

**III Simposio GEDDI
Toledo, 2018**

Conservación de poblaciones de nematodos fitopatógenos

**Juan Emilio Palomares Rius
Instituto de Agricultura Sostenible,
CSIC, Córdoba**

INSTITUTO DE
AGRICULTURA
SOSTENIBLE



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

PUNTOS A TRATAR

- Relación entre características morfológicas y moleculares (identificación-taxonomía integrativa).
- Colecciones de individuos tipo-topotipos.
- Tipos de alimentación.
- Alimentación alternativa.
- Grupos específicos.
- Otras alternativas (criopreservación...).

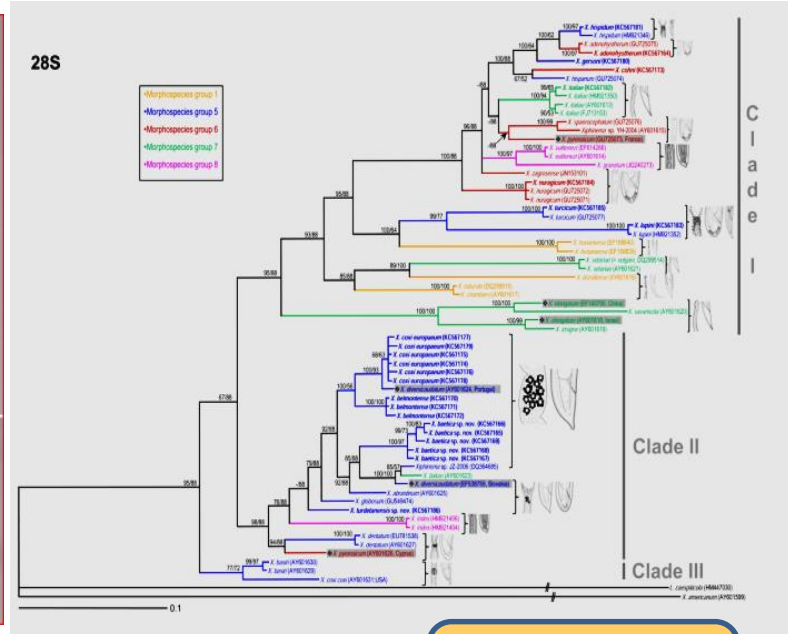
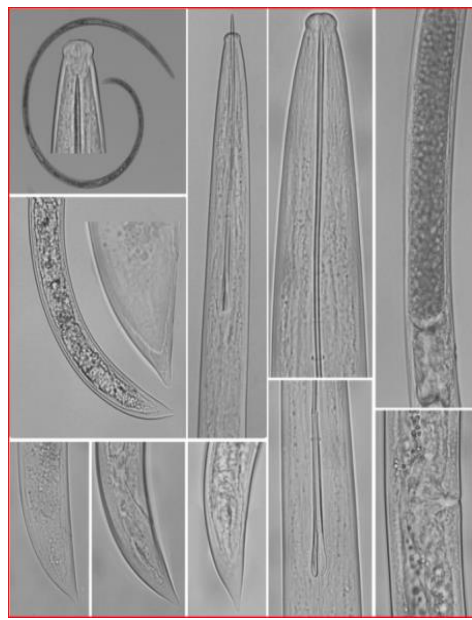
ESPECIES CRÍPTICAS: casi idénticas morfológicamente, pero genotípicamente muy diferentes

Complejidad en el diagnóstico

ESPECIES CRÍPTICAS

Homogeneidad morfológica y plasticidad fenotípica

Elevada diversidad



Identificación correcta

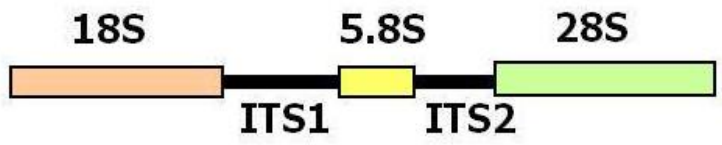
Estrategías en el manejo Integrado

Taxonomía Integrativa

Criterios polifásicos

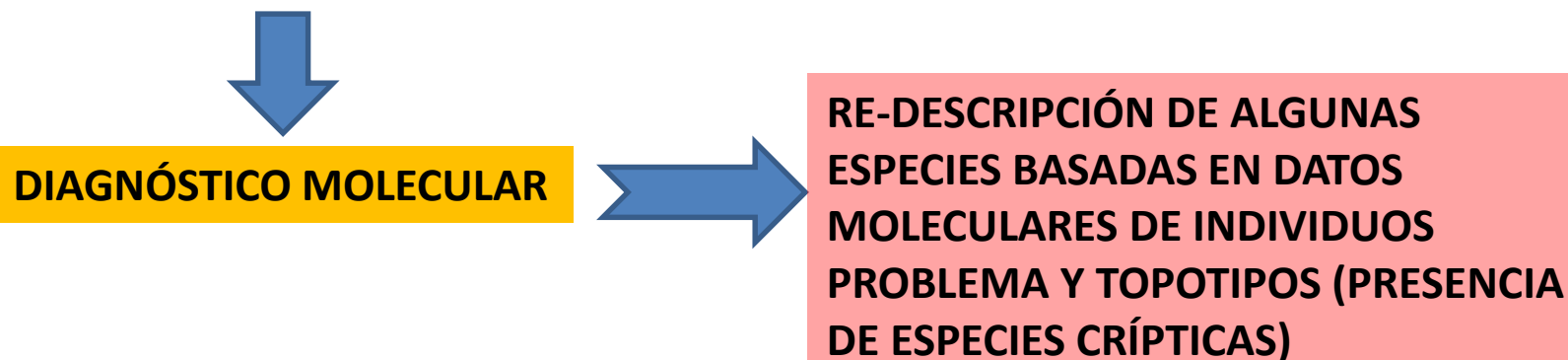
Morfométrico / molecular

Ecológico / biológico



ESPECIES CRÍPTICAS: casi idénticas morfológicamente, pero genotípicamente muy diferentes

- ❑ **HOLOTIPO:** un miembro de la serie tipo (generalmente el mejor preservado, en el que el concepto de nueva especie está preservado y preferentemente ilustrado en la descripción).
- ❑ **PARATIPO:** el resto de especímenes usados en la descripción de la nueva especie.
- ❑ **TOPOTIPO:** especímenes de la especie objetivo localizados en el lugar exacto de la localidad tipo donde se describió la especie (los paratipos y holotipo).
- ❑ Los **TOPOTIPOS** se deben medir y confirmar que es la especie objetivo, para evitar errores en el caso de mezcla y/o introducción/cambio de especies en la localidad tipo.

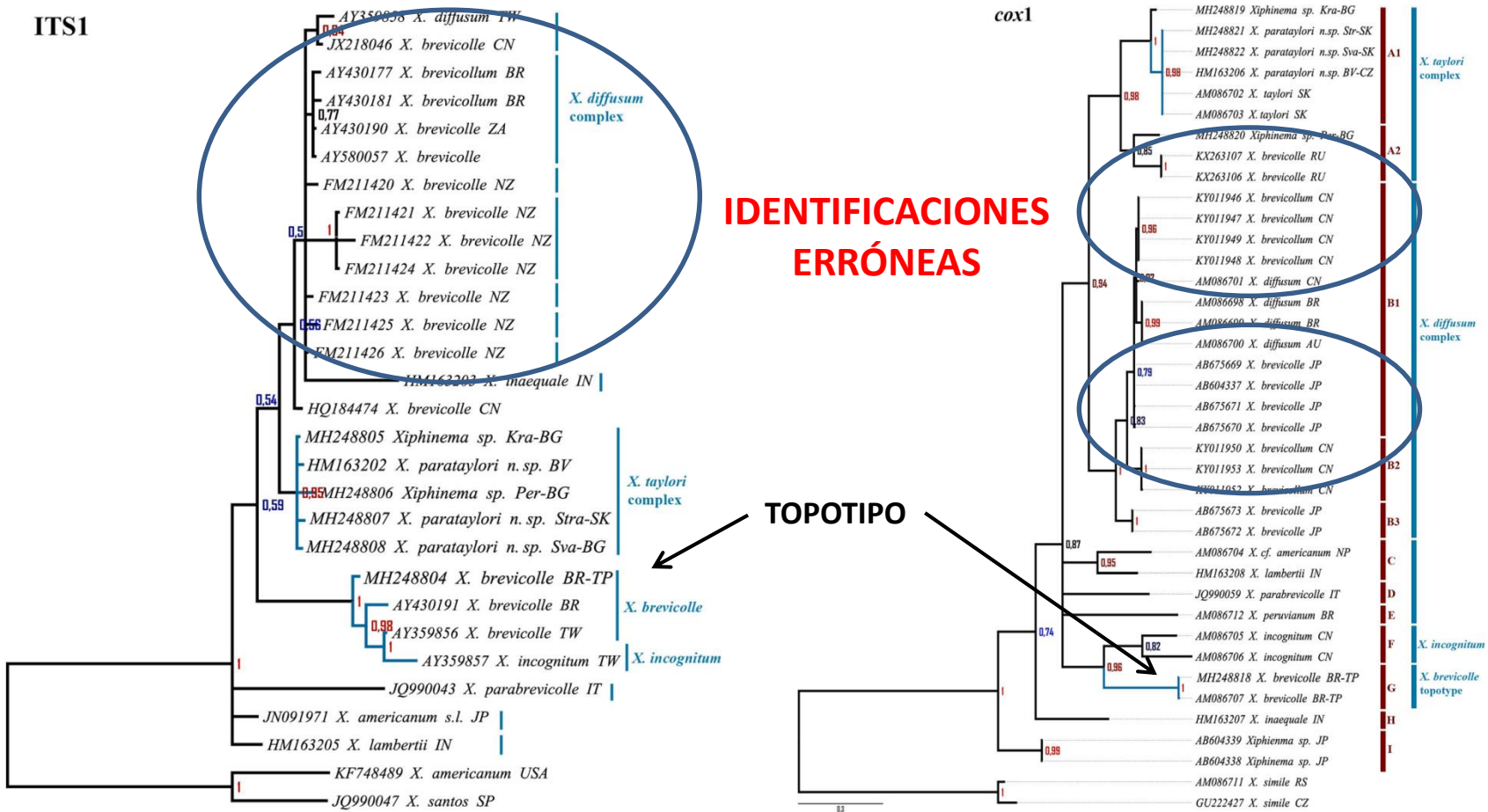


➤ **EJEMPLO: GRUPO *X. BREVICOLLE***

ESPECIES CRÍPTICAS: casi idénticas morfológicamente, pero genotípicamente muy diferentes

➤ **EJEMPLO: GRUPO *X. BREVICOLLE* (GR. *AMERICANUM*)**

Varios marcadores moleculares-identificación morfológica-morfométrica



- Diversos laboratorios de referencia y colecciones reconocidas.
- Generados en la descripción de especies nuevas.
- Nematodos tipo **fijados y embebidos en glicerina**
→ **montajes permanentes.**
- >30 años pueden estar en malas condiciones.
- Se suelen ceder temporalmente.
- Laboratorios: USDA, Ghent, WaNeCo
Wageningen, CNR-Bari, MNCN-CSIC, IAS-CSIC,...

