



Universidad de El Salvador
Facultad de Ciencias Agronómicas
Dirección de Investigación



Informe Final: Título de la pasantía: PPA-2405

“Elaboración de Protocolos de Diagnóstico de plagas asociadas a cultivos agroindustriales de importancia económica (café, cacao, tomate, caña de azúcar)”

Grado al que se opta: Ingeniero Agroindustrial

Datos del egresado:

Nombre	Carné	Dirección	Email	Teléfono	Firma
José Jeremías Paz Carpio	PC15045	Residencial Europa Senda Florencia, Casa 22, Santa Tecla, La Libertad	pc15045@ues.edu.sv	7629-5097	

Datos del docente asesor

Visto Bueno

Nombre y formación académica	Lugar de trabajo	Teléfono	Email	Firma y Sello
Ing. Agr. M.Sc. Rafael Antonio Menjívar Rosa	Universidad de El Salvador	7940-0113	rafael.menjivar@ues.edu.sv	

Datos del asesor externo

Visto Bueno

Nombre y formación académica	Lugar de trabajo	Teléfono	Email	Firma y Sello
Ing. Agr. Anakely Romero de Huevo	Laboratorio de Sanidad Vegetal del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG)	6992-7748	anakely.romero@mag.gob.sv	

INDICE

1. Resumen	3
2. Introducción	4
3. Información de la Unidad Productiva.....	5
3.1 Datos Generales.....	5
3.1.1 Localización.....	5
3.1.2 Antecedentes	5-6
3.1.3 Recursos.....	6
3.1.3.1 Naturales	6
3.1.3.2 Instalaciones y equipos	6
3.1.3.3 Humanos	6
3.2 Actividades Actuales	6
3.2.1 Producción principal y otras	6
3.2.2 Situación técnica	6
3.2.3 Situación Administrativa.....	7
3.2.4 Generales de comercialización.....	7
4. Análisis de la problemática en el sector.....	7
5. Metodología.....	7-8
6. Resultados y discusión.....	9-132
Protocolos de Café (<i>Coffea arabica</i>)	
<i>Hemileia vastatrix</i>	11-24
Protocolos de Cacao (<i>Theobroma cacao</i>)	
<i>Carmenita Foraseminis</i>	26-36
<i>Monalonion dissimulatum</i>	37-49
Protocolos de Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	
<i>Aculops Lycopersici</i>	51-61
<i>Colletotrichum coccodes</i>	62-74
<i>Virus del mosaico del tomate</i>	75-89
Protocolos de Caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i>)	
<i>Virus del mosaico de la caña de azúcar</i>	91-100
<i>Virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar</i>	101-110
<i>Xanthomonas albilineans</i>	111-120
<i>Acidovorax avenae</i>	121-131
7. Conclusiones	132
8. Recomendaciones.....	133
9. Bibliografía.....	134-136

1. Resumen

Los cultivos de Café (*Coffea arábica* L.), Cacao (*Theobroma cacao*), Tomate (*Solanum lycopersicum*) y Caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) son de importancia económica en el sector agroindustrial, por su aporte como materia prima para la elaboración de muchos derivados para consumo humano. En su ciclo productivo están expuestos al acecho de plagas que afectan su rendimiento en cosecha, debido a estas pérdidas es pues necesario para los productores, tener certeza de las presencias de plagas en sus cultivos, y esa certeza se puede obtener por detección en campo o identificación a nivel de laboratorio, ante esto, los documento tal como un Protocolo de Diagnóstico en laboratorio se vuelve indispensable para los analistas en su búsqueda de una identificación segura de las plagas.

Entre abril y octubre del 2024, en el Laboratorio de Diagnóstico Vegetal de La Dirección de Sanidad Vegetal del Ministerio de Agricultura y Ganadería, que tiene su sede en Cantón Matazano, Soyapango, se desarrolló la presente Pasantía de Practica Profesional, ejecutando la redacción de 10 Protocolos de diagnóstico, para: *Aculops lycopersici* (Acari); *Colletotrichum coccodes*, *Hemileia vastatrix* (Fungi); *Virus del mosaico de la caña de azúcar*, *Virus de la hoja de la hoja amarilla de la caña de azúcar*, *virus del mosaico del tomate*; *Xanthomonas albilineans* de la caña de azúcar, *Acidovorax avenae* de la caña de azúcar, *Monalonion dissimulatum* (Hemiptera: Miridae) y *Carmenta foraseminis* (Lepidoptera: Sesiidae), con la finalidad de proporcionar a cada analista técnico de laboratorio una herramienta fiable de trabajo para dar resultados certeros al cliente que solicite un análisis de la posible presencia de estas plagas en sus cultivos respectivos.

2. Introducción

Un Protocolo de diagnóstico da fiabilidad a un proceso de identificación de un microorganismo a nivel de laboratorio, dicta los pasos, materiales, reactivos y tiempos de ejecución de un diagnóstico de plaga con resultados certeros para el solicitante de un análisis ya sea acarológico, bacteriológico, micológico, entomológico, virológico y otros.

En el Laboratorio de Diagnóstico Vegetal del Ministerio de Agricultura y Ganadería cuentan con algunos protocolos que ya son de utilidad, aun así, existía la necesidad de expandir la disponibilidad de más protocolos para plagas cuarentenadas y no cuarentenadas. Por ello se enfocó y busco elaborar los protocolos de 10 plagas de incidencia nacional tomando los 4 cultivos en estudio. Los Protocolos redactados ayudarán de manera positiva a cada analista técnico de cada Laboratorio según su área de trabajo para tener como analizar una muestra recibida donde exista la sospecha de la presencia de cualquiera de las 10 plagas investigadas.

Además, servirá como guía de trabajo para otros proyectos que surjan relacionados con la Sanidad Vegetal en la que futuros estudiantes deseen aportar para la mejora o actualización de contenido bibliográfico que el Laboratorio necesite.

3. Información de la Unidad Productiva

3.1 Datos Generales

3.1.1. Localización

La Pasantía Práctica Profesional se llevó a cabo en el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), en la Dirección General de Sanidad Vegetal, en el Laboratorio de Diagnóstico Vegetal (DGSV), ubicado en Centro Agropecuario Matazano, Cantón Matazano, Soyapango, San Salvador, con coordenadas geográficas 13° 41'17" N y 89° 08'18" W, con una elevación de 634 msnm. (Figura 1)

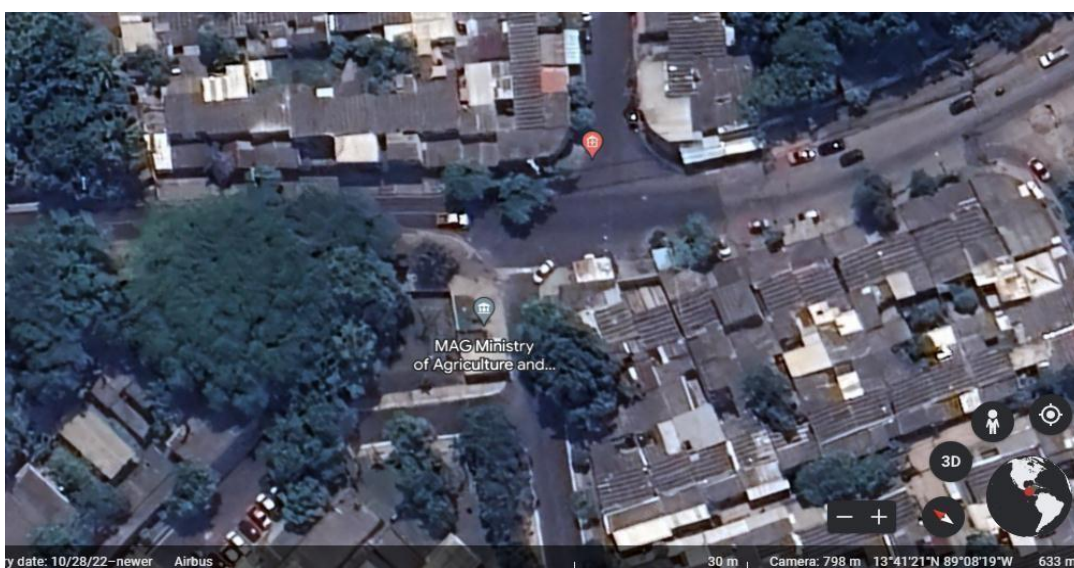


Figura 1. Mapa de Ubicación de la Dirección General de Sanidad Vegetal y Animal

3.1.2. Antecedentes

En el año de 1911, al asumir la Presidencia de la República el Dr. Manuel Enrique Araujo, el 1 de marzo de dicho año, en el Decreto de Organización del Gabinete de Gobierno, creó la Secretaría de Agricultura. En aquel entonces el Dr. Araujo asumió provisionalmente, y encomendó la de Agricultura a Don Miguel Dueñas. A la sazón existían 4 Ministerios y 7 subsecretarías, siendo la de agricultura la octava, la cual fue anexada al Ministerio de Gobernación.

A pesar de que, posiblemente por la situación económica de la época, el Ministerio no pudo operar independientemente, el prestigio, la constancia de su labor modesta y las necesidades del mejoramiento agropecuario nacional, hicieron que, en octubre de 1946, ya con la denominación del Ministerio de Agricultura e Industria, surgiera a la vida pública con su propia estructura orgánica, iniciando así, su presente época de desarrollo y progreso.

El 11 de agosto del 2003 se aprobó el Manual de organización de la Dirección General de Sanidad Vegetal y Animal (DGSVA), pero tiempo después en el año 2010 se separa el Área pecuaria de la agrícola, creando la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) y la Dirección General de Ganadería mediante el acuerdo ejecutivo N 28. La Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSVA) en el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), trabaja mediante la Ley de Sanidad Vegetal, que regula y promueve la sanidad vegetal, así como la aplicación, verificación y certificación de los sistemas de reducción de riesgos de contaminación física, química y microbiológica en la producción en la producción primaria de vegetales, mediante la fusión del área de defensa agropecuaria y la dirección de ganadería.

3.1.3. Recursos

3.1.3.1 Naturales

Agua Potable

Energía Eléctrica

3.1.3.2 Instalaciones y equipos

Instalaciones herméticas

Equipo informático

Equipo de laboratorio como microscopio, estereoscopio, cristalería, pinzas, laminas portaobjetos.

3.1.3.3 Humanos

Personal compuesto por 6 Ingenieros Agrónomos

3.2 Actividades Actuales

3.2.1. Producción principal y otras

Realización de diagnósticos fitosanitarios a productos de importación, exportación, inocuidad de alimentos y vigilancia fitosanitaria al interior del país.

3.2.2 Situación técnica

El Laboratorio de Diagnóstico Vegetal funciona por el trabajo de Ingenieros Agrónomos que asumen el papel de entomólogos y fitopatólogos.

3.2.3 Situación Administrativa

- Es dirigida por la Oficina de Planificación y Auditoría Institucional

3.2.4 Generales de comercialización

- Prestar servicio de diagnóstico a la población sin fines de lucro

4. Análisis de la problemática en el sector

El Laboratorio de Diagnóstico Vegetal de la Dirección de Sanidad Vegetal del Ministerio de Agricultura y Ganadería no contaba con protocolos de diagnóstico en productos agroindustriales, tales como: Café (*Coffea arábica L.*), Cacao (*Theobroma cacao*), Tomate (*Solanum lycopersicum*) y Caña de azúcar (*Saccharum officinarum*).

La elección de las plagas a investigar se basó según la necesidad del Laboratorio, por las veces que habían recibido muestras con sospechas de estas plagas, pero no disponían del documento guía para su detección, además de ser de importancia económica en cada sector agroindustrial de los cultivos en estudio.

5. Metodología

Metodología de Laboratorio

El reconocimiento de los Ácaros, Bacterias, Insectos, Hongos y Virus, se basó en la elección de las plagas investigadas, así como en las cuarentenadas o no existentes en el país, y de las cuales el Laboratorio no poseía Protocolos de Diagnóstico alguno. Para conocer el funcionamiento del Laboratorio de Diagnóstico Vegetal o su rutina cotidiana se apoyó en el área de recepción de muestras, tal como se muestra en la Fig. 2 y 3. Seguidamente fue la búsqueda y recolección de la información bibliográfica fiable como muestra la (Fig.4), con respecto a los pasos necesarios para llegar a un documento elaborado llamado protocolo de Diagnóstico, la cual servirá de insumo a los Ingenieros analistas del laboratorio para que trabajen en la identificación de estas plagas y enfermedades que atacan a los 4 cultivos agroindustriales sometidos en este estudio.

Para redactar cada Protocolo se requirió de las herramientas necesarias, tales como el equipo informático adecuado, libros, disposición de internet, y el personal capacitado a disposición para hacer las consultas necesarias sobre las plagas en estudio, como primeros pasos se identifica la plaga a investigar, de libros en línea o físicos, se extrae la información más confiable o lógica para buscar las generalidades de la plaga, sus formas de identificación en campo y a nivel de laboratorio, se buscan imágenes acordes que muestren ejemplos de cómo realizar un protocolo de detección, el trato de las muestras obtenidas y su disposición final en caso de obtener resultado positivo o negativo.



Figura. 2. Recepción de muestra a técnico de Vigilancia fitosanitaria



Figura. 3. Verificación de informes de resultados para ser entregados al solicitante de análisis.

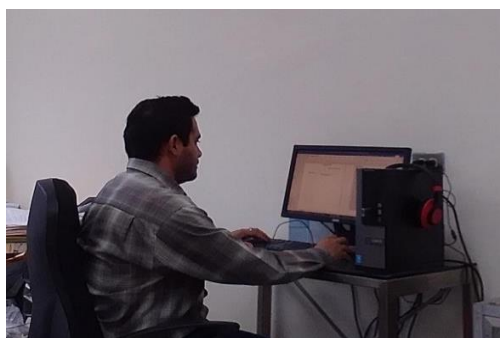


Figura. 4. Redacción de Protocolos de Diagnóstico

6. Resultados y discusión

Los conocimientos adquiridos durante el desarrollo de la Pasantía Práctica Profesional fueron conocer el funcionamiento del Laboratorio en todas sus áreas y saber aplicar las normas que lo rigen para la obtención de resultados fiables en los diagnósticos realizados, además de conocer en las acciones a tomar ante alguna muestra mal recibida o entregada.

El manejo de bitácoras de muestras recibidas, la forma de tratar o evitar el daño de cada muestra según su naturaleza fue un aprendizaje interesante en la sanidad vegetal, ya que ayudó a comprender la importancia de cada paso durante el análisis a un producto de naturaleza agrícola o agroindustrial.

Así también el conocimiento más importante fue el aprender a redactar un Protocolo de Diagnóstico, y entender como es el proceso minucioso que un técnico analista debe seguir para confiadamente redactar un informe de resultado certero, por ello a continuación se presentan los 10 Protocolos resultado de la detenida investigación bibliográfica y lógica redacción.

Como aporte de parte del estudiante fue el estudio de la Fuente Bibliográfica de la NIMF 27, esta norma brinda orientación sobre la estructura y el contenido de los protocolos de diagnóstico de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) para las plagas reglamentadas. Los protocolos describen los procedimientos y métodos para el diagnóstico oficial de las plagas reglamentadas que sean pertinentes al comercio internacional.

Protocolos de Café (<i>Coffea arabica</i>)	<i>Hemileia vastatrix</i>
Protocolos de Cacao (<i>Theobroma cacao</i>)	<i>Carmenta Foraseminis</i> <i>Monalonion dissimulatum</i>
Protocolos de Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	<i>Aculops Lycopersici</i> <i>Colletotrichum coccodes</i> <i>Virus del mosaico del tomate</i>
Protocolos de Caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i>)	<i>Virus del mosaico de la caña de azúcar</i> <i>Xanthomonas albilineans</i> <i>Virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar</i> <i>Acidovorax avenae</i>

PROTOCOLO DE DIAGNOSTICO DEL CULTIVO DE CAFÉ (*Coffea arabica*)



		Protocolo de Diagnóstico del Hongo Roya del caféto <i>Hemileia vastatrix</i>	
Elaborado por:	José Jeremías Paz Carpio	Versión:	
		Revisión:	
Aprobado por:	Ing. Anakely Romero de Huevo	Fecha aprobación	Página 1 de 12

1. Propósito

Describir la metodología aplicada para el diagnóstico de la roya del caféto *Hemileia vastatrix* Berk y Brome.

2. Alcance

Identificar la estructura del hongo para dotar al técnico de información fiable en el proceso de detección.

3. Responsabilidades.

Actividad	Responsable
Preparación de la muestra	Técnico del Laboratorio
Ejecución del ensayo	Técnico del Laboratorio
Entrega de resultados	Técnico del Laboratorio

4. Documentos o registros.

Relación con otros documentos del SGC	Registros generados
<ul style="list-style-type: none"> • <p>REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA</p> <ul style="list-style-type: none"> • SENASICA, 2018. <u>Protocolo de Diagnóstico: <i>Hemileia vastatrix</i> (Roya del caféto), México</u> • Agrios, G. (2005) Fitopatología. 5ª edición, Elsevier Academic Press, Ámsterdam • Arneson, P. A. (2000). Coffee rust. 20 June 2018, de The Plant Health Instructor. Doi: 10.1094/PHI-I-2000-0718-02 Sitio web: https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lesson/s/fungi/Basidiomycetes/Pages/CoffeeRust.aspx • Aime, A. C. (2006). Toward resolving family 	<ul style="list-style-type: none"> • F.D 1.1.1. Bitácora de Trabajo de Diagnóstico Vegetal • FD 1.1.2. Hoja de Resultados de Diagnóstico Vegetal

<p>level relationships in rust fungi (Uredinales). Mycoscience. (4) ,112-122.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Robert, V., Stegehuis, G. & Stalpers, J. (2018). The MycoBank engine and related databases. Recuperado de: http://www.mycobank.org/MB/182962 • Little Field, Larry. 2010. Biology of the Plant Rusts: An Introduction, Universidad de Michigan, USA. 	
---	--

5. Equipo y materiales

Equipo	<ul style="list-style-type: none"> • microscopio estereoscópico • microscopio compuesto • Mechero
Materiales	<ul style="list-style-type: none"> • aguja de disección • alfiler entomológico • sacabocado • cubreobjetos • porta laminas
Reactivos	<ul style="list-style-type: none"> • cristales de fenol • glicerina • ácido láctico • colorante azul de Nilo • hidróxido de potasio
Protección	<ul style="list-style-type: none"> • Gabacha de tela • Mascarilla desechable • Gorro desechable • Guantes de látex

6. Información de la plaga

El cultivo de cafeto (*Coffea arábica* L.) ocupa el segundo lugar en el comercio mundial (Rivillas *et al.*, 2011). Entre los principales problemas fitosanitarios que afectan a este cultivo sobresale la roya causada por el hongo *Hemileia vastatrix* Berk y Brome, que puede ser muy devastadora a nivel mundial (Agrios, 2005).

La roya de cafeto es una enfermedad que se encuentra distribuida de manera cosmopolita en todas las zonas donde se cultiva café. Se conoce como único hospedante al género *Coffea* spp.; infecta principalmente a café arábica (*Coffea arábica*) y café robusta (*Coffea canephora*), y posiblemente a otras 25 especies más. Aún no se conocen hospedantes alternos (Arneson, 2000; López, 2005)

La roya infecta las hojas y causa su caída prematura. Las esporas del hongo son conocidas como uredosporas, éstas se producen en uredias, cuyas pústulas no están cubiertas por una membrana. Bajo condiciones de alta humedad y presencia de agua libre sobre la superficie de la hoja, germinan y penetran a través de las estomas invadiendo los tejidos internos de la hoja. La expresión de los síntomas requiere de 20 a 40 días a partir de la germinación de las esporas dependiendo de la humedad y temperatura. Una vez que inicia la formación de esporas en las lesiones o manchas, su producción se mantiene activa mientras se mantenga adherida la hoja a la planta (Agrios, 2005; López, 2005; Baquero, 2013).

En las hojas, inicialmente se manifiesta con la aparición de lesiones de 1 a 3 mm, color amarillo pálido, translucidas con apariencia aceitosa que al madurar se tornan de color amarillo naranja, aspecto polvoso y contienen las esporas del hongo. Al envejecer, se tornan de color naranja pálido y en el centro de la lesión amarilla surge una mancha de color café marrón o negro con apariencia seca que crece e invade toda la superficie de la lesión. Alrededor de la mancha marrón se forma un anillo de color amarillo donde se producen nuevas esporas del hongo y representa una fuente de infección para otro ciclo de la enfermedad. Las lesiones pueden unirse hasta cubrir la hoja y provocar su caída (Arneson, 2000; SENASICA, 2017).

6.1 Información taxonómica

Nombre científico: *Hemileia vastatrix* Berk y Broome, 1869

Sinónimos: No se conocen

Nombres comunes: Roya del cafeto (Español) Coffee rust (ingles)

Clasificación taxonómica:

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Clase: Pucciniomycetes

Orden: Pucciniales

Familia: Mikronegeriaceae

Género: *Hemileia*

Especie: *Hemileia vastatrix*

(Robert *et al.*, 2005; Aime, 2006)

7. Procedimiento

7.1 Preparación de la muestra.

Identificación morfológica

- La muestra que se reciba para el diagnóstico de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*) debe presentar lesiones de color amarillo o naranja en el envés de las hojas (uredosporas) y manchas de color café, sin que el daño se presente en más del 50% de la superficie foliar.

