

Métodos de extracción de nematodos fitopatógenos

Leonel Rosas-Hernández, Laboratorio de Nematología “Dr. Carlos Sosa-Moss”. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Dirección General de Sanidad Vegetal. SENASICA-SAGARPA. leonel.rosas@senasica.gob.mx.

Para el diagnóstico de nematodos fitopatógenos es de vital importancia conocer los hábitos alimenticios de los nematodos de interés y con esta información elegir el método de extracción más adecuado que asegure su aislamiento de la muestra a analizar. Existen diversos métodos para la extracción de estos fitopatógenos, sin embargo, todos toman ventaja del tamaño, la densidad y la movilidad de los nematodos para separarlos de la muestra través de principios como tamizado, centrifugación y filtración.

Disección directa. Para la obtención de nematodos sedentarios como *Globodera*, *Heterodera*, *Punctodera*, *Meloidogyne* y *Nacobbus* será necesaria una revisión directa y minuciosa de las raíces, buscando crecimientos anormales, deformaciones (agallas) o en su caso los quistes. Una vez localizada la agalla o los quistes, con ayuda de pinzas y bisturí se disecciona el tejido y se realiza la extracción de las hembras, machos y masas de huevos. Para el caso de *Meloidogyne* y *Nacobbus* es necesario realizar la extracción con mucho cuidado, sin romper a las hembras debido a que es necesario contar suficientes especímenes íntegros (con cuello y estilete) para realizar cortes y estudios morfométricos. Es recomendable depositar a las hembras en una solución de Cloruro de sodio al 0.9 % para asegurar su integridad, debido a que si se conservan en agua destilada, por efectos de la presión osmótica se rompen.

Aparato de Fenwick. Los nematodos formadores de quistes o enquistados como *Globodera*, *Heterodera*, *Punctodera*, *Cactodera*, entre otros, pueden ser separados de muestras de suelo a través de este método. Su eficiencia ha sido reportada en 73 %. Para que esta metodología sea efectiva, el suelo debe estar seco. El aparato de Fenwick es un dispositivo, generalmente de metal (acero, cobre, etc.). Consiste en hacer pasar la muestra de suelo a través de un tamiz de 1mm de abertura y los quistes y demás partículas que logren atravesar la malla bajaran a través de un tubo y finalmente llegaran al fondo donde, las partículas más pesadas como arenas y arcillas quedaran asentadas y las menos densas (quistes y materia orgánica) flotarán hacia la superficie y serán conducidas hacia el collar del aparato. El material flotante es capturado sobre tamices de mayor a menor abertura (20, 60 y 100). Lo retenido sobre el tamiz de 20 es descartado, el material del tamiz 60 es vertido sobre el 100. Con ayuda de agua destilada, adherir papel absorbente sobre la pared interna del vaso de precipitados de 500 ml, agregar 100ml de agua destilada y posteriormente verter el material de flotación retenido en el tamiz 100. Cierta cantidad de material de flotación se adhiere al papel por lo que con ayuda de Tween 20 % puede romperse la tensión superficial de agua y una mayor cantidad de material se

moverá hacia la superficie del papel. Con mucho cuidado retirar del papel del vaso jalando lentamente hacia arriba. Es recomendable colocar el papel húmedo sobre una placa de plástico, vidrio o cartón para agilizar el secado o realizar la revisión inmediatamente bajo microscopio estereoscópico.

Macerado-Tamizado-Centrifugado. Este método es utilizado para la obtención de huevos, juveniles J2 y otros estadios de nematodos endoparásitos sedentarios y migratorios que pueden encontrarse en bulbos, cormos, rizomas, hojas, tallos, y plántulas. El material vegetal es cortado en segmentos pequeños (1-2 cm), y colocados en una licuadora con alrededor de 100 ml de agua de la llave. Entonces el material es macerado accionando el dispositivo 4 veces por periodos de 20 seg cada uno.