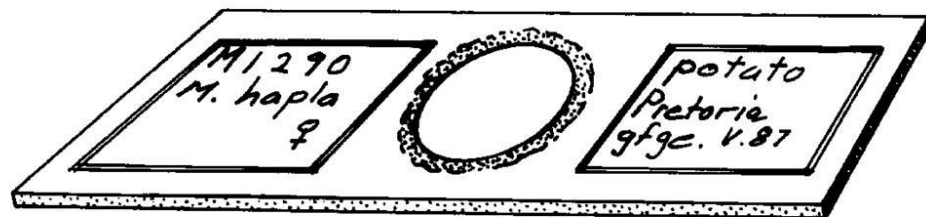


Table 1 Methods for the extraction of plant-parasitic nematodes from plant and soil samples currently included in EPPO Diagnostic Protocols

Plant samples

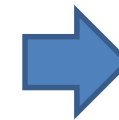
Motile nematodes	Baermann funnel/Oostenbrink dish, mistifier, incubation of plant parts
Motile and immotile nematodes	Direct examination, maceration and filtration, maceration and centrifugal flotation, enzymatic digestion

Soil samples

Motile nematodes	Baermann funnel/Oostenbrink dish, flotation and sieving, Flegg modified Cobb technique, Oostenbrink elutriator
Motile and immotile nematodes	Centrifugal flotation

Cysts from soil

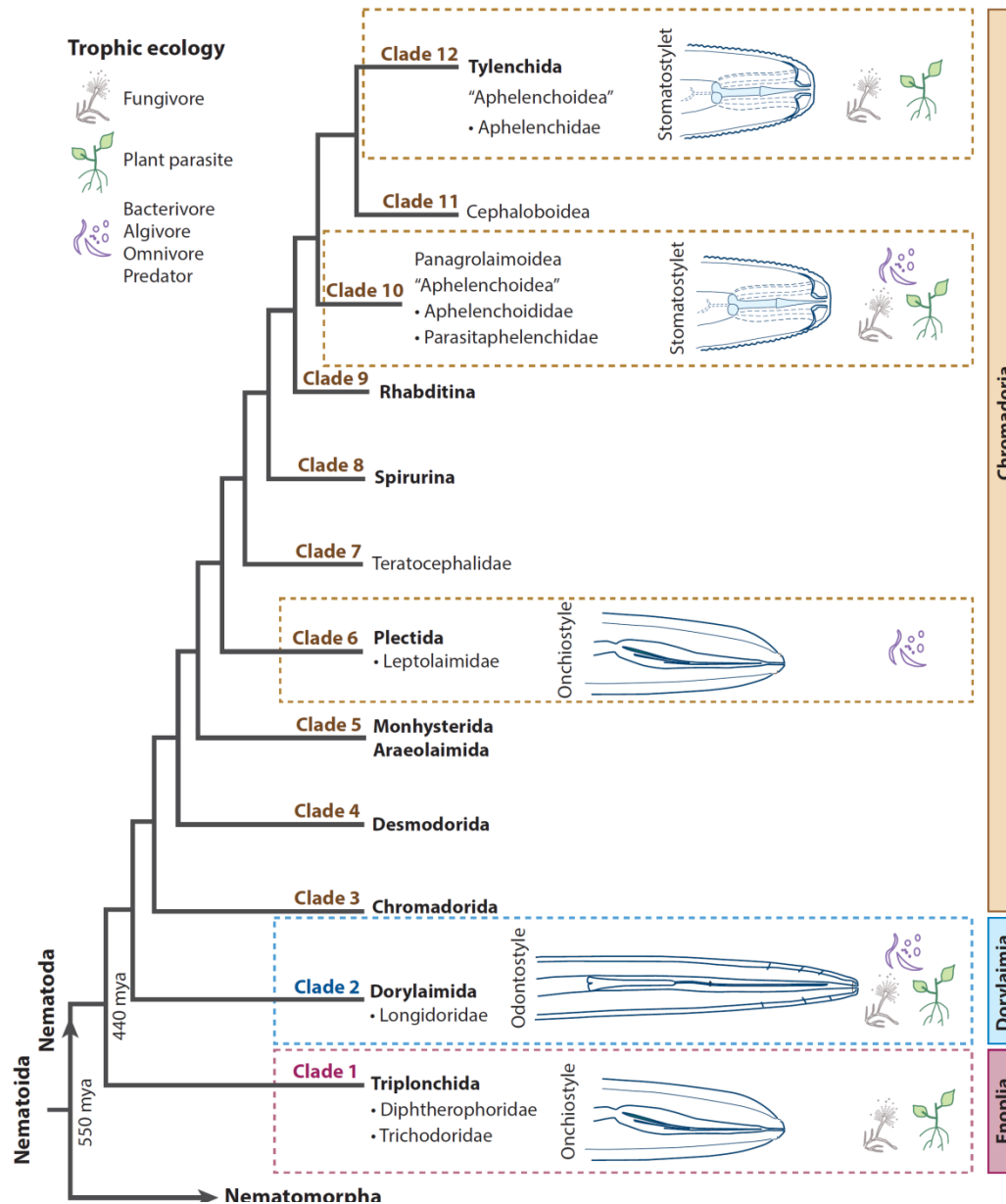
Dried soil	Baunacke method, paper strip method, Fenwick can, Schuiling centrifuge
Wet or dried soil	Seinhorst elutriator, centrifugal flotation, Wye washer



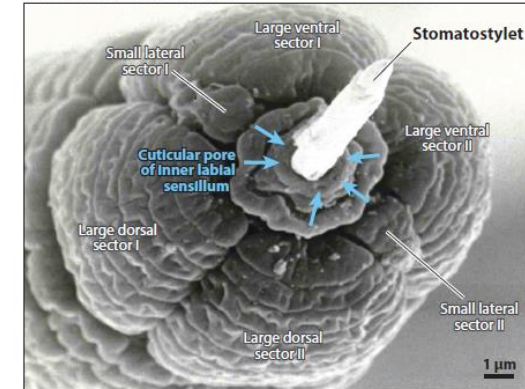
**MÉTODOS QUE
GARANTICEN LA
SUPERVIVENCIA DE
NEMATODOS**

**Atención con el
transporte de
muestras!!!**

TIPOS DE ALIMENTACIÓN



Belonolaimus longicaudatus



**TALLO
HOJAS
FLORES**

Anguina
Aphelenchoides
Bursaphelenchus
Ditylenchus

RAÍZ

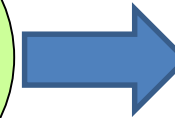
Meloidogyne
Pratylenchus
Heterodera
Globodera
Xiphinema
Tylenchulus
Rotylenchulus
Criconemoides
Helicotylenchus



estilete

**TALLO
HOJAS
FLORES**

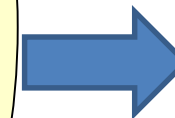
Aphelenchoides
Bursaphelenchus
Ditylenchus



Solo algunas especies de este grupo se pueden multiplicar sobre placa con cultivo fúngico/o sobre material vegetal

RAÍZ

Anguina
Meloidogyne
Pratylenchus
Heterodera
Globodera
Xiphinema
Tylenchulus
Rotylenchulus
Criconemoides
Helicotylenchus



Siempre sobre material vegetal

FORMAS DE SUPERVIVENCIA NEMATODOS

- DESHIDRATACIÓN
- QUIESCENCIA/DIAPAUSA
- DAUER
- CONGELACIÓN

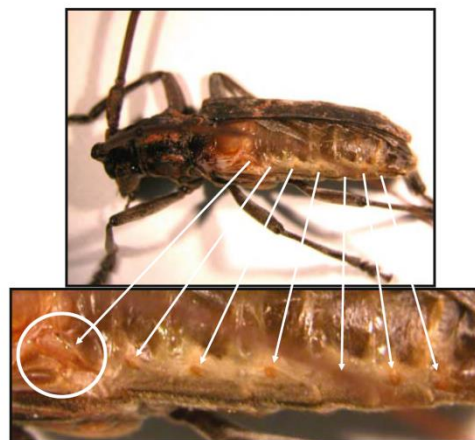


<https://www.bioscripts.net/zoowiki/temas/15C.html>

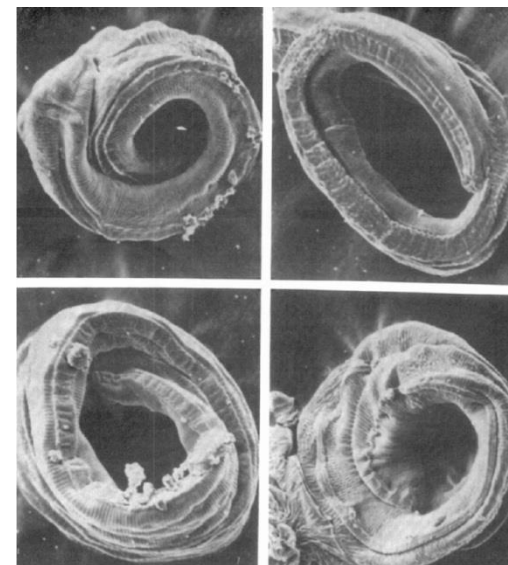
Quistes (*Globodera*-*Heterodera*)



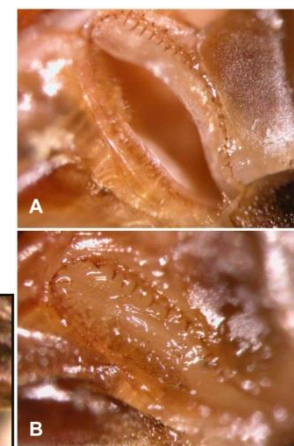
D. dipsaci "lana de nematodo"



Espiráculo en *M. alternatus*-
dauer *B. xylophilus*



Pratylenchus thornei
deshidratados (Glazer and
Orion, 1983)



Aikawa, 2008

ESTRUCTURAS VEGETALES



Aphelenchoides ritzemabosi



Ditylenchus dipsaci

- ALGUNAS ESPECIES.
- MANTENIMIENTO LIMITADO, PRINCIPALMENTE A SEMILLAS.
- BULBOS → PROBLEMAS CON CONDENSACIÓN DE AGUA EN FRÍO