7.2 Realización del ensayo

7.2.1 Observación directa

7.2.2 Raspado de pústulas

- 1) Observar lesiones de color amarillo pálido a naranja pálido en el envés de la lámina foliar utilizando un microscopio estereoscópico
- 2) Localizar las uredosporas y con ayuda de una aguja de disección o un alfiler entomológico, raspar sobre la lesión a fin de desprender las esporas del tejido vegetal.
- 3) Realizar preparaciones temporales o permanentes para su observación con un microscopio compuesto
- 4) Observar las características morfológicas de las uredosporas y obtener las medidas de largo y ancho de al menos 10 esporas.
- 5) Comparar las características morfométricas obtenidas con las reportadas en la literatura de referencia para obtener el diagnóstico
- 6) En caso de corroborar las características morfométricas que definen a *Hemileia vastatrix*, realizar montajes permanentes de las estructuras

7.2.3 Cortes de tejido vegetal con lesiones

- 1) Con un microscopio estereoscópico, localizar lesiones de color amarillo pálido a naranja pálido por el envés de la lámina foliar.
- 2) Cortar el tejido vegetal en una porción que incluya tejido sano y enfermo. Obtener fragmentos de tejido vegetal con esporas, procurando que no sean mayores a 0.5 mm de espesor a fin de permitir el paso del haz de luz a través del tejido
- 3) Preparar montajes temporales para su observación con un microscopio compuesto.
- 4) Observar las características morfológicas de las uredosporas y obtener las medidas de largo y ancho de al menos 10 esporas.
- 5) Comparar las características morfométricas obtenidas con las reportadas en la literatura de referencia para obtener el diagnóstico.
- 6) En caso de corroborar las características morfométricas que definen a *Hemileia vastatrix*, realizar montajes permanentes de las estructuras.

7.3 Descripción morfométrica

Las uredosporas nacen de forma individual sobre pedicelos equinulados (Figura 1 a y b), son periformes, triangulares, rectas o ligeramente curvas, en forma de pirámide truncada y en ocasiones reniformes, de 25-30 μm de largo por 12-28 μm de ancho (Figura 1 c y d).

Las paredes laterales de las uredosporas que están en contacto con otras uredosporas son lisas y planas, mientras que las paredes libres son convexas y equinuladas, con verrugas cónicas o truncas, de 3 μm a 4 μm de largo (Figura 2) (Duran, 1985).

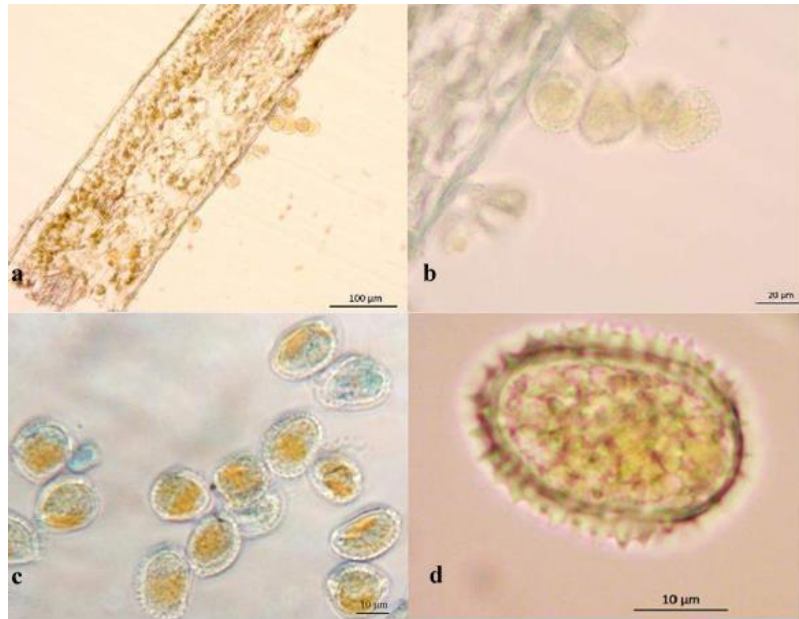


Figura 1. Uredosporas *Hemileia vastatrix* tomadas en un microscopio óptico. a) Corte longitudinal de tejido de hojas de cafeto; b) Uredosporas sobre tejido vegetal; c) Masa de uredosporas; d) Uredospora con equinulaciones. (Créditos: Laboratorio de Micología, CNRF, 2018).

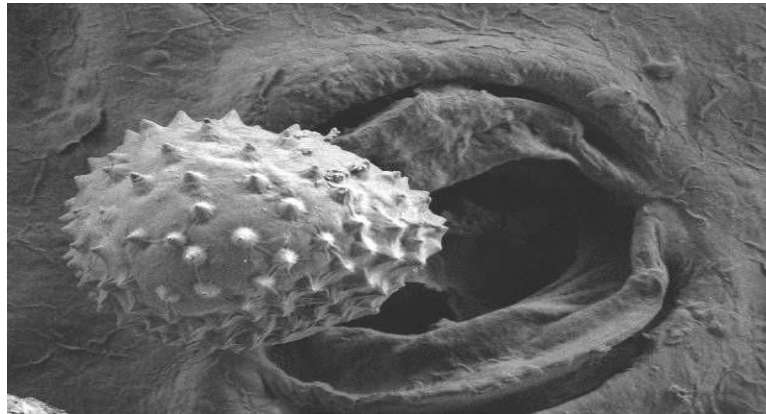


Figura 2. Uredosporas de *Hemileia vastatrix* en un microscopio electrónico de barrido. Mostrando paredes lisas y paredes equinadas con espinas cónicas sobre el tema de Hoja. (Créditos: Área de Microscopía Electrónica, CNRF, 2015).

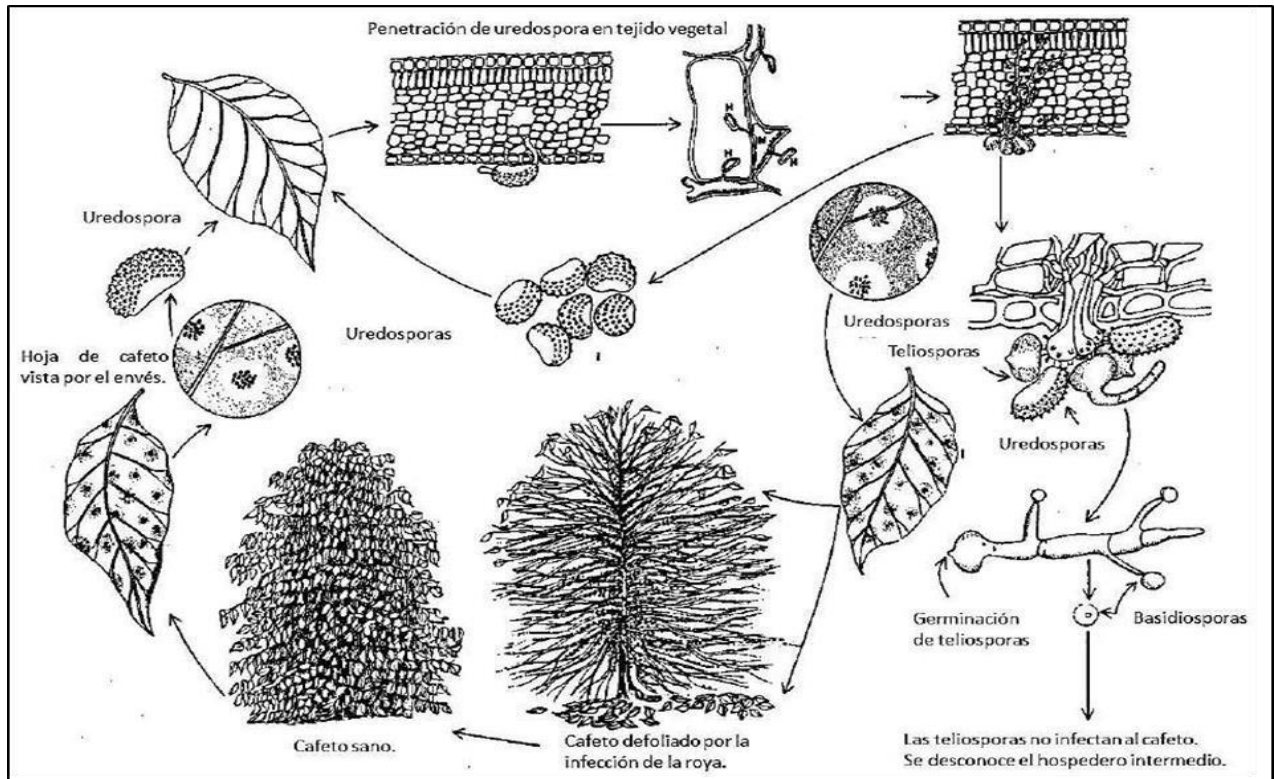


Figura 3. Ciclo biológico de *Hemileia vastatrix*, agente causal de la roya del café
Tomado de: Agrios, 2005

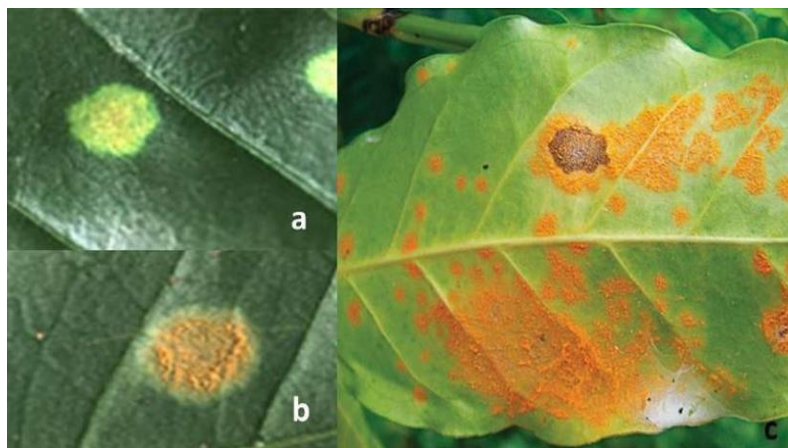


Figura 4. Síntomas y signos de *Hemileia vastatrix* en hojas de café. a) Lesión amarillo pálido, translúcida con apariencia aceitosa; b) Lesión color amarillo de aspecto polvoroso por la presencia de uredosporas; c) Mancha en estado avanzado color naranja pálido por la presencia de uredosporas maduras, con el centro café marrón y apariencia seca.
Tomado de: Arneson, 2000 y SENASICA, 2011).

8. Resultados

Identificación del Hongo

- Para reportar una identificación positiva de *Hemileia vastatrix* es necesaria la observación directa de las uredosporas, ya sea por raspado de pústulas o sobre cortes de tejido vegetal.
- Diagnosticar como negativo, en caso de no encontrar uredosporas con características típicas de *Hemileia vastatrix*.

9. Control de Calidad

El control de calidad en un laboratorio, debe evaluar y documentar el desempeño de todos los aspectos de sus procedimientos. Esto incluye la calidad de la muestra, la eficiencia de los reactivos, los medios de cultivo, el funcionamiento de los diversos instrumentos o equipos y la verificación o validación de los resultados obtenidos.

9.1 Control de calidad de las muestras

Uno de los aspectos más importantes en un laboratorio es la apropiada selección, recolección y transporte de las muestras. Por lo que todo el personal relacionado con estas responsabilidades, debe comprender lo determinante que es el mantenimiento de la calidad de la muestra, en la evaluación e informe de un espécimen.

A pesar de que algunos tipos de muestras requieren metodología de recolección y transporte muy especiales, se pueden enumerar algunos aspectos generales que deben tenerse en cuenta al recolectar las muestras.

- La muestra debe ser representativa
- Al tomar una muestra, es importante evitar la contaminación con microorganismos
- Se debe recolectar un volumen apropiado de muestra para evitar los resultados falsos negativos.
- Se debe identificar cada muestra su nombre y su número de identificación.
- Se debe colocar la muestra en un recipiente adecuado para su transporte, con el fin de asegurar la sobrevivencia del posible agente infeccioso.
- Por último, se debe evitar derramar la muestra y mantener en todo momento las medidas de bioseguridad apropiadas.

9.2 Control de calidad de los medios de cultivo

- Se debe mantener un registro de cada frasco de medio de cultivo, con el nombre del producto, nombre de la casa proveedora, fecha de recibo, fecha de expiración, número de lote y fecha en que se abrió el frasco
- Cada lote preparado de medio de cultivo se debe probar antes de su uso rutinario, mediante la inoculación de microorganismos.
- Las pruebas básicas de control de calidad de los medios preparados deben incluir: medición del pH, pruebas de esterilidad, capacidad de crecimiento y reacción, aspecto, dureza y profundidad del agar.

9.3 Control de Calidad de reactivos

- Un elemento fundamental en el trabajo diario del laboratorio lo constituyen los reactivos, tanto comerciales como de preparación doméstica, que son utilizados en la caracterización de microorganismos. Por ello, deben efectuarse controles diarios con las bacterias tipo y seguir estrictamente las indicaciones en cuanto a almacenamiento de los reactivos, metodología de la prueba y tiempo de lectura. Es recomendable que los reactivos comerciales sean examinados inmediatamente cuando se abre un nuevo lote o vial y llevar un registro de su funcionamiento.
- El registro de funcionamiento debe efectuarse en forma diaria o al menos cada vez que se efectúa la prueba.

9.4 Control de calidad de las tinciones

- La concentración de las soluciones de tinción, por efecto de la evaporación de los solventes o las variaciones introducidas en los métodos recomendados, pueden afectar los resultados de las tinciones para diferenciar microorganismos por su reacción a la tinción de Gram y la morfología, tintes para cápsulas, esporas, etc.
- El control de calidad de estos tintes debe realizarse primero con cada nuevo lote, luego basta con un control semanal para mantener un grado de seguridad apropiado en su uso. Para facilitar el control de los tintes, se recomienda preparar placas con microorganismos aislados en el trabajo rutinario o cepas de la ATCC frescas, tomado en cuenta aquellos que pudieran ser más útiles según la tinción a evaluar.

- Para el control diario de la tinción de Gram, se recomienda el uso de una cepa ATCC de *Staphylococcus aureus* y de *Escherichia coli*.
- Es necesario llevar un registro de estos controles.

9.5 Control de calidad de antisueros y otros productos comerciales como kits de identificación

- Existen cada vez más productos comerciales que tienen como objetivo ayudar en el diagnóstico de agentes etiológicos de enfermedades en el menor tiempo posible, con el mayor grado de especificidad y sensibilidad. Estos antisueros deben ser probados cada vez que se recibe un nuevo lote y cada vez que se utilicen, deben de analizarse los controles positivo y negativo que vienen con cada juego de reactivos. Se deben llevar registros con la fecha de expiración del lote, casa comercial, fecha en que ingresó al laboratorio, fecha en que se abrió el juego y el registro de los controles realizados.

9.6 Control de calidad de la prueba de sensibilidad

- Se debe monitorear la precisión y exactitud del procedimiento de la prueba de susceptibilidad, el comportamiento de los reactivos utilizados en la prueba y el desempeño de las personas que llevan a cabo las pruebas y sus resultados.
- Al hacer el control de calidad de discos, tiras de E-test o métodos de sensibilidad para sistemas automatizados o semi automatizados, se recomienda utilizar cepas ATCC. Cada nuevo lote de estos insumos debe evaluarse antes de su uso rutinario y luego una vez al mes, si no existe cambio de lote en ese periodo.

9.7 Control de calidad de equipos

- Todos los instrumentos utilizados en el laboratorio deben estar respaldados por un programa de control de calidad y de mantenimiento preventivo y correctivo, basados en las instrucciones del fabricante y los procedimientos establecidos. Debe mantenerse un registro de todo lo realizado al respecto, con el nombre del instrumento, fecha, resultado y comentarios.

9.8 Supervisión del personal

- El personal es el factor más importante en la calidad del trabajo en el laboratorio. Este personal debe tener una dedicación y actitud positiva hacia el trabajo, capacidad académica, actualización constante y contar con los elementos indispensables para su labor.

9.9 Control de calidad externo

- Es recomendable que los laboratorios puedan participar en programas de evaluación externa. Estos programas miden la capacidad del laboratorio para evaluar una muestra desconocida y llegar a un resultado seguro.
- Estos controles de calidad externos pueden ser nacionales o internacionales.

10. Disposición Final de la Muestra.

Mantener el material vegetal que no fue utilizado para el diagnóstico en su empaque original bajo refrigeración a 4 C, durante al menos 1 mes posterior al diagnóstico

Almacenar los registros y evidencias del proceso de diagnóstico de *Hemileia vastatrix*.

En caso de obtener un resultado negativo:

- Inactivar y desechar el material vegetal.

En caso de obtener un resultado positivo:

- Seleccionar hojas con síntomas y signos característicos de la roya del café, realizar el prensado y conservar como material de herbario. Desprender las uredosporas con un alfiler entomológico o aguja de disección y colectarlas en viales.
- Conservar los viales en refrigeración a 4 ± 2 °C.
- Conservar los montajes permanentes donde se encuentran estructuras distintivas del hongo, como evidencia de la identificación morfométrica.
- Contar con evidencia fotográfica de los signos y uredosporas.

Elaboración de montajes

9.1 Preparaciones temporales con cubreobjetos

- 1) Colocar una gota de medio de montaje en un portaobjetos. Evitar la formación de burbujas de aire.
- 2) Adicionar las estructuras del hongo sobre la gota, con ayuda de una aguja de disección o de un alfiler entomológico.
- 3) Colocar un cubreobjetos sobre la gota y presionar ligeramente.

- 4) Observar las estructuras con microscopio compuesto su disposición, tamaño, forma y ornamentación.

9.2. Preparaciones temporales con cinta adhesiva

- 1) Colocar en un portaobjetos una gota de medio de montaje.
- 2) Con un pedazo de cinta adhesiva transparente tocar con delicadeza y en forma superficial las lesiones para obtener las uredosporas.
- 3) Pegar la cinta sobre el portaobjetos cuidando que las uredosporas queden dentro de la gota.
- 4) Observar en un microscópio compuesto.

10.3. Preparaciones permanentes

- 1) Colocar una gota de medio de montaje en un portaobjetos.
- 2) Adicionar las estructuras del hongo sobre la gota con ayuda de una aguja de disección o de un alfiler entomológico. Eliminar la formación de burbujas con una aguja o calentar el portaobjetos en un mechero o plancha.
- 3) Con ayuda de un sacabocados, formar un anillo de parafina alrededor de la gota del medio de montaje.
- 4) Colocar un cubreobjetos sobre el anillo de parafina y calentar hasta que se derrita la parafina, cuidando que no queden burbujas de aire en la gota.
- 5) Dejar enfriar y observar con un microscopio compuesto.

Medios de montaje

Lacto fenol

Fenol (cristales)	20 g
Ácido láctico	20 ml
Glicerina	40 ml
Agua destilada	20 ml
Azul de Nilo	0.1- 0.5 g

Agregar los cristales de fenol y el agua a un recipiente, calentar ligeramente para disolver los cristales, adicionar la glicerina y el ácido láctico, colocar el colorante azul de Nilo, agitar hasta que se diluya, agregar colorante hasta obtener la coloración deseada.

Nota: este medio de montaje actúa como solución fijadora y restaura la turgencia del material seco. Es excelente medio para montajes temporales y permanentes.

Aqua-glicerina

Glicerina	50 ml
Agua destilada	50 ml

Consiste en una concentración de 50% de glicerina y adicionar algún colorante como azul de Nilo.

Nota: se utiliza en montajes temporales y permanentes.

Ácido láctico

Ácido láctico

Agua destilada

Se recomienda utilizar en una concentración de 45%. Se puede adicionar algún colorante.

Hidróxido de Potasio

Hidróxido de potasio 40 g

Creatina 0.3 g

Agua destilada 100 ml

Agregar el KOH a 75 ml de agua, agitando, una vez disuelto, agregar la creatina y aforar a 100 ml.

Nota: este medio restaura la turgencia del material seco, útil cuando se requiere aclarar el material montado.

Prensado de tejido vegetal

El prensado permite secar el material vegetal para conservar por mayor tiempo las estructuras de hongos como royas. Para ello se requiere una prensa de madera, papel periódico, láminas de cartón liso, liso y corrugado.

- 1) Seleccionar hojas con síntomas de la enfermedad y signos característicos del hongo.
- 2) Colocar una de las tapas de la prensa de madera y sobre esta una lámina de cartón.
- 3) Disponer tres hojas de papel periódico sobre el cartón corrugado.
- 4) Colocar de tres a cinco hojas de la planta sobre papel periódico, cuidando que no se doblen las hojas y cubrir con otra mitad de papel. Acomodar de esta forma todo el tejido vegetal hasta terminar y adicionar tres capas de papel periódico.
- 5) Sobreponer cartón corrugado y cubrir con una lámina de cartón y la otra tapa de la prensa.
- 6) Amarrar la prensa por sus cuatro lados con un cordón, a fin de mantener fijo el material prensado.
- 7) Cuidar y conservar la identificación de la muestra durante todo el proceso.
- 8) Cambiar el papel periódico diariamente hasta obtener el secado total del material vegetal.
- 9) Guardar el material preservado en un folder para herbario debidamente etiquetado con los datos de identificación de la muestra.

