

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL
CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA

MANUAL DE TÉCNICAS DE PRESERVACIÓN DE NEMATODOS FITOPATÓGENOS



GOBIERNO DE
MÉXICO

AGRICULTURA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



SENASICA
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

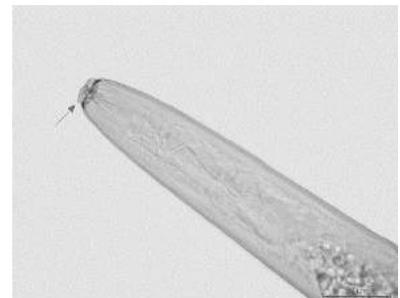
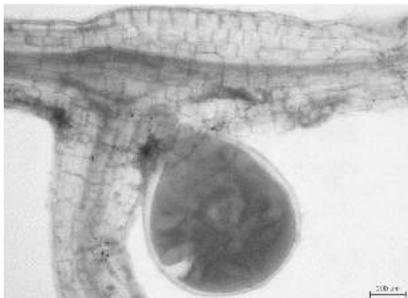
Senasica, agricultura sana para el bienestar

“Los nematodos son tan numerosos que si destruimos toda materia menos los nematodos, éstos se quedarían adoptando la forma del globo terráqueo.”

-JUAN FCO. BELTRÁN GALA-

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. Fijación de Nematodos..... | 3 |
| 1.1 Materiales..... | 4 |
| 1.2 Procedimiento de Fijación..... | 4 |
| 2. Deshidratación de Especímenes | 6 |
| 2.1 Materiales..... | 6 |
| 2.2 Procedimiento de Deshidratación..... | 7 |
| 3. Montaje de Nematodos | 9 |
| 3.1 Materiales..... | 9 |
| 3.2 Procedimiento de Montaje Temporal con Solución Robbins..... | 10 |
| 3.3 Procedimiento de Montaje Permanente con Anillo de Parafina..... | 11 |
| 4. Preservación de Material Vegetal Infestado | 14 |
| 4.1 Materiales..... | 14 |
| 4.2 Procedimiento..... | 15 |
| 5. Preservación de Poblaciones de Nematodos..... | 16 |
| 5.1 Materiales..... | 16 |
| 5.2 Procedimiento | 16 |
| REFERENCIAS | 18 |
| GLOSARIO..... | 19 |
| ANEXO 1: Soluciones..... | 21 |



INTRODUCCIÓN

Los nematodos ocupan el segundo lugar en cuanto a número de especies dentro del Reino Animal, únicamente superados por los insectos. Se estima que solo el 3% de especies de nematodos han sido descritas. Estos organismos están adaptados para vivir en diversos hábitats, desde climas extremos muy fríos, como los polos, hasta condiciones muy adversas de mínima humedad, como los desiertos.

Hasta el año 2006 se habían descrito 4,100 especies de nematodos parásitos de plantas (Decraemer y Hunt, 2006). Existen ciertas especies importantes por cultivo y por país. A nivel mundial, ocasionan pérdidas en cultivos agrícolas con un valor estimado de 80 mil millones de dólares (Jones et al., 2013).

De acuerdo con Cristín y Perrilliat (2011), la curación, es un conjunto de diversas actividades y procedimientos que buscan mantener la utilidad y accesibilidad de los ejemplares e información al corto, mediano y largo plazo, manteniendo una organización eficiente de la información y materiales curados. Por lo que la información contenida en el presente Manual sobre las técnicas de preservación de nematodos fitopatógenos, forma parte del proceso de curación de estos microorganismos.

Este Manual tiene como finalidad, proveer a los interesados en el estudio de nematodos fitopatógenos, información relacionada para realizar una adecuada preservación de los ejemplares. Estos procedimientos también pueden ser aplicados con éxito para preservar nematodos parásitos de animales, de vida libre o marinos. Las técnicas aquí descritas son aplicadas por el Laboratorio de Nematología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) para su posterior observación y resguardo.

Es importante aclarar que observar nematodos vivos o recién muertos directamente al microscopio proporciona ventajas respecto a las observaciones que se realizan con ejemplares en preparaciones permanentes, debido a que muchas estructuras internas se deterioran durante los procesos de preservación.



1. Fijación de Nematodos



Cuando una suspensión de nematodos no se puede analizar inmediatamente después de su extracción, se recomienda realizar la muerte y fijación de los especímenes. Generalmente, se pueden obtener mejores resultados si los nematodos se matan rápidamente y son fijados al instante (Van Bezooijen, 2006).