Anguina tritici en granos de trigo



Aphelenchoides besseyi en granos de arroz

EXAMPLES OF NEMATODE SURVIVAL, SHOWING SPECIALIZATION IN VARIOUS STAGES OF THE LIFE CYCLE

Species	Longevity	Conditions	Reference
Eggs ←			
<i>Ascaris lumbricoides</i> (AP) ^a	5 yr	Moist soil	81
<i>Heterodera rostochiensis</i> (PP) ^b	8 yr	Field soil	44
<i>H. schachtii</i> (PP)	6-7 yr	Field soil	107
<i>H. glycines</i> (PP)	4-5 yr	Field soil	94
<i>Nematodirus filicollis</i> (AP)	20 mo	Dried dung	16
<i>N. spathiger</i> (AP)	2 yr	Dried dung	110
Eggs or 2nd-stage larvae ←			
<i>Meloidogyne incognita acrita</i> (PP)	1 yr	Specially prepared soil	9
<i>M. javanica</i> (PP)	6 mo	Field soil	105
<i>Tylenchulus semipenetrans</i> (PP)	3-10 yr	Field soil	6
2nd-Stage larvae ←			
<i>Anguina agrostis</i> (PP)	3-6 yr	Dried plant material	28
<i>A. tritici</i> (PP)	27-28 yr	Dried plant material	42
3rd-Stage larvae			
<i>Bursaphelenchus fungivorus</i> (FL) ^a	—	Dried agar	45
<i>Cheilobus quadrilabialis</i> (FL)	—	Dried to insects	17
<i>Diplogaster stercoralis</i> (FL)	—	Dried to insects	17
<i>Eustrongylides ignotus</i> (AP)	4 yr	In vitro	124
<i>Rhabditis dubia</i> (FL)	—	Dried to insects	17
<i>Naemonchus contortus</i> (AP)	7 mo	Soil	18
<i>Nematodirus spathiger</i> (AP)	1 yr	Dried on glass slide	110
<i>Nippostrongylus muris</i> (AP)	4½ yr	Dried on glass slide	58
<i>Neoaplectana bibionis</i> (AP)	12 mo	Tap water	17
<i>Ostertagia circumcincta</i> (AP)	9 mo	Tap water	47
<i>Trichostrongylus axei</i> (AP)	8 mo	Tap water	101
4th-Stage larvae ←			
<i>Ditylenchus dipsaci</i> (PP)	20-23 yr	Dried plant material	42
<i>Paratylenchus dianthus</i> (PP)	4½ yr	Dry soil	86
<i>P. projectus</i> (PP)	2 yr	Dry soil	86
Adults ←			
<i>Criconomoides xenoplax</i> (PP)	2 mo	Specially prepared soil	104
<i>Hemicylichophora arenaria</i> (PP)	6 mo	Specially prepared soil	115, 116
Unspecified			
<i>Adinolaimus hintoni</i> (FL)	10 yr	Dried mud	66
<i>Aphelenchoides ritzemabosi</i> (PP)	3 yr	Dried plant material	46
<i>Ditylenchus myceliophagus</i> ^c (PP)	3 yr	Dried	20
<i>D. trifurmis</i> (PP)	2½ yr	Dried	54

TABLE I (Continued)

Species	Longevity	Conditions	Reference
<i>Dorylaimus keilini</i> (FL)	10 yr	Dried mud	66
<i>Longidorus elongatus</i> (PP)	29 mo	Specially prepared soil	50
<i>Helicotylenchus nannus</i> (PP)	6 mo	Specially prepared soil	41
<i>H. microlobus</i> (PP)	4½ mo	Frozen soil	102
<i>Plectus</i> sp., <i>Dorylaimus</i> sp. and <i>Cephalobus</i> sp. (FL)	2 yr	Dried moss	58
<i>Pratylenchus crenatus</i> (PP)	29 mo	Specially prepared soil	50
<i>P. brachyurus</i> (PP)	21 mo	Specially prepared soil	39
<i>Radopholus similis</i> (PP)	9-14 mo	Field soil	48
<i>Tylenchus balsamophilus</i> (PP)	24 yr	Dried plant material	42
<i>T. polyhypnus</i> (PP)	39 yr	Dried plant material	100
<i>Tylenchorhynchus claytoni</i> (PP)	10 mo	Specially prepared soil	64
<i>T. dubius</i> (PP)	29 mo	Specially prepared soil	50
<i>Xiphinema index</i> (PP)	4 yr	Field soil	85
Specialised features			
<i>Panagrellus silusiae</i> (FL)		Eggs and larvae survive in dead adult "endothic parasitica"	67
<i>Trichotylenchus falciformis</i> (FL)		Larvae and adults in cocoon-like structures in dried mud	27

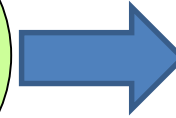
^a AP (animal parasitic)

^b PP (plant parasitic)

^c FL (free living)

**TALLO
HOJAS
FLORES**

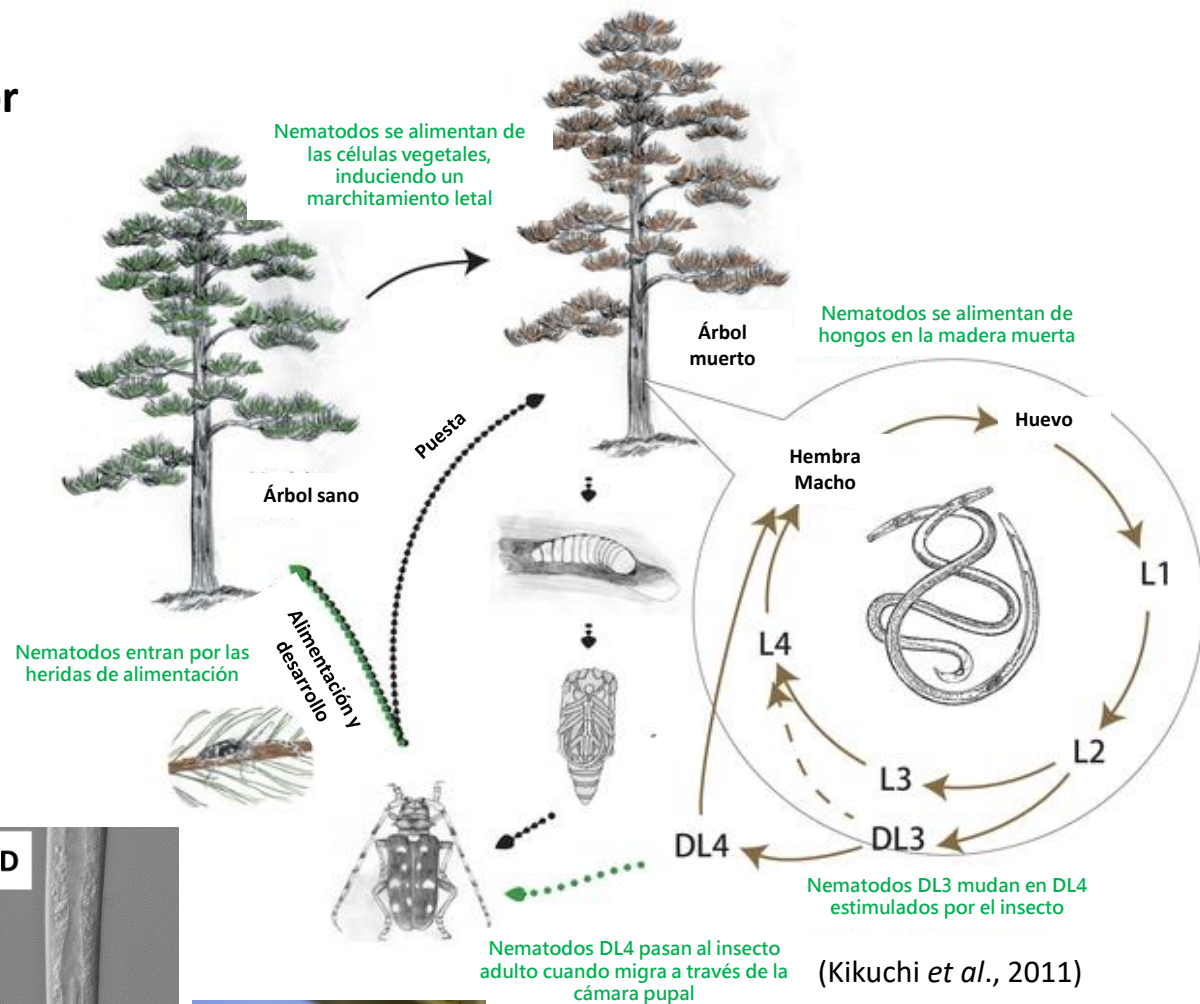
Aphelenchoides
Bursaphelenchus
Ditylenchus



Solo algunas especies
se pueden
multiplicar sobre
placa con cultivo
fúngico/o sobre
planta

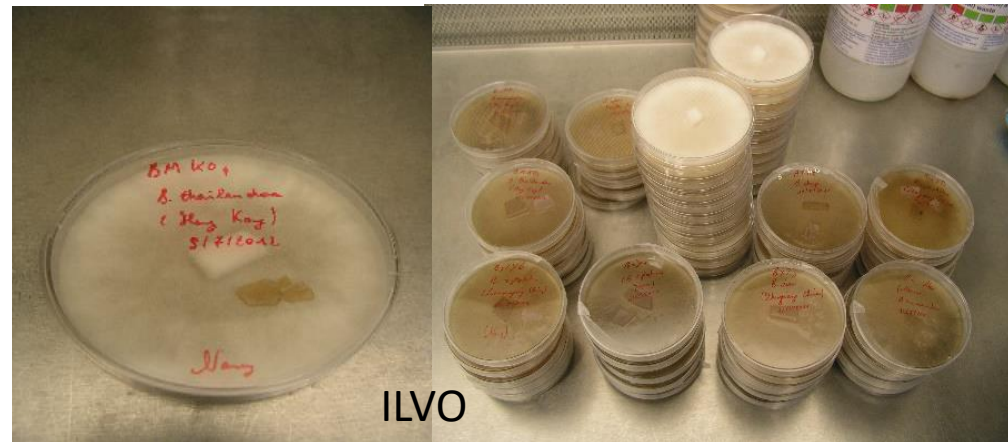
- **ATENCIÓN POSIBLE PÉRDIDA DE PATOGENICIDAD O SELECCIÓN EN LAS POBLACIONES**

- Ciclo complejo pasando por diversos estadios y diferentes tipos de alimentación



Monochamus alternatus

1. Esterilizar cebada perlada con agua / medio fúngico (PDA).
2. Inocular cultivo hongo (*Botrytis cinerea* u otros hongos) hasta crecimiento del hongo inicial.
3. Nematodos con 100 mg/ml streptomycin y 25 mg chloramphenicol), (nematodos naturales tal vez esterilización más fuerte).
4. Incubación a 25 °C para el crecimiento de la población.
5. Mantenimiento a 4 °C.
6. Renovación cada 4-5 meses.

