caliente a 61 C por 10 min. Para esto, poner aproximadamente 10 cm<sup>3</sup> de semillas en bolsas dobles de manta de cielo (Nt: tela de algodón de tejido muy abierto) y sumergirlos en el agua.

2. Una vez finalizado el tratamiento con agua caliente, sumergir en agua fría las bolsas conteniendo a las semillas.
3. Ponerlas a secar durante dos semanas, disponiéndolas en una sola capa sobre una superficie adecuada.

#### B. Preparación de callos como substrato

##### 1. Desinfección de semillas

- a. Sumergir por 15 min 5-10 cm<sup>3</sup> de semillas secas de alfalfa, en un volumen suficiente de ácido sulfúrico concentrado hasta cubrirlas totalmente.
- b. Inmediatamente lavarlas con 3 baños diferentes de 150 ml de agua destilada estéril. Agitar por unos segundos antes de eliminar el agua.
- c. Sumergir durante 15 min a las semillas ya lavadas en el volumen suficiente de cloruro mercúrico (1 ppm HgCl<sub>2</sub> en etanol al 30%) para cubrirlas.
- d. Lavarlas nuevamente con 3 baños diferentes de 150 ml de agua destilada estéril.

##### 2. Germinación de semillas

- a. Esparcir sobre la superficie del medio de agar (10 gr de agar, 10 gr de sucrosa, 2 gr de extracto de levadura Difco y 1 litro de agua destilada), a las semillas desinfectadas en cajas de Petri.
- b. Permitir que las semillas se desarrollen en las cajas dejándolas de 4-7 días en la obscuridad a 22-24 C.

##### 3. Producción de callos

- a. Verter 14 ml de medio para desarrollar callos (10 gr de agar, 10 gr de sucrosa, 2 gr de extracto de levadura Difco, 2 mg de ácido 2-4 diclorofenoxiacético y 1 litro de agua destilada), en cada uno de los tubos de cultivo (150 X 25 mm) inclinados.

b. Transferir de 8-12 plántulas de alfalfa desinfectadas, a cada uno de los tubos de cultivo con medio inclinado.

c. Permitir que se desarrollen los callos durante 10-14 días en la obscuridad a 22-24 C.

#### 4. Inoculación de callos

a. Transferir a cajas de Petri estériles una porción de callo conteniendo Pratylenchus.

b. Dividir la porción en 6-8 partes iguales.

c. Transferir cada parte a cada uno de los tubos de cultivo que contienen callos.

d. Dejar que se desarrollen los cultivos durante 8-10 semanas, antes que sean utilizados. Incubarlos dentro de bolsas de plástico a la temperatura de 22-24 C, manteniéndolos en la obscuridad.

#### 4. Fuente de los Materiales

##### A. Organismos

1. Los cultivares de alfalfa CUF 101 o Moapa 69 alta calidad, se pueden ordenar a Cal West Seeds, P.O. Box 1428, Woodland, CA 95695.

2. Cultivos establecidos de Pratylenchus spp, (ver Apéndice 2).

##### B. Equipos y materiales

1. La solución de Merthiolate NF es producida por los Laboratorios Eli Lilly Co., Indianapolis, IN 46206.

#### 5. Observaciones a Realizar

A. Verificar las tasas de germinación y esterilización microbiológica en agar (Paso 3, B). Debe haber un porcentaje alto de germinación de semillas aunado a la ausencia de colonias de bacterias y hongos.

B. Verificar el desarrollo de callos (Paso 3, C). Los hipocotilos de las plántulas de alfalfa desarrollarán tejidos callosos desmenuzables de color blanco. No

deberán estar contaminados con bacterias u hongos.

- C. Verificar los callos para la reproducción de nematodos (Paso 3, C). A las 2 o 3 semanas, los nematodos empezarán a transformar los callos de húmedos y morenos, a negros.

#### 6. Resultados Esperados

Las poblaciones de nematodos deben incrementarse rápidamente de 100-200 inoculados inicialmente por tubo, hasta 20-40,000 después de 6-8 semanas.

#### 7. Variaciones del Ejercicio para Cambiar los Niveles de Intensidad

Los estudiantes pueden adquirir experiencia adicional, cultivando nematodos mediante el establecimiento de cultivos monoxénicos a partir de una sola hembra grávida extraída de una muestra de suelo.

Las masas de huevecillos se pueden desinfectar superficialmente mediante el siguiente procedimiento:

- A. Colocar los nematodos extraídos en tubos cónicos de centrífuga de 15 cc.
- B. Centrifugar a la velocidad máxima por 15 segundos en una centrífuga clínica.
- C. Eliminar el lavado agua y agregar la solución de Merthiolate (8 ml de solución de Merthiolate<sup>R</sup> NF en 200 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril).
- D. Centrifugar como se indicó en el Paso 7, B.
- E. Repetir el lavado con Merthiolate 6 veces más.
- F. Transferir individualmente las hembras desinfectadas superficialmente a los cultivos de tejidos de callos.

#### 8. Consideraciones Importantes

##### A. Cosas por hacer

- 1. Si es posible, efectuar todas las técnicas asépticas utilizando la cámara de flujo laminar. De lo contrario usar un cuarto sin corrientes de aire.

## B. Cosas que no deben hacerse

1. No almacenar los cultivos en el mismo laboratorio donde se trabaja con suelos. Los ácaros de los suelos pueden convertirse en un serio problema en cultivos almacenados.
2. Nunca usar semillas húmedas ni muy secas para sumergir en la solución de ácido sulfúrico concentrado, ya que ésto las dañaría irreversiblemente.
3. Evitar que las semillas permanezcan mucho tiempo en los lavados con agua después de haberse tratado con el ácido, ya que ésto, puede sobrecalentarlas y por lo mismo dañarlas.

## C. Medidas de seguridad

1. El  $H_2SO_4$  concentrado puede ocasionar quemaduras<sup>4</sup> severas. Siempre que se trabaje con él, usar ropa y equipo apropiado de protección.
2. Extremar precauciones cuando se transfieran las semillas al primer lavado con agua después de haberse tratado con ácido sulfúrico, evitando salpicaduras.
3. Las soluciones alcoholicas de cloruro mercúrico puede provocar la formación de vapores de mercurio. Preparar las soluciones madres de este compuesto, dentro de una campana de extracción.
4. El cloruro mercúrico es un producto muy tóxico. Usar guantes cada vez que se este manejando el producto.

## Referencias Recomendadas

Riedel, R. M., Alves de Lima, M. M., and Martin, M. 1983.  
In: Handbook of plant cell cultures. (D. A. Evans,  
W. R. Sharp, P. V. Amirato and Y. Yamada, Eds.) Vol. 1.  
pp. 880-903. MacMillan, Inc. New York.

## Ejercicio 27

### Control de Nematodos Fitoparásitos con Nematicidas

Edward P. Caswell and Ivan J. Thomason  
Nematology Department  
University of California, Riverside 92521

#### 1. Objetivos

Los nematicidas constituyen un medio para controlar nematodos fitoparásitos en circunstancias donde si no se les controla, ocasionan daños a los cultivos. Existen dos tipos principales de nematicidas; los fumigantes y los no fumigantes. El presente ejercicio se ocupa únicamente de los nematicidas granulados no fumigantes. Estos productos son típicamente aplicados al suelo antes de la siembra, en el surco o al voleo.

El ejercicio está diseñado para que los estudiantes se familiaricen con técnicas para evaluar la eficacia de un nematicida. La eficacia del producto granulado al 15% (15G) DASANIT<sup>®</sup> (fensulfotión; O, O-dietil O-[p-(metilsulfinil) fenilo] fosforotiato, Mobay Chemical Co.), será evaluada bajo condiciones de invernadero. La eficacia de 3 concentraciones diferentes de DASANIT 15G para controlar al nematodo nodulador (Meloidogyne spp), antes de la siembra, será analizada utilizando plantas de tomate (Lycopersicon esculentum Mill) como herramientas de estudio. La prueba incluye un total de 6 tratamientos, tres de los cuales son en realidad testigos. Cada tratamiento incluye 5 repeticiones.

\* El hecho de seleccionar a DASANIT 15G para la efectuación del presente ejercicio, no significa que los autores o la Universidad de California lo recomienden.

#### 2. Tiempo Requerido

Lab 1: 1.0 h para preparar macetas.

Lab 2: 1.5 h para trasplantar plántulas.

Lab 3: 3.0 h para evaluar el crecimiento de plantas.

El ejercicio está diseñado para que los estudiantes trabajen en grupos de 3-4.

### 3. Procedimiento

#### A. Tratamientos

1. Control; -nematodos, -nematicida.
2. Control; -nematodos, +nematicida (a la dosis alta recomendada y designada aquí como 1.0X).
3. Control; +nematodos, -nematicida.
4. Dosis baja; +nematodos, +nematicida (dosis baja recomendada, designada aquí como 0.5X).
5. Dosis alta; +nematodos, +nematicida (dosis alta recomendada, designada aquí como 1.0X).
6. Tratamiento prueba; +nematodos, +nematicida (dosis más alta recomendada, designada aquí como 1.5X).

Cualquiera de las especies más comunes de Meloidogyne (M. hapla, M. arenaria, M. incognita o M. javanica) podrían ser utilizadas. Aunque debe considerarse que M. incognita y M. javanica inducen los mejores agallamientos radicales. Los cultivares de tomate Rutgers, Tropic o cualquier otro susceptible, pueden ser ideales para este tipo de experimentos.

Cada uno de los tratamientos que incluyen nematodos (+) deben inocularse con aproximadamente 15,000 huevos y larvas en macetas de 15 cm de diámetro (1500 cm<sup>3</sup> de suelo).

#### B. Estimación de la cantidad de nematicida a necesitar

El nematicida seleccionado para este ejercicio DASANIT 15G, está registrado para controlar nematodos asociados al cultivo del tomate. En la etiqueta del producto se recomiendan 2 métodos de aplicación; en el surco y al voleo. A través de los pasos siguientes, el estudiante debe convertir la dosis libras/acre aplicada al voleo, a la dosis de mg/maceta para ensayar nematicidas en macetas pequeñas.

La dosis recomendada (al voleo), es de 66.7 a 134 libras por acre del nematicida formulado en 15G. Nosotros denominaremos la dosis de 66.7 libras/A como "dosis baja" (0.5X), y la de 134 libras/A como "dosis alta" (1.0X). Los factores respectivos de conversión se especifican al final del ejercicio.

1. Convertir libras/A a kilogramos/A.

$$66.7 \text{ Libras/A} = \underline{\hspace{2cm}} \text{ kg/A,}$$
$$134.0 \text{ libras/A} = \underline{\hspace{2cm}} \text{ kg/A.}$$

2. Presumiendo que la dosis de nematicida está calculada para funcionar en el primer pie de la superficie de un acre de suelo. ¿Qué volumen de suelo representa esto?

$$\underline{\hspace{2cm}} \text{ Pies}^3/\text{A.}$$

3. Convertir pies cúbicos por acre a pulgadas cúbicas por acre.

$$\underline{\hspace{2cm}} \text{ Pies}^3/\text{A} \times \underline{\hspace{2cm}} \text{ pulg}^3/\text{pies}^3 = \underline{\hspace{2cm}} \text{ pulg}^3/\text{A.}$$

4. Convertir pulgadas cúbicas a centímetros cúbicos.

$$\underline{\hspace{2cm}} \text{ Pulg}^3/\text{A} \times \underline{\hspace{2cm}} \text{ cm}^3/\text{pulg}^3 = \underline{\hspace{2cm}} \text{ cm}^3/\text{A.}$$

5. Calcular la cantidad de nematicida por unidad de volumen de suelo ( $\text{kg}/\text{cm}^3$ ) para cada una de las dosis mencionadas en el paso (1).

$$\underline{\hspace{2cm}} \text{ Kg/A} / \underline{\hspace{2cm}} \text{ cm}^3/\text{A} = \underline{\hspace{2cm}} \text{ kg}/\text{cm}^3,$$
$$\underline{\hspace{2cm}} \text{ kg/A} / \underline{\hspace{2cm}} \text{ cm}^3/\text{A} = \underline{\hspace{2cm}} \text{ kg}/\text{cm}^3.$$

6. Convertir los valores obtenidos en el paso 5 a  $\text{mg}/\text{cm}^3$ .

$$\text{Dosis baja (0.5X)} = \underline{\hspace{2cm}} \text{ mg}/\text{cm}^3,$$
$$\text{dosis alta (1.0X)} = \underline{\hspace{2cm}} \text{ mg}/\text{cm}^3.$$

7. Las macetas de barro de 15 cm de diámetro que se recomiendan para este ejercicio, tienen un volumen aproximado de  $1500 \text{ cm}^3$ . Utilizar el valor obtenido en el paso 6 para determinar el peso actual de nematicida que agregado a las macetas de 15 cm de diámetro, sea equivalente a las dosis mencionadas en el paso 1.

$$\text{Dosis baja (0.5X)} = 1500 \text{ cm}^3 \times \underline{\hspace{2cm}} \text{ mg}/\text{cm}^3 = \underline{\hspace{2cm}} \text{ mg,}$$
$$\text{dosis alta (1.0X)} = 1500 \text{ cm}^3 \times \underline{\hspace{2cm}} \text{ mg}/\text{cm}^3 = \underline{\hspace{2cm}} \text{ mg.}$$

8. La cantidad de nematicida que se necesitará por maceta en el tratamiento prueba (1.5X) será:

$$1.5 \times \underline{\hspace{2cm}} \text{ mg} = \underline{\hspace{2cm}} \text{ mg.}$$

9. Se han calculado las cantidades del nematicida que se van a incorporar en cada maceta para cada uno de los tres tratamientos con el mismo. Este procedimiento puede utilizarse para calcular la cantidad requerida de cualquier nematicida granulado, para obtener la "dosis específica de campo" en cualquier tipo de maceta de volumen conocido.

### C. Establecimiento del experimento

#### Día 1

1. Llenar con suelo arenoso esterilizado en autoclave, cada una de las 30 macetas (de barro, 15 cm de diámetro y 1500 cm<sup>3</sup> de capacidad) hasta 4 cm por debajo del borde superior.
2. Cuidadosamente apisonar el suelo de las macetas.
3. En este momento, etiquetar cada una de las macetas indicando el nombre del grupo, la fecha, el tratamiento y número de repetición.
4. Por medio de una vara puntiaguda (2.5 cm de diámetro), efectuar 6 hoyos de aproximadamente 4-5 cm de profundidad, alrededor del centro de la maceta (SEPARAR LAS MACETAS DE LOS TRATAMIENTOS 1 y 2 DESPUES DE HABER TERMINADO ESTE PASO).
5. Agregar 1 ml de la suspensión con inóculo (aproximadamente 2500 huevos/ml), en cada uno de los hoyos de las macetas de los tratamientos 3-6.