La materia viva se compone de proteínas, grasas, carbohidratos y agua, así como las proteínas que forman el esqueleto celular principal. La fijación de este tipo de proteínas es de suma importancia y sus cadenas moleculares deben interconectarse establemente durante el proceso para hacerlas insolubles. El agua, el cual se combina débilmente con las proteínas, es el solvente que primero es sustituido o removido por el fijador (Cid del Prado, et al. S/A)

Los fijadores pueden agruparse en coagulantes y no coagulantes según su acción sobre el tejido. Los fijadores coagulantes transforman a las proteínas en una mezcla opaca de sólidos de aspecto granular o reticular. Entre los fijadores coagulantes están el etanol, el ácido pírico, el cloruro mercúrico y el trióxido de cromo (Sandoval, 2005).

Mientras que los fijadores no coagulantes interaccionan con diferentes sitios químicos de las macromoléculas tisulares para establecer, a modo de puente, uniones que originan una malla que las entrelaza. Ejemplos de fijadores no coagulantes son: el tetróxido de osmio y ciertos aldehídos, principalmente, formaldehído, glutaraldehído y acroleína.

El proceso de fijación tiene la finalidad de conservar las estructuras del nematodo en un estado lo más próximo al estado vivo. Los fijadores permiten prevenir la digestión de tejidos por enzimas, tanto del propio organismo (autólisis) como de diferentes microorganismos, para idealmente detener cualquier disolución o distorsión de los tejidos. Cuando un tejido es fijado, se insolubilizan los componentes intracelulares y el material se endurece

facilitando la manipulación posterior, además de provocar un incremento en los índices de refracción a causa de la coagulación de las proteínas (Cid del Prado et al., S/A).

La muerte de los nematodos puede anteceder a su fijación, o bien, la muerte y fijación puede hacerse en un solo paso. Se recomienda evitar hervirlos debido a que sus estructuras internas podrían romperse dificultando su identificación, especialmente, cuando se realiza a nivel de especie (Manzanilla-López, 2012).

Con la finalidad de conservar lo mejor posible las estructuras internas y externas, se recomienda que la muerte de los nematodos se realice con calor moderado a 55-60 °C, directamente en la suspensión obtenida de la extracción, concentrando los especímenes en el menor volumen posible (Manzanilla-López, 2012; Cid del Prado et al., S/A).

De acuerdo con Hooper et al. (2005), el uso de formol para la fijación, puede oscurecer estructuras internas del nematodo u ocasionar una apariencia granular en los intestinos, por lo que se recomienda el uso de TAF. El fijador se debe calentar a 65-70°C, agregando 2 volúmenes a la suspensión de nematodos y mantenerlos por al menos dos semanas en el fijador para posteriormente pasar al proceso de deshidratación.

1.1 Materiales

- Baño María
- Cinta adhesiva o etiquetas
- Flotador para tubos
- TAF o Formol 8 %
- Gradilla
- Marcador permanente Termómetro
- Tubos para centrifuga de 50 MI

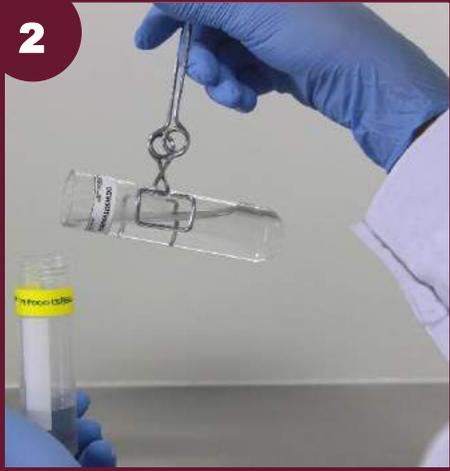
1.2 Procedimiento de Fijación

1



Colocar la suspensión de nematodos en tubos de 50 ml, dejar sedimentar por al menos una hora y reducir el volumen (5-10 mL).

2



En caso de utilizar formol, agregar un volumen al 8% para obtener una solución al 4%.