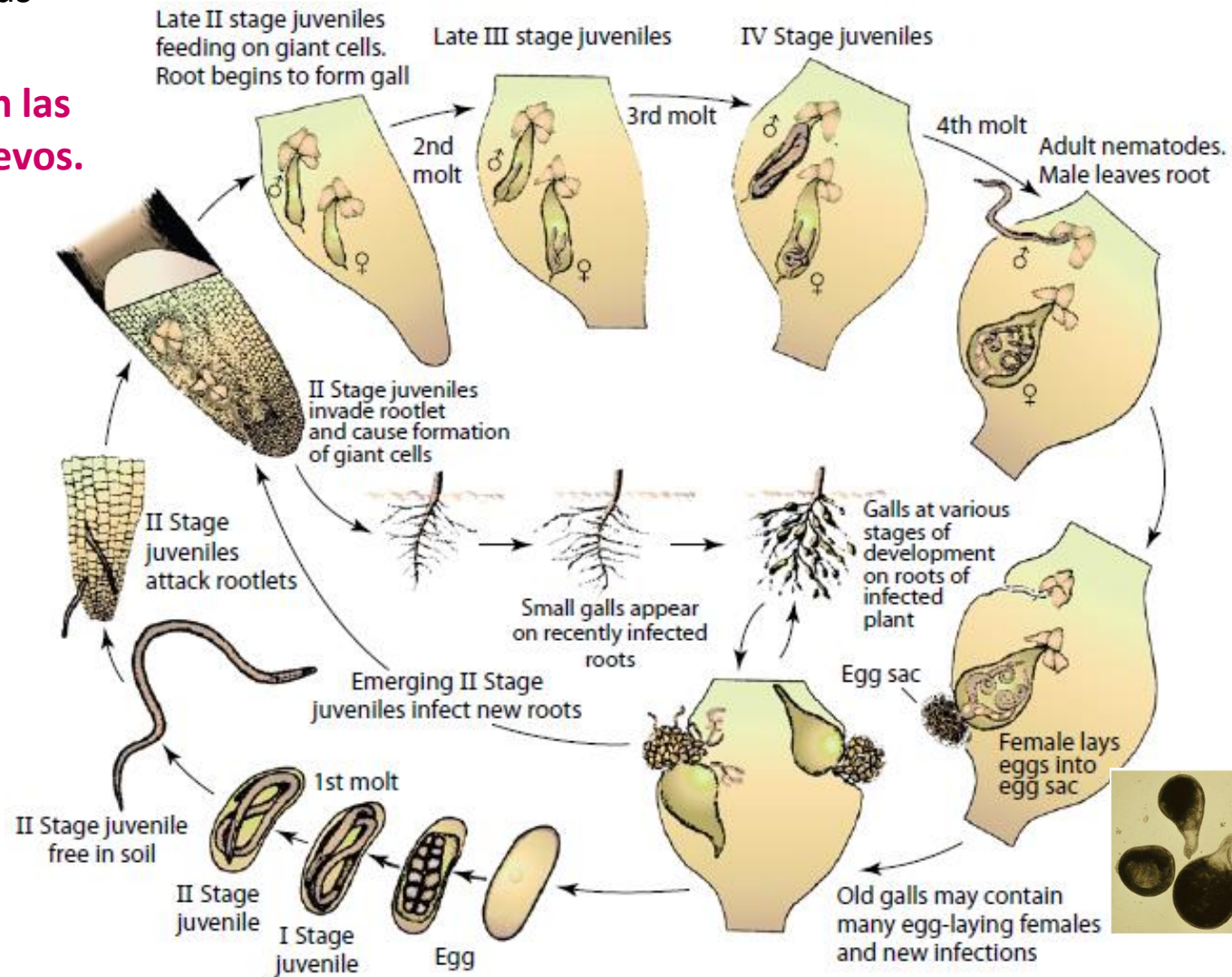


ILVO; Kikuchi et al., 2011

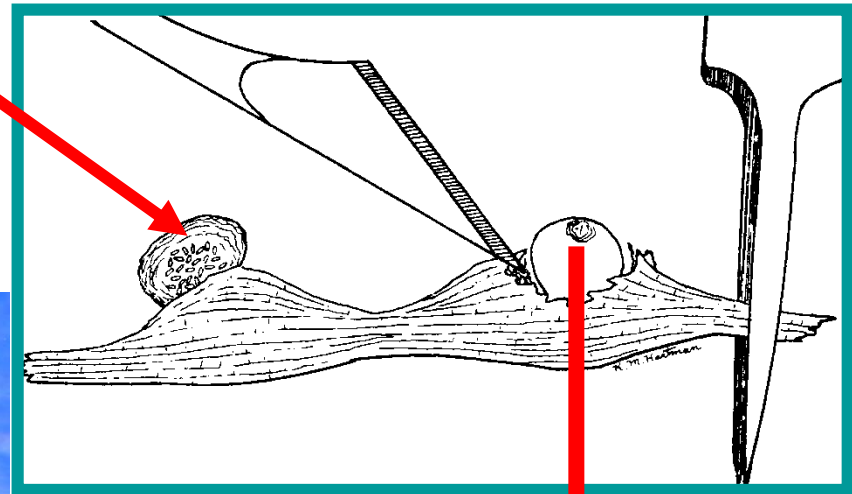
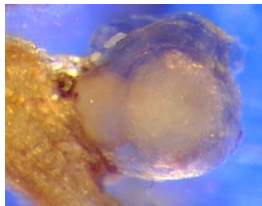
ILVO

Meloidogyne spp.

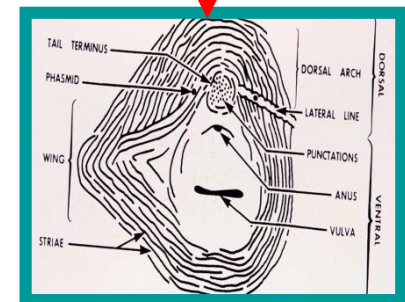
- Endoparasitos sedentarios
- Especies muy polífagas, supervivencia en malas hierbas.
- Producen nódulos en las raíces y masas de huevos.



- ✓ Comenzar con una **única** masa de huevos contenida en una hembra, sacar la hembra para su identificación.



- ✓ Inocular en plantas huéspedes de 4-6 semanas (tomate, berenjena, garbanzo, etc.) con suelo estéril durante varios meses (3-4), submultiplicaciones de esta población.



Patrón perineal



PCR específica /
secuenciación
fragmentos ADN

Isoenzimas

- ✓ Suelo 1:2 limo:arena o 100% arena → conductivo y facilita la extracción (evitar turba).
- ✓ Fertilización semanal y riego cuando sea necesario.
- ✓ +22 °C día / 15 °C noche.
- ✓ Inoculo: suelo anterior + juveniles (J2s) (2x/año).
- ✓ Control de identificación: generalmente 1/año, depende de la especie.

☐ Algunas especies son difíciles de cultivar en tomate u otras plantas hortícolas, incluso algunas NO se reproducen en tomate (*M. baetica*)



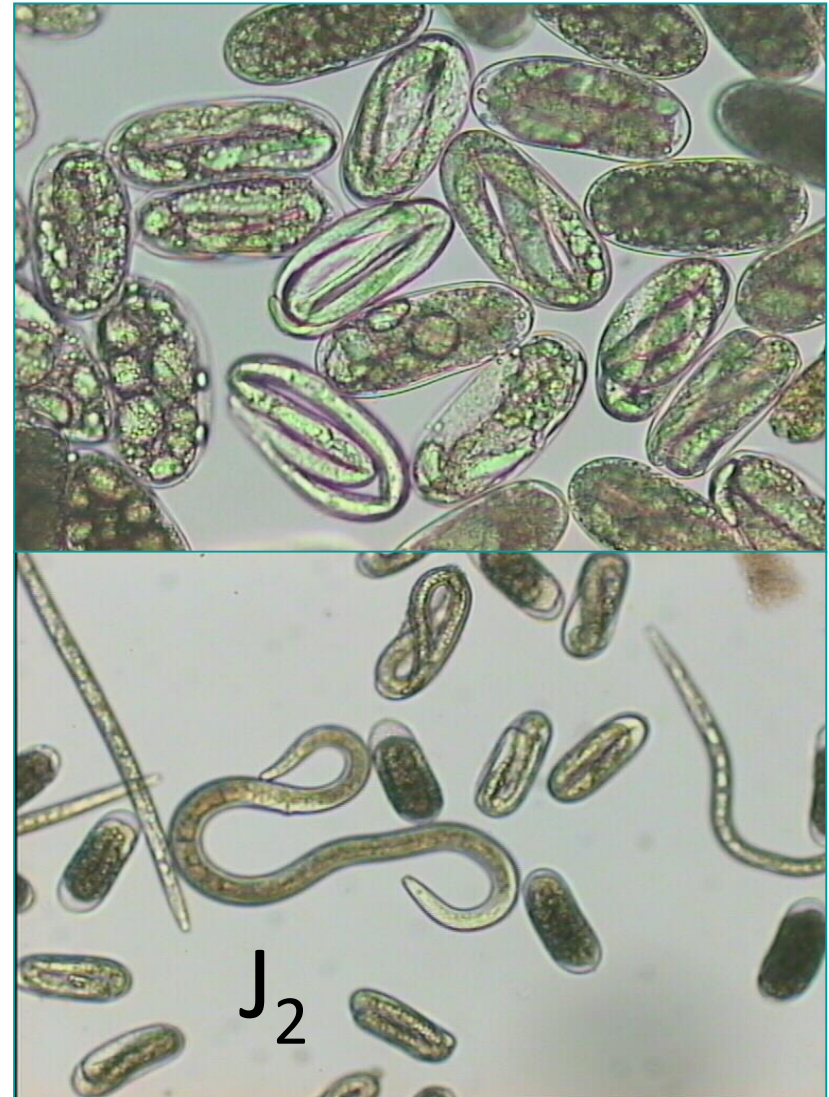
ILVO

Extracción de inóculo

❖ Para la extracción, las raíces infectadas (sobre 2 MAI) se lavan, cortan en piezas (1-2 cm) y los huevos se extraen agitando las raíces durante 3-4 min en 0.5% NaOCl

❖ Se pasa la solución a través de un tamiz de 75 μm debajo con uno de 5 μm , se lavan con agua y se cuentan huevos y J_2

(Husey & Barker, 1973)

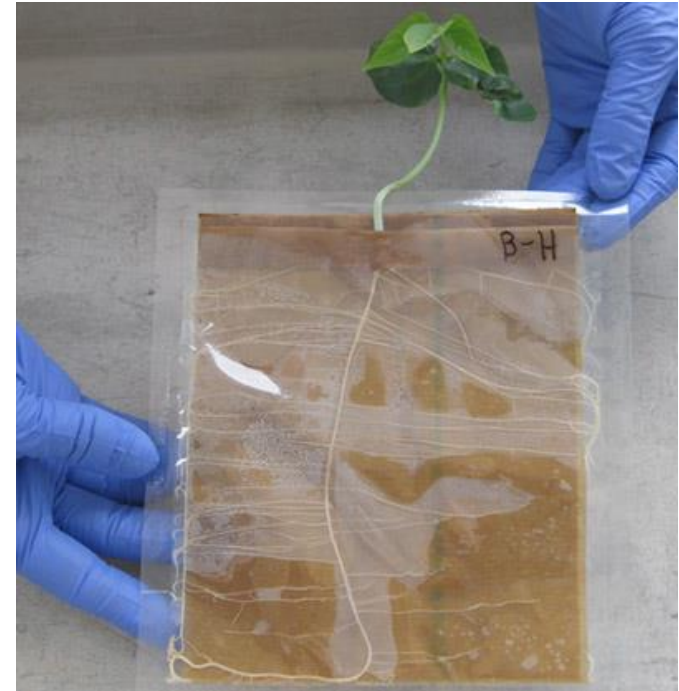


- ✓ Algunas especies se pueden mantener en patata o suelo (*M. chitwoodi* o *M. fallax*) 4 °C, 1 año, (con cierta mortalidad) (datos ILVO)
- ✓ Test: el 20-45 % de poblaciones de *M. chitwoodi* y *M. fallax* pueden sobrevivir en suelo después de 8 meses a 14°C (ILVO).