Nota: Si el suelo esta muy seco, agregar un volumen de 5-10 ml de agua esterilizada, inmediatamente después de haber inoculado para evitar que los huevecillos se des sequen. Si este volumen adicional de agua es incorporado a estos tratamientos, también debe incorporarse a los testigos.

6. Rellenar los hoyos con la cantidad necesaria de suelo esterilizado en autoclave (SEPARAR AHORA LOS TRATAMIENTOS 1 y 3).

Nota: Los pasos siguientes involucran aplicar las concentraciones apropiadas de nematicida en cada una de las macetas. CUANDO SE APLIQUEN LOS NEMATICIDAS, USAR GUANTES DE HULE Y EVITAR QUE LA PIEL SE PONGA EN CONTACTO CON ELLOS. Cada dosis de nematicida debe prepararse con anterioridad por

el profesor del curso (etiquetar los recipientes que contengan a los nematocidas con sus designaciones correspondientes: 0.5X, 1.0X y 1.5X). Cada recipiente contendrá la cantidad de nematocida necesaria para cada maceta; cantidades que fueron estimadas en la sección 3-B.

7. Aplicar a cada una de las macetas del tratamiento 4, el contenido del recipiente respectivo con la cantidad de nematocida necesaria para la dosis 0.5X. Espolvorear el nematocida sobre la superficie del suelo procurando distribuirlo lo más parejo posible.
8. Inmediatamente después de haber aplicado los nematocidas a las macetas, cubrirlos con una capa de suelo (0.5 cm de espesor) autoclaveado.
9. Las cantidades de nematocidas para las dosis en los tratamientos 1.0X y 1.5X, serán incorporadas a sus respectivas macetas, de la misma manera como se indica en los pasos 7 y 8.
10. Inmediatamente después de haberse aplicado los nematocidas, espolvorear sobre ellos una capa de suelo (0.5 cm de espesor) esterilizado en autoclave, para retenerlos.
11. Espolvorear la misma cantidad de suelo esterilizado en autoclave sobre la superficie del suelo en las macetas de los tratamientos 1 y 3.
12. Colocar las macetas sobre las mesas del invernadero en un diseño experimental completamente al azar (el profesor deberá explicarlo).
13. Enseguida, regar las macetas agregando solamente la cantidad de agua necesaria para humedecer (aproximadamente se requieren de 150-200 ml). Por ningún motivo sobregar, ya que el nematocida podría ser arrastrado fuera de las macetas.
14. Al siguiente día, regar las macetas con aproximadamente 50-100 ml de una solución nutritiva como la de Hoagland.

Día 3

1. En el segundo día después del tratamiento, trasplantar una plántula de tomate por maceta. El trasplante debe iniciarse con los tratamientos 1 y

2. Por medio de un plantador, hacer un hoyo de aproximadamente 4 cm de profundidad y trasplantar las plántulas en las macetas (limpiar el plantador cada vez que se inicie un nuevo tratamiento). Cuidadosamente humedecer el suelo alrededor de las raíces de las plántulas con la ayuda de una pizeta. Las plántulas deben tener de 2-3 semanas de edad (después de la siembra) y poseer 2 hojas verdaderas. No sobregar las plantas.

#### 4. Fuente de los Materiales

- A. Para la obtención de huevos y larvas de Meloidogyne a la concentración aproximada de 2500 huevos/ml, ver el Apéndice 2.
- B. Veinte recipientes (frascos) para guardar las cantidades necesarias del nematocida granulado DASANIT 15G.
- C. Treinta macetas de barro por grupo, esterilizadas y de 15 cm de diámetro (también las hechas de plástico o fibras naturales pueden utilizarse).
- D. Suelo migajón arenoso esterilizado en autoclave.
- E. Plántulas de tomate de aproximadamente 1.5-2.5 semanas de edad. Cualquier otro cultivar susceptible a nematodos puede también ser utilizado.
- F. Guantes de hule, un par por grupo.
- G. Un agitador magnético por grupo.
- H. Una pipeta por grupo (5 ml).
- I. Una balanza.
- J. Espacio suficiente en invernadero (24-28 C).
- K. Un macho de madera o plantador.
- L. Pizetas conteniendo agua.
- M. Un cernidor de malla metálica (0.65 cm de abertura) con marco de madera.

## **5. Observaciones a Realizar**

- A. Después de 4-6 semanas, las plántulas estarán listas para ser evaluadas.**
- B. Cortar cuidadosamente el follaje de cada una de las plantas por medio de tijeras para podar, pesarlas y registrar los pesos individuales obtenidos de cada repetición en cada uno de los tratamientos.**
- C. Sacar los sistemas radicales del suelo, invirtiendo a las macetas sobre la malla del cernidor y golpeando lo suficiente el fondo de las mismas, hasta que el bulto de suelo y raíces sea obligado a salir.**
- D. Quitar el suelo de las raíces lavándolo al chorro suave de agua corriente.**
- E. Después de que el suelo se ha quitado de las raíces, secarlas cuidadosamente y enseguida, pesarlas anotando los pesos de cada repetición en todos los tratamientos.**
- F. Es necesario evaluar el índice de agallamiento radical en cada una de las raíces, mediante la utilización de una escala arbitraria (de 0 = ausencia de agallas, hasta 5 = severo agallamiento: del 90 al 100% de agallamiento). Para obtener mayor información sobre el índice de agallamiento, consultar a DiSanzo *et al*, (1978). Anotar los datos obtenidos en cada repetición de los distintos tratamientos.**
- G. Sumar los pesos obtenidos de las raíces y el follaje de las plantas en cada repetición, para obtener los pesos totales de las mismas.**

## **6. Análisis de Datos**

- A. Hacer el análisis de varianza con los datos obtenidos de los pesos de raíces, follaje y total de plantas. ¿Hay diferencias significativas entre los tratamientos? Interpretar los resultados.**
- B. Calcular el índice de agallamiento promedio (y el error estándar) para cada tratamiento. ¿Qué tan diferentes son estos niveles de agallamiento entre los tratamientos?**
- C. ¿Existe alguna relación aparente entre el índice de agallamiento y los distintos parámetros de crecimiento de las plantas observadas?**

- D. ¿Cómo se comparan entre sí los 3 tratamientos (1-3) testigo? ¿Cómo se interpretan en lo concerniente al efecto de nematodos en el crecimiento de las plantas y el efecto de los nematicidas sobre este mismo parámetro? Discutir los resultados.
- E. Hacer histogramas comparando los tratamientos en lo que respecta al peso del follaje (a) y peso de la raíz (b).
- F. Con base en los resultados obtenidos, ¿Qué conclusiones generales se pueden obtener, respecto a la eficacia del DASANIT 15G? ¿Con qué dosis se logró el mejor control de nematodos? Discutir brevemente:

#### Factores de Conversion

Un acre = 43,560 pies<sup>2</sup>  
 1728 pulg<sup>3</sup> = 1 pie<sup>3</sup>  
 16.387 cm<sup>3</sup> = 1 pulg<sup>3</sup>  
 1000 gr = 1 kg  
 1000 mg = 1 gr  
 0.4536 kg = 1 libra.

#### 7. Consideraciones Importantes

**Precaución:** Este ejercicio de laboratorio involucra el uso de productos químicos muy venenosos, con propiedades nematicidas, y que requieren para su manejo la vigilancia estricta de un supervisor muy competente. Los estudiantes deben ser advertidos que el ejercicio exige llevarse a cabo de manera responsable y previsoría.

#### Referencias Recomendadas

DiSanzo, C. P., J. Feldmesser, R. F. Myers, F. C. O'Melia, R. M. Riedel, and A. E. Steele. 1978. Guidelines for evaluating nematicides in greenhouses and growth chambers for control of root-knot nematodes. In: Methods for evaluating plant fungicides, nematicides and bactericides., Eds. E. I. Zehr, et al. pp. 101-103. St Paul:American Phytopathological Society.

University of California, 1982. Integrated Pest Management for Tomatoes. Division of Agricultural Sciences Publication 3274.

Ware, G. W. 1983. Pesticides, theory and application. San Francisco:Freeman pp. 308.

## Ejercicio 28

### Uso de Nematicidas y de Tratamientos Térmicos como Herramientas de Diagnóstico

Martin B. Harrison  
Department of Plant Pathology  
Cornell University  
Ithaca, New York 14853

#### 1. Objetivos

En ocasiones, resulta difícil demostrar el papel que juegan los nematodos fitoparásitos en el crecimiento y producción de plantas. Una evaluación inicial, puede llevarse a cabo comparando el crecimiento de plantas y desarrollo de síntomas de alguna enfermedad, entre plantas que crezcan en: Suelo infestado (1); suelo tratado con un plaguicida de acción primaria nematicida (2); suelo tratado con un producto biocida (3) o suelo esterilizado en autoclave (4). El presente ejercicio no constituye una prueba sobre patogenicidad de nematodos, pero servirá de guía para saber si están o no involucrados en un determinado problema fitopatológico.

#### 2. Tiempo Requerido

Se requerirá una sesión de laboratorio de 2 1/2 h para preparar suelo y aplicar tratamientos. Enseguida, habrá un intervalo de 2 semanas durante el cual ocurrirá la acción de los tratamientos químicos. Después se necesitará de 1 h para trasplantar plántulas en suelos tratados y no tratados. Seis semanas después habrá otra sesión de 2 h para sacar las plantas de las macetas y proceder a pesar por separado los follajes y raíces y llevar a cabo la examinación de éstas.

#### 3. Procedimiento

- A. Dejar crecer a plántulas de tomate (cv Rutgers) en macetas con suelo esterilizado, hasta que las 2 primeras hojas verdaderas estén totalmente expandidas. Trasplantar a un suelo previamente tratado con químicos.
- B. Cada estudiante, o grupo de estudiantes (2-4), debe recibir aproximadamente 30 litros de suelo severamente infestado con Meloidogyne incognita. Mezclar completamente al suelo para lograr una infección uniforme de plantas.

C.

1. En la primera sesión de laboratorio, esterilizar en autoclave aproximadamente 7.5 litros de suelo. Enseguida esparcirlo sobre una superficie adecuada, hasta lograr una capa de 5 cm de espesor. Dejarlo sin perturbar por espacio de 2 semanas.
2. Durante esta misma sesión, aplicar a los 7.5 litros de suelo<sup>1</sup>, Telon II\* (1,3 - dicloropropeno) a la dosis de 285 l/ha. Esto se lleva a cabo poniendo 3.75 litros de suelo dentro de un recipiente de plástico u otro material sin poros y aplicando el nematicida con una pipeta dentro de un hoyo cuya profundidad llegue casi a la mitad del recipiente. Inmediatamente después de aplicado el producto, rellenar el hoyo con suelo e incorporar agua sobre la superficie del mismo hasta humedecer una capa de 6.25 mm de espesor (Fig. 1). Simultáneamente, tratar otros dos volúmenes idénticos de suelo infestado, con el fumigante Bromuro de Metilo (MC<sub>2</sub>). Una forma muy conveniente de efectuar esto, consiste en colocar todo el suelo que se vaya a necesitar, dentro de dos bolsas de plástico empalmadas y colocadas a su vez en el interior de un balde de 75-112.5 litros de capacidad. Enseguida, aplicar el contenido de una lata (453 gr) de bromuro de metilo, como se ilustra en la Fig. 2; después de insertar la lata en el aplicador, se coloca sobre los clavos de una tabla de madera descansando, a su vez, sobre una bandeja colocada sobre la superficie del suelo, la cual funciona como evaporador. Después de sellar las bolsas de plástico proceder enseguida a pinchar la lata presionándola contra los clavos de la tabla. Estos tratamientos químicos deben efectuarse ya sea dentro de una campana de extracción o al aire libre, en un lugar aislado. Debe usarse también ropa protectora, así como mascarilla contra gases.

---

\* El uso de nombres comerciales no constituye ningún tipo de recomendación para el producto por parte del autor o de los editores.

<sup>1</sup> En el ejercicio 27 se menciona una guía para calcular las dosis correctas de productos para recipientes pequeños.

D. Dos semanas después que el suelo haya sido esterilizado en autoclave o esterilizado químicamente, llenar las macetas de 7.6 cm de diámetro y trasplantar una plántula de tomate en cada una. Las macetas con plántulas deberán disponerse en forma aleatoria sobre la mesa del invernadero. Colocarlas por lo menos a una distancia de 12.5 cm entre sí y regarlas cuidadosamente evitando salpicaduras. Aplicar fertilizantes solubles en agua, conforme se requiera.

E. Cuatro semanas después, medir la altura de las plantas, pesar hojas, tallos y sistemas radicales. Examinar cuidadosamente las raíces y evaluar índices de agallamiento (Taylor y Sasser, 1978).

#### 4. Fuente de los materiales

A. Cultivos de Meloidogyne incognita (ver Apéndice 2).

B. Nematicidas: Disponibles en la mayoría de los establecimientos comerciales de productos agrícolas.

#### 5. Observaciones a Realizar

Las plantas no deben crecer igual en todos los tratamientos. ¿En cuál tratamiento se observó el máximo crecimiento? ¿En cuál tratamiento hubo el menor crecimiento? ¿En uno o más tratamientos hubo mejor crecimiento de plantas que el peor de los tratamientos pero no tan bueno como el mejor tratamiento? Concentrar los resultados obtenidos para los distintos grupos y determinar si hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos. Discutir el significado de los resultados obtenidos y los posibles errores inherentes al diseño experimental.

Si otros organismos patogénicos normalmente presentes en suelo sin esterilizar no se encuentran presentes, entonces será muy probable encontrar diferencias significativas entre los resultados obtenidos con un material esencialmente nematicida (Telon II), comparado con otro de amplio espectro o biocida (MC<sub>2</sub>).

#### 6. Variaciones para Cambiar el Nivel de Intensidad

El siguiente paso de este ejercicio, consiste en incorporar inóculo de nematodo a suelo sin esterilizar, mediante el uso de cualquiera de los métodos descritos en el ejercicio 14. Obtener un cultivo de M. incognita (ver

Apéndice 2), e inocular la cantidad necesaria al suelo esterilizado en autoclave para igualar el nivel de inóculo determinado en el mismo suelo sin esterilizar. Trasplantar plántulas de tomate a macetas conteniendo estos suelos y seguir las instrucciones indicadas en el experimento anterior.