2. Deshidratación de Especímenes



Una vez fijado el material, es necesario eliminar el agua de las células y tejidos (deshidratar) ello con el fin de evitar la refringencia del material cuando se observa bajo el microscopio de luz. Esto implica sustituir el fijador por etanol al 96% para después transferirlos a soluciones que contengan diferentes proporciones de etanol, glicerina y agua destilada para así lograr una deshidratación gradual y el aclaramiento de la cutícula con la glicerina, permitiendo observar con mayor nitidez las estructuras internas (Cid del Prado, et al. S/A).

La infiltración de algunos medios a los tejidos de los nematodos requiere de un proceso previo de deshidratación. Otros medios, son miscibles en agua y a pesar de que es viable sustituir ésta de los especímenes fijados, mediante una serie gradual de matrices de fijación miscibles en agua, los mejores resultados se obtienen a través de la deshidratación seriada con etanol (Cid del Prado, et al. S/A).

2.1 Materiales

- Caja Petri de 60 x 15 mm
- Cloruro de calcio
- Desecador
- Desecador con alcohol
- Incubadora de baja temperatura
- Solución A (ver Anexo 1)
- Solución B (ver Anexo 1)
- Solución C (ver Anexo 1)

2.2 Procedimiento de Deshidratación

1



Transferir la suspensión de nematodos fijados a una caja Petri.

2



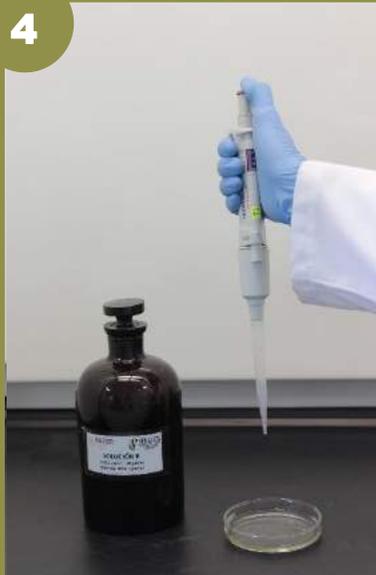
Dejar sedimentar por 2 horas y reducir el volumen a 30%. Agregar solución A hasta un 80% de capacidad de la caja Petri.

3



Depositar la caja Petri con solución A en un desecador con alcohol al 96% y colocarlo en la incubadora a 40°C.

4



Después de 2 a 3 días, remover la solución A y añadir solución B. Mantener la caja Petri semiabierta a temperatura ambiente.



5

Reemplazar la solución B por la solución C y mantener la caja Petri semiabierta a temperatura ambiente.



6

Cuando la mayor parte del etanol se haya evaporado, transferir la caja Petri a una estufa o incubadora a 40°C por 2 días.



7

Colocar la caja Petri abierta dentro de a un desecador con cloruro de calcio.



8

Después de haber permanecido al menos una semana en deshidratación, realizar los montajes permanentes de los especímenes en glicerina pura deshidratada.

NOTA: para evitar la deformación o distorsión de los ejemplares, se recomienda no utilizar estufas, hornos o incubadoras para acelerar la deshidratación. El proceso debe ser gradual y lento para obtener mejores resultados (Cid del Prado, et al. S/A). Un indicador para saber el momento de añadir la solución B, en el paso cuatro, es cuando la caja Petri desprende olor a alcohol.



Los nematodos frescos (recién muertos) se pueden identificar y estudiar fácilmente en un montaje temporal. En este tipo de montaje, algunas estructuras como: estilete, esófago y las aberturas naturales como poro excretor, ano y vulva pueden observarse con mayor facilidad en comparación al analizar nematodos fijados en preparaciones permanentes (Bezooijen, 2006).