11. Registros

- el nombre científico de la plaga identificada
- el código o número de referencia de la muestra (para la rastreabilidad)
- la naturaleza del material infestado incluyendo el nombre científico del hospedante
- el origen (incluida la ubicación geográfica, si se conoce) del material infestado,
- la descripción de las signos o síntomas (incluyendo las fotografías, de ser pertinentes)

- los métodos, incluyendo los controles, utilizados en el diagnóstico y los resultados
- para los métodos morfológicos o morfométricos, las medidas, los dibujos o las fotografías
- para los métodos bioquímicos y moleculares, la documentación de los resultados de la prueba tales como fotografías del gel del diagnóstico o registros de los resultados de la prueba ELISA en los cuales se basó el diagnóstico
- cuando proceda, la magnitud de cualquier infestación (la cantidad de plagas individuales encontradas y de tejido dañado)
- el nombre del laboratorio y, cuando proceda, el nombre de las personas responsables del diagnóstico y/o quienes lo realizaron
- las fechas de recolección de la muestra, y de la detección e identificación de la plaga
- cuando sea apropiado, el estado de la plaga, viva o muerta, o la viabilidad de sus etapas de desarrollo

12. Puntos de contacto para información adicional

<https://croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/roya-del-cafeto>

13. Reconocimiento

Contribución principal: SENASICA

14. Referencias

SENASICA, 2018. Protocolo de Diagnóstico: *Hemileia vastatrix* (Roya del café), México

FIN DEL PROCEDIMIENTO

PROTOCOLOS DE DIAGNOSTICO DEL CULTIVO DE CACAO (*THEOBROMA CACAO*)



		Protocolo de Diagnóstico de Insectos Plaga <i>Carmenta foraseminis</i> (Lep.Sesiidae) en Cacao	
Elaborado por:	José Jeremías Paz Carpio	Versión:	
		Revisión:	
Aprobado por:	Ing. Anakely Romero de Huevo	Fecha aprobación	Página 1 de 18

1. Propósito.

Conocer la plaga *Carmenta foraseminis* y sus métodos de detección e identificación a nivel de laboratorio para diagnóstico preventivo y así evitar pérdidas en producción.

2. Alcance

Identificar la morfología y estructura del insecto para dotar al técnico de información fiable en el proceso de detección.

3. Responsabilidades.

Actividad	Responsable
Preparación de la muestra	Técnico del Laboratorio
Ejecución del ensayo	Técnico del Laboratorio
Entrega de resultados	Técnico del Laboratorio

4. Documentos o registros.

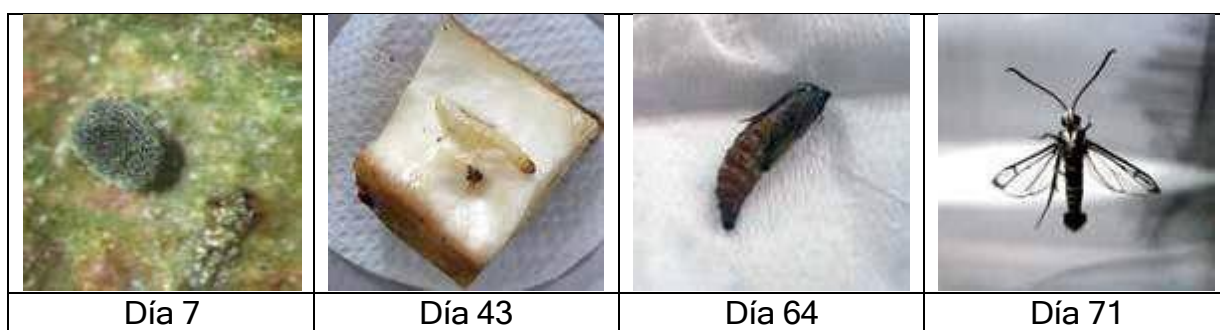
Relación con otros documentos del SGC	Registros generados
<ul style="list-style-type: none"> • <p>REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cubillos G, Manual del perforador de la mazorca del Cacao, Colombia, 2013. • Delgado Puchi N. 2005. Caracterización morfológica de los Sesiidae (Insecta: Lepidoptera) perforadores del fruto del cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.), presentes en la región costera del estado Aragua, Venezuela. • MORÁN-ROSILLO, J.L.; CASTILLOCARRILLO, P. S. 2020. El barrenador del fruto y tallo del cacao (<i>Carmenta foraseminis</i>, Lepidoptera: Sesiidae) en el valle de 	<ul style="list-style-type: none"> • F.D 1.1.1. Bitácora de Trabajo de Diagnóstico Vegetal • FD 1.1.2. Hoja de Resultados de Diagnóstico Vegetal
Zarumilla, Tumbes, Perú. Revista Colombiana de Entomología	

5. Equipo y materiales

Equipo	<ul style="list-style-type: none">• Estereoscopio Olympus modelo SZ21 con ocular micrométrico
Materiales	<ul style="list-style-type: none">• Bisturí• Pinzas• Alfileres entomológicos
Reactivos	<ul style="list-style-type: none">• Hidróxido de potasio al 10%
Protección	<ul style="list-style-type: none">• Mascarilla desechable• Gabacha de tela• Guantes de látex

6. Información De la Plaga

C. foraseminis, como todos los lepidópteros, presenta metamorfosis completa. El daño lo hace la larva al alimentarse principalmente de la placenta del fruto y el mucilago de la semilla. A continuación (Figura 1), se aprecian las distintas fases por las que pasa el insecto. El ciclo desde la postura hasta adulto es de 71 días.



Características morfológicas de las fases inmaduras de *C. foraseminis*

Huevos

Forma: generalmente ovoides, con ambas regiones anterior y posterior redondeadas entre $3,63 \pm 0,15$ y $2,31 \pm 0,10$ mm ($1,57 \pm 0,02$ más largo que anchos). La región del micrópilo presenta una leve hendidura, pero sin cambios en la coloración. Dorsalmente, la superficie del corión es de color castaño rojizo y presenta estrías longitudinales cortas, en forma de punturas; ventralmente la superficie es totalmente lisa, castaño claro y levemente convexa (Fig. 2).



Figura 2. Huevos de *Carmenta foraseminis*, A. vista dorsal. B. vista ventral

Larva

Cuerpo blanquecino o amarillo claro; cabeza marrón, ligeramente más estrecha que el pronoto. En éste, el escudo anal, son amarillo claro, haciendo poco contraste con el color del cuerpo de la larva. Las larvas del último instar en general son muy voraces y activas y son altamente fotofóbicas, lo cual dificulta realizar las observaciones con larvas vivas.

Pupa

Castaño claro, $1,43 \pm 0,04 \times 0,33 \pm 0,04$ cm..

Cabeza: Labrum triangular con 2 setas, ambas de la misma longitud. Región anterior de la galea de la maxila de forma sinusoidal y tocando el borde inferior de los ojos. Las galeas son más anchas en su base y bordean los palpos labiales, pero se hacen más estrechas a partir del ápice de éstos (Figura 3a y b).

Tórax: Pronoto rectangular, ocupando $1/6$ de la longitud dorsal del tórax. Con punturas circulares profundas, muy densas. El mesotórax es la región más desarrollada, abarcando casi el 70% de la superficie dorsal. Posee un par de surcos alares, longitudinales a ambos lados del mesonoto, los cuales comienzan en el borde anterior del segmento (sutura pro-mesonotal), y se extienden un poco más allá de la mitad del mesonoto. Este surco es ancho en toda su extensión, debido a que ambos bordes externo e interno son paralelos, siendo el externo ligeramente más corto que el borde interno. La superficie del mesotórax posee densas punturas semicirculares en la región anterior; la región media y posterior es lisa, con escasas estrías transversas. El metanoto en su zona media es tan estrecho como el pronoto, pero en los laterales, es el doble de ancho. Superficie presenta estrías transversas escasas, especialmente en la región anterior (Figura 4b).

Abdomen: Diez segmentos. A2 y A8-9 con una fila simple transversa de espinas dorsales. A3-6 con 2 filas de espinas dorso laterales, las del margen anterior más largas y más desarrolladas que las del margen posterior. A7 en machos con 2 filas de espinas, las hembras con una (Figura 5). Tergo del A1 totalmente liso, con pocas estrías en el borde anterior. Espiráculo del A2 poco visible, circular y retraído hacia el integumento

(Figura 5b). Espiráculos A3-A7 poco conspicuos. Ápice del abdomen sin cremaster. La región anal representada por leve protuberancia circular en su zona media (Figura 7b); región genital con una abertura estrecha, longitudinal, que delimita internamente un par de lóbulos. La zona anterior de la abertura está separada de la protuberancia circular anal. El ápice espaciadas, aplanadas, esclerotizadas y claramente definidas; en la región ventral, se observan a cada lado un par de espinas semi-fusionadas. En conjunto, entre todas forman un arreglo circular.

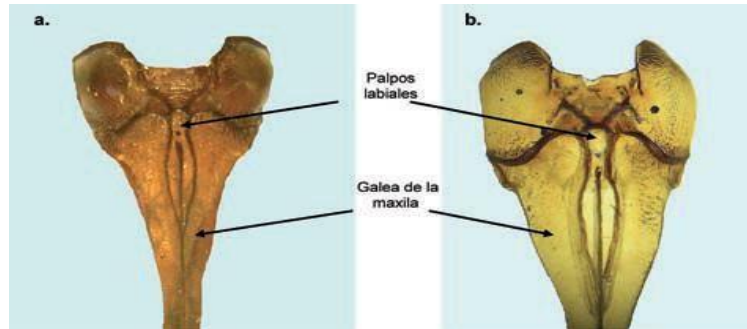


Figura 3. Palpos labiales y galea de la maxila en pupas, vista frontal. a. *Carmenta theobromae*. b. *Carmenta foraseminis*

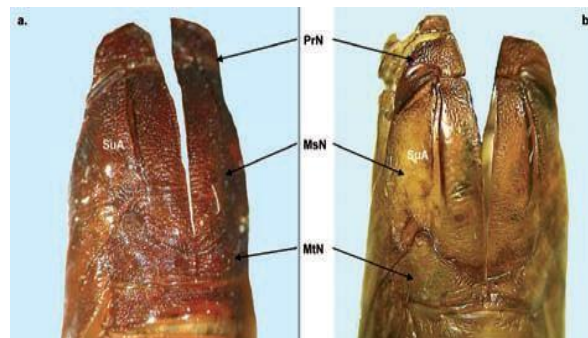


Figura 4. Vista dorsal del tórax en pupas. Pronoto (PrN); Mesonoto (MsN); Metanoto (MtN), Surco Alar (SuA). a. *Carmenta theobromae*. b. *Carmenta foraseminis*.

Fuente: Cubillos G, Manual del perforador de la mazorca del Cacao, Colombia, 2013

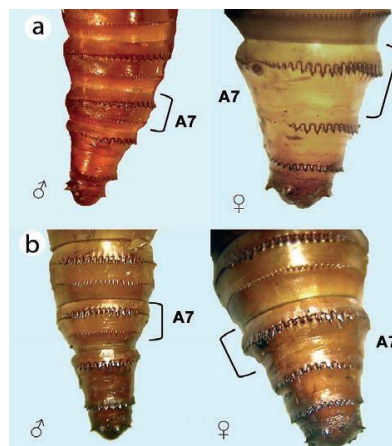


Figura 5. Pupas de *C. foraseminis*. Diferencias entre machos y hembras. a. *Carmenta theobromae*. b. *C. foraseminis*. A7: Segmento VII del abdomen.

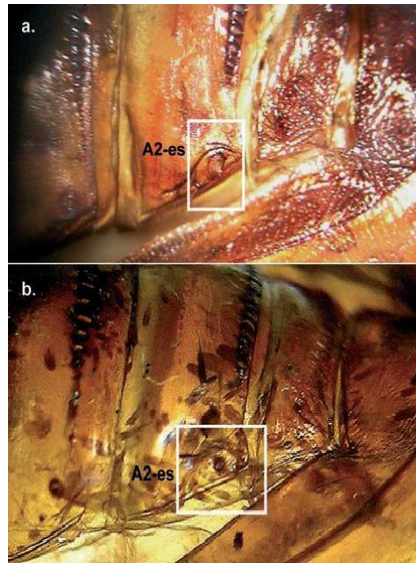


Figura 6. Espiráculo del segundo segmento abdominal (A2-es) en pupas. a. *Carmentia theobromae*. b. *Carmentia foraseminis*.

Fuente: Cubillos G, Manual del perforador de la mazorca del Cacao, Colombia, 2013

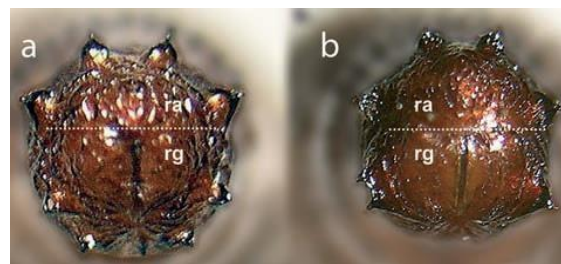


Figura 7. Ápice del abdomen en pupas. Región anal (ra), región genital (rg). a. *Carmentia theobromae*. b. *Carmentia foraseminis*

Características morfológicas del adulto de *C. foraseminis*

Los machos son más largos y su abdomen se estrecha al final terminando en un penacho de escamas en forma de hisopo. Las hembras son cortas y gruesas. Las características morfológicas de la fase adulta de *C. foraseminis*, macho y hembra se aprecian en la Fig. 8.

Figura 8. *Carmentia foraseminis* Eichlin a. Hembra. B. Macho. Izquierda, vista dorsal. Derecha, vista ventral



Información taxonómica

Nombre común: Perforador de la mazorca del cacao

Nombre científico: *Carmenta foraseminis*

Taxonomía:

Reino: Animalia

Filo: Artrópoda

Subfilo: Hexápoda

Clase: Insecta

Orden: Lepidoptera

Familia: Sesiidae

Tribu: Synanthedonini

Género: *Carmenta*

Especie: *foraseminis*

(Delgado,2005, Gillot,2005, Vásquez *et al.* ,2015)

7. Procedimiento

Identificación morfométrica

Observación directa

7.1 Preparación de la muestra.

- Del Fruto o tallo extraer de su interior con una cuchilla los huevos, larvas, pupas o a identificar.
- Para adultos machos y hembras se congelan por 20 minutos para provocar su muerte, luego con bisturí y pinza se disecciona el abdomen para extraer la genitalia, colocan en una solución de hidróxido de potasio al 10% por espacio de 24 horas.
- Las muestras de huevos y ninfas se extraen de la mazorca del cacao con ayuda de un bisturí luego deben estar depositados en viales con alcohol al 70%

7.2 Realización del ensayo

- Para identificar adultos con ayuda de bisturí y pinzas se hace la disección del abdomen, luego se extrae la genitalia masculina, se abre y se fotografía desde varios ángulos, a partir de ello se realiza la identificación por comparación con ayuda de un estereoscopio Olympus modelo SZ21 con ocular micrométrico, con una platina micrométrica. También

se puede montar en alfileres entomológicos para describir sus características morfológicas y sus genitales.

- Para identificar huevos se utiliza una muestra de 20 huevos encontrados en trozos de la corteza del tallo o frutos recolectados cerca de la zona afectada, se realizan comparaciones con literatura antes descrita y para el tamaño se mide el ancho y longitud con el estereoscopio con ocular micrométrico.
- Para identificar larvas se pueden utilizar 10 larvas del cuarto estadio se debe tomar en cuenta: forma, color, ancho de la capsula cefálica, tórax y abdomen, disposición de las propatas ventrales y caudales, se considera observar solo este estadio porque en él se encuentran presentes las estructuras de importancia taxonómica necesarias para la confirmación de la especie.
- Para identificar la pupa se puede utilizar 10 pupas en las que se observa forma, tamaño, color y sexo, se toma como carácter de referencia la fusión de los segmentos terminales del abdomen.

8. Resultados

- Se debe tomar en cuenta que cualquier espécimen que no cumpla con los caracteres que se describen, se considera como negativo.
- Si las características presentadas por el espécimen en muestra coinciden con la información de la plaga descrita al inicio del Protocolo se considera y reporta como positivo.

9. Control de Calidad

El control de calidad en un laboratorio, debe evaluar y documentar el desempeño de todos los aspectos de sus procedimientos. Esto incluye la calidad de la muestra, la eficiencia de los reactivos, los medios de cultivo, el funcionamiento de los diversos instrumentos o equipos y la verificación o validación de los resultados obtenidos.

9.1 Control de calidad de las muestras

Uno de los aspectos más importantes en un laboratorio es la apropiada selección, recolección y transporte de las muestras. Por lo que todo el personal relacionado con estas responsabilidades, debe comprender lo determinante que es el mantenimiento de la calidad de la muestra, en la evaluación e informe de un espécimen.

A pesar de que algunos tipos de muestras requieren metodología de recolección y transporte muy especiales, se pueden enumerar algunos aspectos generales que deben tenerse en cuenta al recolectar las muestras.

- La muestra debe ser representativa
- Al tomar una muestra, es importante evitar la contaminación con microorganismos
- Se debe recolectar un volumen apropiado de muestra para evitar los resultados falsos negativos.
- Se debe identificar cada muestra su nombre y su número de identificación.
- Se debe colocar la muestra en un recipiente adecuado para su transporte, con el fin de asegurar la sobrevivencia del posible agente infeccioso.
- Por último, se debe evitar derramar la muestra y mantener en todo momento las medidas de bioseguridad apropiadas.

9.2 Control de calidad de los medios de cultivo

- Se debe mantener un registro de cada frasco de medio de cultivo, con el nombre del producto, nombre de la casa proveedora, fecha de recibo, fecha de expiración, número de lote y fecha en que se abrió el frasco
- Cada lote preparado de medio de cultivo se debe probar antes de su uso rutinario, mediante la inoculación de microorganismos
- Las pruebas básicas de control de calidad de los medios preparados deben incluir: medición del pH, pruebas de esterilidad, capacidad de crecimiento y reacción, aspecto, dureza y profundidad del agar.

9.3 Control de Calidad de reactivos

Un elemento fundamental en el trabajo diario del laboratorio lo constituyen los reactivos, tanto comerciales como de preparación doméstica, que son utilizados en la caracterización de microorganismos. Por ello, deben efectuarse controles diarios con las bacterias tipo y seguir estrictamente las indicaciones en cuanto a almacenamiento de los reactivos, metodología de la prueba y tiempo de lectura. Es recomendable que los reactivos comerciales sean examinados inmediatamente cuando se abre un nuevo lote o vial y llevar un registro de su funcionamiento.

- El registro de funcionamiento debe efectuarse en forma diaria o al menos cada vez que se efectúa la prueba.

9.4 Control de calidad de las tinciones

- La concentración de las soluciones de tinción, por efecto de la evaporación de los solventes o las variaciones introducidas en los métodos recomendados, pueden afectar los resultados de las tinciones para diferenciar microorganismos por su reacción a la tinción de Gram y la morfología, tintes para cápsulas, esporas, etc.
- El control de calidad de estos tintes debe realizarse primero con cada nuevo lote, luego basta con un control semanal para mantener un grado de seguridad apropiado en su uso. Para facilitar el control de los tintes, se recomienda preparar placas con microorganismos aislados en el trabajo rutinario o cepas de la ATCC frescas, tomado en cuenta aquellos que pudieran ser más útiles según la tinción a evaluar.
- Para el control diario de la tinción de Gram, se recomienda el uso de una cepa ATCC de *Staphylococcus aureus* y de *Escherichia coli*.
- Es necesario llevar un registro de estos controles.

9.5 Control de calidad de antisueros y otros productos comerciales como kits de identificación

- Existen cada vez más productos comerciales que tienen como objetivo ayudar en el diagnóstico de agentes etiológicos de enfermedades en el menor tiempo posible, con el mayor grado de especificidad y sensibilidad. Estos antisueros deben ser probados cada vez que se recibe un nuevo lote y cada vez que se utilicen, deben de analizarse los controles positivo y negativo que vienen con cada juego de reactivos. Se deben llevar registros con la fecha de expiración del lote, casa comercial, fecha en que ingresó al laboratorio, fecha en que se abrió el juego y el registro de los controles realizados.

9.6. Control de calidad de la prueba de sensibilidad

- Se debe monitorear la precisión y exactitud del procedimiento de la prueba de susceptibilidad, el comportamiento de los reactivos utilizados

en la prueba y el desempeño de las personas que llevan a cabo las pruebas y sus resultados.

- Al hacer el control de calidad de discos, tiras de E-test o métodos de sensibilidad para sistemas automatizados o semi automatizados, se recomienda utilizar cepas ATCC. Cada nuevo lote de estos insumos debe evaluarse antes de su uso rutinario y luego una vez al mes, si no existe cambio de lote en ese periodo.

9.7 Control de calidad de equipos

- Todos los instrumentos utilizados en el laboratorio deben estar respaldados por un programa de control de calidad y de mantenimiento preventivo y correctivo, basados en las instrucciones del fabricante y los procedimientos establecidos. Debe mantenerse un registro de todo lo realizado al respecto, con el nombre del instrumento, fecha, resultado y comentarios.

9.8 Supervisión del personal

- El personal es el factor más importante en la calidad del trabajo en el laboratorio. Este personal debe tener una dedicación y actitud positiva hacia el trabajo, capacidad académica, actualización constante y contar con los elementos indispensables para su labor.

9.9 Control de calidad externo

- Es recomendable que los laboratorios puedan participar en programas de evaluación externa. Estos programas miden la capacidad del laboratorio para evaluar una muestra desconocida y llegar a un resultado seguro.
- Estos controles de calidad externos pueden ser nacionales o internacionales.

10. Disposición Final de la Muestra.

- Si el resultado de la identificación es positivo, se pone en micro viales con alcohol para su conservación.
- Si el resultado es negativo, se desecha en bolsa plástica bien cerrada y asegurando la muerte del espécimen.

11. Registros

- el nombre científico de la plaga identificada
- el código o número de referencia de la muestra (para la rastreabilidad)
- la naturaleza del material infestado incluyendo el nombre científico del hospedante
- el origen (incluida la ubicación geográfica, si se conoce) del material infestado,
- la descripción de las signos o síntomas (incluyendo las fotografías, de ser pertinentes)
- los métodos, incluyendo los controles, utilizados en el diagnóstico y los resultados
- para los métodos morfológicos o morfométricos, las medidas, los dibujos o las fotografías
- para los métodos bioquímicos y moleculares, la documentación de los resultados de la prueba tales como fotografías del gel del diagnóstico o registros de los resultados de la prueba ELISA en los cuales se basó el diagnóstico
- cuando proceda, la magnitud de cualquier infestación (la cantidad de plagas individuales encontradas y de tejido dañado)
- el nombre del laboratorio y, cuando proceda, el nombre de las personas responsables del diagnóstico y/o quienes lo realizaron
- las fechas de recolección de la muestra, y de la detección e identificación de la plaga
- cuando sea apropiado, el estado de la plaga, viva o muerta, o la viabilidad de sus etapas de desarrollo

12. Puntos de contacto para información adicional

<https://repositorio.unas.edu.pe/server/api/core/bitstreams/ae94c5c2-18a8-44cd9a24-ee1ff7253ab6/content>

13. Reconocimiento

Delgado Puchi N. 2005. Caracterización morfológica de los Sesiidae (Insecta: Lepidóptera) perforadores del fruto del cacao (*Theobroma cacao* L.), presentes en la región costera del estado Aragua, Venezuela.