## 7. Consideraciones Importantes

Ser precavidos cuando se trabaje con productos químicos nematicidas. El grupo debe discutir las medidas de seguridad y los peligros a que están expuestos, antes de iniciar el ejercicio. Cada vez que se manejan productos tóxicos se debe usar guantes de hule, mascarillas, anteojos y vestimenta especial de protección. También es aconsejable establecer la secuencia ordenada del experimento para minimizar las posibles contaminaciones entre tratamientos. El tratamiento con el nivel de inóculo más bajo siempre debe manejarse primero.

## Referencias Recomendadas

- Taylor, A. L., and Sasser, J. N. 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes (Meloidogyne species). Int. Meloidogyne Project, NC State Univ. and USAID. pp. 111.
- DiSanzo, C. P., Feldmesser, J., Myers, R. F., O'Melia, F. C., Riedel, R. M., and Steele, A. E. 1978. Guidelines for evaluating nematicides in greenhouses and growth chambers for control of root-knot nematodes. In: Methods for evaluating plant fungicides and bactericides. Eds. E. I. Zehr, et al. pp. 101-103. St Paul: American Phytopathological Society.

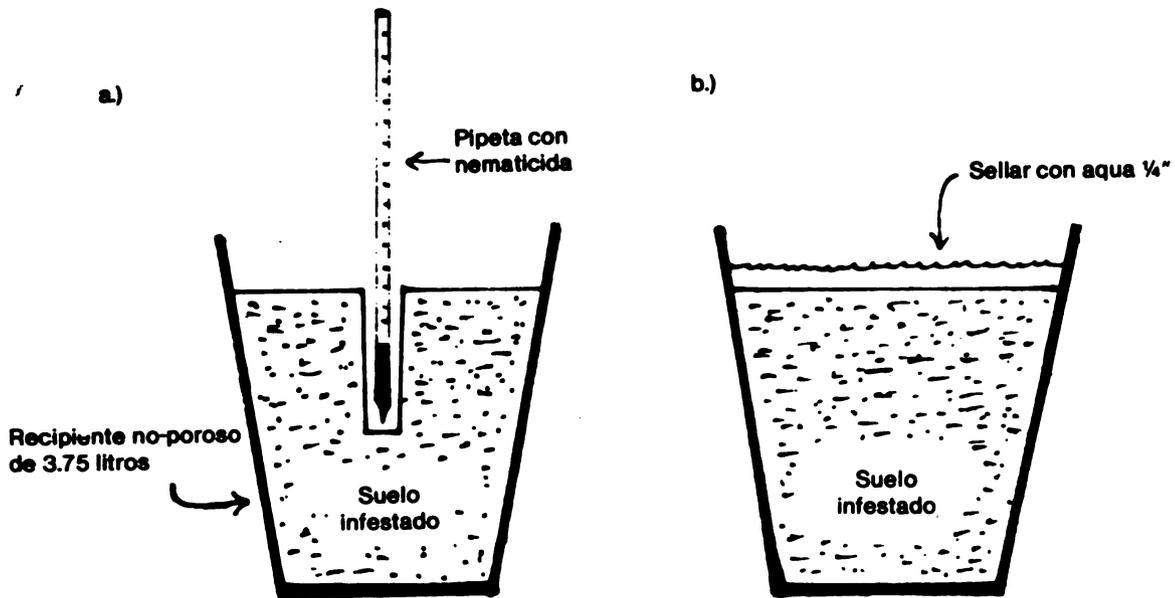


Fig. 1 Aplicación de 1,3-dicloropropano en suelo infestado.

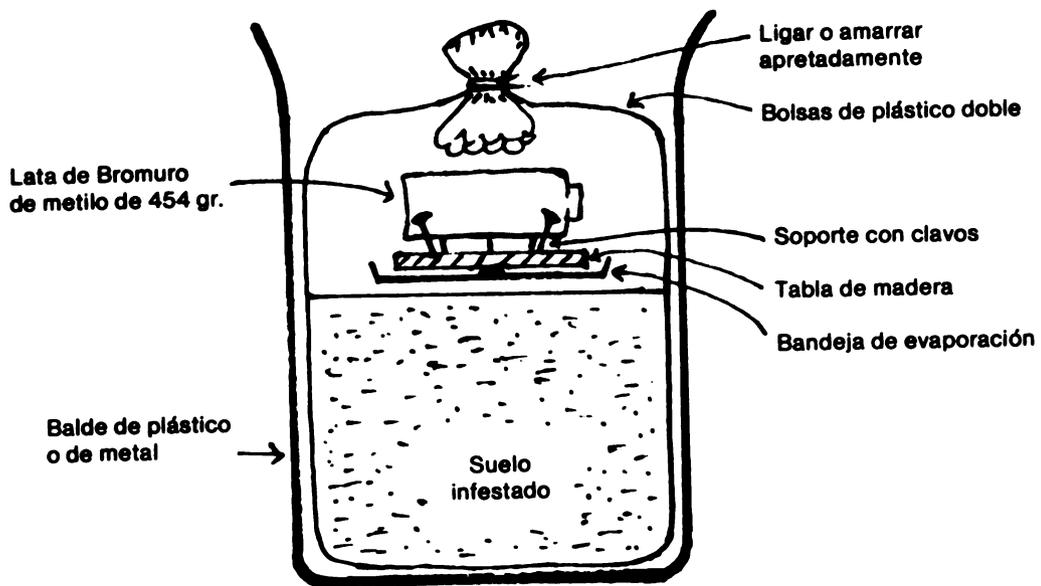


Fig. 2 Aplicación de Bromuro de Metilo (lata de 454 gr.) en un suelo infestado contenido en bolsas de plástico doble.

## Ejercicio 29

### Pruebas de Toxicidad "in vitro"

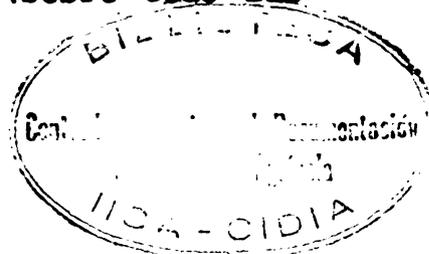
A. Coomans y R. Vanderhaeghen  
Instituut voor Dierkunde  
Rijksuniversiteit Gent  
Gent, Belgium

#### 1. Objetivos

Ya que el control de polución se ha convertido en un tema importante en la investigación científica, muchos trabajos se han llevado a cabo sobre los efectos de metales pesados en pequeños invertebrados; sin embargo, a pesar de los esfuerzos, todavía existe gran interés por contar con técnicas rutinarias y estandarizadas para evaluar toxicidad en condiciones de laboratorio.

La prueba más común a corto plazo en ecotoxicología, es la prueba de 96 h para determinar toxicidad aguda de diversas concentraciones, en las que, el 50% de la población del organismo prueba muere (DL 50-96 h). Sin embargo, últimamente se ha determinado que para ciertos metales pesados, la referida prueba convencional de las 96 h, es demasiado corta para poder detectar adecuadamente los efectos de toxicidad aguda. Más aún, por lo general se acepta que mientras los estudios de toxicidad aguda son un instrumento valioso para medir las propiedades tóxicas de diversos agentes químicos, éstos no son del todo satisfactorios, ya que no revelan los efectos sutiles a largo plazo en la dinámica poblacional de las especies en estudio. Quizás una manera más realista de obtener las concentraciones más "seguras", para el medio ambiente, consista en determinar las concentraciones mínimas efectivas (C.M.E.), en lugar de las inherentes a la toxicidad aguda. Las concentraciones mínimas efectivas, son aquellas que manifiestan las primeras diferencias significativas en el criterio de evaluación de la prueba, cuando comparadas con los controles. El criterio de evaluación debe ser un parámetro sensible y de significancia ecológica.

El procedimiento que se describirá enseguida, se desarrolló con nematodos bacteriófagos marinos, sin embargo, se ha probado con éxito en especies eurialinas como Pellioiditis marina y Caenorhabditis elegans. Es probable que también pueda usarse en una gran variedad de nematodos, incluyendo los fitoparásitos, siempre y cuando se cumplan las siguientes condiciones. Primero, estandarizar las técnicas de cultivación (sobre todo las



monoxénicas) y segundo, que el organismo-prueba posea ciclo de vida corto (menos de 10 días), ya que los valores de C.E.M., se basan esencialmente en la habilidad de las especies para desarrollarse del estado juvenil al adulto, cuando expuestas a diferentes dosis de la droga en estudio.

El siguiente procedimiento esta basado en el trabajo reciente de Vranken et al (en prensa), el cual incluye una técnica nueva estandarizada para cultivar nematodos, así como un método experimental también nuevo (C.E.M.), para evaluar la toxicidad de metales pesados y poluentes solubles en los nematodos.

## 2. Procedimiento

El procedimiento será descrito con base en un experimento de Caenorhabditis elegans cultivado monoxénicamente con Escherichia coli. Para mayor información sobre las condiciones de cultivación y ciclo de vida de este nematodo de vida libre, favor de consultar el Ejercicio 12.

### A. El medio

1. Cajas de Petri ventiladas (35 X 10 mm), se llenarán con 4 ml de bacto-agar al 0.5% (Laboratorios Difco), esterilizado en agua destilada amortiguada (buffer Tris 0.005 M), más 0.2 ml de una mezcla de esteroides.
2. Una vez que el medio se ha enfriado, hacer un hoyo de 15 mm de diámetro en la parte central del mismo, utilizando para ello un tubo de cultivo esterilizado (simplemente introducir su boca hasta topar con la base de la caja). Inocular en el hoyo un volumen de 0.02 ml de la suspensión de E. coli conteniendo  $10^{11}$  células/ml (ver Fig. 1).
3. Inocular los nematodos fuera del hoyo.

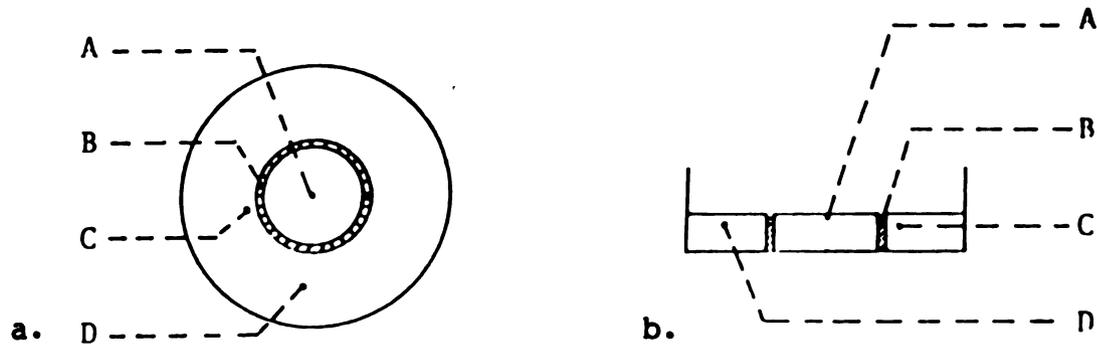


Fig. 1. Diagrama a escala completa, ilustrando el inicio de un cultivo estándar de nematodos (a: vista de frente; b: vista lateral).

A: Zona central; B: hoyo donde se inocula la suspensión de bacterias; C: zona de menor densidad bacteriana debido a la difusión en el agar y bioturbidez; D: zona de inoculación de nematodos.

#### Ventajas de esta técnica de cultivo:

- a. Se limita el crecimiento adicional de bacterias en el cultivo, debido a la falta de nutrientes, obteniéndose un cultivo claro y transparente que permite observar fácilmente los diferentes estadios de nematodos; huevos, juveniles, adultos.
- b. No se necesita axenizar los nematodos, ya que en este tipo de cultivo, los contaminantes no se desarrollan.
- c. Con este método gnotobiótico se incrementa la reproductibilidad de los ensayos y la mortalidad en los controles durante el desarrollo, es casi cero.

#### B. Pruebas de toxicidad

La toxicidad aguda se lleva a cabo utilizando series graduales de soluciones diluidas de drogas o toxicantes. Estos se pueden escoger de una gran variedad de toxicantes solubles como productos agrícolas (v.gr. Paration), constituyentes de la lluvia ácida (de  $\text{SO}_2$  a  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) o contaminantes industriales (Biseniles policlorados). El método para evaluar las concentraciones seriadas del toxicante seleccionado, es exactamente igual al descrito en el Ejercicio 27.

Los nematodos juveniles (J2) obtenidos de un cohorte sincrónico de C. elegans son ensayados en grupos de 120, en cada una de las repeticiones. Desde el punto de vista práctico, se sugiere determinar los valores DL-50 a las 24 h, contando los nematodos muertos en los cultivos prueba. En este caso, muerte se define como la pérdida total del movimiento, aun después de estimular mecánicamente los nematodos con la aguja de disección.

Los efectos tóxicos subletales se pueden observar en el mismo experimento; sin embargo, esto requiere de mayor experiencia en la experimentación. Los valores C.M.E., obtenidos en los parámetros de desarrollo, se pueden medir contando el número de adultos jóvenes en todos los cultivos-prueba, en el instante en que más del 50% de los juveniles en los cultivos testigo, alcanzan la madurez. La dilución más baja del producto en ensayo que cause la primera diferencia significativa, en relación al testigo, será la concentración mínima efectiva.

#### Procedimiento

1. La solución madre del producto a ensayar se efectúa disolviendo  $10^{-1}$  mol del toxicante en un litro de agua destilada.
2. Preparar 100 ml de cada una de las concentraciones del producto a ensayar, en progresión logarítmica oscilando de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  mol/l. De ser necesario, se pueden preparar otras diluciones intermedias.
3. Cinco ml de cada una de las soluciones, deben mezclarse con 42.5 ml del medio esterilizado bacto-agar al 0.6% (buferizado-60 C) y 2.5 ml de una mezcla de esteroides, de tal suerte que se obtengan diluciones seriadas del producto en el medio de C. elegans de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  mol/l.
4. Preparar 4 cajas de cultivo para cada una de las diluciones, siguiendo las indicaciones previamente mencionadas.
5. Inocular la suspensión de E. coli (conteniendo  $10^{11}$  células/ml e incubadas previamente en las mismas concentraciones a ensayar por 12 h a 37 C), en el centro del hoyo del medio de cultivo.
6. Inocular en cada cultivo-prueba 30 nematodos juveniles (J2), obtenidos de un cohorte sincrónico de C. elegans.

### 3. Fuente de los Materiales

#### A. Organismos y su mantenimiento

1. C. elegans y E. coli (ver Apéndice 2).
2. Medios de cultivo y mantenimiento (ver Ejercicio 12).

### 4. Observaciones a Realizar

#### Secuencia de tiempos:

Primer día: Cerca de 250 individuos hermafroditas muy bien alimentados de C. elegans, son transferidos a diferentes cultivos monoxénicos e incubados para ovipositar (cohorte sincrónico) por 4 h.