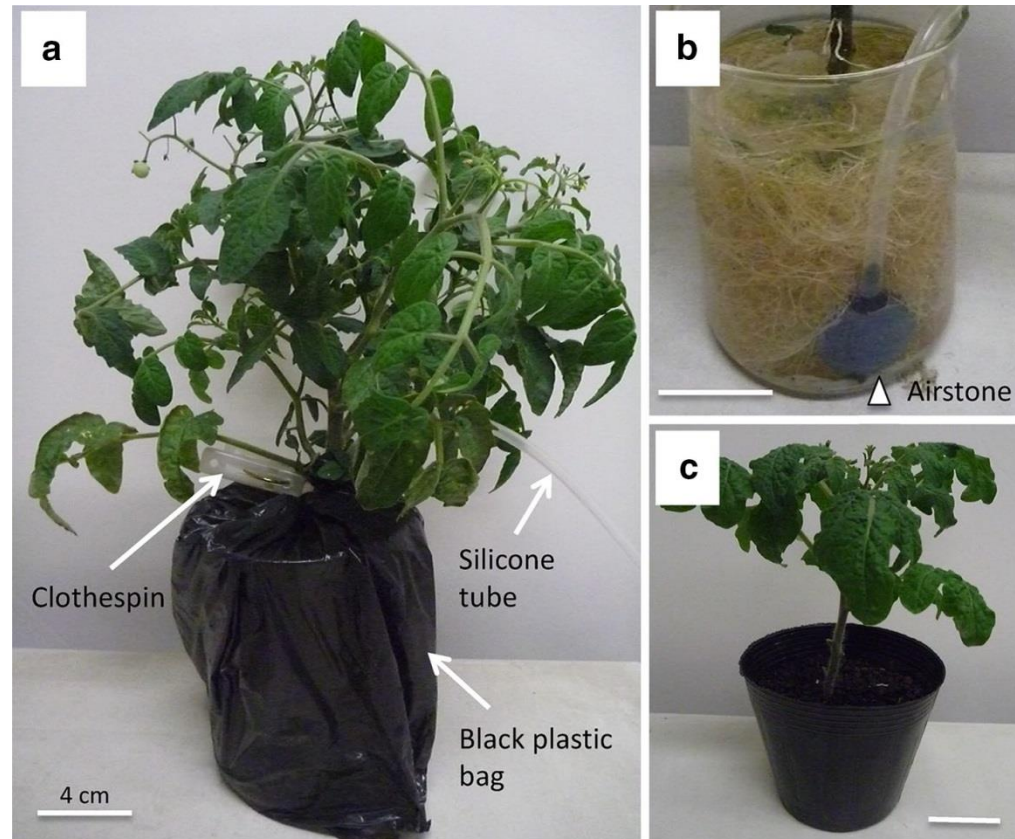
OTRAS TÉCNICAS:

- ☐ Cultivos en bolsitas de papel, principalmente para testar resistencias en plantas con semillas grandes (Atamian *et al.*, 2012)
- ☐ Inoculación en horizontal y mantenimiento durante al menos 24 h (Atamian *et al.*, 2012)
- ☐ Gran ahorro de espacio
- ☐ No es una buena técnica para tener poblaciones durante largos periodos de tiempo



OTRAS TÉCNICAS PARA PRODUCIR JUVENILES Y MACHOS:

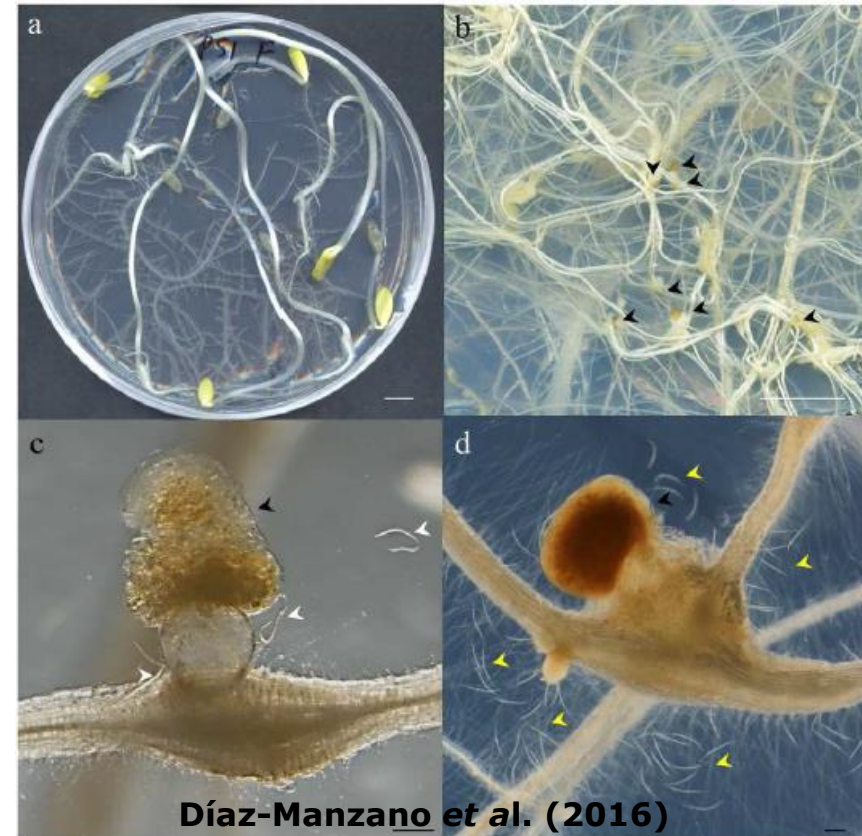
- ☐ Hidropónico
- ☐ Cultivares enanos (“Pritz”; “Regina”; “Red Cherry”)
- ☐ Tres pre-inoculaciones previas en suelo (total 15000 J2s)
- ☐ Cambio de solución cada 2-3 días
- ☐ Oxigenación del medio con inyección de aire



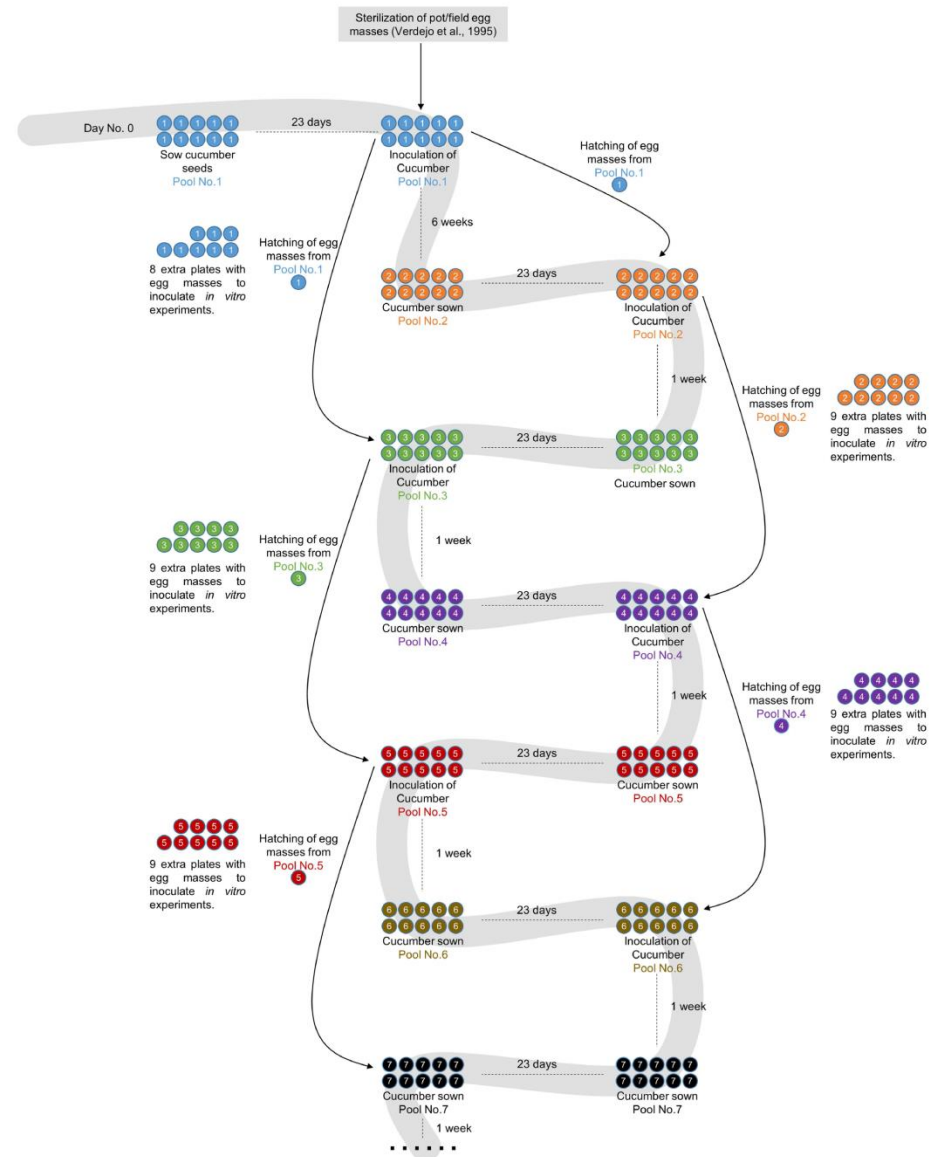
CULTIVOS ESTÉRILES:

- ☐ Permiten tener cultivos para experimentos de transcriptómica, metabolómica, etc...
- ☐ Permiten un control exacto de la infección y muestreo en algunos tipos de experimentos.
- ☐ Cultivos con semillas pregerminadas (tomate, pepino, etc...).
- ☐ Cultivos de raíces.
- ☐ Se tienen que renovar continuamente (1-2 meses, depende planta).
- ☐ Contaminaciones.

