**Medios de Cultivo para *Phytophthora* sp**

**Agar Tomate (1Lt)**

20gr Agar bacteriológico

18 gr Glucosa (azúcar de mesa blanco)

0.5 gr Carbonato de calcio (CaCO3)

200 ml Jugo de Tomate de árbol

* **Preparación Jugo de Tomate:**
* 5 Tomates de árbol pelados y picados (400gr)
* Licuar en 1000ml de agua destilada
* Congelar en nevera -20

**Agar arveja (1Lt)**120gr Caldo de arveja verde seca

20gr Glucosa (azúcar de mesa blanco)

15gr Agar bacteriológico

2gr Carbonato de calcio (CaCO3)

**Preparación caldo arveja:**

* Pesar 120 gr de arveja
* Agregar 1000 ml de Agua destilada
* Enviar al autoclave
* Descartar las arvejas (cocinadas) y aforar el sobrenadante a 1000 ml con Agua destilada
* Congelar en nevera -20

**Medio para aislamiento de muestras PDA Y Agar Tomate (1Lt)**

* Agar PDA y Agar Tomate suplementado con antibióticos (Rifampicina 1ml por litro, Ampicilina 1ml por litro, PCNB 5ml por litro)
* **Preparación de Rifampicina (solución Stock): (fotosensible)**

Disolver 0.125gr de ampicilina en 10ml de etanol absoluto, cubrir con papel metálico, y guardar en nevera -4°

* **Preparación de Ampicilina (solución Stock):**

Disolver 1gr de ampicilina en 10ml de agua destilada estéril (ADE), pasar por filtro de 0.22ul y guardar en nevera -4°

* **Preparación de PCNB (solución Stock):**

Disolver 2gr de ampicilina en 400ml de etanol absoluto, pasar por filtro de 0.22ul y guardar a temperatura ambiente.

**Medio Plich (crecimiento de micelio)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Reactivos** | **1000ml** | **500ml** |
| KH2PO4 (R77) | 0.50gr | 0.25gr |
| Mg SO4 (R52) | 0.25gr | 0.125gr |
| Extracto de levadura | 0.5gr | 0.25gr |
| Sacarosa(azucar blanco) | 25gr | 12.5gr |
| B-sitosterol | 2ml | 1ml |

\*Asparagina 10ml 5ml

\*Thiamina 1gr 0.5gr

* **Preparación del B-sitosterol:**
* 1gr B-sitosterol
* Diluir en 30 ml de Etanol absoluto
* Hacer vortex por 2 minutos y dejar precipitar

\* Siempre tomar el sobrenadante (transparente) NUNCA el precipitado

* **Preparación de la Thiamina:**

-**Líquida:** 5ml por por cada 500ml de medio plich

-**Pastilla:** 5gr en 50ml de **AGUA DESTILADA ESTERIL**

\* La Asparagina y la Thiamina pesar y enviar a UV por 1 hora (**NUNCA SE ENVIAN AL AUTOCLAVE),** se agregan después de autoclavar y de UV.

**Medio para cruces 1Lt**

**pH =** 8.5

**Centeno (50%)=** 500ml

**V8 [10%] (50%)=** 500ml

**B-sitosterol=** 1.5ml

* **Preparación del centeno clarificado (Método Judelson) (1Lt)**
* 60 gr centeno (grano)
* 500ml de Agua destilada (remojar por 3 días)
* Licuar los 500ml de centeno con grano y adicionar 500ml de agua destilada (1000ml en total)
* Centrifugar el sobrenadante 5minutos 8.500rpm
* Congelar en nevera -20
* **Preparación Jugo V8 clarificado más carbonato de calcio (CaCO3) (1Lt)**
* Centrifugar 100ml de jugo v8
* 5 minutos a 8500rpm
* Agregar los 100ml de Jugo v8 centrifugado y aforar con 900 ml de agua destilada.
* Agregar 1gr de carbonato de calcio (CaCO3)
* Congelar en -20