Segundo día: Los juveniles (J2) son transferidos a los cultivos-prueba conteniendo las diferentes dosis de productos a ensayar (30 nematodos por cultivo).

Tercer día: Observación: determinar el número de juveniles muertos con el propósito de precisar los valores DL-50 para las 24 h.

Cuarto día: Observación: contar el número de adultos en todos los cultivos-prueba con el propósito de determinar los valores C.M.E., con base en el desarrollo de nematodos.

### 5. Variaciones del Ejercicio para Cambiar los Niveles de Intensidad

A. Las secuencias propuestas para este ejercicio pueden adaptarse muy fácilmente con otros nematodos de ciclo de vida corto.

B. El investigador podría quizás llevar a cabo un estudio piloto, con el objeto de obtener mayor información sobre la toxicidad de los compuestos. Este estudio podría a su vez servir de base para otro más completo.

### Referencias Recomendadas

Vranken, G., Vanderhaeghen, R., and Heip, C. Toxicity of cadmium to free-living marine and brackish water nematodes (Monhystera microphthalma, Monhystera disjuncta and Pellioiditis marina). A new experimental method and evaluation of LC 50 tests. Marine Ecology Progress Series (in press).

## **Ejercicio 30**

### **Métodos para Obtención de Alicuotas**

**Victor H. Dropkin  
Department of Plant Pathology  
University of Missouri  
Columbia, MO 65211**

#### **1. Objetivos**

Los nematólogos necesitan investigar el efecto de diferentes tipos de nematodos en el crecimiento y producción de plantas hospedantes. Una parte importante de tales investigaciones es determinar los efectos en las plantas con diferentes niveles de inóculo. Básicamente existen 2 métodos para facilitar la infección de nematodos con distintos niveles de inóculo, ellos son:

- A. Diluyendo suelo severamente infestado con otro del mismo tipo, pero libre de nematodos, hasta lograr una serie progresiva de distintas densidades de inóculo.
- B. Agregando a suelo no infestado, suspensiones de nematodos en concentraciones progresivas. El presente ejercicio ilustra una técnica para tomar alicuotas y establecer niveles conocidos de infestaciones con nematodos.

#### **2. Procedimientos y Observaciones**

##### **Métodos para tomar alicuotas**

Los nematodos se sedimentan muy lentamente en agua. Por lo tanto, para contarlos, uno debe de suspenderlos en una columna de agua, agitar y tomar una muestra de la misma.

- A. Calibrar una pipeta Pasteur perfectamente limpia, de tal manera que un número conocido de gotas forme un volumen de 1 ml. SIEMPRE SOSTENERLA VERTICALMENTE CUANDO SE LIBEREN LAS GOTAS. Colocar en el extremo de la pipeta una perilla o bulbillo de hule. Llenar una probeta graduada de volumen pequeño, verificando que el menisco coincida exactamente con la marca de un volumen determinado. Enseguida, contar el número de gotas de agua obtenidas con la pipeta en un volumen de 2 ml, aspecto que se determinará, cuando el menisco se encuentre a 2 ml por encima del nivel del volumen inicial.

B. Colocar nematodos limpios en un tubo de centrifuga, centrifugarlos hasta ajustar el volumen donde una gota de agua de la pipeta contenga cerca de 25 nematodos. Este número de nematodos es muy conveniente para realizar los conteos a 20X, o aun con aumentos más bajos del microscopio estereoscópico. Si el número de nematodos resulta sumamente excesivo para los tubos de centrifuga, entonces utilizar probetas graduadas. Los nematodos se pueden concentrar colocando la probeta en el refrigerador por una hora. Enseguida ajustar la concentración hasta lograr la densidad de 25 nematodos/gota.

C. Contar el número de nematodos como sigue:

1. Sumergir la pipeta cerca del fondo de la columna de agua conteniendo nematodos. Presionar el bulbillo para producir burbujas de aire, sacar la pipeta del agua y repetir el procedimiento varias veces hasta mezclar correctamente los nematodos.
2. Presionar ligeramente el bulbillo y proceder a introducir la pipeta por el centro de la columna succionando un poco de agua.
3. Inmediatamente colocar una gota de agua sobre un portaobjetos.
4. Repetir el procedimiento anterior (pasos 1-3), hasta lograr 10 muestras independientes; contar los nematodos en cada gota y calcular la media aritmética.

Media de nematodos/gota X número de gotas/ml es igual al número de nematodos/ml.

Si se desean concentraciones más grandes de nematodos, se pueden sedimentar o centrifugar ajustando el volumen respectivo.

### 3. Fuente de Nematodos

Debe contarse con una fuente de nematodos confiable.

A. Algunos fitonematodos se pueden mantener en condiciones asépticas, cultivándolos en callos de plantas, explantes radicales o discos de zanahoria (ver Ejercicio 24, 25, y 26).

- B. Muchas especies de Aphelenchidae se reproducen bien en hongos. Pocas cajas de cultivo de estos nematodos se requieren para obtener suficientes nematodos para el ejercicio. Para la metodología ver el Ejercicio 23 y el Apéndice 2.
- C. Cultivos en condiciones de invernadero con plantas hospedantes infectadas con una sola especie de fitonematodo (especies disponibles, ver Apéndice 2).
- D. En ocasiones se puede contar con diversas especies de nematodos presentes en los campos de cultivo a niveles poblacionales elevados. Algunas otras especies se presentan en la parte aérea de las plantas; v.gr. Ditylenchus dipsaci, Anguina tritici, Aphelenchoides ritzemabosi y Bursaphelenchus xylophilus. A veces se pueden obtener enormes cantidades a partir de los tejidos vegetales que infectan.

#### 4. Variación y Nivel de Intensidad

Hacer que cada uno de los estudiantes calcule la media y la desviación estándar de sus muestras y que informe por escrito al resto de sus compañeros los resultados obtenidos.

## Ejercicio 31

### Uso y Cuidado de Microscopios de Campo Claro

A. P. Elliott y G. W. Bird  
Division of Nematology  
University of California, Davis 95616 and  
Department of Entomology  
Michigan State University, East Lansing 48824

#### 1. Objetivos

- A. Aprender cómo utilizar los microscopios de campo claro de disección y compuesto para observar e identificar nematodos.
- B. Calibrar el micrómetro ocular mediante la utilización del micrómetro de precisión o de platina.

#### 2. Tiempo Requerido

Tres horas.

#### 3. Procedimiento

- A. Introducción: Microscopio de disección y compuesto, montajes permanentes de nematodos - 30 min.
- B. Observación de los diferentes componentes del microscopio de disección y compuesto; procedimientos para la iluminación - 20 min.
- C. Observación de especímenes de nematodos con cada uno de los distintos objetivos del microscopio de disección - 30 min.
- D. Observación de los distintos componentes del microscopio compuesto; procedimientos para la iluminación y observación de nematodos con los diferentes objetivos - 60 min.
- E. Calibración del micrómetro ocular - 30 min.
- F. Variación del ejercicio - 10 min.

Microscopio de campo claro

En nematología, es muy importante saber trabajar con los microscopios de campo claro, para efectuar observaciones

detalladas de nematodos y poder identificarlos. El entender su óptica, las técnicas de iluminación, la calibración de micrómetros, uso y manejo es esencial; ya que en nematología, con mucha frecuencia el microscopio compuesto se usa muy cerca de sus límites ópticos o de capacidad máxima.

#### A. Microscopios

Dos tipos de microscopios son utilizados. El primero de ellos, es el microscopio de disección de campo claro para observar especímenes microscópicos vivos o preservados, en montajes individuales o asociados a porciones vegetales. El rango total de aumentos es por lo general de 10-80X. El segundo, es el microscopio compuesto de campo claro provisto de binoculares, fuente de luz incorporada y 4 objetivos. Este microscopio demanda de cuidados extraordinarios en su manejo y es utilizado para lograr aumentos de 40X-1000X. En microscopios de campo claro, el campo visual en sí es claro y los especímenes a observar se ven oscuros.

#### B. Ópticas

La amplificación de 2000X-3000X, es el límite del aumento útil de un microscopio compuesto, y que se explica en función a la longitud de onda de la luz y las diversas leyes ópticas que la gobiernan. El poder máximo de resolución es de aproximadamente 2000A (0.2  $\mu\text{m}$ ), esto es; ningún objeto más pequeño a dicha dimensión, puede ser detectado.

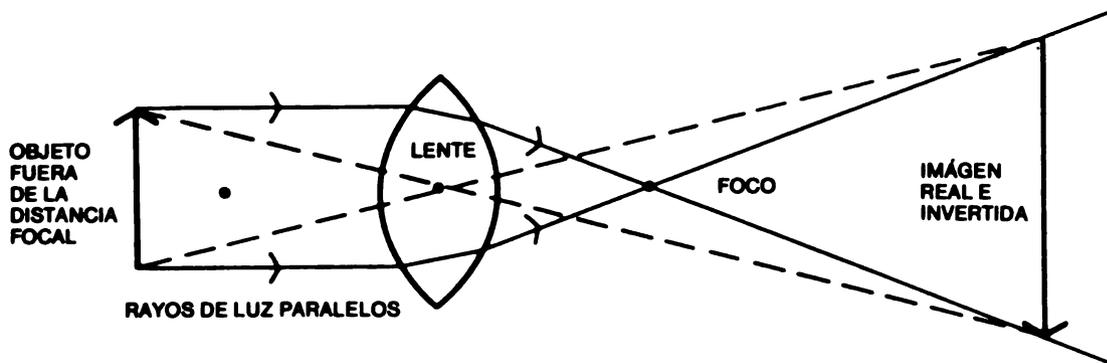
1. El poder de aumento de una lente depende de la distancia del objeto al foco de la lente y de la curvatura de ésta. Mientras más pequeño el diámetro de la esfera utilizada para hacer la lente, más corta será la distancia focal y mayor su poder de aumento.

#### Lentes de un Microscopio Compuesto

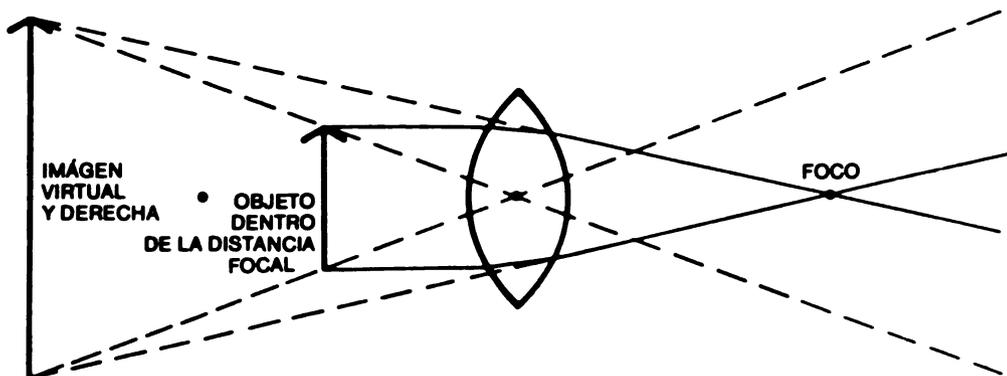
<u>Objetivo</u> <u>Lentes</u>	<u>Diámetro</u> <u>de Esfera</u>	<u>Distancia</u> <u>Focal</u>	<u>Amplificación</u>
Bajo aumento	16.0 mm	7.0 mm	10X
Alto aumento	4.0 mm	0.6 mm	40X
Inmersión en Aceite	1.8 mm	0.2 mm	100X.

Para calcular el poder de aumento en una combinación específica objetivo-ocular, multiplicar el poder de aumento del objetivo en cuestión por el poder de aumento del ocular. Por ejemplo, un ocular 10X utilizado en combinación con un objetivo 40X, dará una imagen ampliada de 400X.

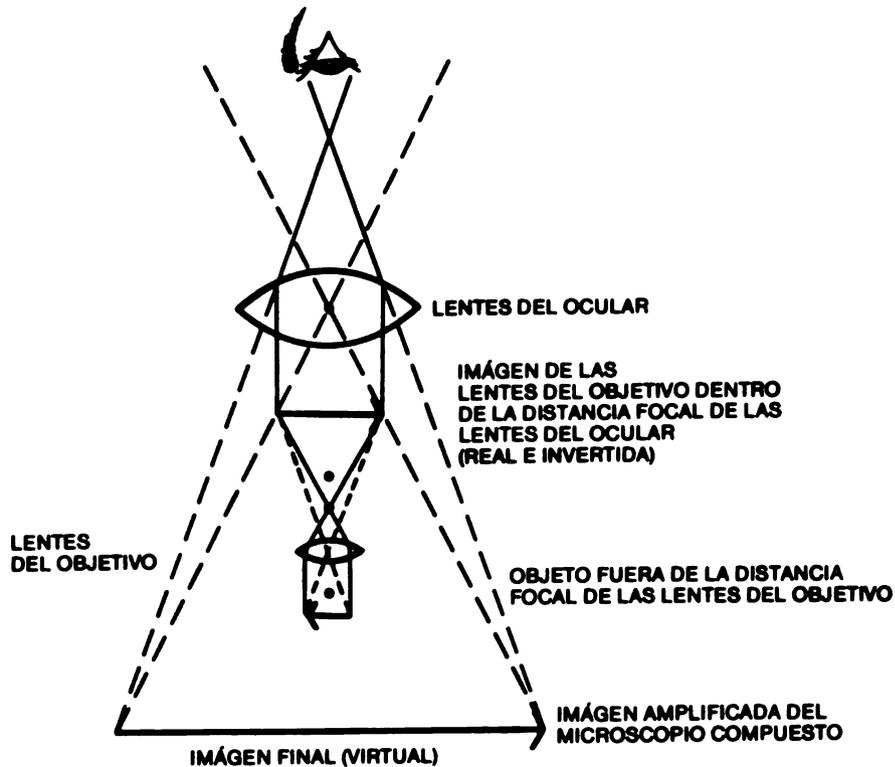
2. Cuando el objeto se encuentra fuera de la distancia focal, la imagen obtenida será real e invertida. Si la distancia del objeto es dos veces mayor que la distancia focal, la imagen será más pequeña que el mismo objeto. Si la distancia del objeto es mayor que la distancia focal pero dos veces menor que la distancia focal, la imagen será más grande que el tamaño real del objeto.