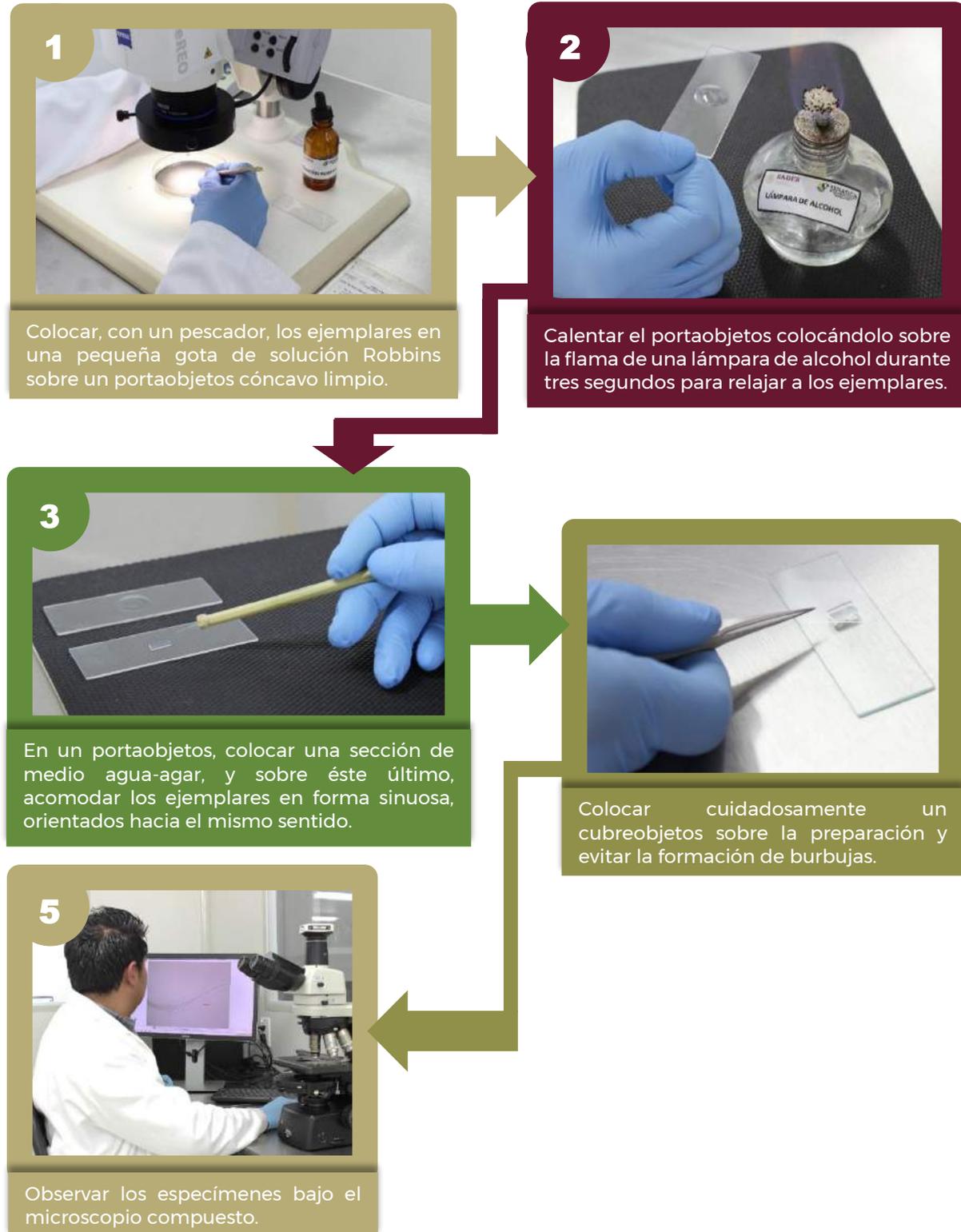
Las preparaciones permanentes deben estar selladas para evitar la evaporación de los medios de montajes y la subsecuente desecación de los especímenes. El sellado se realiza con parafina (grado histopatología) o esmalte de uñas. El método del anillo de parafina consiste en colocar los nematodos en el centro de una pequeña gota de glicerina, como medio de montaje, rodeado por un anillo de parafina que sirve como soporte y sellado de la preparación. Se coloca un cubreobjetos redondo de 18 mm de diámetro sobre el anillo de parafina y se calienta en una placa térmica a 65 °C durante unos segundos. La parafina se derrite, lo que permite que el cubreobjetos se asiente, manteniendo la glicerina y los especímenes en el centro del montaje (Manzanilla-López, 2012).