El producto del macerado es clarificado a través del tamizado de Cobb, que consiste en hacer pasar el macerado a través de los tamices 20, 60, 100, 200 y 325. El material retenido en 20 es descartado. En el tamiz 60 quedan capturados los nematodos adultos largos de *Anguina*, *Meloidogyne* (hembras maduras), *Hirschmanniella*, *Belonolaimus*, *Dolichodours*, *Longidorus* y *Xiphinema*. En el tamiz 100 se pueden encontrar adultos de *Aphelenchoides*, *Ditylenchus* y *Hemicycliophora*; adultos de nematodos pequeños como *Criconemella*, *Paratrichodorus*, *Paratylenchus*, *Pratylenchus* y *Radopholus* en 200 y en 325 los estadios juveniles de nematodos pequeños. Por lo anterior, el material retenido en 60 se conserva en un vaso de precipitado y lo retenido en 100 y 200 es vertido sobre el tamiz 325, concentrando y depositándolo en tubos de centrifuga. Agregar un gramo de caolín y mezclar de manera manual o través de agitador eléctrico por 1 minuto. El caolín al ser una arcilla posee carga negativa por lo que cubrirá toda la cutícula del nematodo (cargada positivamente) haciéndolo más denso y precipitándolo, acción que se maximiza aplicando una fuerza centrífuga de 2900g por 5 minutos. Descartar el sobrenadante, los nematodos se encuentran en la pastilla del fondo del tubo, agregar 25-30 ml de solución azucarada a una concentración de 16-17° Brix, mezclar perfecta y rápidamente y centrifugar a 2900g por 2 minutos. El sobrenadante es vertido sobre un tamiz pequeño de 325, 400 o 500 mallas y el exceso de azúcar es eliminado a través de lavados con agua.

Es muy importante asegurarse que la solución azucarada presente la concentración indicada verificándola través de un densímetro certificado. Si la concentración es superior, o si los nematodos permanecieran mucho tiempo (>5 min), aun siendo la concentración indicada, se corre el riesgo de plasmólisis de los especímenes.

Embudo de Baermann. Este método es muy

conveniente para la extracción de nematodos juveniles y adultos activos de muestras pequeñas (30 a 100 cm³) de suelo o tejido vegetal. En este método, incluso los huevos pueden eclosionar durante la incubación y los juveniles J2 pueden ser recuperados. Este método no es efectivo para nematodos anillados y sedentarios como *Criconemella*, *Criconemoides*, *Hemicycliophora* y *Xiphinema* ni hembras sedentarias no vermiformes de *Globodera*, *Heterodera*, *Meloidodera*, *Meloidogyne*, *Rotylenchulus* y *Tylenchulus*.

Consiste en utilizar un embudo de 10-15 cm de diámetro con un tubo de látex en la base del tallo del embudo cerrado con una pinza. El embudo es colocado sobre un soporte y es llenado con agua destilada. El material vegetal es seccionado en piezas pequeñas de aproximadamente 1 cm de longitud y colocado sobre una malla de acero o plástico sobre una hoja de papel Kleenex. Es importante revisar continuamente el nivel del agua, la cual siempre debe estar en contacto con la muestra sin que sea demasiado como para que la muestra llegue a estar sumergida. Requiere de al menos 12 h y puede mantenerse hasta por 5 días (generalmente 3 días). La mayoría de los nematodos son recuperados después de 24 a 48 h pero la cantidad recuperada dependerá del tamaño de la muestra, la temperatura, tiempo de conservación y especie de nematodo.

El inconveniente de este método es que se presentan condiciones anaeróbicas debido a que las bacterias que se generan de la materia orgánica sumergida consumen el oxígeno de la solución por lo que algunos especímenes suelen ser afectados.

Incubación de tejidos. Se realiza colocando secciones pequeñas del material vegetal (3-5cm de longitud) dentro de una caja Petri con agua destilada y examinando los tejido con ayuda de bisturí, agujas y pinzas de disección.

Los nematodos pueden ser extraídos directamente sobre los tejidos vegetales (raíces, hojas, bulbos, cormos, tallos, semillas, etc.), previamente seccionados en piezas pequeñas de aproximadamente 2 cm de longitud, depositados dentro de un vaso de precipitados y añadir agua hasta cubrir la muestra e incubar a temperatura ambiente (20±3°C) durante 3-5 h. Los nematodos endoparásitos como *Aphelenchoides*, *Ditylenchus*, *Hirschmanniella*, *Pratylenchus*, *Radopholus* y *Radinaphelenchus* se mueven del tejido hacia el agua en pocos minutos y pueden ser encontrados muy activos en el fondo del recipiente. Decantar y revisar utilizando microscopio estereoscópico con aumentos de 15 a 50X.

Referencias Bibliográficas

- Luc, M., Sikora R. A. and Bridge. 2005. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. 2nd edition. Wallingford, UK. CAB International. 871 p.
- Manzanilla-López, R.H. and Marbán-Mendoza, N. Eds. 2012. Practical Plant Nematology. Biblioteca básica de agricultura. México. 883 p.
- Shurtleff M. C. and Averre C. W. 2000. Diagnosis plant diseases caused by nematodes. APS PRESS. U. S. A. 187 p.