3. Cuando el objeto se encuentra dentro de la distancia focal, la imagen obtenida es derecha y virtual.



4. Un microscopio compuesto consiste de dos sistemas de lentes convergentes. Las lentes de los objetivos poseen una distancia focal muy corta, el objeto se encuentra muy cerca de las mismas, pero fuera de la distancia focal. Las lentes del ocular se utilizan para ver las imágenes producidas por las lentes de los objetivos. La imagen que se produce en el ocular es derecha y virtual.



## Microscopio de disección

### A. Componentes

1. Un par de oculares sencillos (10X) más 3 objetivos (1X-8X) montados en un dispositivo mecánico que dan aumentos de 10X-80X.
2. Una platina de vidrio para la colocación de especímenes.
3. Un espejo colocado bajo la platina.

En nematología, es necesario utilizar la luz transmitida de una lámpara colocada frente al espejo. El grado y tipo de iluminación varía con la rotación del espejo.

### B. Procedimiento

1. Colocar la lámpara frente al espejo, procurando que la luz incida sobre la superficie del espejo que es ajustable y está colocado en la base del microscopio.
2. Observar a través del ocular, ajustando el espejo, hasta que la luz transmitida sea perfecta y se observe el campo claro.

3. Ajustar las dos piezas oculares hasta que coincidan con la distancia interpupilar del observador.
4. Colocar sobre la platina de vidrio la preparación que contiene los nematodos.
5. Mover el mecanismo para intercambiar objetivos y colocar al menos potente de éstos por encima de la platina.
6. Moviendo la cremallera para enfocar, subir y bajar la montura de los objetivos, hasta que se puedan ver los especímenes.
7. Por medio de la cremallera y en un rango de amplificación de 20-40X, enfocar al espécimen con el ojo derecho. Enseguida, ajustar el enfoque para el ojo izquierdo, moviendo cuidadosamente el ajustador correspondiente del ocular del lado izquierdo, sin mover la cremallera para enfocar. De esta manera se compensarán las diferencias visuales que casi siempre existen entre los dos ojos.
8. Utilizando el objetivo de 10X, enfocar hasta lograr una clara imagen del espécimen, observándolo simultáneamente con ambos ojos. Dibujar un diagrama del espécimen.
9. Cambiar los objetivos para efectuar observaciones con los objetivos 40X y 60X. Para cada aumento, proceder a dibujar un diagrama del espécimen. Este se verá más grande a medida que se incrementan los aumentos.

## Microscopio compuesto

### A. Componentes

1. Oculares para microscopios mono o binoculares (10X-15X). Estos pueden substituirse por un ocular calibrado llamado micrómetro ocular, el cual es utilizado para efectuar mediciones de especímenes bajo el microscopio.
2. Un sistema de objetivos consistente en lupa (4X), objetivo de bajo aumento (10X), de gran aumento (40X) y de inmersión en aceite (100X).
3. Un condensador, iris o diafragma con iluminador

incorporado. Este puede ajustarse para regular la intensidad de luz.

4. Un dispositivo mecánico sobre el cual se colocan las preparaciones para su observación. Este dispositivo se puede mover hacia atrás y hacia adelante o lateralmente por medio de tornillos especiales.
5. Un espejo por debajo del sistema de iluminación.
6. Tornillos de cremallera y micrométricos para enfocar los especímenes (este último de precisión).

#### B. Procedimiento

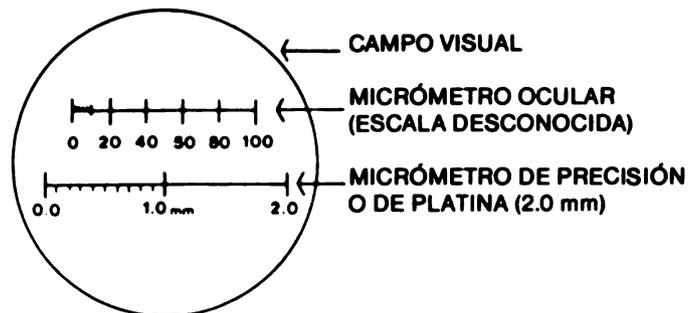
1. Colocar en posición de encendido el interruptor eléctrico.
2. Mirar a través del ocular y ajustar la luz hasta obtener un campo visual claro y brillante. Ajustar la distancia interpupilar moviendo los oculares montados en la cabeza del microscopio.
3. Colocar la preparación de nematodos, sobre la platina movable y por debajo de los objetivos.
4. Girar el revólver hasta que el objetivo 10X esté en posición de observar los especímenes.
5. Por medio del tornillo de cremallera, enfocar bajando o subiendo a los objetivos. Enfocar el espécimen con el ojo derecho. Enseguida, ajustar el enfoque del ojo izquierdo, moviendo cuidadosamente el ajustador correspondiente pero sin mover la cremallera. Así se compensarán las diferencias visuales entre ambos ojos. (Dibujar un diagrama del espécimen).
6. Mover el revólver del microscopio para observar al espécimen a 400X. Utilizando el tornillo micrométrico, enfocar la región cefálica de los nematodos. Hacer un diagrama. Observar otras regiones de nematodos, moviendo la preparación con el dispositivo mecánico de la platina.
7. Agregar una gota pequeña de aceite de inmersión sobre el cubreobjetos, inmediatamente por encima de los especímenes. Girar el revólver y colocar sobre la gota el objetivo de inmersión para obtener aumentos de 1000X. Por medio del tornillo

micrométrico, enfocar la región cefálica del nematodo. De ser necesario, ajustar la intensidad luminosa para lograr observar el máximo detalle. (Dibujar un diagrama de la región cefálica).

8. Observar otras regiones del nematodo moviendo la platina móvil.

#### Micrómetro del ocular

El micrómetro del ocular se utiliza para medir el tamaño de especímenes microscópicos. Debido a que se utilizan 4 diferentes objetivos con distintos aumentos y sistemas ópticos ligeramente diferentes entre sí, el micrómetro ocular debe calibrarse con cada objetivo de cada microscopio. El procedimiento estándar se lleva a cabo mediante la utilización de un micrómetro de precisión o de platina.



#### A. Procedimiento para calibrar

1. Anotar en la página siguiente el número de serie del micrómetro ocular que se vaya a utilizar. Asegurarse de usar siempre el mismo micrómetro de precisión.
2. Preparar el microscopio compuesto con la iluminación correcta para 100X aumentos (ocular 10X, objetivo 10X).
3. Enfocar a la escala contenida en el micrómetro de precisión, (escala blanca de dimensiones conocidas).
4. Quitar el ocular del lado derecho y poner en su lugar al micrómetro ocular, (escala negra de dimensiones desconocidas).
5. Reenfocar la escala del micrómetro de precisión.
6. Determinar la longitud de la escala del micrómetro

ocular, midiéndola con las unidades de longitud conocidas del micrómetro de precisión. Determinar la longitud de las subunidades contenidas en la escala del micrómetro ocular.

7. Calcular y anotar como sigue:
  - a. Longitud total de la escala del micrómetro ocular.
  - b. Longitud de los incrementos en escala de 10 en el micrómetro ocular.
  - c. Longitud de los incrementos en escala individual en el micrómetro ocular.
8. Utilizando un ocular de 10X, repetir el procedimiento anterior para 400X (gran aumento) y 1000X (inmersión en aceite), anotando como sigue:

Número de microscopio: \_\_\_\_\_

Número del micrómetro ocular: \_\_\_\_\_

Datos de la calibración (1 mm = 1,000  $\mu\text{m}$ ).

	Longitud Total de la Escala	Longitud de Unidades Grandes	Longitud de Unidades Pequeñas
4X Lupa	_____ mm	_____ mm	_____ $\mu\text{m}$
10X Bajo aumento	_____ mm	_____ $\mu\text{m}$	_____ $\mu\text{m}$
40X Gran aumento	_____ mm	_____ $\mu\text{m}$	_____ $\mu\text{m}$
100X Inmersión en aceite	_____ mm	_____ $\mu\text{m}$	_____ $\mu\text{m}$ .

#### 4. Consideraciones Importantes

##### A. Cosas por hacer

Observar cuidadosamente todas las partes de los microscopios. Limpiar lentes y espejos antes y después de haberse utilizado, usando solamente papel especial (tipo seda). Limpiar la lente de inmersión eliminando el aceite utilizado para observar los especímenes. Siempre mantener en su lugar al ocular. Siempre apagar la luz del microscopio cuando se termine de observar.

##### B. Cosas que no deben hacerse

Nunca usar la cremallera para enfocar, cuando se esté trabajando con los objetivos de máxima resolución.

## 5. Precauciones

### A. Cuidado del microscopio

Mantener al microscopio limpio y cubierto. Los objetivos y oculares solamente deben limpiarse con papel especial para limpiar lentes.

1. Verificar la limpieza del microscopio antes de iniciar el ejercicio.
2. Dar a conocer a los profesores o ayudantes, cualquier anomalía observada en el microscopio.
3. Quitar siempre el aceite de inmersión y limpiar el microscopio cada vez que se termine de usarlo.

## 6. Ejercicio de Laboratorio

A. Dibujar una flecha pequeña sobre un portaobjetos, colocarlo sobre la platina de tal suerte que la flecha apunte hacia la derecha cuando es observada con la lupa del microscopio.

¿Qué dirección apunta cuando es observada a bajo aumento? \_\_\_\_\_.

¿Qué dirección apunta cuando es observada a gran aumento? \_\_\_\_\_.

B. Si un objeto se encuentra fuera de la distancia focal de una lente, la imagen será \_\_\_\_\_ y \_\_\_\_\_.

C. Si un objeto se encuentra dentro de la distancia focal de una lente, la imagen será \_\_\_\_\_ y \_\_\_\_\_.

D. Si se utilizan las mismas lentes para las dos preguntas anteriores, ¿Qué imagen será más grande?  
\_\_\_\_\_.

E. Indicar cuáles de los siguientes, son visibles al microscopio compuesto:

1. Hifa de hongo (10  $\mu\text{m}$  de ancho)<sup>1</sup>
2. Partícula viral (150 X 5000A)
3. Nematodo (25 X 600  $\mu\text{m}$ )
4. Bacteria (0.5 X 3.0  $\mu\text{m}$ )
5. Espora de hongo (0.01 mm X 0.01 mm)
6. Flagelo de bacteria (0.1 X 3.0  $\mu\text{m}$ )
7. Ribosoma (7.5 nm).

F. Si la distancia focal de una lente es 5.0 mm y un objeto se coloca a 6.0 mm del centro óptico de la lente, ¿Cuál será la resultante en cuanto al aumento?

G. Medir y anotar lo siguiente con la preparación de nematodos (Desconocido "A").

1. Longitud del nematodo \_\_\_\_\_  $\mu\text{m}$
2. Anchura del nematodo (mitad del cuerpo) \_\_\_\_\_  $\mu\text{m}$
3. Anchura del nematodo (cerca de la cabeza) \_\_\_\_\_  $\mu\text{m}$
4. Anchura del nematodo (cerca de la cola) \_\_\_\_\_  $\mu\text{m}$
5. Largo del estilete \_\_\_\_\_  $\mu\text{m}$ .

Identificación del espécimen desconocido "A" \_\_\_\_\_  
Identificar al espécimen desconocido "A", utilizando la clave ilustrada del Ejercicio 5.

Fundamentación de la identificación (escribir brevemente la descripción del nematodo).

### Referencias

Clark, G. Y. 1961. The Encyclopedia of Microscopy. Reinhold Pub. Co., New York, 693 pp.

Needham, G. H. 1958. The Practical Use of the Microscope: Including Photomicroscopy. Charles C. Thomas Pub., Springfield, MA. 493 pp.

---

<sup>1</sup>  
1 mm = 1 x 10<sup>-3</sup> m  
1  $\mu\text{m}$  = 1 x 10<sup>-6</sup> m  
1 nm = 1 x 10<sup>-9</sup> m  
1 A = 1 x 10<sup>-10</sup> m

## Ejercicio 32

### Preparación y Montaje de Nematodos para Observaciones al Microscopio

A. Morgan Golden  
USDA, ARS, PPI, BARC-W  
Nematology Laboratory  
Beltsville, MD 20705

#### 1. Objetivos

Matar y fijar nematodos, preparar montajes temporales y permanentes, con el propósito de preservar y revelar estructuras lo más cerca posible a sus formas vivas.

#### 2. Tiempo Requerido

Variable, dependiendo del procedimiento.

#### 3. Procedimiento

Tres pasos básicos:

I. Matado y fijado de nematodos.

II. Procesamiento de nematodos en glicerina.

III. Montajes de nematodos.

Paso I. Matado y fijado de nematodos

Nota: Empezar el paso I con nematodos vivos suspendidos en agua. Por lo general, es mejor matar o por lo menos relajar los nematodos con calor, antes de agregar el agente fijador (a excepción cuando el fijador es calentado antes de incorporarlo a la suspensión de nematodos). Siempre utilizar agua desionizada o destilada.

A. Fijador F.A. 4:1 (Seinhorst, 1966)

1. Prepararlo como sigue:

Formalina (formaldehído al 40%)	10 ml
ácido acético glacial	1 ml
agua	89 ml.

2. Colocar los nematodos en un vidrio de reloj o en un vaso pequeño de precipitado conteniendo un volumen pequeño de agua.
3. Poner un poco de fijador dentro de una pipeta o un recipiente apropiado, sumergirlo en agua caliente (90 C), contenida en un vaso de precipitado hasta que se caliente.
4. Agregar el fijador calentado al recipiente con nematodos, cubrirlo y dejarlo en reposo por algunas horas.

El fijador F.A. 4:1, fija muy bien los nematodos. Los especímenes así fijados se pueden dejar en el fijador, transferirse a otro fijador, o procesarse en glicerina como se explica en otro lado. Sin embargo, pocos días después, los especímenes tienden a virar al color café y la porción basal del estilete de los Tilenchidos, palidece o se torna transparente.

Aunque no se necesita de equipo especializado para este procedimiento, sí es recomendable disponer de una parrilla eléctrica con agitador magnético para calentar agua.

#### B. Fijador TAF (Courtney, et al, 1955)

1. Prepararlo como sigue:

Formalina (formaldehido al 40% con Ca)	7 ml
trietanolamina	2 ml
agua	91 ml.

2. Colocar los nematodos en un vidrio de reloj o en un vaso de precipitado, en un volumen pequeño de agua; relajarlos con calor a 50 C colocando el recipiente en un horno o dentro de un recipiente conteniendo agua caliente.
3. Agregar el fijador a los especímenes (22-24 C) hasta llenar el vidrio de reloj. Cubrirlos.
4. Pocas horas después, los nematodos pueden ser montados, preservados indefinidamente en el fijador o procesados en glicerina.