3.1 Materiales

- Cubreobjetos
- Parafina (grado histopatología)
- Esmalte de uñas
- Lámpara de alcohol
- Microscopio
- Pescador (es)
- Pinzas
- Placa térmica
- Portaobjetos
- Sacabocados

- Solución Robbins (ver Anexo 1)

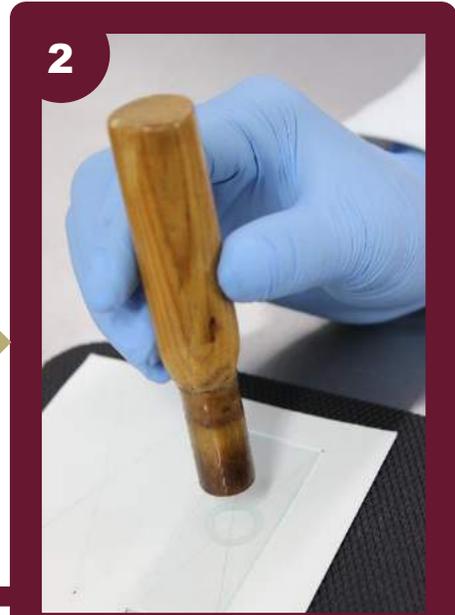
3.2 Procedimiento de Montaje Temporal con Solución Robbins



3.3 Procedimiento de Montaje Permanente con Anillo de Parafina



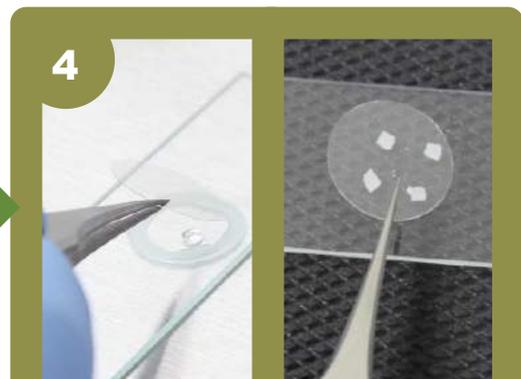
1
Calentar el sacabocados en la flama de la lámpara de alcohol e inmediatamente colocarlo sobre la parafina sólida.



2
Colocar el borde del sacados sobre el portaobjetos para formar un anillo de parafina de diámetro aproximado de 1.5 cm.



3
Colocar una gota de glicerina deshidratada en el centro del anillo de parafina. Los ejemplares deben colocarse con un pescador limpio en el fondo de la gota.



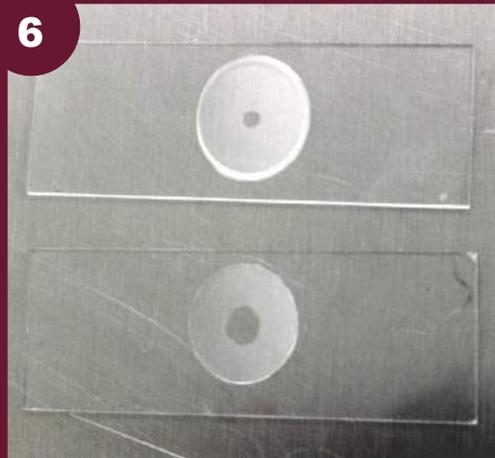
4
Colocar, un cubreobjetos redondo (18 mm de diámetro,) sobre el anillo de parafina.

5



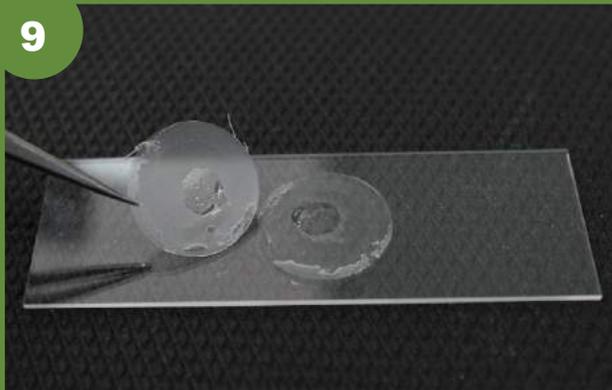
Colocar la preparación sobre una placa térmica a 90°C para fundir la parafina y obtener el sellado.

6



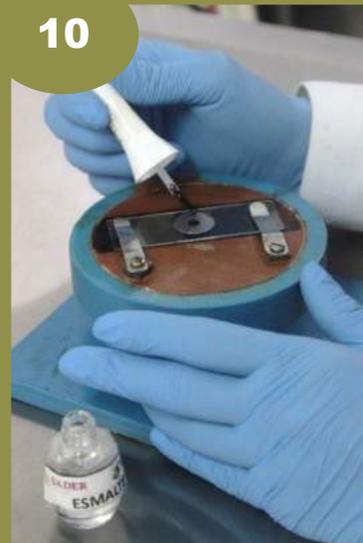
Depositar la preparación sobre una superficie fría para que solidifique la parafina y posteriormente quitar el excedente de ésta.