14. Referencias

MORÁN-ROSILLO, J.L.; CASTILLOCARRILLO, P. S. 2020. El barrenador del fruto y tallo del cacao (*Carmanta foraseminis*, Lepidóptera: Sesiidae) en el valle de Zarumilla, Tumbes, Perú. Revista Colombiana de Entomología

FIN DEL PROCEDIMIENTO

		Protocolo de Diagnóstico del Insecto Plaga <i>Monalonion dissimulatum</i> (Hemiptera: Miridae) en Cacao.	
Elaborado por:	José Jeremías Paz Carpio	Versión:	
		Revisión:	
Aprobado por:	Ing. Anakely Romero de Huevo	Fecha aprobación	Página 1 de 14

1. Propósito.

Conocer la plaga *Monalonion dissimulatum* y sus métodos de detección e identificación a nivel de laboratorio para diagnóstico preventivo y así evitar pérdidas en producción

2. Alcance

Identificar la morfología y estructura del insecto para dotar al técnico de información fiable en el proceso de detección.

3. Responsabilidades.

Actividad	Responsable
Preparación de la muestra	Técnico del Laboratorio
Ejecución del ensayo	Técnico del Laboratorio
Entrega de resultados	Técnico del Laboratorio

4. Documentos o registros.

Relación con otros documentos del SGC	Registros generados
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA <ul style="list-style-type: none"> • Riera, C. Contribución al conocimiento de plagas de cacao: Situación actual y mecanismos de Antixenosis sobre <i>Molanion dissimulatum</i> Distant, Ecuador, 2012. • Rabanal, G. Morfología y Biología del Chinche (<i>Monalonion sp.</i>) del Cacao (<i>Theobroma cacao L.</i>) en Amazonas, Perú, 2023. 	<ul style="list-style-type: none"> • F.D 1.1.1. Bitácora de Trabajo de Diagnóstico Vegetal • FD 1.1.2. Hoja de Resultados de Diagnóstico Vegetal

5. Equipo y materiales.

Equipo	<ul style="list-style-type: none">• Estereoscopio con software IMAGE TOOL
Materiales	<ul style="list-style-type: none">• Viales con su tapón• Regla milimétrica
Reactivos	<ul style="list-style-type: none">• Alcohol al 70%
Protección	<ul style="list-style-type: none">• Gabacha de tela• Mascarilla desechable• Gorro desechable• Guantes de látex

6. Información de la Plaga

Las especies del Genero *Monalonion*, sufren una metamorfosis gradual o sencilla denominada Paurometabolismo en la cual se incluye el estado de huevo, cinco estadios ninfales y finalmente completan su desarrollo llegando a adultos (Fig. 1). El proceso de crecimiento de las alas es gradual, ocurriendo enteramente en los últimos instares ninfales; las alas rudimentarias están presentes en forma de almohadillas dorsales.

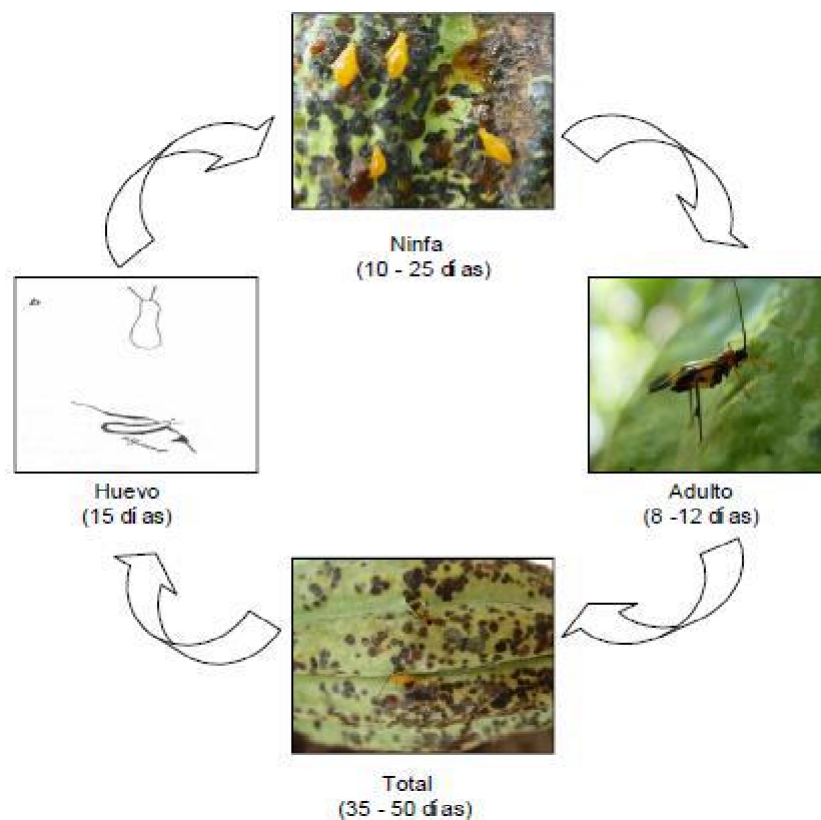


Figura 1. Duración y fases del ciclo biológico del chinche de cacao (*Monalonion dissimulatum*)

Tomado de: (Riera, 2012).

Información Taxonómica

Nombre Común: Chinche del Cacao

Nombre científico: *Monalonion dissimulatum*

Taxonomía:

Reino: Animalia

Clase: Insecta

Orden: Hemiptera

Familia: Miridae

Subfamilia: Bryocorinae

Género: *Monalonion*

Especie: *dissimulatum*

(Riera, 2012)

7. Procedimiento

Identificación morfológica

7.1 Preparación de la muestra.

- Las muestras de huevos, ninfas se extraen de la mazorca del cacao con ayuda de un bisturí luego deben estar depositados en frascos con alcohol al 70%

7.2 Realización del ensayo

- Para la descripción morfológica se realiza las siguientes mediciones: para ninfas longitud, ancho del cuerpo y de los primordios alares, en tanto que para adultos se considera la longitud y ancho del cuerpo, cabeza, vértice, antenómeros, base del pronoto, hemiélitro, base del cuneus, longitud del fémur y de la tibia en las patas anteriores, medianas y posteriores. Estas mediciones se realizan utilizando un estereoscopio con software IMAGE TOOL® Versión 3.00. Como unidad de medida para evaluar todas las dimensiones morfológicas se usa una regla milimétrica.

Se presentan las características morfológicas y morfométricas determinadas para examinar los individuos de *Monalonion* presentados en la muestra.

Huevo

Las posturas son endofíticas, por ese motivo el operculum es muy resistente a presiones laterales del tejido vegetal donde está localizado. El huevo es de color blanco lechoso, alargado y ligeramente curvo (Fig. 2), presentan dos apéndices que sobresalen de la mazorca, los cuales están en contacto con el ambiente y permite su identificación en un campo de cacao; se presume que estas estructuras tienen función respiratoria (Fig. 3). Al respecto Riera (2012) y Rodríguez (2015) mencionan que los huevos son de forma alargada y algo curvada, de color blanquecino y cuentan con dos apéndices filiformes o aerófilos que sirven para respirar.

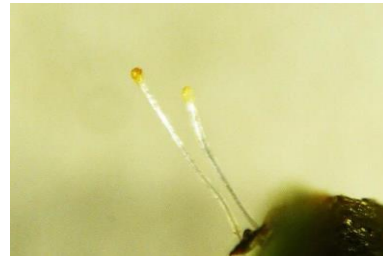


Figura 2. Huevo de *Monalonion dissimulatum*.

Figura 3. Apéndices de huevo

Tomados de: Morfología y Biología del Chinche (*Monalonion sp.*) del Cacao (*Theobroma cacao L.*) en Amazonas, Perú, 2023.

Ninfas

Este insecto pasa por cinco estadios ninfales antes de llegar al estado adulto, cada estadio presenta diferencias de color, tamaño y primordios alares. Riera (2012) y Valarezo *et al.* (2012) señalan que el género *Monalonion* pasa por cinco estados ninfales hasta llegar al estado adulto.

Ninfa I

Se caracteriza por presentar tonalidad amarillo anaranjado claro brillante y una movilidad limitada; en promedio el estadio I (Fig. 4), alcanza una longitud de 2,09 mm en promedio. Al respecto Rodríguez (2015) indica que al finalizar la fase de incubación emergen las ninfas que presentan una coloración anaranjada brillante cuyo tamaño oscila de 2,5 - 3 mm, tienen las patas y antenas más oscuras de un color café, y el cuerpo ligeramente alargado. Giraldo *et al.* (2010) menciona que el primer estadio se caracteriza por presentar una tonalidad rojiza anaranjada poco definida y una movilidad limitada.

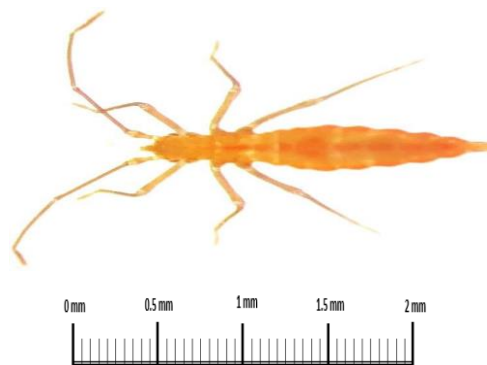


Figura 4. Estadio ninfal I

Tomado de: Morfología y Biología del Chinche (*Monalonion sp.*) del Cacao (*Theobroma cacao L.*) en Amazonas, Perú, 2023.

Ninfa II

Presenta tonalidad amarillo anaranjado claro brillante, incrementa su tamaño y movilidad; y alcanza una longitud promedio de 2,55 mm. (Fig. 5). Rodríguez (2015), menciona que el estado II es de cuerpo ligeramente alargado, de coloración anaranjada brillante, alcanzando a medir de 3,5 - 4 mm.

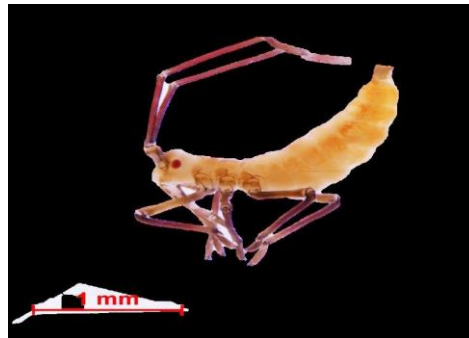


Figura 5. Estadio ninfal II

Tomado de: Morfología y Biología del Chinche (*Monalonion sp.*) del Cacao (*Theobroma cacao L.*) en Amazonas, Perú, 2023.

Ninfa III

Se desplaza a lo largo de la mazorca y del tallo de la planta de cacao, aumentando su actividad alimenticia; es de color anaranjado brillante, en promedio llega a medir 3,30 mm de longitud y en esta etapa se inicia la diferenciación de los primordios alares. Al respecto Giraldo et al. (2010) mencionan que tiene una mayor movilidad a lo largo de su hospedero, en este estadio inicia también la diferenciación de los primordios alares. (Fig. 6). Rodríguez (2015) indica que el estado ninfal III presenta un tamaño de 4 - 4,5 mm. y es de color anaranjado brillante.

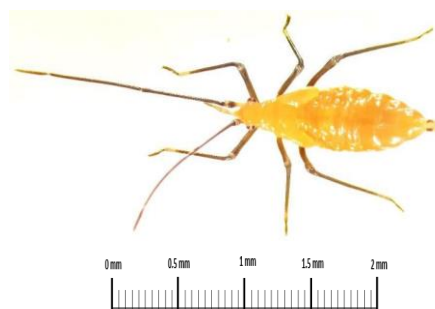


Figura 6. Estadio ninfal III

Tomado de: Morfología y Biología del Chinche (*Monalonion sp.*) del Cacao (*Theobroma cacao L.*) en Amazonas, Perú, 2023.

Ninfa IV

Son de color amarillo anaranjado brillante, presentan sus primordios alares de mayor tamaño con respecto a los demás estadios y alcanzan una longitud promedio de 4,28 mm. (Fig. 7). Rodríguez (2015) menciona que en este estadio se puede observar las partes alares en desarrollo de un color negruzco en la parte anterior del tórax, la coloración anaranjada es más intensa a los estadios anteriores y alcanza a medir de 5 - 6 mm de longitud.



Figura 7. Estadio ninfal IV

Tomado de: Morfología y Biología del Chinche (*Monalonion sp.*) del Cacao (*Theobroma cacao L.*) en Amazonas, Perú, 2023.

Ninfa V

Presenta una tonalidad parecida al estadio IV, tiene los primordios alares de color negro hacia el ápice, y a medida que se acerca el proceso de muda a adulto, el abdomen se alarga tomando la forma de esta última fase, alcanza una longitud promedio de 9,63 mm. (Fig.8). Al respecto Riera (2012) indica que en el quinto estado ninfal, el insecto llega a medir hasta 12 mm de longitud.



Figura 8. Estadio ninfal V

Tomado de: Morfología y Biología del Chinche (*Monalonion sp.*) del Cacao (*Theobroma cacao L.*) en Amazonas, Perú, 2023.

Las dimensiones de los estadios se reflejan en el Cuadro 1.

Cuadro 1

Cuadro 1. Dimensiones de cada estadio ninfal de *Monalonion dissimulatum*.

Estadio ninfal	Longitud de cuerpo (prom.mm)	Ancho de cuerpo (prom.mm)	Ancho primordio alar (prom.mm)
I	2.09	0.56	-
II	2.55	0.87	-
III	3.30	1.58	0.64
IV	4.28	1.75	1.22
V	9.63	2.78	1.21

Tomado de: Morfología y Biología del Chinche (*Monalonion sp.*) del Cacao (*Theobroma cacao L.*) en Amazonas, Perú, 2023.

Adulto

Presenta una coloración variable con respecto a cada uno de las partes de su cuerpo. Cuando los adultos se observan al estereoscopio, la cabeza es negra y brillante. El tórax y el abdomen son de color variable que va desde amarillo hasta naranja; notándose manchas 30 irregulares de color negro a lo largo del abdomen. (Fig. 9). Las patas son negras, con los fémures engrosados hacia su parte distal, provistas de una franja amarilla anaranjada.



Figura 9. Estado adulto de *Monalonion dissimulatum*

Tomado de: Morfología y Biología del Chinche (*Monalonion sp.*) del Cacao (*Theobroma cacao L.*) en Amazonas, Perú, 2023.

Antenas

Son de color negro brillante, se encuentran segmentadas y divididas en cuatro antenómeros, los cuales se encuentran recubiertos de pequeños pelos negros. Riera (2012) refiere que las antenas son de color negro excepto el último artejo que es de color amarillo (Fig. 10). Del mismo modo, Figueroa (1952) menciona que las antenas son de 31 color negro brillante, presenta cuatro segmentos con grosor uniforme y con pelos negros rígidos en todos los artejos.



Figura 10. Antena de estado de adulto *Monalonion dissimulatum*

Tomado de: Morfología y Biología del Chinche (*Monalonion sp.*) del Cacao (*Theobroma cacao L.*) en Amazonas, Perú, 2023.

Alas

Las alas anteriores son del tipo hemiélitro cuyo corium es de color amarillo anaranjado con una mancha irregular de color oscuro tenue hacia su parte basal, siendo de color más acentuado hacia la parte distal, la membrana es de color amarillo anaranjado pálido en su base y oscuro pálido en su parte distal; las alas posteriores del tipo membranoso son de color crema a transparente. Abril (2016), Riera (2012) y Valarezo *et al.* (2012) mencionan que las alas son de coloración amarillo anaranjada donde posee dos franjas negras a la mitad y final de las alas (Fig. 11).

Al respecto Figueroa (1952) indica que las alas son hemiélitros de color pardo oscuro casi negro, con la membrana de color negro ahumado. Del mismo modo, Gamboa *et al.* (2020) refieren que los hemiélitros cubren el abdomen totalmente; y la longitud de la membrana llega hasta casi la mitad del hemiélitro; con una vena fuerte que forma una celda prominente. Las medidas de adultos se reflejan en el cuadro 2.

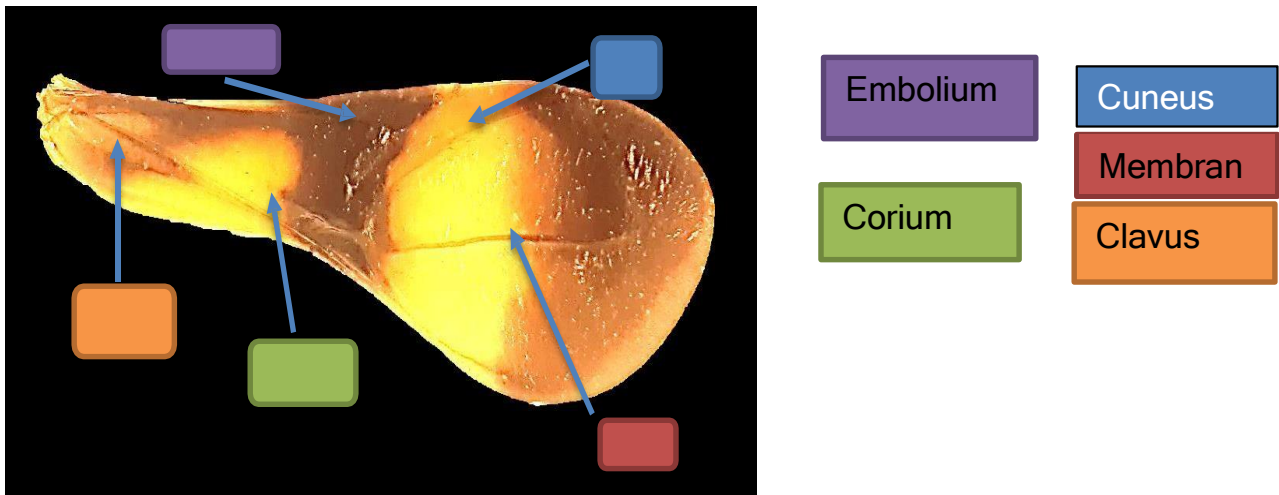


Figura 11. Ala anterior del insecto adulto

Tomado de: Morfología y Biología del Chinche (*Monalonion sp.*) del Cacao (*Theobroma cacao L.*) en Amazonas, Perú, 2023.

Cuadro 2. Medidas de adultos machos y hembras de *Monalonion dissimulatum*.

	Medida	Macho (prom.mm)	Hembra(prom.mm)
Cuerpo	Longitud	11.43	12.77
	Ancho	2.23	2.39
Cabeza	Longitud	0.88	0.99
	Ancho	1.49	1.71
	Vértice	0.63	0.64
Antena	Segmento I	0.45	0.51

	Segmento II	4.19	4.83
	Segmento III	4.05	4.57
	Segmento IV	1.16	1.18
Pronoto	Longitud	1.66	1.84
	Ancho en la base	0.92	0.99
Hemielitro	Longitud	9.19	11.50
	Ancho	2.60	3.28
Cuneus	Longitud	2.06	2.58
	Ancho en la base	0.44	0.65
Patás	Fémur anterior	2.23	2.66
	Fémur medio	2.43	2.59
	Fémur posterior	3.53	3.88
	Tibia anterior	3.28	3.87
	Tibia media	3.55	3.83
	Tibia posterior	5.32	5.90

Tomado de: Morfología y Biología del Chinche (*Monalonion sp.*) del Cacao (*Theobroma cacao L.*) en Amazonas, Perú, 2023.

8. Resultados

- Se debe tomar en cuenta que cualquier espécimen que no cumpla con los caracteres que se describen, se considera como negativo.

9. Control de Calidad

El control de calidad en un laboratorio, debe evaluar y documentar el desempeño de todos los aspectos de sus procedimientos. Esto incluye la calidad de la muestra, la eficiencia de los reactivos, los medios de cultivo, el funcionamiento de los diversos instrumentos o equipos y la verificación o validación de los resultados obtenidos.

9.1 Control de calidad de las muestras

Uno de los aspectos más importantes en un laboratorio es la apropiada selección, recolección y transporte de las muestras. Por lo que todo el personal relacionado con estas responsabilidades, debe comprender lo determinante que es el mantenimiento de la calidad de la muestra, en la evaluación e informe de un espécimen.

A pesar de que algunos tipos de muestras requieren metodología de recolección y transporte muy especiales, se pueden enumerar algunos aspectos generales que deben tenerse en cuenta al recolectar las muestras.

- La muestra debe ser representativa
- Al tomar una muestra, es importante evitar la contaminación con microorganismos
- Se debe recolectar un volumen apropiado de muestra para evitar los resultados falsos negativos.
- Se debe identificar cada muestra su nombre y su número de identificación.
- Se debe colocar la muestra en un recipiente adecuado para su transporte, con el fin de asegurar la sobrevivencia del posible agente infeccioso.
- Por último, se debe evitar derramar la muestra y mantener en todo momento las medidas de bioseguridad apropiadas.