Con este fijador se obtienen imágenes excelentes de los especímenes, es fácil de preparar y usar y es muy estable conservando sus excelentes características. La desventaja es que, después de varios meses, la parte basal del estilete de los

Tilenchidos, tiende a desaparecer o a volverse transparente. No se requiere de equipo especializado.

C. Fijador de formalina (modificado por Golden en Hooper, 1970)

1. Prepararlo como sigue:

Formalina (formaldehido al 40%)	8ml
agua	92 ml.

2. Colocar los nematodos en un vidrio de reloj conteniendo un volumen pequeño de agua (2-3 ml) y dejarlos en el horno (43 C) por espacio de 12-15 min.
3. Llenar el vidrio de reloj con el fijador tibio (43 C), conservado en un recipiente cerrado.
4. Sacar el vidrio de reloj del horno, cubrirlo y mantenerlo a la temperatura de 22-24 C. Los especímenes pueden montarse con este fijador o procesarse con glicerina, 16-24 h después (ver Paso II).

Este fijador da buenos resultados y es fácil de preparar y usar. Los especímenes pueden montarse con él, o preservarse por largos periodos, no obstante, después de algunos años su cuerpo tiende a endurecerse, granularse y deteriorarse en forma general. No se necesita de equipo altamente especializado.

Nota: La formalina ha sido utilizada por varios investigadores en distintas concentraciones por muchos años. Las citas bibliográficas que se mencionan al final del ejercicio, señalan detalladamente otras técnicas (ver a Hooper, 1970). Algunos investigadores sugieren diferentes tiempos y temperaturas para relajar y matar nematodos, como por ejemplo; el colocarlos dentro de un horno a 60 C por 5 min (suspendidos en agua).

Paso II. Procesamiento de nematodos en glicerina

Nota: En este paso, utilizar nematodos que hayan sido matados y fijados por cualquiera de las técnicas que se mencionaron anteriormente, o por otra parecida, estando los especímenes todavía en el fijador.

**A. Formalina-glicerina (modificado por Golden en Hooper, 1970)**

**1. Preparar la siguiente solución:**

Formalina (formaldehído al 40%)	8 ml
glicerina	2 ml
agua	90 ml.

2. Poner los nematodos en un vidrio de reloj (o si ya lo están, eliminar el fijador usado por medio de una pipeta), y llenar con la solución anterior.
3. Agregar 2 o 3 gotas de solución saturada de ácido picrico (preparada anticipadamente) y agitar suavemente con la aguja de disección.
4. Cubrir el vidrio de reloj con otro similar vacío y colocarlos dentro de un horno calibrado a 43 C, por espacio aproximado de 10 semanas.
5. A intervalos de 3-4 días, vigilar la evaporación del volumen contenido en los vidrios, nivelando cuando se requiera y conservando la reserva del fijador, dentro de un frasco gotero.
6. Después de aproximadamente 6-8 semanas, dejar de agregar la solución. Permitir que se evapore gradualmente hasta glicerina pura. Casi al final de esta etapa, observar con el microscopio de disección los nematodos; si éstos se ven colapsados, inmediatamente volver a llenar los vidrios de reloj con la solución y dejar evaporar nuevamente hasta glicerina.
7. Cuando solamente quede glicerina en los vidrios, agregar unas gotas más de glicerina y proceder a sacarlos del horno. Montar los especímenes en glicerina deshidratada, o transferirlos a frascos conteniendo glicerina deshidratada. De no ser así, dejarlos cubiertos en los vidrios de reloj, dentro de un desecador o cámara de deshidratación.

Este "método lento" a base de glicerina, requiere de 10 semanas y da muy buenos resultados (Hooper, 1970). Reduce la manipulación de nematodos, permitiendo que pocos o miles de especímenes, sean procesados con el mismo esfuerzo. La solución es también buena para preservar a los especímenes por largos periodos en frascos o recipientes, con la ventaja adicional de que en caso de evaporación total, los nematodos quedan incluidos en la

glicerina y no se destruyen.

No obstante, el ácido pícrico en la solución, induce un ligero amarillamiento a los especímenes. Su uso evita el aclaramiento y excesiva transparencia de la región basal del estilete, aparentemente sin interferir con la observación de otras estructuras.

Nota: El ácido pícrico seco ES EXPLOSIVO y por lo tanto, siempre debe mantenerse húmedo.

B. Etanol-glicerina (modificado después de Seinhorst, 1959)

1. Preparar y etiquetar las siguientes soluciones (conservarlas a 22-24 C en frascos de tapón esmerilado o equivalentes).

I	II
Etanol al 96% 20 partes	etanol al 96% 95 partes
glicerina 1 parte	glicerina 5 partes
agua 79 partes.	

2. Colocar los nematodos fijados en un disco de Siracusa pequeño de 10 ml, conteniendo 7.5 ml de la solución I.
3. Agregar 1-2 gotas de la solución saturada de ácido pícrico, para teñir de amarillo y evitar la transparencia del estilete (opcional).
4. Colocar este pequeño recipiente abierto, dentro de otro más grande y cerrado (desecador o cámara de tinción), provisto con etanol al 95%, hasta 1/10 de su volumen. Colocarlo dentro de un horno calibrado a 35-40 C por lo menos durante 12 h (con ésto se elimina casi toda el agua).
5. Sacar los discos del horno, reducir el volumen contenido en el disco pequeño hasta la mitad (por medio de una pipeta y bajo el microscopio de disección para evitar la pérdida de especímenes), y llenarlo casi totalmente con la solución II.
6. Colocar el disco en cajas de Petri y ponerlo nuevamente en el horno a 40 C.
7. Varias horas después, repetir el paso #5 (hemos observado menos colapsamiento de nematodos haciendo ésto; ahora continuar agregando la solución II por 4-7 días más).

8. Mantener los discos en cajas de Petri cubiertas en el horno, hasta que el alcohol se evapore y los especímenes estén en glicerina pura. Montar o almacenar en frascos con glicerina.

Este es el "método rápido" que da muy buenos resultados. Seinhorst (1959) sugirió cuando menos 3 h para el paso #5 de arriba, y también sugirió repetir dicho paso en caso que los especímenes se encogieran. El tiempo puede modificarse conforme se necesite. Consultar el método anterior para enterarse del uso del ácido pícrico. Un aspecto muy importante para trabajar con el método rápido consiste en tener perfectamente limpios los frascos y recipientes para las soluciones, así como tener a los especímenes totalmente libres de basuras que pueden adherirse aun al final del proceso. Frecuentemente es necesario remover a los nematodos del fijador individualmente, para evitar las basuras asociadas. Para otros métodos rápidos, consultar a Hooper (1970). No se necesita de equipo especializado.

### Paso III. Montajes de nematodos

#### A. Montajes temporales

##### 1. Especímenes en fijador

- a. Colocar una gota de fijador (solución de formaldehído al 3-4%, TAF, etc), en el centro de un portaobjetos limpio (76 X 25 mm).
- b. Poner el vidrio de reloj conteniendo especímenes fijados sobre la platina de un microscopio de disección y transferir individualmente de 10-15 especímenes a la gota del fijador en el portaobjetos. Para "pescar" los nematodos, utilizar filamentos apropiados de distinta naturaleza como fibras de bambú o de nylon, pegadas al extremo de un mango o asidero pequeño.
- c. Poner el portaobjetos en el microscopio de disección y acomodar los nematodos en el centro de la gota del fijador, asegurando que estén en el fondo sobre la superficie del vidrio.
- d. Entre el cubre y el portaobjetos, deben colocarse soportes de diferente naturaleza, v.gr. filamentos de vidrio, pelo de ángel (cerca

de 5 mm de largo), en tres sitios equidistantes sobre los márgenes de la gota. El grosor de los soportes debe aproximarse al de los nematodos.

- e. Por medio de fórceps o pinzas de disección, colocar cuidadosamente el cubreobjetos (18-22 mm de ancho, grosor No. 0 o No. 1), sobre la gota.
- f. Bajo el microscopio, quitar los excesos del fijador en los márgenes del cubreobjetos, utilizando tiras de papel filtro en forma triangulada. Para no perder especímenes o cambiarlos de posición, extremar precauciones durante el proceso. La eliminación de excesos de fijador, alternando lados opuestos en el cubreobjetos, puede ser de utilidad.
- g. Sellar los márgenes del cubreobjetos aplicando Zut, Glycel o esmalte claro para las uñas con la ayuda de un pincel adecuado.
- h. Una vez secado el sellador (1-2 h después), el montaje debe etiquetarse y examinarse bajo el microscopio compuesto.

Los montajes temporales en fijador, constituyen un medio rápido para observar nematodos. Algunas estructuras como los campos laterales y anillos de la cabeza, pueden verse muy claramente, particularmente si los especímenes se montan inmediatamente después de fijarse. Los montajes temporales pueden durar desde algunos días, hasta varias semanas, dependiendo de la calidad de la preparación, el fijador que se utilice y la clase de nematodo. Con el tiempo, los especímenes se conservarán en mejores condiciones si se mantienen en una atmósfera húmeda como en cajas de Petri provistas de papel filtro humedecido. De ser necesario, se pueden desmontar las preparaciones y recuperarse los especímenes para preservarse en fijador o procesarse en glicerina. Sin embargo, cuando se haya planeado lo anterior, ésto debe hacerse a los pocos días de haberse hecho el montaje. La implementación de esta técnica no requiere de equipo especializado.

## 2. Especímenes vivos en agua

- a. Colocar en el centro de un portaobjetos limpio (del tamaño como en la), una gota de agua.

- b. Poner en el microscopio de disección el vidrio de reloj conteniendo nematodos vivos en agua, y transferir en forma individual de 10-15 especímenes a la gota de agua sobre el portaobjetos (para ésto usar el equipo indicado en lb).

Proceder como anteriormente de lc a lf.

- g. Sellar el cubreobjetos con la mezcla a partes iguales de parafina (punto de fusión, cerca de 60 C) y vaselina. Esta mezcla debe calentarse, antes de aplicarse sobre los márgenes del cubreobjetos con un pincel. El sellador se solidifica rápidamente, pudiéndose examinar enseguida los especímenes con el microscopio compuesto (se puede utilizar también Zut o Glycel aunque requieren más tiempo para secar).

La examinación de especímenes vivos es muy importante para poder observar estructuras del estilete, esqueleto cefálico y lumen del esófago; las que por lo general, son menos aparentes después de haberse fijado. Si los especímenes se mueven mucho, exponer brevemente el portaobjetos sobre una flama pequeña o colocarlo sobre la plancha de la parrilla. También, los especímenes vivos pueden anesthesiarse para examinarse (Hooper, 1970). Estos montajes en agua deben ser observados inmediatamente después de haberse preparado, ya que el deterioro de especímenes, puede ocurrir en horas.

## B. Montajes permanentes

### 1. Especímenes en glicerina

- a. Poner en el centro de un portaobjetos limpio (tamaño como en la), una gota de glicerina deshidratada.

Nota: Las laminillas de Cobb (Hooper, 1970) son utilizadas por muchos investigadores.

- b. Colocar bajo el microscopio de disección un vidrio de reloj o cualquier otro recipiente adecuado conteniendo nematodos en glicerina. Transferir individualmente de 10-15 nematodos a una gota de glicerina sobre un portaobjetos (utilizar los materiales indicados en lb, c, d, y e en el inciso A del Paso III).

Los soportes deben mantenerse en glicerina deshidratada.

- f. Sellar el cubreobjetos con Zut o Glycel, aplicándolos con un pincel adecuado.
- g. Después de 2 h se puede aplicar una segunda capa de sellador. Dejar secar, etiquetar y proceder a examinar o guardar especímenes.

**Nota:** El quitar el exceso de glicerina del cubreobjetos sin mover ni interferir con el sellador, es sumamente difícil. Con la práctica, se aprende a colocar el tamaño adecuado de gota de glicerina sobre el portaobjetos; pero cuando ésta es muy grande, es mejor transferir los especímenes a otra gota sobre un portaobjetos diferente y seguir el procedimiento.

Actualmente la glicerina es el mejor de los medios para montajes permanentes. Con ella se logra gran claridad y los montajes bien hechos pueden durar hasta 25 años.

## 2. Especímenes en gelatina-glicerina

Esta técnica es especial para observar la cara de nematodos, aunque también es muy útil para hacer cortes transversales y observar las incisiones de los campos laterales. Se utiliza para montar colas y observar la bursa así como para hacer preparaciones del lado ventral y observar detalles de la vulva. Dos referencias al respecto se citan (Buhner, 1949; Hooper, 1970).

## 4. Consideraciones Importantes

### Medidas de Seguridad

Siempre debe tenerse especial cuidado al matar, fijar y montar nematodos. Como se mencionó previamente, el ácido pícrico deshidratado es explosivo y por lo tanto debe mantenerse húmedo. La formalina es un agente muy irritante, por ello evitese el contacto con la piel y los ojos. Cuando se preparen soluciones con formaldehído, hacerlas siempre en la campana de extracción para eliminar los gases. El alcohol del 95% es un producto inflamable, por lo tanto no debe usarse cerca de la flama. Siempre extremar precauciones cuando se manipulen elementos vidriados como portaobjetos y cubreobjetos,

para evitar que se rompan y puedan ocasionar heridas en las manos. Tener la misma actitud cuando se usen fórceps puntiagudos u otros instrumentos similares, así como parrillas y hornos.

#### Referencias Recomendadas

Buhrer, E. M. 1949. Proc. Helminth. Soc. Wash. 16:3-6.

Courtney, W. D., D. Polley, and V. L. Miller. 1955. Pl. Dis. Repr. 39:570-571.

Hooper, D. J. 1970. In: Laboratory methods for work with plant and soil nematodes (Ed. J. F. Southey). Her Majesty's Stationery Office, London. 148 pp.

Seinhorst, J. W. 1959. Nematologica 4:67-69.

Seinhorst, J. W. 1966. Nematologica 12:178.

## Ejercicio 33

### Tinción de Nematodos en Tejidos Vegetales

Richard S. Hussey  
Department of Plant Pathology  
University of Georgia  
Athens, GA 30602

#### 1. Objetivos

La investigación de nematodos endoparásitos involucra con frecuencia la penetración y desarrollo de nematodos dentro de raíces intactas. Se han desarrollado muchos métodos para teñir y aclarar tejidos infectados, siendo la mayoría de ellos efectivos en diversos tejidos vegetales.