- ✓ Algunos protocolos estandarizados para multiplicar y mantener las poblaciones durante largos periodos de tiempo
- ✓ Semillas en oscuridad (reserva de la planta) o cultivar plantas in-vitro (requerimiento de luz)
- ✓ Medios reducidos a la mitad de la riqueza o menos (p. ej. Murashige and Skoog Basal Medium) para evitar crecimiento excesivo de la planta

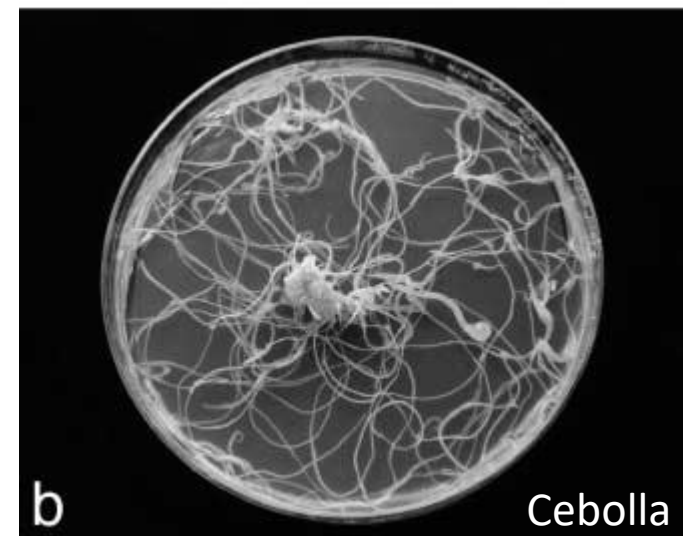
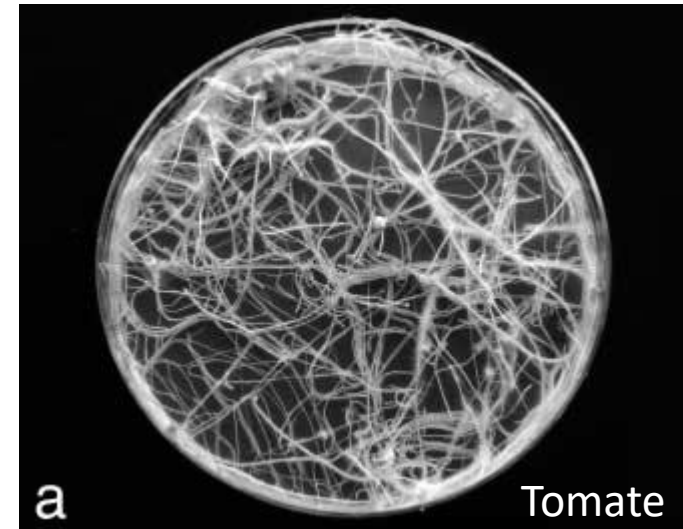


✓ **Díaz-Manzano et al. (2016)**
Sugiere un esquema para el
mantenimiento de estas
poblaciones en cultivo
estéril de pepino



✓ Cultivo de raíces

- ❑ SE PUEDEN CULTIVAR EN OSCURIDAD → AUMENTA NÚMERO DE PLACAS
- ❑ Algunas especies hasta 6 meses con la misma planta (por ej. cebolla) (Mitkowski y Abawi, 2002) → pero se tienen que revisar periódicamente.
- ❑ Mejor en raíces transformadas, ya que producen un mayor incremento de las raíces laterales (por tanto más meristemos y zonas de elongación) y tienen tendencia a crecer horizontalmente (Tefer, 1983).
- ❑ Medios que no favorezcan un crecimiento rápido, los nematodos no infectan raíces senescentes (por ej. Gamborg's B5 medium).



❑ ALGUNOS PROBLEMAS MULTIPLICACIÓN DE *MELOIDOGYNE*:

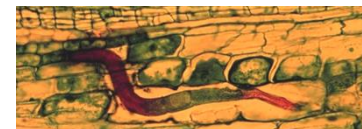
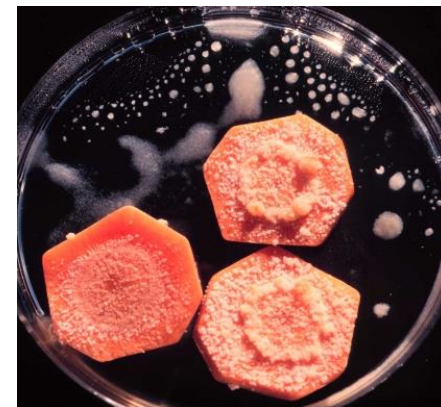
- ✓ **Mezcla de poblaciones en campo.**
- ✓ **Algunas especies no se multiplican sobre tomate (p. ej. *M. artiellia* o *M. baetica*).**
- ✓ **Diferentes temperaturas óptimas de crecimiento (p. ej. *M. chitwoodi*).**
- ✓ **Cultivo repetido a altas densidades poblacionales incrementa el número de agentes de biocontrol en las macetas → refresco de la poblaciones.**
- ✓ **Etiquetado de placas,....**

CULTIVO MONOXÉNICO *PRATYLENCHUS* SPP.

(Huett *et al.*, 1987; Moody *et al.*, 1973)

I. PREPARACIÓN DISCOS DE ZANAHORIA

1. Lavar y cortar el extremo agudo
2. Sumergir en etanol (95%) o 20% NaOCl durante 3-5 min.
3. Flamear.
4. Pelar epidermis, solo la parte flameada, flamear el cuchillo en cada corte. Tb se puede seleccionar cilindro central (evitar contaminaciones)
5. Cortar discos y depositar en placa (algunos autores sugieren una mejora sobre placas con agua-agar 1%) (Santos *et al.*, 2012).



II. ESTERILIZACIÓN DE NEMATODOS

1. Extraer nematodos, concentrar y cuantificar.
2. 0,02% ethoxyetil o cloruro mercúrico durante 2 horas (variaciones entre autores).
3. 0,1% streptomycin durante 24 horas.
4. 4-5 lavados con agua estéril.
5. Conteos y visualización de la viabilidad de la población final.
6. Inocular varias gotas de la concentración de nematodos encima de los discos de zanahoria.
7. Renovación discos,....

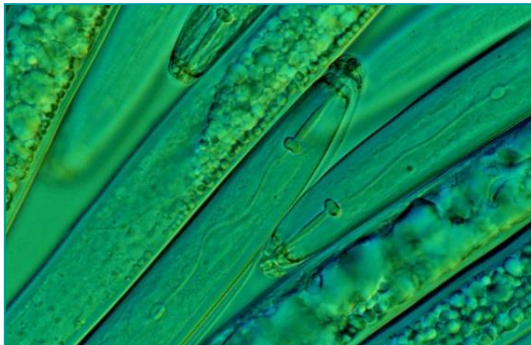
Grupos específicos: *Pratylenchus* spp.

- ❖ Algunas especies de nematodos tienen dificultades de multiplicación-mantenimiento en este sistema.
- ❖ Condiciones óptimas para el máximo ratio reproductivo:
 1. Inoculación 25-100 nematodos/disco zanahoria.
 2. Incubación a 20-25 °C.
 3. Periodo de incubación: al menos 100 DAI.

Incremento de las poblaciones 1,254-3,619-veces.

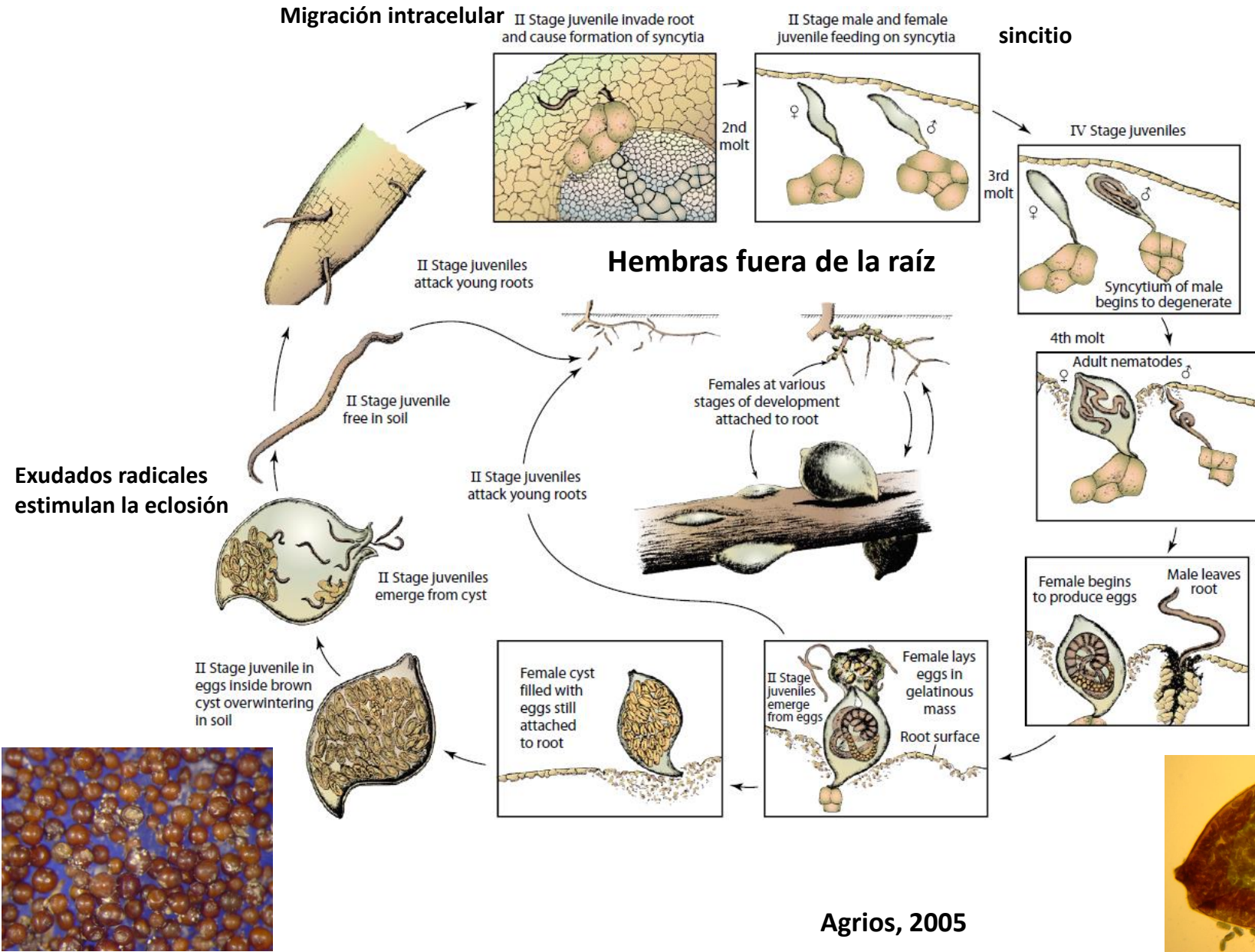
(Castillo *et al.*, 1985)

****Otras especies: NEMATODOS MIGRADORES como *Radopholus* spp.; *Zygotylenchus guevarai*; *Tylenchorhynchus* spp.; *D. dipsaci*, *D. weischeri*, *D. destructor* (Verdejo y Pinochet, 1991; Trinh *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2012; Hajihassani *et al.*, 2017).**



- ❑ *D. dipsaci* puede multiplicarse en variedades de haba susceptible, callos de tejido o en discos de zanahoria.
- ❑ Protocolo similar al de *Pratylenchus* para los discos de zanahoria.
- ❑ Inoculación específica a la axila de la hoja en plantas de haba con alta humedad (bolsa).
- ❑ Ajos pueden ser almacenados durante algún tiempo (“lana de nematodo”).
- ❑ No se ha podido multiplicar en diversos cultivos fúngicos (Hajihassani *et al.*, 2017).