9.2 Control de calidad de los medios de cultivo

- Se debe mantener un registro de cada frasco de medio de cultivo, con el nombre del producto, nombre de la casa proveedora, fecha de recibo, fecha de expiración, número de lote y fecha en que se abrió el frasco
- Cada lote preparado de medio de cultivo se debe probar antes de su uso rutinario, mediante la inoculación de microorganismos
- Las pruebas básicas de control de calidad de los medios preparados deben incluir: medición del pH, pruebas de esterilidad, capacidad de crecimiento y reacción, aspecto, dureza y profundidad del agar.

9.3 Control de Calidad de reactivos

- Un elemento fundamental en el trabajo diario del laboratorio lo constituyen los reactivos, tanto comerciales como de preparación doméstica, que son utilizados en la caracterización de microorganismos. Por ello, deben efectuarse controles diarios con las bacterias tipo y seguir estrictamente las indicaciones en cuanto a almacenamiento de los reactivos, metodología de la prueba y tiempo de lectura. Es recomendable que los reactivos comerciales sean examinados inmediatamente cuando se abre un nuevo lote o vial y llevar un registro de su funcionamiento.
- El registro de funcionamiento debe efectuarse en forma diaria o al menos cada vez que se efectúa la prueba.

9.4 Control de calidad de las tinciones

- La concentración de las soluciones de tinción, por efecto de la evaporación de los solventes o las variaciones introducidas en los métodos recomendados, pueden afectar los resultados de las tinciones para diferenciar microorganismos por su reacción a la tinción de Gram y la morfología, tintes para cápsulas, esporas, etc.
- El control de calidad de estos tintes debe realizarse primero con cada nuevo lote, luego basta con un control semanal para mantener un grado de seguridad apropiado en su uso. Para facilitar el control de los tintes, se recomienda preparar placas con microorganismos aislados en el trabajo rutinario o cepas de la ATCC frescas, tomado en cuenta aquellos que pudieran ser más útiles según la tinción a evaluar.
- Para el control diario de la tinción de Gram, se recomienda el uso de una cepa ATCC de *Staphylococcus aureus* y de *Escherichia coli*.
- Es necesario llevar un registro de estos controles.

9.5 Control de calidad de antisueros y otros productos comerciales como kits de identificación

- Existen cada vez más productos comerciales que tienen como objetivo ayudar en el diagnóstico de agentes etiológicos de enfermedades en el menor tiempo posible, con el mayor grado de especificidad y sensibilidad. Estos antisueros deben ser probados cada vez que se recibe un nuevo lote y cada vez que se utilicen, deben de analizarse los controles positivo y negativo que vienen con cada juego de reactivos. Se deben llevar registros con la fecha de expiración del lote, casa comercial, fecha en que ingresó al laboratorio, fecha en que se abrió el juego y el registro de los controles realizados.

9.6 Control de calidad de la prueba de sensibilidad

- Se debe monitorear la precisión y exactitud del procedimiento de la prueba de susceptibilidad, el comportamiento de los reactivos utilizados en la prueba y el desempeño de las personas que llevan a cabo las pruebas y sus resultados.

- Al hacer el control de calidad de discos, tiras de E-test o métodos de sensibilidad para sistemas automatizados o semi automatizados, se recomienda utilizar cepas ATCC. Cada nuevo lote de estos insumos debe evaluarse antes de su uso rutinario y luego una vez al mes, si no existe cambio de lote en ese periodo.

9.7 Control de calidad de equipos

- Todos los instrumentos utilizados en el laboratorio deben respaldarse por un programa de control de calidad y de mantenimiento preventivo y correctivo, basados en las instrucciones del fabricante y los procedimientos establecidos. Debe mantenerse un registro de todo lo realizado al respecto, con el nombre del instrumento, fecha, resultado y comentarios.

9.8 Supervisión del personal

- El personal es el factor más importante en la calidad del trabajo en el laboratorio. Este personal debe tener una dedicación y actitud positiva hacia el trabajo, capacidad académica, actualización constante y contar con los elementos indispensables para su labor.

9.9 Control de calidad externo

- Es recomendable que los laboratorios puedan participar en programas de evaluación externa. Estos programas miden la capacidad del laboratorio para evaluar una muestra desconocida y llegar a un resultado seguro.
- Estos controles de calidad externos pueden ser nacionales o internacionales.

10. Disposición Final de la Muestra.

- Si el resultado de la identificación es positivo, se pone en micro viales con alcohol para su conservación.
- Si el resultado es negativo, se desecha en bolsa plástica bien cerrada y asegurando la muerte del espécimen.

11. Registros

- el nombre científico de la plaga identificada
- el código o número de referencia de la muestra (para la rastreabilidad)
- la naturaleza del material infestado incluyendo el nombre científico del hospedante
- el origen (incluida la ubicación geográfica, si se conoce) del material infestado,
- la descripción de las signos o síntomas (incluyendo las fotografías, de ser pertinentes)
- los métodos, incluyendo los controles, utilizados en el diagnóstico y los resultados
- para los métodos morfológicos o morfométricos, las medidas, los dibujos o las fotografías
- para los métodos bioquímicos y moleculares, la documentación de los resultados de la prueba tales como fotografías del gel del diagnóstico o registros de los resultados de la prueba ELISA en los cuales se basó el diagnóstico
- cuando proceda, la magnitud de cualquier infestación (la cantidad de plagas individuales encontradas y de tejido dañado)
- el nombre del laboratorio y, cuando proceda, el nombre de las personas responsables del diagnóstico y/o quienes lo realizaron
- las fechas de recolección de la muestra, y de la detección e identificación de la plaga
- cuando sea apropiado, el estado de la plaga, viva o muerta, o la viabilidad de sus etapas de desarrollo

12. Puntos de contacto para información adicional

<https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biologicalsciences>

13. Reconocimiento

Riera, C. Contribución al conocimiento de plagas de cacao: Situación actual y mecanismos de Antixenosis sobre *Molanyon dissimulatum* Distant, Ecuador, 2012.

14. Referencias

Rabanal, G. Morfología y Biología del Chinche (*Monalonion sp.*) del Cacao (*Theobroma cacao L.*) en Amazonas, Perú, 2023

FIN DEL PROCEDIMIENTO

PROTOCOLO DE DIAGNOSTICO DEL CULTIVO DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*)



		Protocolo de Diagnóstico del Acaro <i>Aculops lycopersici</i> en Tomate	
Elaborado por:	José Jeremías Paz Carpio	Versión:	
		Revisión:	
Aprobado por:	Ing. Anakely Romero de Huevo	Fecha aprobación	Página 1 de 10

1. Propósito.

Describir la metodología aplicada para la detección y diagnóstico del ácaro *Aculops lycopersici* para alertar a tiempo sobre afectaciones en cultivo de tomate.

2. Alcance

Identificar la morfología y estructura del Acaro para dotar al técnico de información fiable en el proceso de detección.

3. Responsabilidades.

Actividad	Responsable
Preparación de la muestra	Técnico del Laboratorio
Ejecución del ensayo	Técnico del Laboratorio
Entrega de resultados	Técnico del Laboratorio

4. Documentos o registros.

Relación con otros documentos del SGC	Registros generados
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA <ul style="list-style-type: none"> Izquierdo, J. Problemática del acaro del bronceado del tomate (<i>Aculops lycopersici</i>) y su gestión integrada, España, 2019. Serrano, L. Detección de la Presencia del Ácaro (<i>Aculops lycopersici</i>) Causante del bronceamiento del Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>) en El Salvador, América Central. El Salvador, 1990. González, A. IDENTIFICACIÓN Y DAÑOS DEL ÁCARO DEL 	<ul style="list-style-type: none"> F.D 1.1.1. Bitácora de Trabajo de Diagnóstico Vegetal FD 1.1.2. Hoja de Resultados de Diagnóstico Vegetal

<p>BRONCEADO DEL JITOMATE (<i>Aculops lycopersici</i>) EN CONDICIONES DE INVERNADERO, México, 2018.</p> <ul style="list-style-type: none"> • INIA (Instituto de Investigaciones Agropecuarias) Plagas del tomate, Eriofido <i>Aculops lycopersici</i>. Chile, 2016. 	
--	--

5. Equipo y materiales.

Equipo	<ul style="list-style-type: none"> • parrilla eléctrica • estufa • fotomicroscópio
Materiales	<ul style="list-style-type: none"> • portaobjetos • alfileres entomológicos • cubreobjetos • pincel
Reactivos	<ul style="list-style-type: none"> • alcohol al 70%. • KOH al 10% • bálsamo de Canadá • aceite de clavo • xileno
Protección	<ul style="list-style-type: none"> • Gabacha de tela • Mascarilla desechable • Gorro desechable • Guantes de látex

6. Información de la plaga

Aculops lycopersici es conocido como ácaro pardo rojizo o ácaro del tomate. Fue descrito como *Phyllocotes lycopersici* Tryon en 1987 a partir de muestras recogidas en Queensland, Australia. El mismo ácaro fue descrito más tarde como nueva especie de (Masse, 1937) con el mismo nombre.

Fue encontrado por primera vez en el cultivo de pepino (*Solanum muricatum*), en agosto de 2010 y septiembre de 2011, *Aculops lycopersici* y su típico síntoma tal como bronceado de hojas, marchitamiento y cambio del color del tallo, de verde a marrón (Akyasi, 2012). Era considerada como una plaga cosmopolita, en los cultivos de jitomate y otras solanáceas, cultivado entre los 60 ° de latitud norte y 60 ° latitud sur (Sepúlveda *et al.*, 2015).

Este ácaro como todos los pertenecientes a la familia Eriophyidae, presenta un cuerpo alargado con estrías transversales y tiene solo dos pares de patas. El aparato bucal es de tipo chupador. Su tamaño es muy pequeño de 0,18 a 0,2 mm de largo y su color es amarillento. El ciclo de vida de esta especie consta de los estados de huevo, dos estados ninfales y adulto. Los huevos son esféricos transparentes y los deposita en el envés de las hojas. No presenta diapausa por lo que puede encontrarse durante todo el año. (Akyasi, 2012).

El ácaro del bronceado (*Aculops lycopersici* Tryon, 1917) es un pequeño ácaro alargado cuyos adultos, de no mucho más de 0,15 mm de longitud, son imperceptibles a simple vista, y es necesario el uso lentes de aumento, como mínimo 60 aumentos, para poderlo detectar.

Además de su proliferación en el cultivo del tomate, en el que se convierte en plaga, también puede multiplicarse en otras plantas, fundamentalmente solanáceas cultivadas (berenjena, patata) o espontáneas (datura, tomatitos,).

Tiene una capacidad de multiplicación muy rápida en condiciones óptimas. Por su pequeño tamaño y las dimensiones de sus estiletes, solo es capaz de alimentarse de las células superficiales, siendo necesarias la presencia de poblaciones altas para que se observen daños de forma evidente en el cultivo (suelen haberse sucedido varias generaciones). Normalmente se observa un crecimiento de los daños desde las partes bajas de la planta (donde las poblaciones llevan más tiempo presentes) hacia arriba. La no presencia de síntomas no implica que no exista una presencia significativa del ácaro. (Izquierdo, J. 2019).

Ciclo de vida y aspecto del acaro del bronceado del tomate

Los ácaros son extremadamente pequeños en todos los estadios de su desarrollo (Fig.1) y son difíciles de observar. Son largos (en forma de torpedo), suaves y segmentados. El cuerpo parece estar dividido en dos partes: la cabeza con los aparatos bucales y el resto del cuerpo. Las etapas móviles solo tienen dos pares de patas, mientras que otros grupos de ácaros tienen cuatro pares.

Los huevos miden alrededor de 0.05 mm de diámetro y se ponen en el envés de las hojas, en los pecíolos de las hojas y en los tallos de la parte inferior de las plantas. Cuando se acaban de poner, son de un color blanco crema, pero al madurar se vuelven de un amarillo irregular. Los ácaros tienen dos estadios ninfales: a veces también se denominan larva (primer estadio) y ninfa (segundo estadio). El primer estadio ninfal tiene un color blanco transparente y mide alrededor de 0.1 mm de largo. Suelen evolucionar al segundo estadio en un solo día. Todos los estadios tienen un aspecto bastante similar. Los adultos se desarrollan después de unos dos o tres días. Su color varía de la crema al naranja-amarillo, tienen una forma de cuña y son muy pequeños (unos 0.17 mm de largo), siendo los machos algo más pequeños que las hembras. (INIA, 2016)



Fig.1. a) Huevo b) Ninfa 1 c) Ninfa 2 d) Adulto macho e) Adulto hembra
Tomado de: INIA (Instituto de Investigaciones Agropecuarias) Plagas del tomate, Eriofido *Aculops lycopersici*. Chile, 2016.

Información taxonómica

Nombre Común: Acaro bronceado del tomate

Nombre Científico: *Aculops lycopersici*

Taxonomía:

Filo: Arthropoda

Clase: Aracnida

Orden: Acariformes

Familia: Eriophyidae

Género: *Aculops*

Especie: *Aculops lycopersici*

(Jeppson *et al.*, 1975)

7. Procedimiento

Observación directa por toma de fotografía.

7.1 Preparación de la muestra.

Se realizan Montajes de ácaros para una buena identificación de *Aculops lycopersici*, siguiendo los pasos a continuación:

- a) Se colocan los especímenes en alcohol al 70%.
- b) Se remueve el contenido orgánico de los ejemplares en KOH al 10% calentándolo en parrilla eléctrica a 36° C.
- c) Se retira el exceso de KOH en agua acidulada con tres enjuagues.
- d) Los ejemplares se someten a deshidratación por cinco minutos en soluciones de alcohol al 70%, 80%, 96% y 100%, respectivamente.
- e) Los ejemplares deshidratados se colocan en aceite de clavo por 10 minutos con el fin de aclararlos.

- f) Luego se montan en portaobjetos aplicando bálsamo de Canadá sobre el portaobjeto.
- g) Con la ayuda de alfileres entomológicos se coloca el ejemplar, una vez acomodado se pone el cubreobjetos y a la orilla con la ayuda de un pincel se le aplica xileno para sellarlo y evitar el escurrimiento del bálsamo.
- h) Por último, los montajes se ponen a secar durante una semana en la estufa a 40°C

7.2 Realización del ensayo

Observación directa por toma de fotografía

- Para la toma de fotografías se utiliza una foto microscopio III (Carl Zeiss) el cual tiene adaptada una cámara digital para microscopía (PAXcam3).
- Se coloca el portaobjeto sobre la platina, después se enfoca el ácaro con el objetivo 6X, posteriormente al objetivo 16X y se procede con la toma de fotos.
- Al lograr identificar la especie del acaro se aprovecha la preparación microscópica para hacer dibujos de la morfología externa del acaro.

8. Resultados

Observación directa por toma de fotografía

- Mediante el análisis realizado a los montajes se corrobora si la especie se trata de *A. lycopersici*, las características observadas para el diagnóstico deben ser como muestra la Fig.1 (A y B) y Fig. 2:

- a) Garras plumosas
- b) Patrón de marcas en el escudo cefalotorácico
- c) Estiletes cortos
- d) Tanosoma estriado

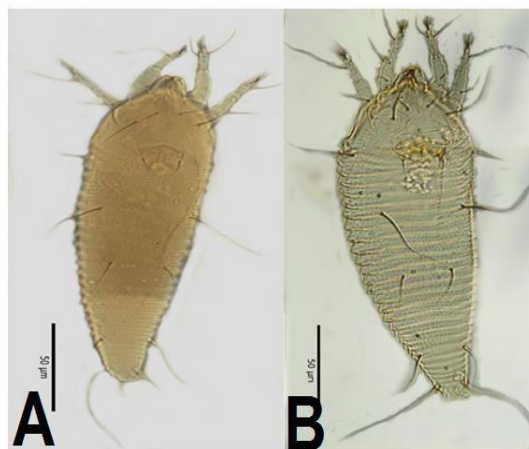


Figura 1. A) Vista dorsal B) Vista ventral.

Tomado de: INIA (Instituto de Investigaciones Agropecuarias) Plagas del tomate, Eriofido *Aculops lycopersici*. Chile, 2016.

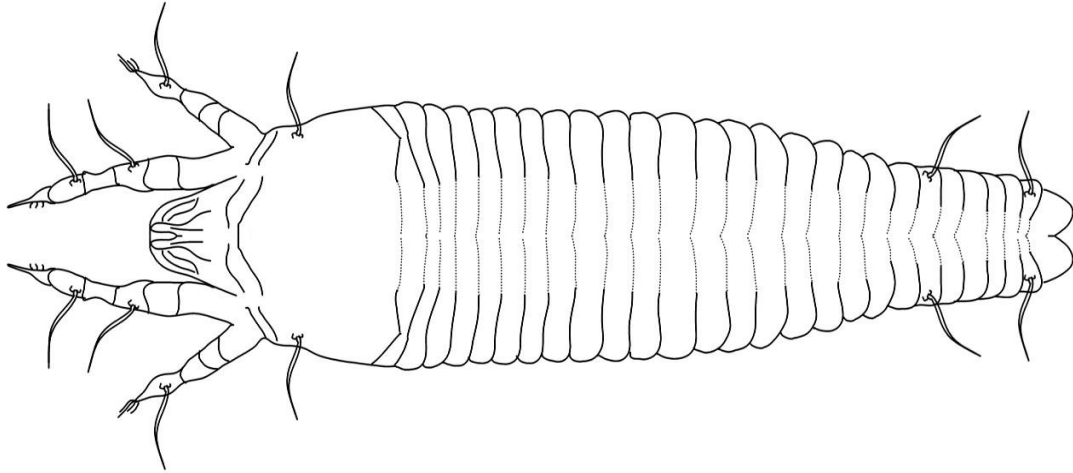


Figura 2. Esquema en vista dorsal de *Aculops lycopersici*.

Tomado de: INIA (Instituto de Investigaciones Agropecuarias) Plagas del tomate, Eriofido *Aculops lycopersici*. Chile, 2016.

Fotografías que pueden ser tomadas mediante microscopia de barrido ambiental si se dispone del equipo necesario.

Las fotografías tomadas mediante microscopia electrónica de barrido ambiental muestran los huevos del acaro, los cuales son absolutamente invisibles a simple vista, así también se puede observar un adulto el cual sirve para una mejor identificación (Fig. 3 y 4).

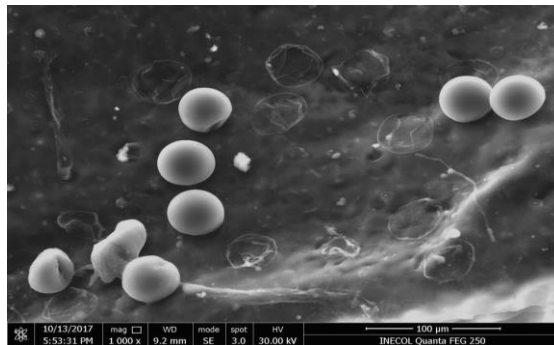


Figura 3. Huevos de *Aculops lycopersici* puestos en el envés de las hojas de tomate. Tomado de: INIA (Instituto de Investigaciones Agropecuarias) Plagas del tomate, Eriofido *Aculops lycopersici*. Chile, 2016.

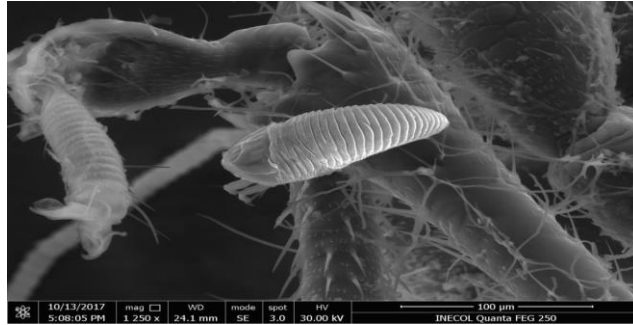


Figura 4. *Aculops lycopersici* adulto. Tomado de: INIA (Instituto de Investigaciones Agropecuarias) Plagas del tomate, Eriofido *Aculops lycopersici*. Chile, 2016.

9. Control de Calidad

El control de calidad en un laboratorio, debe evaluar y documentar el desempeño de todos los aspectos de sus procedimientos. Esto incluye la calidad de la muestra, la eficiencia de los reactivos, los medios de cultivo, el funcionamiento de los diversos instrumentos o equipos y la verificación o validación de los resultados obtenidos.

9.1 Control de calidad de las muestras

Uno de los aspectos más importantes en un laboratorio es la apropiada selección, recolección y transporte de las muestras. Por lo que todo el personal relacionado con estas responsabilidades, debe comprender lo determinante que es el mantenimiento de la calidad de la muestra, en la evaluación e informe de un espécimen.

A pesar de que algunos tipos de muestras requieren metodología de recolección y transporte muy especiales, se pueden enumerar algunos aspectos generales que deben tenerse en cuenta al recolectar las muestras.

- La muestra debe ser representativa
- Al tomar una muestra, es importante evitar la contaminación con microorganismos
- Se debe recolectar un volumen apropiado de muestra para evitar los resultados falsos negativos.
- Se debe identificar cada muestra su nombre y su número de identificación.

- Se debe colocar la muestra en un recipiente adecuado para su transporte, con el fin de asegurar la sobrevivencia del posible agente infeccioso.
- Por último, se debe evitar derramar la muestra y mantener en todo momento las medidas de bioseguridad apropiadas.

9.2 Control de calidad de los medios de cultivo

- Se debe mantener un registro de cada frasco de medio de cultivo, con el nombre del producto, nombre de la casa proveedora, fecha de recibo, fecha de expiración, número de lote y fecha en que se abrió el frasco
- Cada lote preparado de medio de cultivo se debe probar antes de su uso rutinario, mediante la inoculación de microorganismos
- Las pruebas básicas de control de calidad de los medios preparados deben incluir: medición del pH, pruebas de esterilidad, capacidad de crecimiento y reacción, aspecto, dureza y profundidad del agar.