La tinción con fucsina ácida en lactofenol, es el método más ampliamente utilizado. Sin embargo, un método nuevo a base de blanqueador clorado como tratamiento de preteñido, ha resultado muy confiable y relativamente fácil de usar (Byrd *et al*, 1983). El método del blanqueador será utilizado en el presente ejercicio.

#### 2. Tiempo Requerido

Después de prepararse los tejidos vegetales infectados, el ejercicio puede completarse en una sesión de laboratorio de 3 h.

#### 3. Procedimiento

##### A. Preparación de plantas infectadas con nematodos

Sembrar 5 semillas de un cultivar susceptible a Meloidogyne spp como algodónero o soya, en macetas de 15 cm de diámetro, conteniendo suelo migajón arenoso. Después de 7 días, eliminar plántulas hasta dejar solamente 2 por maceta, mismas que deben inocularse con 10,000 huevecillos de M. incognita (Raza 3). Inocular las plantas aproximadamente 30 días antes de iniciar el ejercicio. Las plantas deben mantenerse en invernadero o en cámaras bioclimáticas, aplicando riegos y fertilizando conforme se requiera.

## B. Tinción

1. Raíces agalladas con *M. incognita* de plantas de algodón, tomate o soya de 30 días de edad, son lavadas con agua y colocadas en un vaso de precipitado de 150 ml. Las raíces se pueden fragmentar en pedazos o dejarse intactas si son muy pequeñas.
2. Las raíces son aclaradas, agregándoles 50 ml de agua y la cantidad necesaria de cloro para lograr la concentración de 5.25% de NaOCl. La cantidad de blanqueador a necesitar, dependerá de la edad de las raíces. Utilizar como guía las siguientes sugerencias para decidir la cantidad de cloro a necesitar.
  - a. Raíces jóvenes - agregar 10 ml de blanqueador.
  - b. Raíces de edad intermedia - agregar 20 ml de blanqueador.
  - c. Raíces viejas o lignificadas - agregar 30 ml de blanqueador.
3. Incubar las raíces en el blanqueador por 4 min, agitando de vez en cuando.
4. Lavar las raíces al chorro de agua por 45 segundos y enseguida sumergirlas en agua de la llave por espacio de 15 min, hasta quitar los residuos del blanqueador que pueden inhibir la tinción de fucsina ácida.
5. Drenar el agua y dejar las raíces sumergidas en otros 30-50 ml de agua.
6. Agregar 1 ml de solución madre de fucsina ácida, al volumen de agua con las raíces, (la solución madre del colorante se prepara disolviendo 3.5 gr de fucsina ácida en 250 ml de ácido acético y 750 ml de agua destilada).
7. Hervir la solución por 30 segundos en una parrilla.
8. Enfriar la solución a la temperatura ambiente, eliminar el colorante y enjuagar las raíces con agua.
9. Poner las raíces en 20-30 ml de glicerina acidificada, junto con unas gotas de HCl 5 N y calentar hasta desteñir. El desteñimiento se

completa cuando los tejidos radicales se ven claros y los nematodos destacan por el color llamativo.

10. Después de desteñir, las raíces pueden conservarse en glicerina acidificada hasta que vayan a examinarse.

#### C. Conteo de nematodos en tejidos radicales

Los nematodos endoparásitos teñidos, pueden contarse directamente en los tejidos radicales. Las raíces son examinadas esparciéndose en una cantidad pequeña de glicerina, sobre la tapa de una caja de Petri (de vidrio o de plástico), en la que se coloca cuidadosamente la contratapa. De gran utilidad es el rayar la superficie externa de la tapa, para facilitar el conteo de los nematodos con el microscopio de disección a 40X.

#### 4. Fuente de los Materiales

- A. Organismos - cultivos de *M. incognita* (ver Apéndice 2).
- B. Materiales - colorantes y otros reactivos químicos estándares para laboratorio, como se indica en el texto.

#### 5. Observaciones a Realizar

Los nematodos en el interior de tejidos vegetales, deben teñirse de color rosa a rojo y el tejido vegetal debe permanecer claro. Examinar las raíces para localizar los diferentes estadios de *M. incognita* (juveniles de segundo estadio vermiformes o hinchados, hembras adultas piriformes, con o sin masas de huevecillos). Observar la posición del nematodo en relación al tejido agallado. Determinar la relación del número de hembras adultas por agalla.

#### 6. Variaciones del Ejercicio para Cambiar el Nivel de Intensidad

Como variaciones se puede incluir: (1) evaluar plantas infectadas a diferentes intervalos (1, 3 y 6 semanas), para estudiar el efecto del tiempo sobre la penetración y desarrollo de nematodos (Hussey y Bernard, 1975), y (2) comparar la penetración y desarrollo de nematodos en cultivares susceptibles y resistentes a *Meloidogyne* spp.

Antes de aclarar con blanqueador las raíces de plantas infectadas de 6 semanas de edad, la reproducción de nematodos puede evaluarse tiñendo las masas de huevecillos de color rosa, mediante la incubación del sistema radical en una solución acuosa de floxina B (0.15 gr/1 de agua), durante 15-20 min. La concentración exacta de floxina B no es crítica. Después de los tratamientos, lavar las raíces para eliminar los residuos del colorante. La floxina B tiñe esencialmente la masa gelatinosa de huevecillos en cultivares susceptibles y resistentes, por lo que las raíces pueden aún procesarse para teñir nematodos.

## 7. Consideraciones Importantes

Este método de fucsina ácida y blanqueador es excelente para teñir nematodos endoparásitos en raíces de algodón y soya. El paso para aclarar los tejidos (tratamiento con blanqueador), puede modificarse ligeramente para raíces de otras especies vegetales. El tratar el tejido radical con blanqueador antes de teñir con la fucsina ácida, previene la tinción excesiva reduciendo de esta manera el tiempo para desteñir.

### A. Otros métodos

1. Lactofenol- fucsina ácida (McBeth *et al*, 1941). Este es el método de tinción más ampliamente utilizado. La desventaja que tiene es que el desteñimiento es muy difícil de realizar, requiriendo en ocasiones varios días y además se utiliza fenol, un producto muy tóxico.
2. Método de McBryde (1936). Este método sencillo para teñir nematodos endoparásitos es particularmente útil porque no requiere de calentar y desteñir. Es además relativamente rápido y muy fácil de regular. La desventaja que tiene es que requiere del hidrato de cloral para desteñir, substancia muy controlada en los Estados Unidos.

## Referencias Recomendadas

- Byrd, D. W., Jr., Kirkpatrick, T., and Barker, K. R., 1983. *J. Nematol.* 15:142-143.
- Hussey, R. S., and Bernard, E. C. 1975. *The Am. Biol. Teacher* 37:224-226.
- McBeth, C. W., Taylor, A. L., and Smith, A. L. 1941. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 8:26.
- McBryde, M. C. 1936. *Am. J. Bot.* 23:686-689.

## Ejercicio 34

### Extracción de Nematodos del Suelo y de Tejidos Vegetales

Terry L. Niblack y Richard S. Hussey  
Department of Plant Pathology  
University of Georgia  
Athens, GA 30602

#### 1. Objetivos

La caracterización cualitativa y cuantitativa de la fauna nematológica en cualquier hábitat, se inicia con muestreos apropiados como los descritos en el Ejercicio 1. También es importante utilizar un método apropiado de extracción, de tal suerte que las conclusiones sobre la población muestreada, sean lo más cercano posible a la realidad. A continuación se explican los métodos comunes para extraer nematodos así como su eficacia relativa.

#### 2. Tiempo Requerido

Una sesión de laboratorio de 3 h.

#### Métodos para Extracción del Suelo

#### 3. Procedimiento

Se han desarrollado varios métodos para extraer nematodos del suelo (Barker *et al*, 1978). Los métodos escogidos para este ejercicio han mostrado ser confiables y por ello son de uso muy común en nematología.

##### A. Toma de muestras del suelo

Colectar 1 litro de suelo de un jardín, bosque o terreno agrícola. El suelo debe colectarse del área radical de la planta, mezclarse completamente rompiendo a la vez los terrones y eliminando piedras y residuos indeseables.

##### B. Centrifugación y flotación con azúcar

Es el método más utilizado para extraer nematodos del suelo (Barker *et al*, 1978). Los nematodos vivos y muertos, son recuperados del suelo haciéndolos flotar en una solución azucarada durante la centrifugación. Con éste método, también se recuperan otros organismos edáficos como Protozoarios, Rotíferos, Artrópodos,

### **Tardigrados, esporas y micorrizas.**

1. Colocar 100 cm<sup>3</sup> de suelo en un vaso de plástico de 1 litro.
2. Agregar agua suficiente en el vaso hasta completar el volumen de 800 ml.
3. Mezclar con un agitador motorizado de laboratorio (1550 rpm) durante 20 segundos, y permitir que el suelo se sedimente por 60 segundos.
4. Decantar la suspensión sobre la malla de dos tamices de 15 cm de diámetro empotrados entre sí; 40 mallas (abertura de 425 μm) y 400 mallas (abertura de 38 μm), respectivamente.
5. Lavar el tamiz de 40 cuando todavía esté sobre el de 400.
6. Transferir con una pizeta, los nematodos y residuos retenidos sobre la malla del tamiz de 400 a un vaso de precipitado de 150 ml.
7. Agitar la suspensión del vaso, antes de vaciar a los tubos de centrifuga (50 ml) de fondo plano.
8. Colocar los tubos en el cabezal horizontal, asegurando balancear los pesos antes de centrifugar.
9. Centrifugar a 400 X g por 5 min.
10. Decantar cuidadosamente el agua de los tubos, procurando perturbar al mínimo el precipitado que contiene los nematodos.
11. Rellenar parcialmente los tubos con una solución de sacarosa (454 gr en suficiente agua hasta 1 litro) y resuspender el precipitado agitándolo con una varilla. Enseguida, vaciar la suspensión hasta aproximadamente 6 mm antes del borde de la boca del tubo. Limpiar la varilla agitadora después de haberse utilizado.
12. Centrifugar a 400 X g por 60 segundos (no usar el freno para parar la centrifuga).
13. Inmediatamente decantar la solución azucarada conteniendo los nematodos, sobre la malla de un tamiz 500 (abertura de 28 μm) de 7.5 cm de diámetro, dejando a la vez los residuos en el

fondo del tubo.

14. Cuidadosamente arrastrar con agua los nematodos a un vaso de precipitado de 150 ml por medio de una pizeta y sosteniendo ligeramente inclinado el tamiz. Procurar mantener en el vaso un volumen final de agua inferior a 30 ml.
15. Si no hay necesidad de observar o contar las muestras inmediatamente, almacenar el vaso en un lugar cerrado a 14 C.

### C. Embudo de Baermann

Este método (Flegg y Hooper, 1970), es particularmente apropiado para extraer nematodos muy activos del suelo. La recuperación de juveniles de segundo estadio, se facilita con este método porque los huevos eclosionan cuando el suelo es incubado en los embudos.

1. Unir al tallo de un embudo de vidrio de 10 cm de diámetro, un tubo de hule de 7.5 cm de largo. Colocar a los embudos en los soportes.
2. Cortar trozos de mallas de metal o de plástico (de aproximadamente 10 mallas), de tamaño adecuado, para acomodar en la boca del embudo.
3. Cerrar el tubo con pinzas y llenar con agua hasta tocar la malla.
4. Eliminar las burbujas de aire atrapadas en el tubo, abriendo ligeramente la pinza para permitir la salida de un poco de agua.
5. Colocar un papel doble, tipo "kleenex", "Kimwipes", etc, resistentes a la humedad, sobre la malla y agregar enseguida agua hasta rebasar el nivel del papel.
6. Cuidadosamente colocar 30 cm<sup>3</sup> de suelo sobre el papel (de la misma clase que se utilizó en el primer método).
7. Agregar cuidadosamente más agua al embudo, levantando una de las esquinas del papel y dirigiendo el agua hacia las paredes del embudo. Nunca dirigir el agua al bulto de la muestra. El nivel del agua debe estar ligeramente por encima de la malla, lo suficiente para mantener humedecida la muestra.

8. Doblar las esquinas del papel hacia el centro de la muestra, de tal manera que éstas queden cubiertas.
9. Reponer el agua evaporada conforme se necesite como se describe en el paso #7. De lo contrario, dejar sin perturbar el embudo por 48 h.
10. Los nematodos que se han sedimentado en el tubo de hule, son colectados al abrir ligeramente la pinza, permitiendo la salida de 10-30 ml de agua a un vaso de precipitado de 100 ml.
11. Este método puede modificarse muy fácilmente para satisfacer una gama elevada de necesidades. La bandeja de Baermann es una modificación para extraer nematodos de grandes cantidades de suelo. En este método, el suelo (100 cm<sup>3</sup> o más), es colocado sobre papeles resistentes a la humedad en un tamiz malla 10 de 15 cm de diámetro (o un cedazo parecido), el cual descansa dentro de una bandeja con el volumen suficiente de agua hasta rebasar ligeramente a la malla. Los nematodos son colectados de la bandeja 48 h después, mediante el uso de tamices.

#### 4. Observaciones a Realizar

Después de haberse extraído nematodos de muestras de suelo del mismo origen con los 2 métodos anteriores, contarlos individualmente. Para ello, la suspensión contenida en el vaso de precipitado debe agitarse antes de sacar una alícuota y ponerla en el contador. Estos contadores se pueden hacer con las tapas de las cajas de Petri (7.5 X 3.5 X 1.5 cm), a las que pueden gravarse rayas en la superficie externa, con el propósito de facilitar el conteo de nematodos bajo el microscopio de disección. Calcular el número de nematodos contenidos en un volumen base de 100 cm<sup>3</sup> para cada muestra, y comparar la eficiencia de los métodos de extracción. Las variaciones con este ejercicio pueden ser: (i) evaluar la eficiencia de extracción de nematodos con los 3 métodos, procesando muestras inoculadas con un número conocido de nematodos; (ii) comparar la eficiencia de ambos métodos con diferentes tipos de suelos y (iii) determinar la eficiencia relativa con diferentes especies de nematodos.

#### 5. Consideraciones Importantes

Ambos procedimientos de extracción tienen ventajas y

desventajas. El método de centrifugación y flotación permite el procesamiento rápido de varias muestras y no requiere que los nematodos sean muy activos para poderlos extraer. Sin embargo, los nematodos muy grandes se extraen pobremente con este método. Se requiere de un equipo relativamente caro. El embudo de Baermann, por otro lado, es simple y requiere de componentes muy baratos. Sin embargo, solamente se recuperan nematodos activos (los Criconematidos son difíciles de extraer) y la cantidad de suelo que se puede procesar por embudo, es muy pequeña. Otra desventaja es que se requiere de 48 h para obtener una recuperación adecuada. Ciertos nematodos como los juveniles de Meloidogyne, pueden pasar las mallas de los tamices de 400 y 500, si se orientan adecuadamente.