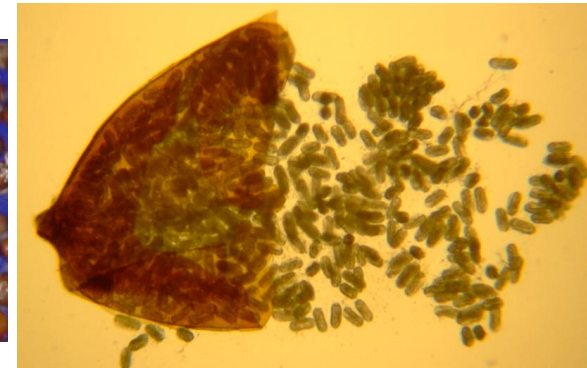
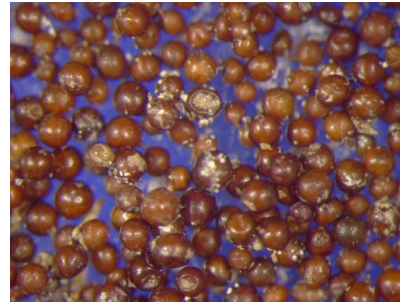
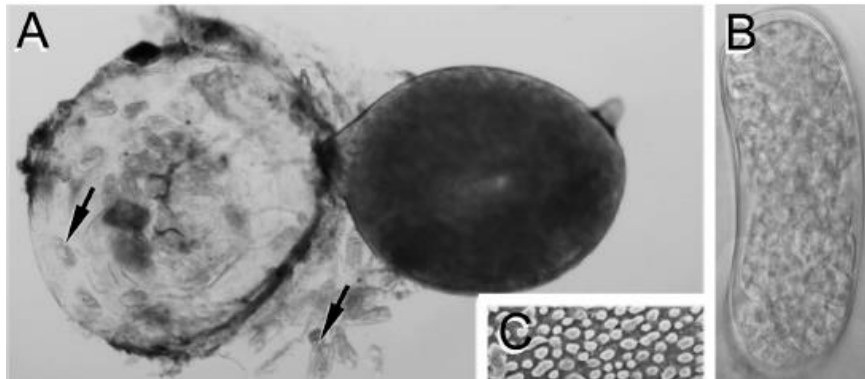
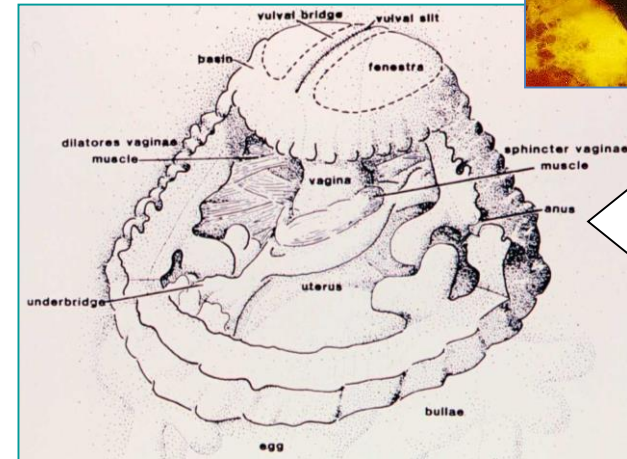




Grupos específicos: *Globodera-Heterodera spp.*

- La hembra es globosa, sedentaria, con la mayor parte o totalmente fuera de la raíz
- La mayoría de los huevos son retenidos en un quiste con cutícula gruesa y endurecida derivado del cuerpo de la hembra. Algunas especies también depositan los huevos en una matriz gelatinosa
- La mayoría de las especies son huésped-específicas
- Poblaciones con un solo quiste →

(examinar quistes de la muestra de suelo-PCR)



■ La eficacia de la extracción de quistes decrece con la cantidad de materia orgánica (EPPO, 2013)

Table 1 Methods for the extraction of plant-parasitic nematodes from plant and soil samples currently included in EPPO Diagnostic Protocols

Plant samples

Motile nematodes	Baermann funnel/Oostenbrink dish, mistifier, incubation of plant parts
Motile and immotile nematodes	Direct examination, maceration and filtration, maceration and centrifugal flotation, enzymatic digestion

Soil samples

Motile nematodes	Baermann funnel/Oostenbrink dish, flotation and sieving, Flegg modified Cobb technique, Oostenbrink elutriator
Motile and immotile nematodes	Centrifugal flotation

Cysts from soil

Dried soil	Baunacke method, paper strip method, Fenwick can, Schuiling centrifuge
Wet or dried soil	Seinhorst elutriator, centrifugal flotation, Wye washer

■ Algunos de estos métodos permiten obtener quistes en la muestra o en el sobrenadante de la segunda centrifugación (EPPO, 2013)

■ **MÉTODOS PARA SUELO SECO:** los quistes pequeños de hembras jóvenes, no flotan correctamente, por lo que pueden perderse (EPPO, 2013) → métodos húmedos pueden extraer quistes pequeños y quistes con pocos huevos o rotos.

Table 1 Methods for the extraction of plant-parasitic nematodes from plant and soil samples currently included in EPPO Diagnostic Protocols

Plant samples

Motile nematodes	Baermann funnel/Oostenbrink dish, mistifier, incubation of plant parts
Motile and immotile nematodes	Direct examination, maceration and filtration, maceration and centrifugal flotation, enzymatic digestion

Soil samples

Motile nematodes	Baermann funnel/Oostenbrink dish, flotation and sieving, Flegg modified Cobb technique, Oostenbrink elutriator
Motile and immotile nematodes	Centrifugal flotation

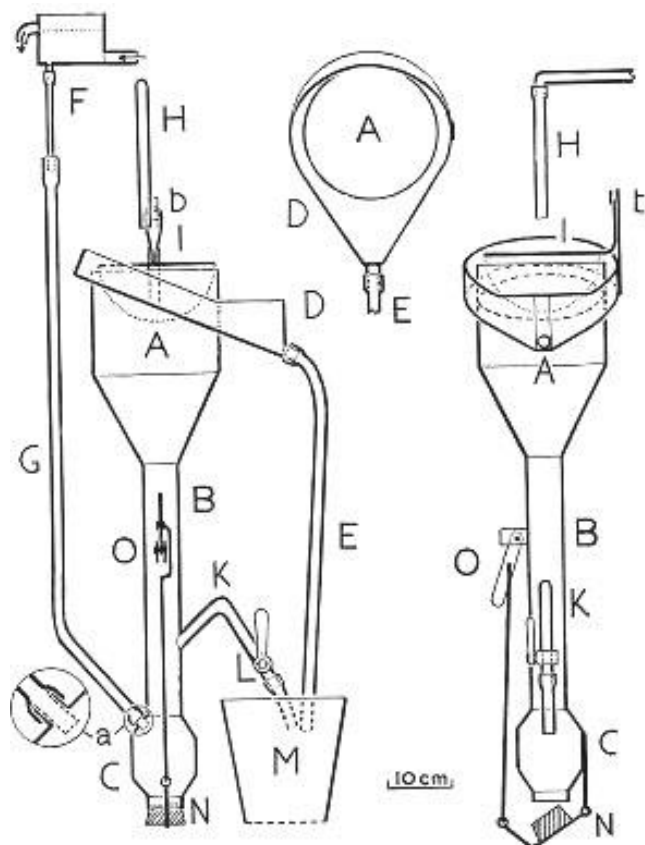
Cysts from soil

Dried soil	Baunacke method, paper strip method, Fenwick can, Schuiling centrifuge
Wet or dried soil	Seinhorst elutriator, centrifugal flotation, Wye washer

■ **ATENCIÓN:** *Globodera spp.* pueden resistir el secado, pero la vitalidad de los huevos de *Heterodera spp.* decrece rápidamente durante el secado, especialmente a temperaturas superiores a 25 °C y la humedad del aire es inferior al 40% (EPPO, 2013)

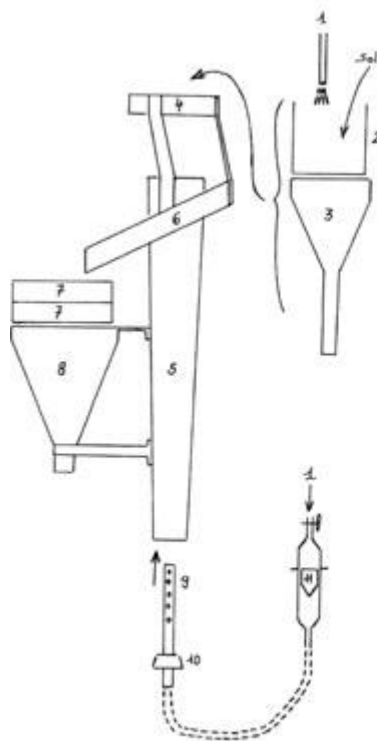
☐ MÉTODOS PARA SUELO HÚMEDO O SECO

SEINHORST ELUTRIATOR



❑ MÉTODOS PARA SUELO HÚMEDO O SECO

KORT'S CYST EXTRACTION ELUTRIATOR

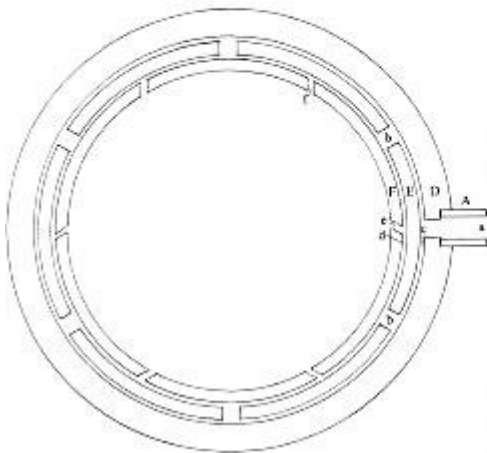


❑ MÉTODOS PARA SUELO HÚMEDO O SECO

FLOTACIÓN-CENTRIFUGACIÓN

- Similar al método centrifugación-flotación con densidad específica superior (1,22-1,28 g/ml) de MgSO_4 (u otro compuesto).
- Sobrenadante de la centrifugación sobre tamices de 200 ó 250 μm .
- Revisar sobrenadante de la primera centrifugación para la presencia de quistes (quistes vacíos o no muy llenos).