9.3 Control de Calidad de reactivos

- Un elemento fundamental en el trabajo diario del laboratorio lo constituyen los reactivos, tanto comerciales como de preparación doméstica, que son utilizados en la caracterización de microorganismos. Por ello, deben efectuarse controles diarios con las bacterias tipo y seguir estrictamente las indicaciones en cuanto a almacenamiento de los reactivos, metodología de la prueba y tiempo de lectura. Es recomendable que los reactivos comerciales sean examinados inmediatamente cuando se abre un nuevo lote o vial y llevar un registro de su funcionamiento.
- El registro de funcionamiento debe efectuarse en forma diaria o al menos cada vez que se efectúa la prueba.

9.4 Control de calidad de las tinciones

- La concentración de las soluciones de tinción, por efecto de la evaporación de los solventes o las variaciones introducidas en los métodos recomendados, pueden afectar los resultados de las tinciones para diferenciar microorganismos por su reacción a la tinción de Gram y la morfología, tintes para cápsulas, esporas, etc.

- El control de calidad de éstos tintes debe realizarse primero con cada nuevo lote, luego basta con un control semanal para mantener un grado de seguridad apropiado en su uso. Para facilitar el control de los tintes, se recomienda preparar placas con microorganismos aislados en el trabajo rutinario o cepas de la ATCC frescas, tomado en cuenta aquellos que pudieran ser más útiles según la tinción a evaluar.
- Para el control diario de la tinción de Gram, se recomienda el uso de una cepa ATCC de *Staphylococcus aureus* y de *Escherichia coli*.
- Es necesario llevar un registro de estos controles.

9.5 Control de calidad de antisueros y otros productos comerciales como kits de identificación

- Existen cada vez más productos comerciales que tienen como objetivo ayudar en el diagnóstico de agentes etiológicos de enfermedades en el menor tiempo posible, con el mayor grado de especificidad y sensibilidad. Estos antisueros deben ser probados cada vez que se recibe un nuevo lote y cada vez que se utilicen, deben de analizarse los controles positivo y negativo que vienen con cada juego de reactivos. Se deben llevar registros con la fecha de expiración del lote, casa comercial, fecha en que ingresó al laboratorio, fecha en que se abrió el juego y el registro de los controles realizados.

9.6 Control de calidad de la prueba de sensibilidad

- Se debe monitorear la precisión y exactitud del procedimiento de la prueba de susceptibilidad, el comportamiento de los reactivos utilizados en la prueba y el desempeño de las personas que llevan a cabo las pruebas y sus resultados.
- Al hacer el control de calidad de discos, tiras de E-test o métodos de sensibilidad para sistemas automatizados o semi automatizados, se recomienda utilizar cepas ATCC. Cada nuevo lote de estos insumos debe evaluarse antes de su uso rutinario y luego una vez al mes, si no existe cambio de lote en ese periodo.

9.7 Control de calidad de equipos

- Todos los instrumentos utilizados en el laboratorio deben estar respaldados por un programa de control de calidad y de mantenimiento preventivo y correctivo, basados en las instrucciones del fabricante y los procedimientos establecidos. Debe mantenerse un registro de todo lo realizado al respecto, con el nombre del instrumento, fecha, resultado y comentarios.

9.8 Supervisión del personal

- El personal es el factor más importante en la calidad del trabajo en el laboratorio. Este personal debe tener una dedicación y actitud positiva hacia el trabajo, capacidad académica, actualización constante y contar con los elementos indispensables para su labor.

9.9 Control de calidad externo

- Es recomendable que los laboratorios puedan participar en programas de evaluación externa. Estos programas miden la capacidad del laboratorio para evaluar una muestra desconocida y llegar a un resultado seguro.
- Estos controles de calidad externos pueden ser nacionales o internacionales.

10. Disposición Final de la Muestra.

- Si se reporta hallazgo positivo del acaro la muestra se incinera en mechero y se desecha el residuo obtenido en bolsa plástica.
- Si se reporta hallazgo negativo del acaro la muestra se desecha en bolsa plástica.

11. Registros

- el nombre científico de la plaga identificada
- el código o número de referencia de la muestra (para la rastreabilidad)
- la naturaleza del material infestado incluyendo el nombre científico del hospedante
- el origen (incluida la ubicación geográfica, si se conoce) del material infestado,
- la descripción de las signos o síntomas (incluyendo las fotografías, de ser pertinentes)
- los métodos, incluyendo los controles, utilizados en el diagnóstico y los resultados
- para los métodos morfológicos o morfométricos, las medidas, los dibujos o las fotografías
- para los métodos bioquímicos y moleculares, la documentación de los resultados de la prueba tales como fotografías del gel del diagnóstico o registros de los resultados de la prueba ELISA en los cuales se basó el diagnóstico
- cuando proceda, la magnitud de cualquier infestación (la cantidad de plagas individuales encontradas y de tejido dañado)
- el nombre del laboratorio y, cuando proceda, el nombre de las personas responsables del diagnóstico y/o quienes lo realizaron
- las fechas de recolección de la muestra, y de la detección e identificación de la plaga
- cuando sea apropiado, el estado de la plaga, viva o muerta, o la viabilidad de sus etapas de desarrollo

12. Puntos de contacto para información adicional

<https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/aculops-lycopersici>

13. Reconocimiento

Serrano, L. Detección de la Presencia del Ácaro (*Aculops lycopersici*) Causante del bronceamiento del Tomate (*Lycopersicon esculentum*) en El Salvador, América Central. El Salvador, 1990

14. Referencias

INIA (Instituto de Investigaciones Agropecuarias) Plagas del tomate, Eriofido *Aculops lycopersici*. Chile, 2016

FIN DEL PROCEDIMIENTO

Protocolo de Diagnóstico de hongo <i>Colletotrichum coccodes</i> en Tomate			
Elaborado por:	José Jeremías Paz Carpio	Versión:	
		Revisión:	
Aprobado por:	Ing. Anakely Romero de Huevo	Fecha aprobación	Página 1 de 13

1. Propósito.

Describir la metodología aplicada en el Laboratorio de Diagnóstico Vegetal para la detección e identificación de *Colletotrichum coccodes* mediante caracterización morfológica a partir de semillas y material vegetal de tomate, bajo las condiciones de uso de reactivos que aquí se detallan.

2. Alcance.

Este método es apropiado para tejido vegetal de tomate (*Solanum lycopersicum*) que presente signos y síntomas característicos, como necrosis, pudrición de raíz, etc.

3. Responsabilidades.

Actividad	Responsable
Preparación de la muestra	Técnico del Laboratorio
Ejecución del ensayo	Técnico del Laboratorio
Entrega de resultados	Técnico del Laboratorio

4. Documentos o registros.

Relación con otros documentos del SGC	Registros generados
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA • SENASICA, Protocolo de Diagnóstico: <i>Colletotrichum coccodes</i> (Antracnosis del tomate y chile), México, 2019	• F.D 1.1.1. Bitácora de Trabajo de Diagnóstico Vegetal • FD 1.1.2. Hoja de Resultados de Diagnóstico Vegetal

5. Equipo y materiales.

Equipo	<ul style="list-style-type: none">• Microscopio compuesto• Cajas Petri de cristal• Microscopio estereoscópico• Cámaras húmedas
Materiales	<ul style="list-style-type: none">• Papel secante• Navaja de bisturí - PDA• Papel filtro Whatman N 4 Medios de cultivo - OA• Alfiler entomológico -EMA• Aguja de disección• Papel filtro
Reactivos	<ul style="list-style-type: none">• Solución de hipoclorito de sodio al 1%• Hipoclorito de sodio al 0.5%• Agua destilada estéril
Protección	<ul style="list-style-type: none">• Gabacha de tela• Mascarilla desechable• Guantes de látex

6. Introducción

6.1 Información sobre la plaga

Colletotrichum es el agente etiológico de la enfermedad conocida como antracnosis o pudrición negra en solanáceas. Afectan principalmente cultivos de papa, tomate y chile (Costa, Pfenning y Pozza, 2006; Jamiotkowska Skwaryto y Patkowska, 2018); sin embargo, también se ha reportado su aislamiento a partir calabacín, crisantemo, berro, col, lechuga y distintas malezas (Dillard y Cobb, 1998; Raid y Pennypacker, 1987; Gilardi *et al.*, 2013)

Los daños ocasionados por el patógeno consisten en la reducción de la calidad y cantidad del fruto, así como en el aumento de los costos de producción y manejo pos cosecha. En tomate afecta tallos, raíces y frutos, formando una lesión circular, hundida, con oscurecimiento en la parte central y abundante producción de acévalos, setas y micro esclerocios (Costa *et al.*, 2006).

Dillar (1992) indica que en plantas de tomate se presentan tres tipos de pudriciones: Pudrición de la corteza de las raíces laterales, Pudrición del corcho y pudrición de la base del tallo. En estudios posteriores, Ben *et al.*, (2009) encontraron que en frutos de tomate enfermos el patógeno infecta del 20 al 63% de las semillas; mientras que en la variedad US-39 transformada genéticamente, *C. coccodes* infectó el 40% de la testa (pubescencia y superficie) y el 1% del embrión.

Jamiołkowska *et al.*, (2018) mencionan que las principales fuentes de inóculo son el suelo y los residuos de cosecha por lo que la infección puede iniciar al momento de la germinación de la semilla, causando la muerte de las plántulas; sin embargo, también puede infectar a raíces jóvenes y viejas, donde se caracteriza por formar grandes masas de micro esclerocios. Dillard y Cobb (1998) reportaron que el 90% de los esclerocios del patógeno permanecen viables durante 8 años enterrados a 10 cm. El patógeno se dispersa por medio del viento y salpique de agua de lluvia (conidios), semilla infectada (ya sea contaminada externamente o con el embrión infectado), plántulas infectadas que fueron germinadas en sustratos o suelo contaminado, frutos enfermos, frutos con infecciones latentes (verdes o inmaduros) y tubérculos infectados (Andrison, Lucas, Guerin y Jouan, 1998)

6.2 Información Taxonómica

Nombre Anamorfo: *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) 1958

Sinónimos: *Acrothecium solani* Sacc. 81833)

Vermicularia varians Ducomet (1908)

Colletotrichum colanicola O Gara (1915)

Colletotrichum atromentarium Berk & Broome (1916)

Colletotrichum biologicum Chaudhuri (1924)

(Hughes, 1958)

Nombres comunes: Antracnosis del tomate (español)
Antracnosis de la patata (español)
Anthracnose of potato (ingles)
Anthracnose of tomato (ingles)
Black dot disease of potato (ingles)
Foot rot of tomato (ingles)
Ripe rot of tomato (ingles)
Anthracnose del tomate (francés)
Dartrose de la tomate (francés)

Posición taxonómica:

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Glomerellales

Familia: Glomerellaceae

Género: *Colletotrichum*

Especie: *Colletotrichum coccodes*

(Hughes, 1958)

6.3 Procedimiento de Detección e Identificación

Para determinar la presencia de *Colletotrichum coccodes*, es necesario contar con material vegetal que presente signos y síntomas característicos.

La detección de *Colletotrichum coccodes* a partir de semilla de tomate es rápida y precisa, utilizando la técnica de incubación en medio de cultivo (Young *et al.*, 2018). Si la muestra no cumple con las características requeridas o se encuentra en mal estado, se registra el motivo del rechazo: “Material en mal estado” o “No se procesó” y se especifican los motivos del rechazo.

7.1 Preparación de la muestra y realización del ensayo

7.1.1 Identificación morfométrica

La identificación morfométrica se puede realizar por observación directa de cortes histológicos, a partir de signos en el tejido vegetal (tallos, raíces y frutos) o del crecimiento de las estructuras en papel secante y medio de cultivo a partir de tejido vegetal o semilla.

7.1.1.1 Observación directa y cortes histológicos

- 1) Partir de tallos, raíces o frutos con presencia de síntomas y observar con un microscopio estereoscópico signos del hongo (acérvulos o micro esclerocios).
- 2) Obtener fragmentos de aproximadamente 0.2 mm de grosor, utilizando navaja de bisturí o navaja de afeitar.
- 3) Elaborar montajes temporales o permanentes para su observación con un microscopio compuesto. Marcar las preparaciones con el número de identificación y los datos de la muestra.
- 4) Medir las estructuras (Acérvulos, conidios, esclerocios, apresorios) del hongo, obtener el ancho y largo de estos, y comparar las dimensiones obtenidas con la literatura de referencia, con el fin de definir el género y especie de acuerdo a la descripción morfo métrica.

7.2 Incubación en papel secante

- 1) A partir de tejido vegetal con o sin síntomas y signos del hongo, obtener fragmentos de aproximadamente 1 cm², en condiciones asépticas desinfectarlos con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 minuto y enjuagar en 3 ocasiones con agua destilada estéril. Permitir el secado del material vegetal, para ello, colocar los fragmentos sobre papel absorbente estéril durante un periodo aproximado de 2 a 3 horas.

En el caso de semillas, si el tamaño de la muestra lo permite, utilizar 200 semillas o 40% de la muestra para su incubación en papel secante; desinfectarlas con

hipoclorito de sodio al 0.5%, durante 2 min, enjuagar con agua destilada estéril y secar durante los tiempos señalados para el tejido vegetal.

Preparar cámaras húmedas, para ello colocar en cajas Petri de cristal un círculo de papel filtro Whatman del número 4 (puede utilizarse otro tipo de papel filtro o papel absorbente) y esterilizar en autoclave durante 20 min a 121 C y 15 psi (libras por pulgada cuadrada, por sus siglas en inglés) o durante 2 horas a 160 C con calor seco. Una vez que las cajas están estériles y frías, humedecer el papel filtro con agua destilada estéril (evitar tener exceso de agua) y marcar con los datos de identificación de la muestra.

Colocar en la cámara húmeda de 5 a 6 fragmentos de material vegetal seco o 30 semillas por caja. Incubar durante 5 días a 25 C y 80% de humedad.

Observar con un microscopio estereoscópico si hay estructuras del hongo, realizar el montaje para visualizar sus características.

- 2) Obtener la germinación de conidios para observar la forma y tamaño de los apresorios. Colocar una gota de agua destilada sobre un portaobjetos, con un alfiler entomológico o aguja de disección, tomar masas de conidios a partir del medio de cultivo o del tejido vegetal y depositarlas en la gota de agua. Colocar el portaobjetos con conidios dentro de una cámara húmeda e incubar a 25 C + 3 C durante 4 a 8 horas.
- 3) A partir de las estructuras, obtener montajes temporales o permanentes para su observación con un microscopio compuesto. Medir las estructuras del hongo y obtener el intervalo de medidas del ancho y largo. Comparar las dimensiones con la literatura de referencia para definir el género y especie del hongo de acuerdo con las características morfométricas que presenten.

7.3 Aislamiento en medios de cultivo

- 1) A partir de tejido vegetal, con o sin presencia de síntomas y signos del hongo, obtener fragmentos de aproximadamente 1 cm², desinfectarlos y secarlos. En el caso de semillas, si el tamaño de la muestra lo permite, utilizar 200 semillas o 40% de la muestra para su incubación en papel secante, desinfectarlas con hipoclorito de sodio al 0.5%, durante 2 min, enjuagar con agua destilada estéril y secar durante los tiempos señalados para el tejido vegetal.
- 2) Sembrar de 5 a 6 fragmentos secos en cajas Petri con medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar, por sus siglas en inglés), EMA (Extracto de Malta Agar, por sus siglas en inglés) u OA (Avena Agar, por sus siglas en inglés) o 30 semillas por caja, incubar a 25 C + 3 C durante 5 días.

- 3) A partir de colonias típicas del hongo realizar aislamientos para obtener cultivos puros en medio de cultivo PDA, EMA u OA.
- 4) Incubar los aislamientos puros durante 8 a 12 días con oscuridad a 25 C, al término de este tiempo observar el tipo de crecimiento, coloración del micelio y del medio de cultivo, además de la formación de estructuras del hongo (Acérvulos, conidios, micro esclerocios) y obtener apresorios.
- 5) Obtener preparaciones temporales o permanentes de las estructuras y observar con un microscopio compuesto.
- 6) Medir las estructuras (Acérvulos, conidios, esclerocios, apresorios) del hongo y obtener el intervalo y promedio del ancho y largo de estos. Comparar las dimensiones obtenidas con la literatura de referencia para definir el género y especie del hongo.

7.4 Descripción morfométrica

7.4.1 Descripción colonial

Colonias en medio EMA, con crecimiento de 8.4 a 9.0 cm en 12 días, sin coloración del sustrato tanto por el anverso como por el reverso de la caja; conidios formando masas de color amarillo a rosado; esclerocios abundantes, de color negro, concentrados en la parte central de la colonia y escasos con arreglo radial hacia la periferia de la colonia (Costa, et al, 2006; Jamiotkowska *et al.*, 2018) (Figura 1).

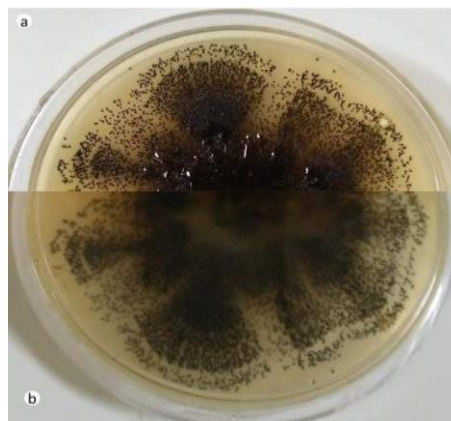


Figura 1. Crecimiento colonial de *Colletotrichum coccodes* en medio de cultivo EMA, con concentración de micro esclerocios al centro de la colonia y arreglo radial de micro esclerocios hacia la periferia. a) anverso de la caja; b) reverso de la caja.

La diferenciación de la especie en solanáceas se basa en la formación de micro esclerocios, los cuales son abundantes tanto en tejido vegetal, como en medio de cultivo, mismos que no se presentan con *C. gloeosporioides*, *C. siamense* y *C. acutatum* (Costa *et al.*, 2006) (Figuras 2 y 3)

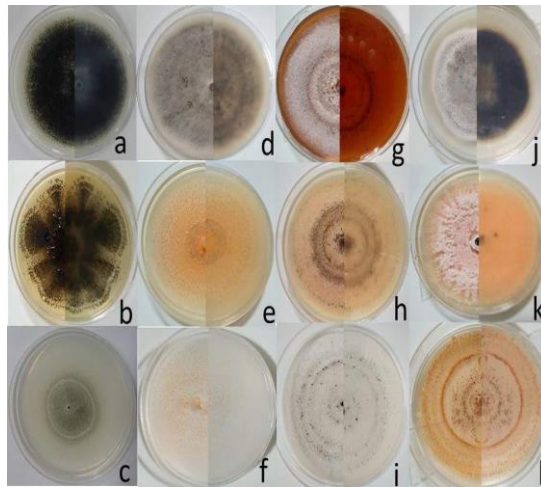


Figura 2. Diferenciación colonial de especies de *Colletotrichum*, incubación a 25 °C durante 8 días. A la derecha el anverso de la caja y a la izquierda el reverso; a, d, g, j) Papa Dextrosa Agar; b, e, h, k) Extracto de Malta Agar; c, f, i, l) Harina de Avena Agar; a-c) *C. coccodes*; d-f) *C. gloeosporioides*; g-i) *C. siamense*; j-l) *C. acutatum*. Than *et al.*, 2008).

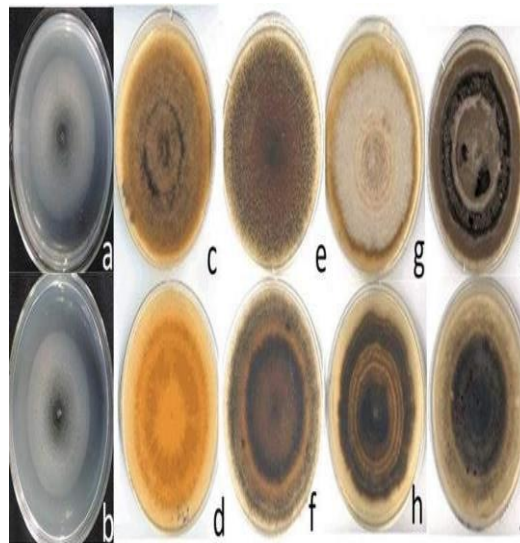


Figura 3. Apariencia colonial de especies de *Colletotrichum* sobre PDA. a-b) *C. coccodes*; c-f) *C. gloeosporioides*; g-h) *C. acutatum*; i-j) *C. capsici*. (a y b: Liu *et al.*, 2011; c-j: Than *et al.*, 2008).

7.5 Descripción morfológica

Acérvulos de 250-315 x 3.2-63.2 μm con setas; conidios de 13.3-22.0 x 2.3-4.0 μm , fusiformes, con extremidades obtusas, hialinos, aseptados, formando masas de color amarillo a rosado; esclerocios de 100-500 μm de diámetro, abundantes, globosos, de color negro, concentrados en la parte central de la colonia y escasos con arreglo radial hacia la periferia de la colonia. (Costa *et al.*, 2006; Jamiotkowska *et al.*, 2018) (Figuras 4 y 5).

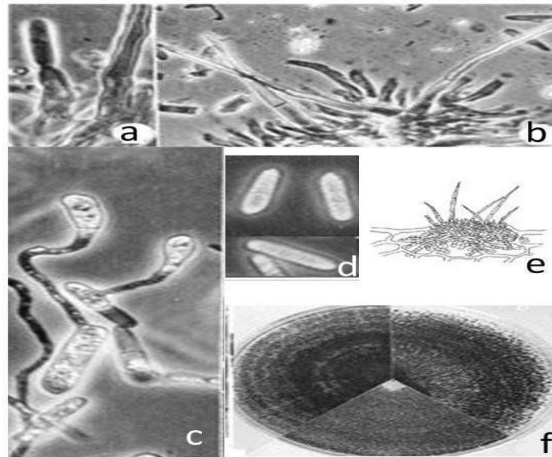


Figura 4. Estructuras de reproducción de *Colletotrichum coccodes*. a, b, e) acérvulo con setas; c) apresorios d) conidios f) Colonia con 20 días de incubación a temperatura ambiente en Extracto de Malta Agar a la izquierda, Papa Dextrosa Agar a la derecha y Avena Agar al 2% abajo (Kokko *et al.*, 1974).