## 6. Tiempo Requerido

Una sesión de laboratorio de 3 h.

### Métodos para Extraer Nematodos de Tejidos Vegetales

## 7. Procedimientos

Los nematodos endoparásitos vermiformes emigran fuera de los tejidos vegetales al incubarse en agua. En esta parte del ejercicio se va a utilizar el método de incubación que es el más fácil de usar y requiere de mucho menos equipo que el método de extracción de tejidos vegetales. No obstante, el método de macerado y filtrado, es más rápido para extraer nematodos endoparásitos migratorios de cualquier tejido vegetal.

### A. Preparación de tejido vegetal infectado con nematodos

Obtener una planta de soya infectada 30 días con especies de Pratylenchus. Sacar la raíz, lavarla y limpiarla de las partículas de suelo. Dividir el sistema radical en 2 partes iguales en base al peso y extraer los nematodos endoparásitos por medio de los dos métodos siguientes:

### B. Método de incubación (Hooper, 1970)

1. Cortar las raíces con tijeras en segmentos de 5-10 cm de largo.
2. Colocar los fragmentos radicales dentro de un frasco de aproximadamente 1 litro, agregando agua suficiente hasta cubrirlos.

3. Puede agregarse agua oxigenada (10 ml/l) a la suspensión para enriquecerla de oxígeno. Si los frascos requieren de incubarse por periodos mayores de 24 h entonces es aconsejable utilizar algún tipo de antibiótico de amplio espectro como el Sulfato de estreptomycin, con el propósito de reducir el crecimiento bacteriano.
4. Tapar los frascos con sus respectivas tapaderas e incubarlos a 22-24 C durante 24 h.
5. Colectar los nematodos agregando agua al frasco hasta la mitad de su volumen; enseguida, agitar y vaciar el contenido sobre la malla (60 = abertura de 250  $\mu$ m) de un tamiz de 15 cm de diámetro, empotrado a su vez sobre otro de malla 500. Repetir el procedimiento dos o tres veces y enseguida transferir con agua los nematodos retenidos sobre la malla del tamiz de abertura más pequeña. Para esto; inclinar el tamiz y arrastrar los nematodos a la parte más baja del tamiz con el agua de una pizeta. Poner la suspensión en un vaso de precipitado de 150 ml. Se puede agregar más agua a las raíces para seguir incubando hasta 7 días más de la manera descrita, si se cambia regularmente el agua.
6. Agitar la suspensión del vaso y decantar en un disco contador para observar o almacenar los nematodos en recipientes cerrados a 14 C.

C. Método de macerado y filtrado (Hooper, 1970)

1. Fragmentar las raíces en porciones de 2.5 cm de largo.
2. Colocar 5 gr de raíces en un vaso de licuadora y agregar 100 ml de agua.
3. Licuar a la máxima velocidad por espacio de 10-15 segundos (el tiempo debe ajustarse en función al tipo de licuadora).
4. Vaciar el macerado en un tamiz de 15 cm de diámetro de malla 400, colocado a su vez dentro de un recipiente adecuado y agregar el suficiente volumen de agua hasta cubrir la superficie de la malla.
5. Dejar reposar la suspensión por 48 h.
6. Agregar agua al recipiente y decantar en un tamiz

malla 500 de 7.5 cm de diámetro. Inclinar el tamiz y arrastrar los nematodos y residuos con agua a un vaso de precipitado.

7. El vaso conteniendo la suspensión se puede almacenar a 14 C o si se prefiere, decantar sobre un disco contador para observar los nematodos.

## 8. Observaciones a Realizar

Los nematodos deben contarse con la ayuda del microscopio de disección a 40X. Determinar los números de nematodos fitoparásitos obtenidos por gr de raíz en cada método y hacer un reporte sobre la eficiencia de cada uno de los métodos probados. Además de los nematodos fitoparásitos, ¿se recuperan otra clase de nematodos de los tejidos vegetales como por ejemplo omnívoros?

## 9. Consideraciones Importantes

El método de incubación es muy sencillo y se requiere de poco esfuerzo y tiempo para preparar una muestra, aunque su eficiencia puede no ser tan buena como la obtenida con otros métodos. Ambos métodos son convenientes para extraer nematodos a partir de partes vegetales infectadas. El método de incubación es bueno solamente para nematodos migratorios endoparásitos. Por otro lado, las formas no filamentosas de nematodos sedentarios endoparásitos, como las especies de Meloidogyne y Heterodera, son obtenidas con el método de maceración. Después del macerado, muchos estadios de estos nematodos se pueden contar, sacando alicuotas de la suspensión del tejido macerado y observándolos bajo el microscopio de disección.

## 10. Otros Métodos

### A. Cámara nebulizadora (Hooper, 1970)

Este es el método más común para obtener nematodos migratorios endoparásitos; sin embargo, su implementación requiere de equipo especializado. Una niebla intermitente muy fina lava los nematodos de las raíces en su movimiento descendente hacia el fondo de un embudo de Baermann modificado.

La contaminación microbiana no es un problema con este método. Los nematodos deben colectarse cada 24 h.

## B. Incubación con agitación

Este método involucra la agitación lenta de secciones radicales infectadas con nematodos, y suspendidas en una solución con antibióticos dentro de frascos Erlenmeyer puestos en el agitador giratorio. Los nematodos son colectados de la solución con tamices de aberturas pequeñas, 72 h después de incubarse.

## 11. Fuente de los Materiales

### A. Agitador de laboratorio motorizado (accionar directo, 1550 rpm).

Fisher Scientific Company  
711 Forbes Avenue  
Pittsburgh, PA 15215.

### B. Tamices.

W. S. Tyler, Inc.  
Combustion Engineering, Inc.  
8200 Tyler Boulevard  
Mentor, OH 44060-4293.

### C. Centrifuga con cabezal horizontal y tubos de 50 ml de fondo redondo.

Fisher Scientific Company  
711 Forbes Avenue  
Pittsburgh, PA 15215.

## Referencias Recomendadas

Barker, K. R., et al. 1978. In Methods for evaluating plant fungicides, nematocides, and bactericides. pp. 114-125. The American Phytopathological Society.

Flegg, F. F. M., and Hooper, D. F. 1970. In "Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes", (J. F. Southey, ed.), pp. 5-22. Tech. Bull. 2, Minist. Agric. Fish and Food, London.

Hooper, D. F. 1970. In "Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes", (J. F. Southey, ed.), pp. 34-38. Tech. Bull. 2, Minist. Agric. Fish and Food, London.

## Ejercicio 35

### Preparación de Patrones Perineales de Meloidogyne spp y de Conos Vulvares de Nematodos Enquistados

R. D. Riggs  
Department of Plant Pathology  
University of Arkansas  
Fayetteville, Arkansas 72701

#### 1. Objetivo

Obtener las porciones de la cutícula de hembras maduras de nematodos que contengan la región del perineo (ano y vulva), para identificar especies.

#### 2. Tiempo Requerido

Un mínimo de 2 h.

#### 3. Procedimiento

##### A. Preparativos antes del ejercicio

1. Obtener raíces de tomate, frescas o preservadas, que estén infectadas con Meloidogyne spp.
2. Obtener quistes frescos o preservados.

##### B. Cortes de patrones perineales

1. Separar las hembras maduras de raíces por medio de agujas de disección, escalpelos pequeños, navajas o cuchillos quirúrgicos. Las hembras obtenidas pueden ponerse en una gota tibia de lactofenol y fucsina ácida para teñir la cutícula.
2. Transferir hembras a un portaobjetos o una pieza de "plexiglas".
3. Cortar la parte posterior del cuerpo de la hembra utilizando dos escalpelos o navajas.
  - a. Hacerlo bajo el microscopio estereoscópico.
  - b. Recortar la cutícula, hasta donde sea posible alrededor del área perineal.
  - c. Si los cortes se hacen sobre el plexiglas, transferir los patrones (teñidos de rojo) a un portaobjetos.

- d. Asegurarse de voltear el patrón perineal en el portaobjetos, de tal suerte que la superficie externa de la cutícula este orientada hacia el objetivo del microscopio.
  4. Colocar el cubreobjetos sobre el patrón.
  5. Agregar lactofenol por los bordes del cubreobjetos, hasta llenar el volumen delimitado por los bordes de los mismos.
  6. Limpiar los excesos de lactofenol.
  7. Sellar el cubreobjetos con Zut o parafina.
  8. Observar con el microscopio compuesto.
- C. Corte de conos vulvares
1. Obtener quistes de color café claro, tamizando suelos infestados o colectándolos individualmente de fragmentos radicales infectados.
  2. Transferir a los quistes por medio de fórceps o pinzas a un portaobjetos o una pieza de plexiglas.
  3. Separar el extremo posterior del cuerpo utilizando un par de escalpelos o navajas quirúrgicas muy bien afiladas.
    - a. Cortar la punta.
    - b. Cortar lo suficientemente lejos de la punta para obtener también las estructuras del subcono.
    - c. Asegurar que la porción posterior esté levantada sobre el portaobjetos (en ocasiones el cono se monta en el hoyo hecho con la punta caliente de una aguja de disección, introducida en el substrato gelatina-glicerina).
  4. Colocar el cubreobjetos.
  5. Agregar lactofenol bajo el cubreobjetos.
  6. Sellar el cubreobjetos con Zut o parafina.
  7. Observar con el microscopio compuesto.

#### 4. Fuente de los Materiales

A. Meloidogyne spp y nematodos enquistados (ver Apéndice 2).

#### B. Equipo

1. Navajas y cuchillos quirúrgicos, obtenerse en establecimientos comerciales especializados.
2. Escalpelos con navajas #11 o #15, pueden comprarse en cualquier casa comercial de productos científicos.

#### 5. Observaciones a Realizar

#### A. Meloidogyne spp

1. Observar la posición relativa del ano y la vulva.
2. Observar el patrón de las líneas alrededor de la vulva y el ano (Fig. 1).

#### B. Quistes de nematodos

1. Observar la presencia del bullae.
2. Observar el tamaño y forma de la fenestra.
3. Observar la estructura del subpuente.
4. Medir la distancia entre ano y vulva así como la longitud de la ranura o hendidura vulvar.

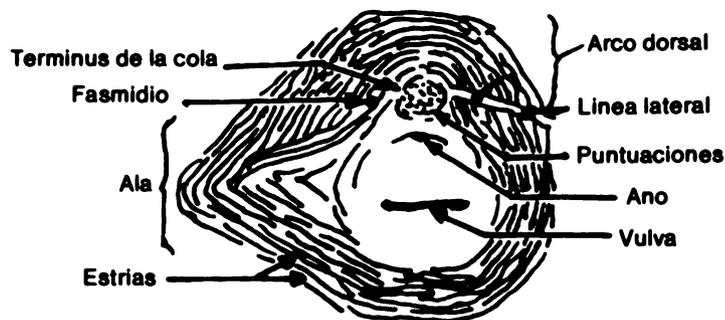


Fig. 1. Morfología general de un patrón perineal (después de Sasser y Carter, 1982).

## 6. Resultados Esperados

El presente ejercicio permitirá a los estudiantes preparar montajes perineales tanto de Meloidogyne spp como de quistes de nematodos, los que son necesarios para identificar especies.

## 7. Variaciones del Ejercicio para Cambiar el Nivel de Intensidad

- A. Incrementar el número de especies por identificar.
- B. Solicitar la descripción de las diferencias entre las especies estudiadas.

## 8. Consideraciones Importantes

- A. Asegurarse de voltear la región posterior en el portaobjetos.
- B. Recortar los excesos de cutícula alrededor del patrón.
- C. Asegurar que los instrumentos cortantes estén bien afilados.
- D. Usar solamente quistes de color café claro.

## Referencias Recomendadas

- Hirschmann, H. 1982. Taxonomy of the cyst and root-knot nematodes. In Riggs, R. D. (Ed.). Nematology in the Southern Region of the United States. South. Coop. Series Bull. 276:54-70.
- Mulvey, R. H., and A. M. Golden. 1983. Jour. Nematol. 15:1-59.
- Sasser, J. N., and C. C. Carter. 1982. Root-knot nematodes (Meloidogyne sp.): Identification, morphological and physiological variation, host range, ecology and control. In Riggs, R. D. (Ed.). Nematology in the Southern Region of the United States. South. Coop. Series Bull. 276:21-32.

## Apéndice 1

Este manual de laboratorio de Fitonematología - versión en Español - puede solicitarse al Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.

## Apéndice 2

La obtención de un cultivo de nematodo u hongo, puede lograrse en forma gratuita solicitándolo directamente a las personas y/o instituciones que al margen se mencionan. El solicitar un número mayor puede condicionar un cargo adicional que debe negociarse con las personas y/o instituciones involucradas.

### Cultivos en callos de alfalfa

#### Pratylenchus penetrans

P. crenatus

P. scribneri

P. coffeae

P. agilis

P. hexincisus

P. brachyurus

P. zeae

#### Aphelenchoides fragariae

Dr. M. Riedel

Dept. of Plant Pathology

Ohio State University

Columbus, Ohio 43210

### Cultivos en macetas (invernadero)

#### Meloidogyne hapla

M. incognita

M. arenaria

M. javanica

#### Aphelenchus avenae

#### Aphelenchoides ritzemabosi

A. bicaudatus

#### Trichodorus

(Estas especies solamente están disponibles en el otoño).

#### Heterodera spp

Dr. R. Riggs

Dept. of Plant Pathology

University of Arkansas

Fayetteville, AK. 72701

Meloidogyne incognita  
Las 4 razas para utilizarse en el Ejercicio 13.

Dr. K. R. Barker  
Dept. of Plant Pathology  
North Carolina State  
University  
Raleigh, NC 27695

Panagrellus redivivus  
(axénico o monoxénico)  
Caenorhabditis elegans  
(axénico o monoxénico)

Dr. B. M. Zuckerman  
Dept. of Plant Pathology  
University of  
Massachusetts  
Amherst, MA 01003

Escherichia coli OP-50

Cultivos de hongos

American Type Culture  
Collection (ATCC) 12301  
Park Lawn Drive  
Rockville, MD 20852

### Apéndice 3

Cuando se soliciten cultivos de nematodos de los Estados Unidos de América, el solicitante debe obtener un permiso para transportar fitopatógenos en el país y fuera de sus fronteras. Para mayor información, así como para obtener las formas respectivas, dirigirse a:

Biological Assessment Support Staff  
USDA - APHIS  
Federal Building  
6505 Belcrest Road

5211