WYE WASHER



No puede procesar muestras con mucha turba

❑ INOCULACIÓN EN PLANTA PARA MANTENIMIENTO/MULTIPLICACIÓN

❖ Inocular plantas con una edad de 4-6 semanas del posible huésped (patata, judía, garbanzo,...) en suelo estéril durante 3-4 meses.

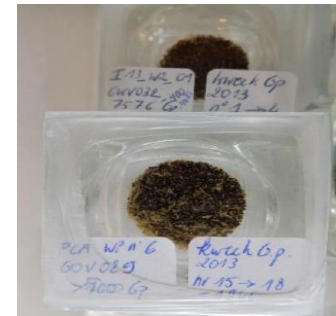


❑ QUISTES SECOS EN FRIO (4 °C) PARA CONSERVACIÓN LARGA

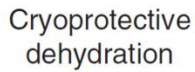
❖ Atención pérdida de viabilidad con el tiempo.

❖ Atención humedad en la nevera.

❖ Tubos de cristal o placas petri selladas con parafilm, etc,...



ILVO



Freeze
tolerance

- ▶ Anhydrobiosis

, no freezing

fast

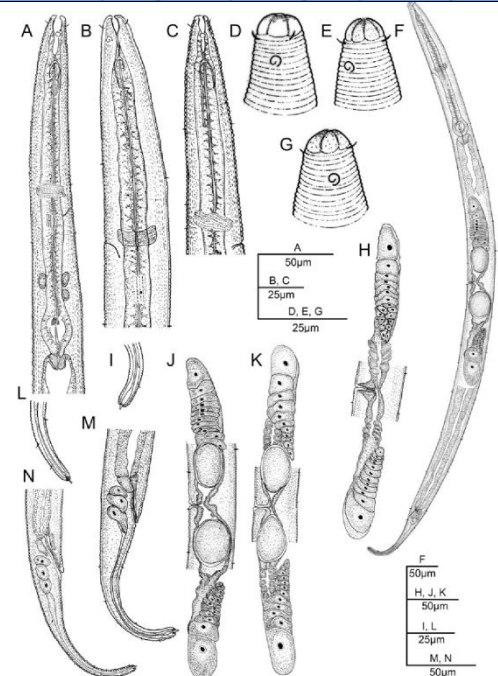
Freezing rate

slow

wet

Soil water content

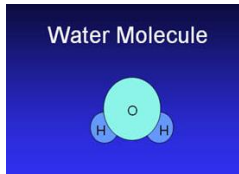
dry



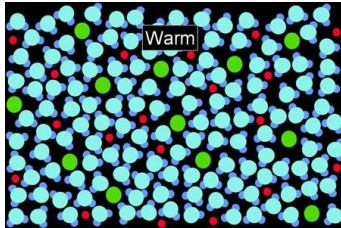
CRIOPRESERVACIÓN

- ☐ **LA TECNOLOGÍA SE BASA EN LA INDUCCIÓN DE LA VITRIFICACIÓN CELULAR DURANTE UN DESCENSO BRUSCO DE LA TEMPERATURA.**
- ☐ **VENTAJAS DE ELIMINAR LAS PRESIONES DE SELECCIÓN ARTIFICIALES O CUELLOS DE BOTELLA EN LAS POBLACIONES, CUANDO ESTÁN MULTIPLICADAS EN CONDICIONES ARTIFICIALES.**
- ☐ **MENOR ESPACIO DE ALMACENAMIENTO PARA MUCHAS ESPECIES/POBLACIONES.**
- ☐ **MENOS PROBABILIDADES DE CONTAMINACIONES ENTRE POBLACIONES.**
- ☐ **MUY USADO EN *C. ELEGANS***
(http://www.wormbook.org/chapters/www_strainmaintain/strainmaintain.html)
- ☐ **PROTOCOLOS USADOS PARA NEMATODOS DE LOS QUISTES**
(*GLOBODERA/HETERODERA* SPP.), NODULADORES DE RAÍCES (*MELOIDOGYNE* SPP.)
(Triantaphyllou y McCabe. 1989; Van der Beek *et al.*, 1996; Folkertsma *et al.*, 1997; Irdani *et al.*, 2011) Y *BURSAPHELENCHUS* SPP. (Irdani *et al.*, 2006).

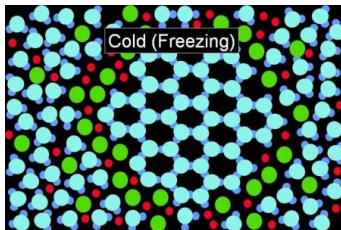
1)



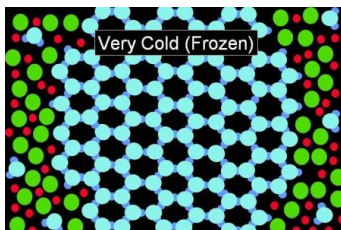
2) Water is part of a solution with other molecules in living things:



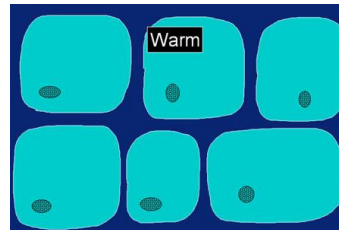
3) When tissue is cooled below freezing, water molecules gather together and form growing ice crystals:



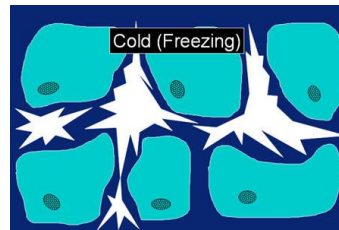
4) Ice squeezes other molecules into a harmful concentrated solution:



5) On a cellular scale, ice forms first outside cells:



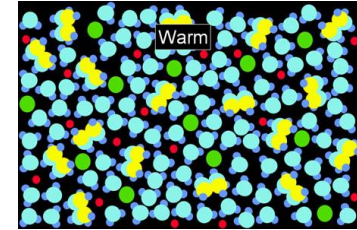
6) Growing ice causes cells to dehydrate and shrink:



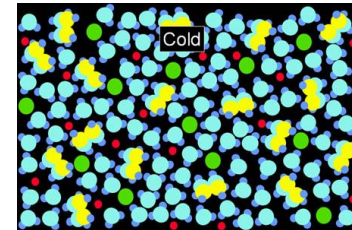
7) Finally cells are left damaged and squashed between ice crystals:



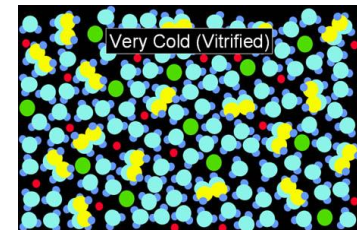
8) Adding chemicals called cryoprotectants to water can prevent water molecules from gathering together to form ice:



9) Instead of freezing, molecules just move slower and slower as they are cooled:



10) Finally, at temperatures below -100°C , molecules become locked in place and a solid is formed. Water that becomes solid without freezing is said to be "vitrified":



NEMATODE CRYOPRESERVATION PROCESS

Collect and concentrate fresh juveniles (J2)

ONE SHORT TREATMENT

H. schachtii and *M. incognita*

(1) Equilibrate fresh juveniles (J2) in 10% EG [1.6 M] at room temperature 30'.

EG: Ethylene glycol (99% EG, BDH)

TWO SHORT TREATMENTS

G. tabacum tabacum

(1) Equilibrate fresh juveniles (J2) in 10% EG [1.6 M] at room temperature 30'.

(2) Spin down briefly and resuspend J2 in cold 25% EG [4 M]. Keep on ice 30'.



Load the embedded larvae onto a

nylon membrane **Chromatography nylon membranes (Roche)**



FREEZING/THAWING

- Proceed with a very fast-freezing in a liquid nitrogen bath (-196°C). Storage the frozen samples in -140°C freezer.

- Rapid recovery of membrane/s from -140°C freezer and thaw it immediately in warm-water bath (30°C).

- Similar protocol in Triantaphyllou and McCabe, (1989)

Irdani *et al.*, 2011

Viability and reproducibility of *G. t. tabacum*, *H. schachtii* and *M. incognita* cryo-J2 24 h after thawing.

Nematode populations	Motility % (mean $\pm$ SD) ($n = 6$) after time at -140°C	Reproduction rate ^a ($R = \text{Pf}/\text{Pi}$) ($n = 3$)		
		Egg-plant	Sugar-beet	Tomato
<i>G. t. tabacum</i>	Before storage	67 $\pm$ 13.7*		
	1 month	62 $\pm$ 12.0*		
	6 months	n.d.		
	1 year	n.d.		
	4 months	52 $\pm$ 45.2*		
<i>H. schachtii</i>	Before storage		362 $\pm$ 15.7*	
	1 month		258 $\pm$ 12.2**	
<i>M. incognita</i>	Before storage			178 $\pm$ 68*
	1 week			n.d.
	1 month			91 $\pm$ 37*
	2 years			150 $\pm$ 46*
	4 years			97 $\pm$ 75*

^a Reproduction rate (R) = Pf/Pi where $\text{Pi} = n.\text{J2}$ inoculated and $\text{Pf} = n.\text{J2}$ recovered.

* Statistically significant differences (One way AVOVA, Tukey's pairwise comparison $P < 0.05$).

- ☐ Autores mencionan la disminución de la supervivencia al tener varias cintas de nylon en los viales y al no utilizar N_2 líquido, congelador a -140°C .
- ☐ Juveniles sobreviven la criopreservación. Huevos en anhidrobiosis en especies de *Globodera* también (en este caso sin pretratamientos) a -80°C (Folkertsma *et al.*, 1997).



MUCHAS GRACIAS!!



XIX CONGRESO

DE LA SOCIEDAD

**ESPAÑOLA DE
FITOPATOLOGÍA**

TOLEDO 2018

8 al 10 de octubre