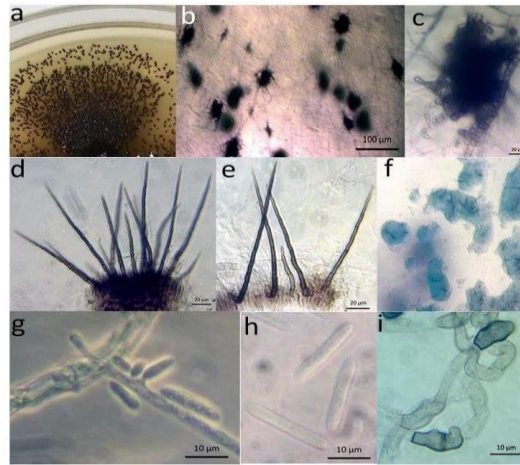


Figura 5. Estructuras de *Colletotrichum coccodes*. a) arreglo de micro esclerocios; b y c) micro esclerocios; d) acérvulo; e) setas; f) acérvulos con conidios en masas; g y h) conidios; i) apesorios.

Tomado de: (Kokko *et al.*, 1974).

7.6 Identificación del patógeno

Para reportar una identificación positiva de *C. coccodes*, es necesario la detección en conjunto de las siguientes pruebas: aislamiento y caracterización de la colonia y caracterización morfométrica de las estructuras distintivas del hongo. De manera opcional y complementaria, en el caso de que así se requiera: realizar el ensayo de PCR punto final con los primers Cspa1- Cspa2, enviar a secuenciar la región ITS (primers ITS1/ITS-4) y hacer análisis filogenético a partir de dichas secuencias

8. Control de Calidad

Sabouraud Glucosado Agar

USO

Medio utilizado para el aislamiento, identificación y conservación de hongos patógenos y saprofitos, También es útil para el cultivo de levaduras.

FUNDAMENTO

Medio de cultivo recomendado para el aislamiento y desarrollo de hongos. En el medio de cultivo, la peptona, la tripteína y la glucosa son los nutrientes para el desarrollo de microorganismos. El alto contenido de glucosa, la presencia de cloranfenicol y el pH ácido, inhiben el desarrollo bacteriano y favorecen el crecimiento de hongos y levaduras. El agar es el agente solidificante. Puede ser suplementado con otros agentes selectivos de crecimiento:

CONTENIDO Y COMPOSICION: Código B0415084: 6 frascos x 50 ml

FÓRMULA

PEPTONA.....5 g	CLORANFENICOL 0.05 g
TRIPTEINA5 g	AGAR..... 15.0 g
GLUCOSA.....40.0 g	AGUA PURIFICADA.....1000 ml

INSTRUCCIONES

Colocar los frascos cerrados en baño maría y llevar a ebullición para fundir el medio de cultivo sólido contenido en los mismos. Una vez que se ha fundido el medio de cultivo, retirar cuidadosamente los frascos del baño maría y dejar enfriar. Cuando alcanzan temperatura 45-50 °C, abrirlos y distribuir aproximadamente 15 ml en placas de Petri estériles.

CARACTERISTICAS DEL PRODUCTO

Medio de cultivo color ámbar claro, ligeramente opalescente sin precipitado.

ALMACENAMIENTO

Medio de cultivo listo para usar en frascos a 10-35 °C.

Medio de cultivo preparado a 2-8 °C.

PROCEDIMIENTO

Siembra

Estriar directamente la superficie del medio de cultivo.

Incubación

En aerobiosis a 20-25 °C.

El tiempo dependerá del hongo y levadura que se quiera recuperar.

Como regla general, incubar en las condiciones descritas durante 2 a 7 días. En el caso de investigar dermatofitos, incubar durante 5 a 20 días y examinar el cultivo cada 4 a 6 días.

INTERPRETACION DE RESULTADOS

Describir las características típicas de las colonias y subcultivar en medios apropiados para identificación

9. Resultados

9.1 Identificación morfológica

En caso de que los signos observados en el tejido vegetal correspondan a micro esclerocios, Acérvulos y conidios y coincidan con la descripción de *C.coccodes*, la técnica se reporta como positiva. Si no se detecta presencia de estructuras características de *C. coccodes* se debe reportar el diagnóstico para esta técnica como negativo.

En ambos casos, el resultado debe corroborarse con otras técnicas de diagnóstico como Aislamiento e incubación en medio de cultivo y papel secante.

9.2 Incubación en papel secante

Si con la técnica de incubación en papel secante, se obtienen estructuras típicas del hongo sobre el tejido vegetal o semilla, que correspondan a *C. coccodes*, el resultado de la técnica se reporta como positivo. Si no se detecta presencia de estructuras características de *C. coccodes*, se debe reportar el diagnóstico para esta técnica como negativo. En ambos casos se recomienda corroborar los resultados con los obtenidos en la técnica de incubación en medios de cultivo.

9.3 Aislamiento en medios de cultivo

Para determinar la presencia del patógeno se deben obtener colonias con micelio hialino, agregación de microesclerocios en la parte central (lo cual le confiere una coloración negra) y con arreglo radiado hacia la periferia, con desarrollo de acérvulos característicos de *C. coccodes*; así como observar las estructuras características del hongo. Si se obtienen estructuras típicas, el resultado de la técnica se reporta como positivo. Si no se detecta presencia de estructuras características de *C. coccodes*, el diagnóstico se debe reportar negativo para esta técnica.

10. Disposición final de la muestra

Almacenar los registros y evidencias del proceso de diagnóstico de *C. coccodes*.

- Mantener el material vegetal que no fue utilizado en el diagnóstico en su empaque original, bajo refrigeración a 4 °C durante al menos 1 mes posterior al diagnóstico.

En caso de obtener un resultado negativo:

- Inactivar y desechar el material vegetal. En caso de obtener un resultado positivo:
- Desde el momento en que se detectan síntomas en hojas, prensarlas hasta que pierdan humedad y resguardarlas a temperatura ambiente.
- Para los frutos, colocar la cubierta del fruto que muestra los signos del hongo en viales de 2 ml y conservarla en congelación a -20 °C. La parte carnosa del fruto se desecha, previa inactivación.
- Conservar montajes permanentes, donde se encuentren estructuras distintivas del hongo como evidencia de la identificación morfométrica.
- Conservar el aislamiento puro mediante técnicas de preservación que garanticen la viabilidad del hongo, no realizar transferencias continuas del aislamiento.
- Resguardar los resultados de las pruebas moleculares (fotografía del gel y secuencias).
- Mantener el DNA obtenido en congelación a -20 °C (de ser posible a -70 °C).

11.Registros

- el nombre científico de la plaga identificada
- el código o número de referencia de la muestra (para la rastreabilidad)
- la naturaleza del material infestado incluyendo el nombre científico del hospedante
- el origen (incluida la ubicación geográfica, si se conoce) del material infestado,
- la descripción de las signos o síntomas (incluyendo las fotografías, de ser pertinentes)
- los métodos, incluyendo los controles, utilizados en el diagnóstico y los resultados
- para los métodos morfológicos o morfométricos, las medidas, los dibujos o las fotografías
- para los métodos bioquímicos y moleculares, la documentación de los resultados de la prueba tales como fotografías del gel del diagnóstico o registros de los resultados de la prueba ELISA en los cuales se basó el diagnóstico
- cuando proceda, la magnitud de cualquier infestación (la cantidad de plagas individuales encontradas y de tejido dañado)
- el nombre del laboratorio y, cuando proceda, el nombre de las personas responsables del diagnóstico y/o quienes lo realizaron
- las fechas de recolección de la muestra, y de la detección e identificación de la plaga
- cuando sea apropiado, el estado de la plaga, viva o muerta, o la viabilidad de sus etapas de desarrollo

12. Puntos de contacto para información adicional

https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/2002/June/Pages/86_6_695.2.aspx

13. Reconocimiento

SENASICA, Protocolo de Diagnóstico: *Colletotrichum coccodes* (Antracnosis del tomate y chile), México, 2019

14. Referencias

<https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-3059.2003.00793.x>

FIN DEL PROCEDIMIENTO

Protocolo de Diagnóstico del <i>Virus del mosaico del tomate (ToMV)</i>			
Elaborado por:	José Jeremías Paz Carpio	Versión:	
		Revisión:	
Aprobado por:	Ing. Anakely Romero de Huevo	Fecha aprobación	Página 1 de 15

1. Propósito

Describir la metodología aplicada para la detección y diagnóstico del *Virus del mosaico del tomate (ToMV)*.

2. Alcance.

Identificar la morfología y estructura del virus para dotar al técnico de información fiable en el proceso de detección.

3. Responsabilidades.

Actividad	Responsable
Preparación de la muestra	Técnico del Laboratorio
Ejecución del ensayo	Técnico del Laboratorio
Entrega de resultados	Técnico del Laboratorio

4. Documentos o registros.

Relación con otros documentos del SGC	Registros generados
<ul style="list-style-type: none"> • REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA • Ana M^a Aguado Martínez (1), Sonsoles Fernández-Cavada Labat (1), Miguel Cambra Álvarez (1), Fernando Escriu Paradell (2), M^a Sol Luis Artiaga (2) (1) Centro de Sanidad y Certificación Vegetal. (2) Unidad de Sanidad Vegetal. CITA. El virus del mosaico del tomate (<i>ToMV</i>), España, 2014 • Dayana Sofía Ortiz Delgado (1), Ahyme María Ramírez Suarez (2), Estandarización de un método Rápido de detección del virus del mosaico del tomate (<i>ToMV</i>) mediante reacción en cadena de la polimerasa con 	<ul style="list-style-type: none"> • F.D 1.1.1. Bitácora de Trabajo de Diagnóstico Vegetal • FD 1.1.2. Hoja de Resultados de Diagnóstico Vegetal

transcripción inversa (RT-PCR), México, 2019	
--	--

5. Equipo y materiales.

Equipo	<ul style="list-style-type: none"> • Nanodrop 8000 • Termociclador
Materiales	<ul style="list-style-type: none"> • Tubos libres de ARnasa
Reactivos	<ul style="list-style-type: none"> • Reactivo PureLink™ Plant RNA de (Thermo Fisher Scientific, No. Cat: 12322-012) • NaCl 5M • Cloroformo • alcohol isopropílico • etanol al 75% • kit M-MLV Reverse Transcriptase • H2O DEPC • H2O • Buffer PCR • MgCl2 • dNTP's • Primer F • Primer R • Enzima Taq • Polimerasa
Protección	<ul style="list-style-type: none"> • Gabacha de tela • Mascarilla desechable • Gorro desechable • Guantes de látex

6. Información de la plaga.

El *virus del mosaico del tomate* (*Tomato mosaic virus = ToMV*) pertenece al género *Tobamovirus*.

Está distribuido por todo el mundo por diferentes cepas (Cuadro 1) y causa daños en cultivos de tomate, tanto protegidos como al aire libre. También afecta a otras especies cultivadas de la familia Solanaceae (pimiento, tabaco, berenjena, pepino dulce), y a especies pertenecientes a familias como Aizoaceae, Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Rosaceae, etc.

El *ToMV*, fue considerado durante mucho tiempo como una cepa del virus del mosaico del tabaco (TMV), pero desde 1976 está descrito como un virus distinto de este, pudiendo ser diferenciado por la gama de especies indicadoras, unidades serológicas y secuencia del genoma viral. (Ortiz, 2019)

Cuadro 1. Diferentes Cepas de ToMV

AF332868	<i>Virus del mosaic del tomate Queensland</i>	Australia	Tomate
GQ280794	<i>Virus del mosaico del tomate Cepa N5</i>	China	Tomate
AJ132845	<i>Virus del mosaico del tomate</i>	China	Tomate
AJ417701	<i>Virus del mosaico del tomate Camellia</i>	China	Tomate
AB083196	<i>Virus del mosaico del tomate L11A-Fukushima</i>	Japón	Tomate
DQ873692	<i>Virus del mosaico del tomate cepa 1-2</i>	Alemania	Tomate
FN985165	<i>Virus del mosaico del tomate China</i>	China	Tomate

Descripción: Partícula cilíndrica y rígida de aproximadamente 300 nm de longitud y 18 nm de diámetro, mostrando un típico canal interior coincidente con el eje de su estructura helicoidal de un diámetro aproximado entre 2-3 nm. Está compuesto por una molécula de ARN monocatenario de sentido positivo de 6,4 kb. El ácido nucleico supone el 5% del virión.

Citopatología: Inclusiones cristalinas y amorfas. Cristales hexagonales, en forma de aguja, de clavo o de huso, agregados de partículas en bandas.

Huéspedes: Tiene una amplia lista de plantas huéspedes, entre las que cabe destacar tomate, pimiento, tabaco, y berenjena.

Sintomatología: Causa mosaico verde claro-verde oscuro o verde-amarillento y reducción de la lámina foliar en hojas; en fruto, mosaico, maduración irregular, áreas de pulpa acorchada y necrosis subepidérmicas conocidas con el nombre de “goma” según las cepas y variedades. La cepa 22 origina enanismo y necrosis de las hojas apicales (Fig.1 y 2).

A nivel microscópico se puede apreciar el *ToMV*(Fig.3).

Falta de desarrollo de las plantas afectadas. Posibilidad de infecciones mixtas con otras virosis con efecto sinérgico, como con el Virus X de la patata y el mosaico del pepino.

Transmisión: Se transmite por inoculación mecánica, por contacto entre plantas y por semilla. Sobrevive en restos de cosecha en el suelo durante meses. Es importante la transmisión mecánica durante las operaciones de cultivo.

Información Taxonómica

Nombre común: *Virus del mosaico del tomate*

Nombre científico: *ToMV*

Dominio: Virus

Phylum: Negarnaviricota

Orden: Tymovirales

Familia: Virgaviridae

Género: *Tobamovirus*

Especie: *Tomato mosaic virus*

(International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2017)



Figura 1. síntomas de ToMV en fruto **Fig 2.** Síntomas en hoja **Fig. 3.** Visión microscópica del *ToMV*

Tomado de: Unidad de Sanidad Vegetal. CITA. El virus del mosaico del tomate (*ToMV*), España, 2014

7. Procedimiento

Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), PCR Convencional, PCR Real.

7.1 Preparación de la muestra.

- Se recomienda utilizar muestras de hojas para su fácil desecho, que sean entregadas envueltas en papel toalla dentro de bolsa plástica.
- Control Positivo
El control positivo consiste en tejido vegetal infectado por el *virus del mosaico del tomate* (*ToMV*), liofilizado y comercializado por Agdia (Agdia, Inc., Estados Unidos). La banda, producto de la amplificación de este control positivo es validada mediante secuenciación

7.2 Realización del ensayo

• Extracción de ARN

A partir de los controles, se purifica el ARN mediante el reactivo PureLink™ Plant RNA de (Thermo Fisher Scientific, No. Cat: 12322-012). Se pesa 15 mg del control positivo y se agrega 0.5 ml del reactivo frío (4°C). Las muestras se agitan en vórtex hasta que quedar completamente suspendidas, luego se incuban las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, para aclarar los lisatos, se centrifugan las muestras a 12,000 × g durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se transfieren los sobrenadantes a tubos libres de ARNasa. Después, se agregan 0.1 ml de NaCl 5M a los extractos clarificados y se agitan por inversión entre 3 y 5 veces. Se agregan 0.3 ml de cloroformo a las muestras y se agitan por inversión hasta formar una emulsión. Posteriormente, se centrifugan las muestras a 12,000 × g durante 10 minutos a 4 ° C para separar las fases y se transfiere la fase acuosa superior a tubos libres de ARNasa. A la fase acuosa se le agrega un volumen igual de alcohol isopropílico, se mezcla y se deja reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, se centrifugan las muestras a 12,000 × g durante 10 minutos a 4 ° C. Se desecha el sobrenadante, teniendo cuidado de no perder el *pellet*, y se agrega 1 ml de etanol al 75% a cada muestra. Se centrifugan las muestras a 12,000 × g durante 1 minuto a temperatura ambiente, repitiendo el paso nuevamente en un segundo lavado. Se agregan 150 µL de agua libre de ARNasa al sedimento de ARN, se mezcla por pipeteo hasta suspender el ARN. Finalmente, se almacena el ARN extraído a -80 ° C hasta su posterior utilización.

• Cuantificación de ARN

Se evalúa la calidad y cantidad del ARN extraído a partir de espectrofotometría. Para ello se utiliza el equipo Nanodrop 8000 (Thermo Scientific). Como blanco se utiliza 3 µL de agua libre de ARNasa. Se toma 2 µL del ARN extraído y se lee en el equipo.

• Síntesis de ADN complementario mediante Transcripción Inversa (RT)

Para la obtención de ADN complementario se utiliza el kit M-MLV Reverse Transcriptase (Thermo Scientific). La reacción consta de dos mezclas: En la primera (Mix 1, 15 µl), se coloca 8 µl de H₂O DEPC, 1 µl de Random primers (0,5 µg/µl) (Thermo Scientific) en un tubo de 1.5 ml libre de ARNasas. Se dispensa a tubos de 0.2 ml y se añade 6 µl del ARN extraído previamente. Se incuba en el termociclador durante 5 min a 70 ° C. La segunda reacción (Mix 2, 10 µl) consiste en 1.5 µl de H₂O, 5 µl de Buffer RT, 1.5 µl de dNTP`s, 1 µl de RNasin y se deja incubar 2 min a 37 ° C. Posteriormente, a esta mezcla se agrega 1 µl de la enzima MLV y se mezcla mediante pipeteo. Se coloca el Mix 2 en el Mix 1 y se sintetiza el ADN complementario con las siguientes condiciones: un ciclo de 5 minutos a 25 ° C, un ciclo de 60 minutos a 37 ° C un ciclo de 10 minutos a 70 ° C y un ciclo a 12 ° C.

- **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Los parámetros iniciales empleados para la amplificación del control positivo, se encuentran detallados a continuación (Cuadro 2, 3 y 4).

Cuadro 2. Reactivos y concentraciones iniciales utilizados para la estandarización de la PCR

Reactivo	Concentración inicial	Concentración Final	1 Rx
H ₂ O	N/A	N/A	18 µl
Buffer PCR	10X	1X	2.5 µl
MgCl ₂	50mM	1.6mM	0.8 µl
dNTP's	10mM	0.2mM	0.5 µl
Primer F	10µM	0.2µM	0.5 µl
Primer R	10µM	0.2µM	0.5 µl
Enzima Taq Polimerasa	5U/µl	1.5U/µl	0.3 µl
Volumen de Reacción	-	-	23 µl
cDNA	-	-	2 µl
Volumen final de reacción		25 µl	

Tomado de: Estandarización de un método Rápido de detección del *virus del mosaico del tomate (ToMV)* mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), México, 2019

Cuadro 3. Perfil térmico inicial utilizado para la obtención de productos de la PCR

Nº de ciclos	Temperatura °C	Tiempo min:seg
1	94	03:00
	94	00:30
35 veces	52	00:30
	72	00:45
1	72	10:00
1	4	∞

Tomado de: (Plant Disease, 2017)

Las reacciones en cadena de la polimerasa de *Tomato mosaic virus (ToMV)*, se realizan empleando cebadores descritos según bibliografía (Cuadro 4).

Cuadro 4. Detalle de las secuencias empleadas para la detección del virus del mosaico del tomate (ToMV) utilizadas en el presente estudio

Primer	Secuencia 5' – 3'	Genoma de referencia	Región	Ubicación	Tamaño producto
ToMV – F		NC_002692	ARN polimerasa dependiente de ARN	3640 4234	- 595 pb
ToMV– R	GAAACATCCAACCTCAAGTACG				

Tomado de: Estandarización de un método Rápido de detección del virus del mosaico del tomate (ToMV) mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), México, 2019

Es importante mencionar que el fragmento de interés que se espera obtener es de 595 pb.

- **Confirmación de producto de PCR mediante secuenciación**

Una vez realizada la amplificación del control positivo con las condiciones del apartado 3.5, se manda a secuenciar (secuenciación Sanger) a Macrogen.

- **Estandarización de la PCR**

Una vez confirmado el producto de PCR, se realiza la estandarización de la PCR donde se evalúan diferentes concentraciones de MgCl₂ y cebadores (Cuadro 5), además, un gradiente de temperatura de alineamiento (Cuadro 5).

Cuadro 5. Reactivos y concentraciones para determinar la concentración óptima de MgCl₂ y cebadores

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
H ₂ O	-	-
Buffer PCR	10X	1X
MgCl ₂	50mM	1 mM, 1.5 mM, 2 mM, 2.5 mM, 3 mM, 3.5 mM
dNTP's	10mM	0.2mM
Primer F	10 µM	0.1µM, 0.4 µM y 0.8µM
Primer R	10 µM	0.1µM, 0.4 µM y 0.8µM
Taq polimerasa	5 U/µL	1U/µL
cDNA	-	-

Tomado de: Estandarización de un método Rápido de detección del *virus del mosaico del tomate (ToMV)* mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), México, 2019

Cuadro 6. Perfil térmico del Programa PCR para los cebadores específicos

Proceso	Temperaturas	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 ° C	2:00	1
Desnaturalización	95 ° C	1:00	
Alineamiento	48.0 ° C, 49.0 ° C, 50.7 ° C, 53.4 ° C, 56.5 ° C, 59.0 ° C, 60.9 ° C, 62 ° C	1:00	35
Extensión	72 ° C	1:00	
Extensión Final	72 ° C	10:00	1
Final	4 ° C	∞	1

Tomado de: Estandarización de un método Rápido de detección del virus del mosaico del tomate (ToMV) mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), México, 2019

La amplificación definitiva, para cada una de las muestras, se realiza con las condiciones previamente estandarizadas.