9



Revisar la disposición final de los ejemplares y el sellado para cumplir con la calidad establecida. De ser necesario, retirar el cubreobjetos, rescatar los ejemplares y rehacer el montaje.

10



Colocar una capa de esmalte de uñas en el borde del cubreobjetos para un sellado extra.



Etiquetar la preparación. Se sugiere considerar datos como: origen, coordenadas geográficas, colector, nombre científico, hospedante, número y sexo de los especímenes, entre otros.



Resguardar las preparaciones dentro de gavetas especiales.

Nota: una alternativa al anillo de cera, mencionada en el paso dos de este procedimiento, es colocar secciones pequeñas de parafina (tres o cuatro) alrededor de la gota de glicerina deshidratada (ver imagen paso 4).

4. Preservación de Material Vegetal Infestado



Los nematodos pueden establecerse sobre diversos tipos de tejidos vegetales como: raíces, tallos, bulbos, tubérculos, hojas, granos, semillas, entre otros. En la mayoría de los casos la mejor manera de conservar el material vegetal infestado es utilizando un fijador no coagulante como el formaldehido y sus variantes (Anexo 1).

Sin embargo, para semillas y bulbos (ajo, específicamente), al contener nematodos en dormancia, se recomienda mantenerlos a temperatura ambiente, sin ningún fijador pero dentro de frascos debidamente etiquetados. De igual forma se conservan los nematodos formadores de quistes.

4.1 Materiales

- Cajas Petri
- Etiquetas
- Formaldehido 7-10%
- Frascos
- Tamiz
- Agua

4.2 Procedimiento





5. Preservación de Poblaciones de Nematodos

Mantener una colección de material biológico vivo resulta de gran importancia debido a que puede utilizarse para diferentes actividades como: capacitaciones, evaluaciones técnicas, así como para trabajos de investigación e intercambio con otras instituciones de material vivo o DNA.

5.1 Materiales

- Macetas
- Plántulas sanas de jitomate
- Suelo infestado o masas de huevos
- Suelo o sustrato estéril

5.2 Procedimiento

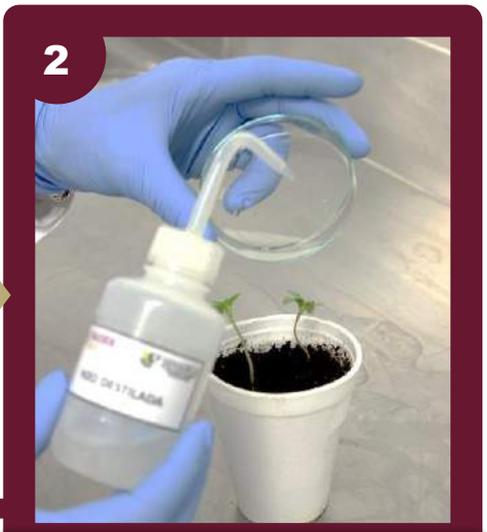
Cuando se cuenta con la identidad del nematodo detectado por medio de morfología, morfometría y técnicas moleculares como PCR, RFLPs y en algunos casos secuenciación; se procede a realizar la inoculación en plántulas sanas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) sobre sustrato estéril utilizando juveniles J2 obtenidos de raíces agalladas enjuagadas con hipoclorito de sodio al 1% por 4 minutos y los huevos incubados en agua destilada estéril a 24°C (Hussey y Barker, 1973) o trasplantando plántulas sanas en el suelo contaminado. Transcurridos el mes o dos meses después de la inoculación, verificar la presencia de agallas con la intención de corroborar el establecimiento de la población en el hospedante.

Con la población establecida, realizar la purificación por medio de la extracción de sólo una masa de huevos y realizar la desinfección e incubación con las condiciones descritas en el párrafo anterior para, posteriormente, inocular los juveniles J2 obtenidos en una plántula sana de jitomate. Se recomienda realizar la inoculación una semana después de la emergencia de la plántula.

Las plantas deben mantenerse en óptimas condiciones, realizando podas y riegos necesarios para conservar la humedad del suelo o sustrato, evitando el exceso de agua porque puede ocasionar pudrición de raíces y muerte de plantas.



1 Separar la masa de huevos, enjuagarla con cloro 1% e incubar para obtener juveniles J2.



2 Inocular plántulas de jitomate con suspensión de juveniles J2.



3 Etiquetar las macetas con los datos: especie del nematodo, especie del hospedante y la fecha de inoculación.

REFERENCIAS

- Baker, J. R. (1958). **Principles of biological microtechnique**. A study of fixation and dyeing. Great Britain, London: Richard Clay and Company Ltd.
- Cid del Prado, I. Manzanilla-Lopez, R. y Franco-Navarro, F. (Sin año). **Manual de Prácticas de Laboratorio: Muerte, fijación y deshidratación de nematodos fitopatógenos**. COLPOS. Texcoco, Edo. México. 41-51 p.
- Cristin, A., y Perrilliat, M. del C. (2011). Las colecciones científicas y la protección del patrimonio paleontológico. Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana. 63(3): 421-427.
- Decraemer, W., and Hunt, D. J. (2006). **Structure and classification**. In: Perry, R. N., and Moens, M. (Eds). *Plant Nematology*, CAB International. Wallingford, Oxfordshire. pp: 3-32.
- Hooper, D.J., Hallmann, J., and Subbotin, S.A. (2005). Methods for extraction, processing and detection of plant soil nematodes. In: Luc, M, Sikora, R.A. and Bridge, J. (Eds.). *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, 2nd edition. Pp: 53-86. UK: CAB International.
- Hussey, R. S. and Barker, K. R. (1973). **A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne spp.*, including a new technique**. *Plant Dis. Repr.* 57 (12): 1025-1028.
- Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G. J., Gaur, H., Helder, J., Jones, M. G. K., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J. E., Wesemel, W. M. L. and Perry, R. (2013). Top 10 plant parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 14 (9): 946-961.
- Manzanilla-Lopez, R. H. (2012). **Methodology and symptomatology**. In: Manzanilla-López, R. H. and N. Marbán-Mendoza, (Eds). *Practical Plant Nematology*, BBA. México. pp: 89-129.
- Sandoval, Z. E. (2005). **Técnicas Aplicadas al Estudio de la Anatomía Vegetal**. Cuadernos del Instituto de Biología 38. UNAM. Mexico. pp 35-44.
- Van Bezooijen. J. (2006). **Methods and techniques for nematology**. En línea: <http://www.nematologia.com.br/files/tematicos/5.pdf> .

GLOSARIO

A.....

Autolisis: proceso biológico en el cual una célula se autodestruye porque está dañada o para prevenir un daño mayor. Es inducido por procesos celulares como radiación o por daños severos en los tejidos, por ejemplo, la necrosis.

C.....

Coagulación de proteínas: es un proceso irreversible y se debe a su desnaturalización por los agentes que destruyen las estructuras secundarias y terciarias.

D.....

Dormancia: período en el ciclo biológico de un organismo en el que el crecimiento, desarrollo y actividad física se suspenden temporalmente. Esto reduce drásticamente la actividad metabólica permitiendo que el organismo conserve energía.

E.....

Espécimen: en el contexto de nematología, es un ejemplar o individuo, que puede ser juvenil, hembra o macho.

I.....

Incubación: es el proceso mediante el cual el embrión se desarrolla y se convierte en su primera etapa juvenil. Tiene por objeto suministrar a los huevos la temperatura, la aireación y la humedad necesaria para eclosión de los juveniles J2.

Índices de refracción: es el cociente de la velocidad de la luz en el vacío(c) y la velocidad de la luz en el medio (v), se simboliza con la letra n. Es un valor adimensional.

Infiltrar: introducir un líquido a presión en el interior de un cuerpo sólido.

Inoculación: es la introducción de microorganismos vivos, muertos o atenuados, en un organismo de forma accidental o voluntaria.

M.....

Miscible: habilidad de dos o más sustancias líquidas para mezclarse entre sí y formar una o más fases.

Montaje: proceso en cual se coloca un espécimen muerto o vivo para su observación al microscopio.

P.....

Pescador: herramienta utilizada para la separar y atrapar a los nematodos de interés.

Protoplasma: parte de la célula que está limitada por la membrana citoplasmática e incluye el citoplasma y el núcleo.

Q.....

Quiste: estructura de resistencia de nematodos. Es el cuerpo una hembra de nematodo heteroderido que al llegar a la etapa avanzada de su madurez reproductiva endurece su epidermis, previo a su muerte, con la finalidad de proteger sus huevos contenidos en su interior.

R.....

Refringencia: propiedad de hacer cambiar la dirección de un rayo de luz al pasar oblicuamente de un medio a otro de diferente velocidad de propagación.

ANEXO 1: Soluciones

✿ FA 4:1 o 4:10 (FORMALDEHIDO- ÁCIDO ACÉTICO)

| | |
|------------------------------|----------------|
| Formaldehído 37 % | 10.8 mL |
| Ácido acético glacial | 1 o 10 mL |
| Agua destilada | 88.2 o 79.2 mL |

El ácido acético neutraliza el efecto de encogimiento causado por la formalina. La desventaja de esta mezcla (especialmente 4:10) es que los nematodos se vuelven marrones y la parte posterior del estilete se transparenta. Este fijador puede usarse para períodos largos de almacenamiento, pero es mejor si se adiciona formaldehído al 4% después de que se matan con FA 4:1 (Van Bezooijen, 2006).

✿ TAF (TRITANOLAMINA-FORMALDEHIDO)

| | |
|-------------------------|-------|
| Formaldehído 40% | 7 mL |
| Trietanolamina | 2 mL |
| Agua destilada | 91 mL |

✿ FAA (FORMOL-ÁCIDO ACÉTICO-ALCOHOL)

| | |
|------------------------------|--------|
| Alcohol etílico 96% | 100 mL |
| Formaldehído 40% | 30 mL |
| Ácido acético glacial | 5 mL |
| Agua destilada | 200 mL |

Debido al alcohol, el FAA tiene efecto deshidratante, lo que puede ser de útil para hacer más visibles las anulaciones o las hendiduras naturales de los nematodos.

✿ FORMOL 8%

| | |
|-------------------------|-------|
| Formaldehído 40% | 20 mL |
| Agua destilada | 80 mL |

El formol en soluciones diluidas, se usa para fijar nematodos, pero los ejemplares tienden a oscurecerse y hacerse granulados con el tiempo. La adición de una pizca de CaCO₃ neutraliza el ácido fórmico libre y puede prevenir la granulación. Con frecuencia los músculos se observan claramente en especímenes muertos y fijados mediante la adición de formol caliente (Baker, 1958).

✿ SOLUCIÓN A

| | |
|-----------------------|-------|
| Etanol 96% | 20 mL |
| Glicerina | 1 mL |
| Agua destilada | 79 mL |

✿ **SOLUCIÓN B**

| | |
|-------------------|-------|
| Etanol 96% | 93 mL |
| Glicerina | 7 mL |

✿ **SOLUCIÓN C**

| | |
|-------------------|-------|
| Etanol 96% | 80 mL |
| Glicerina | 20 mL |

✿ **SOLUCIÓN ROBBINS**

| | |
|-------------------------|-------|
| Formaldehido 37% | 20 mL |
| Glicerina | 1 mL |
| Agua destilada | 79 mL |

DIRECTORIO

Dr. Víctor Manuel Villalobos Arámbula
SECRETARIO DE SADER

SENASICA

Dr. Francisco Javier Trujillo Arriaga
DIRECTOR EN JEFE DEL SENASICA

Ing. Francisco Ramírez y Ramírez
DIRECTOR GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

Dr. José Abel López Buenfil
DIRECTOR DEL CENTRO NACIONAL REFERENCIA FITOSANITARIA

M. en C. José Gustavo Torres Martínez
SUBDIRECTOR DE DIAGNÓSTICO FITOSANITARIO

Elaborado por:

Laboratorio de Nematología
Biól. Carlos Omar Medina Molina
M. en C. Japhet Torres López

Revisión:

Grupo DiaFi
M. en C. Leonel Rosas Hernández

Fotografía:

Las fotografías que ilustran este manual fueron tomadas por personal técnico del Grupo DiaFi y el Laboratorio de Nematología.

Diseño y Edición:

Grupo DiaFi
M. en C. Ariana G. Robles Zárate

Forma recomendada de citar:

Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). (2019). *Manual de Técnicas de Preservación de Nematodos Fitopatógenos* [Versión 1.0]. Tecámac, México: Autor.

www.gob.mx/sader

www.gob.mx/senasica

 **SENASICA SADER**

 **@SENASICA**

 **SENASICA SADER**

"Este programa es público, ajeno a cualquier partido político.
Queda prohibido el uso para fines distintos a los establecidos en el programa".