- **Electroforesis de los productos de PCR**

Los productos de la amplificación se visualizan en gel de agarosa al 1.5% (p/v) con 2 µl de SYBR Safe (Thermo Scientific) por cada 100 ml de buffer TBE 1X y se corre a 90V por 45 minutos.

- **Análisis de especificidad “in silico”**

Para verificar la especificidad “in silico” de los cebadores, primero se obtiene las secuencias de virus relacionados a *solanáceas* en el programa BLAST y posteriormente se utiliza el programa MEGA para realizar el alineamiento de las secuencias. Todo el proceso utiliza un flujograma para su ordenado procedimiento (Fig. 4).

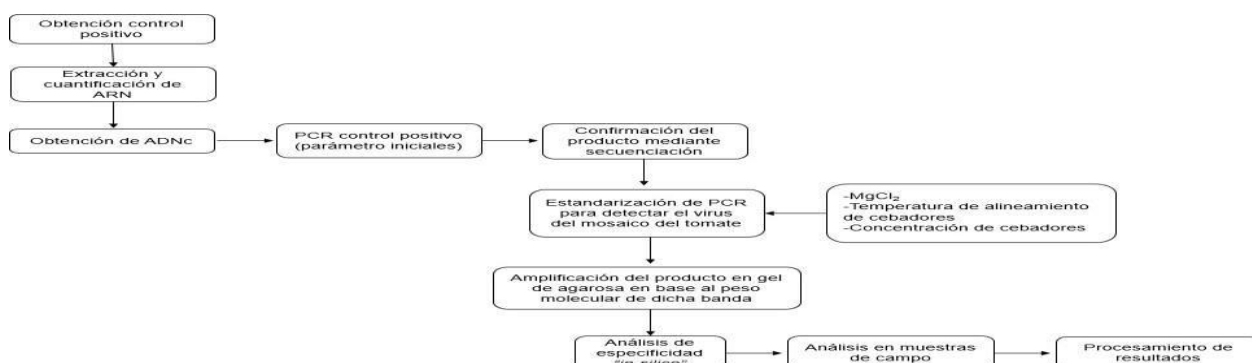


Figura 4. Diagrama de flujo sobre la metodología empleada para la detección del *virus del mosaico del tomate*. Tomado de: Estandarización de un método Rápido de detección del *virus del mosaico del tomate (ToMV)* 2019.

8. Control de Calidad

• RT – PCR del control positivo con parámetros iniciales

- Se observa la amplificación del producto de interés (control positivo) correspondiente a 595 pb (Figura 5).

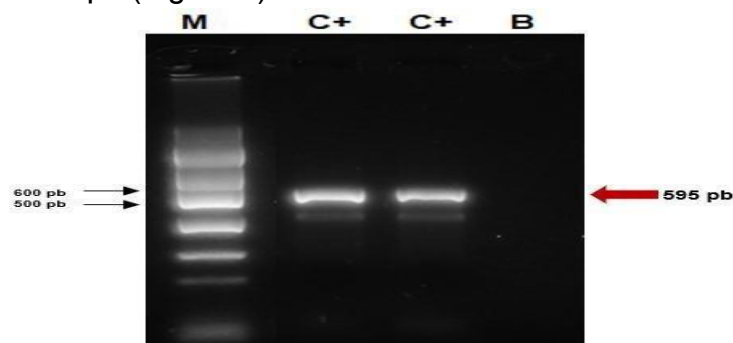


Figura 5. Gel de agarosa al 1.5% revelado tras corrida electroforética del control positivo con parámetros iniciales. **Tomado de:** Estandarización de un método Rápido de detección del *virus del mosaico del tomate (ToMV)* mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), México, 2019

M: marcador de peso molecular (TrackIt™1Kb Plus DNA Ladder)

C+: Control positivo. B: Blanco.

• Confirmación de producto de RT-PCR mediante secuenciación

El fragmento de interés (Control positivo) fue secuenciado mediante la metodología Sanger. Una vez obtenida la secuencia, se la validó para obtener la secuencia consenso, la cual fue sometida a un análisis BLAST para confirmar que la secuencia de interés coincidía con las secuencias previamente reportadas para el virus del mosaico del tomate (Cuadro 7)

Cuadro 7. Valores obtenidos mediante el análisis del blast

Description	Query Cover	E value	Ident	Accession
<i>Tomato mosaic virus</i> isolate Queensland,complete genome	100%	0.0	99%	AF332862.1
<i>Tomato mosaic virus</i> genes encoding RNA-dependent RNA polymerase, movement protein and coat protein	100%	0.0	99%	MF002485.1
<i>Tomato mosaic virus</i> strain To52 RNA-dependent RNA polymerase gene, partial cds	65%	0.0	100%	KJ160239.1

Tomado de: Estandarización de un método Rápido de detección del *virus del mosaico del tomate (ToMV)* mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), México, 2019

En el análisis, se confirma que, si la secuencia pertenece al virus del mosaico del tomate, con un 99% de identidad con el genoma completo, atribuible a pequeños errores de secuenciación o a la variabilidad natural del virus. Se reporta si la secuencia amplificada coincide con la sección de ARN polimerasa del virus con un 100% de identidad y un 65% cobertura total ya que la secuencia no abarca la sección completa de ARN polimerasa (Arinaitwe *et al.*2018).

- **Estandarización de la PCR**
- **Gradiente de concentración de MgCl₂**

La amplificación específica de los controles realizada con cada una de las diferentes concentraciones de MgCl₂, permite determinar que las concentraciones óptimas son de mM y 2.5 mM (Figura 6), sin la presencia de productos inespecíficos comparados con las otras concentraciones (datos no mostrados).

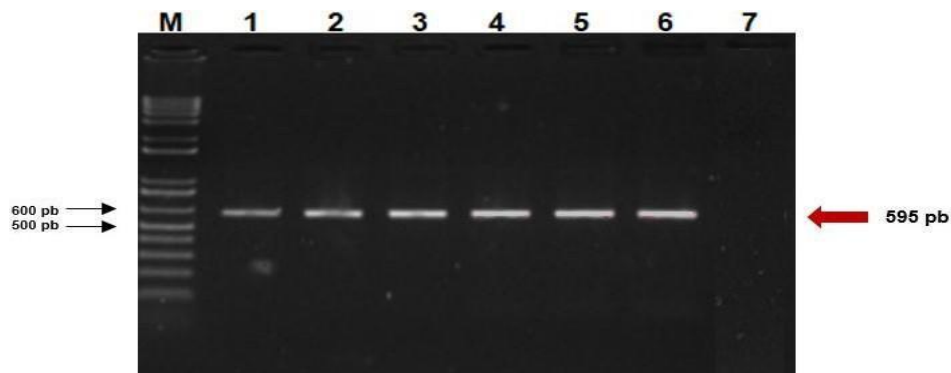


Figura 6. Gel de agarosa al 1.5% revelado tras corrida electroforética de las diferentes concentraciones de MgCl₂ empleadas para los cebadores específicos

- M: marcador de peso molecular (TrackIt™1Kb Plus DNA Ladder)
- Carril 1: [MgCl₂] 1 mM
- Carril 2: [MgCl₂] 1.5 mM
- Carril 3: [MgCl₂] 2 mM
- Carril 4: [MgCl₂] 2.5 mM
- Carril 5: [MgCl₂] 3 mM
- Carril 6: [MgCl₂] 3.5 mM
- Carril 7: Control negativo.

Tomado de: Estandarización de un método Rápido de detección del *virus del mosaico del tomate* (ToMV) mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), México, 2019

Las concentraciones adecuadas de MgCl₂ oscilan entre 0.5 a 3.5 mM, influyendo así en la actividad del ADN polimerasa, ya que los iones de Mg²⁺ se unen al sitio catalítico de la enzima interviniendo en la reacción (Chauhan, 2018), con lo cual una baja concentración de magnesio el ADN polimerasa puede inactivarse, mientras que a una

alta concentración puede generar una amplificación con productos inespecíficos (Chen, 2010). Además, posibilita una unión adecuada del cebador a su secuencia complementaria. Otro de los factores que influyen en la cantidad de $MgCl_2$ que se emplea en la PCR es el contenido de GC, ya que la fuerza ejercida entre las dos hebras es más alta, por ello la separación de estas requieren de una mayor energía, es decir de una mayor concentración de $MgCl_2$ (Chauhan, 2018).

- **Temperatura de alineamiento**

Al emplear diferentes temperaturas de alineamiento se observó que la mejor temperatura fue de $59^{\circ}C$ con una concentración de 2 mM de $MgCl_2$ (Figura 7), en la cual se puede distinguir una banda sin presencia de productos inespecíficos comparados con las otras temperaturas (datos no mostrados).

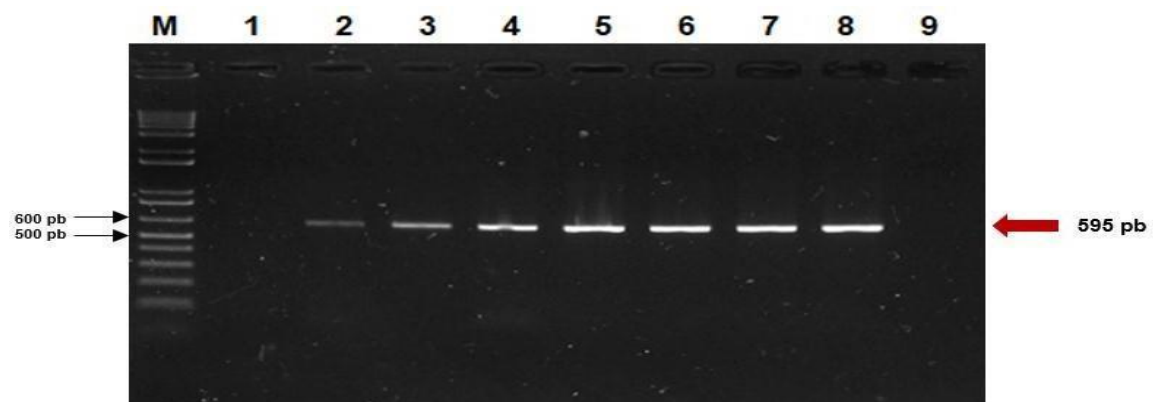


Figura 7. Gel de agarosa al 1.5% revelado tras corrida electroforética de las diferentes temperaturas de alineamiento empleadas para los cebadores específicos, con una concentración de $MgCl_2$ de 2 mM

- a) M: marcador de peso molecular (TrackIt™1Kb Plus DNA Ladder)
- b) Carril 1: $62.0^{\circ}C$
- c) Carril 2: $60.9^{\circ}C$
- d) Carril 3: $59.0^{\circ}C$
- e) Carril 4: $56.5^{\circ}C$
- f) Carril 5: $53.4^{\circ}C$
- g) Carril 6: $50.7^{\circ}C$
- h) Carril 7: $49.0^{\circ}C$
- i) Carril 8: $48.0^{\circ}C$
- j) Carril 9: Control negativo.

Tomado de: Estandarización de un método Rápido de detección del virus del mosaico del tomate (ToMV) mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), México, 2019

La importancia con relación a la temperatura de alineamiento se debe a que, en esta etapa de la PCR, los cebadores se adhieren a una ubicación específica en el ADN de una sola hebra mediante enlaces de hidrógeno (Majumder & Baranwal, 2014). Se debe tomar en cuenta que la temperatura de alineamiento debe ser la más adecuada para que los

cebadores se unan a la hebra de ADN, pero no se recomienda temperaturas muy bajas ya que se puede dar la formación de dúplex no específicos y horquillas intramoleculares, reduciendo de esta manera la eficiencia de la reacción (Watpade *et al.* 2013). Para evaluar los efectos de diferentes temperaturas de alineamiento en una RT-PCR se deben tomar en cuenta valores entre 54º a 62º C, como indica (Crosslin & Hamlin, 201).

Cabe recalcar que la temperatura de alineamiento es uno de los parámetros más importantes en una estandarización, ya que temperaturas demasiado bajas pueden provocar alineamientos inespecíficos con otras secuencias; y una temperatura demasiado alta puede ocasionar una reducción en el rendimiento de la reacción, por lo que no existiría amplificación (Ver carril 1 de figura 18) (Labat *t al.* 2014). Con estos resultados, se puede inferir que el Mg^{2+} , conjuntamente con la temperatura de alineamiento tendría una influencia directa sobre la sensibilidad de la reacción, por lo que se sugiere la evaluación de ambos parámetros al mismo tiempo. Es así que, reacciones con temperaturas de alineamiento bajas, conjuntamente con concentraciones altas de Mg^{2+} , tienen mayores posibilidades de amplificación inespecífica. Por el contrario, concentraciones bajas de Mg^{2+} , conjuntamente con temperaturas de alineamiento elevadas, conducen a una menor eficiencia en la amplificación y reducción de la sensibilidad.

- **Concentración de cebadores**

En cuanto a las diferentes concentraciones de cebadores se observa una mejor amplificación con 0.1 μM (Figura 8), sin la presencia de productos inespecíficos comparados con las otras concentraciones (datos no mostrados).

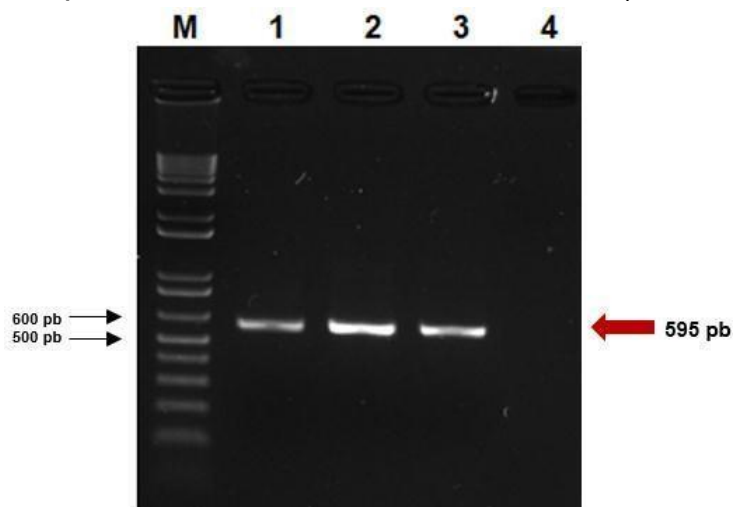


Figura 8. Gel de agarosa al 1.5% revelado tras corrida electroforética de las diferentes concentraciones de cebadores empleados para la PCR, con una concentración de $MgCl_2$ de 2 mM y una temperatura de alineamiento de 59ºC.

Tomado de: Estandarización de un método Rápido de detección del *virus del mosaico del tomate (ToMV)* mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), México, 2019

- a) M: marcador de peso molecular (TrackIt™1Kb Plus DNA Ladder)
- b) Carril 1: 0.1µM
- c) Carril 2: 0.4µM
- d) Carril 3: 0.8µM
- e) Carril 4: Control negativo.

La concentración de cebadores es uno de los componentes más sensibles en el ensayo de PCR, además de tomar en cuenta su concentración en la reacción, el contenido de GC y número de nucleótidos es importante (Boonham *et al.* 2016). Cuando existe una concentración alta de cebadores puede ocasionar acumulación de productos inespecíficos, generando dímeros de cebador. Por otro lado, cuando existe una concentración baja de cebadores, no se llevaría a cabo la amplificación del fragmento esperado (Wilson, 2014).

Los parámetros estandarizados para la detección del *virus del mosaico del tomate* se detallan a continuación (Cuadro 8):

Cuadro 8.

Condiciones estandarizadas de la PCR

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
H ₂ O	-	-
Buffer PCR	10X	1X
MgCl ₂	50mM	2 mM
dNTP's	10mM	0.2mM
Primer F	10 µM	0.1µM
Primer R	10µM	0.1µM
Taq polimerasa	5 U/µl	1U/µl
cDNA	-	-
Volumen final		25µl

Tomado de: Estandarización de un método Rápido de detección del *virus del mosaico del tomate* (*ToMV*) mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), México, 2019

9. Resultados

- La técnica de secuenciación permite corroborar si los amplicones obtenidos, efectivamente corresponden al virus del mosaico del tomate, presentando un 99% de identidad con las secuencias encontradas en la base de datos.

- El método de detección para el *virus del mosaico del tomate* (ToMV) empleado es efectivo y nos permite amplificar la región de ARN polimerasa del virus. Las condiciones estandarizadas en la técnica de PCR para la hibridación son: concentración de MgCl₂ 2 mM, temperatura de alineamiento 59°C y concentración de cebadores de 0,1 μM, las cuales resultan adecuadas dentro de los rangos esperados para una PCR.

10. Disposición Final de la Muestra.

- Si los resultados son positivos la muestra se incinera completamente.
- Si los resultados son negativos la muestra se desecha bien guardada en bolsa plástica.

11. Registros

- el nombre científico de la plaga identificada
- el código o número de referencia de la muestra (para la rastreabilidad)
- la naturaleza del material infestado incluyendo el nombre científico del hospedante
- el origen (incluida la ubicación geográfica, si se conoce) del material infestado,
- la descripción de las signos o síntomas (incluyendo las fotografías, de ser pertinentes)
- los métodos, incluyendo los controles, utilizados en el diagnóstico y los resultados
- para los métodos morfológicos o morfométricos, las medidas, los dibujos o las fotografías
- para los métodos bioquímicos y moleculares, la documentación de los resultados de la prueba tales como fotografías del gel del diagnóstico o registros de los resultados de la prueba ELISA en los cuales se basó el diagnóstico
- cuando proceda, la magnitud de cualquier infestación (la cantidad de plagas individuales encontradas y de tejido dañado)
- el nombre del laboratorio y, cuando proceda, el nombre de las personas responsables del diagnóstico y/o quienes lo realizaron
- las fechas de recolección de la muestra, y de la detección e identificación de la plaga
- cuando sea apropiado, el estado de la plaga, viva o muerta, o la viabilidad de sus etapas de desarrollo

12. Puntos de contacto para información adicional

https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/plataforma_conocimiento/fichas/pdf/fd_399.pdf

13. Reconocimiento

Ana M^a Aguado Martínez (1), Sonsoles Fernández-Cavada Labat (1),
Miguel Cambra Álvarez (1), Fernando Escriu Paradell (2), M^a Sol Luis Artiaga (2)

(1) Centro de Sanidad y Certificación Vegetal.

(2) Unidad de Sanidad Vegetal. CITA.

El virus del mosaico del tomate (*ToMV*), España, 2014

14. Referencias

Dayana Sofía Ortiz Delgado (1), Ahyme María Ramírez Suarez (2), Estandarización
de un método Rápido de detección del virus del mosaico del tomate (*ToMV*)
mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR),
México, 2019

FIN DEL PROCEDIMIENTO

PROTOCOLO DE DIAGNOSTICO DEL CULTIVO DE CAÑA DE AZUCAR (*Saccharum officinarum*)



Protocolo de Diagnóstico del <i>Virus de mosaico de la caña de azúcar</i> (SCMV)			
Elaborado por:	José Jeremías Paz Carpio	Versión:	
		Revisión:	
Aprobado por:	Ing. Anakely Romero de Huevo	Fecha aprobación	Página 1 de 10

1. Propósito.

Describir la metodología aplicada para la detección y diagnóstico del *Virus de mosaico de la caña de azúcar* (SCMV) para ayudar a evitar pérdidas de producción.

2. Alcance.

Identificar la morfología y estructura del virus para dotar al técnico de información fiable en el proceso de detección.

3. Responsabilidades.

Actividad	Responsable
Preparación de la muestra	Técnico del Laboratorio
Ejecución del ensayo	Técnico del Laboratorio
Entrega de resultados	Técnico del Laboratorio

4. Documentos o registros.

Relación con otros documentos del SGC	Registros generados
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA <ul style="list-style-type: none"> Bermúdez-Guzmán MJ, Delgado-Virgen FJ, Cervantes-Preciado JF, García-Preciado JC, Farías-Cervantes VS. 2017. Detection of <i>Sugarcane mosaic virus</i> (SCMV) in <i>Saccharum spp.</i> in Mexico and phylogenetic origin of one isolate from Jalisco. Revista Mexicana de Fitopatología 36(1): 16-34. 	<ul style="list-style-type: none"> F.D 1.1.1. Bitácora de Trabajo de Diagnóstico Vegetal FD 1.1.2. Hoja de Resultados de Diagnóstico Vegetal

5. Equipo y materiales.

Equipo	<ul style="list-style-type: none">• termociclador (Labnet)• transiluminador con luz UV (UVP)
Materiales	<ul style="list-style-type: none">• Bolsas plásticas• Placa PETRI• micro tubo de 2 ml• palillo de madera esterilizado• pipeta• celdas de cuarzo de 1 cm de largo
Reactivos	<ul style="list-style-type: none">• Kit “Reverse Transcription System” (PROMEGA).• MgCl₂• transcriptasa inversa AMV• REDTaq ReadyMix (SIGMA-ALDRICH)• gel de agarosa al 1%• BrEt• nitrógeno líquido• solución de lavado (EDTA 1Mm, NaCl 2 M, BSA 0.05% (p/v) y Tris-HCl 10 Mm)• solución de extracción (CTAB 5% (p/v)• fenol• cloroformo• alcohol isoamílico• isopropanol frio• acetato de amonio• agua ultra pura
Protección	<ul style="list-style-type: none">• Gabacha de tela• Mascarilla desechable• Gorro desechable• Guantes de látex

6. Información de la plaga

El *Virus de mosaico de la caña de azúcar (SCMV)* es uno de los principales agentes virales que infectan a caña de azúcar (*Saccharum officinarum*).

El síntoma general causado por el SCMV en caña de azúcar se caracteriza principalmente por presentar decoloraciones en la lámina foliar, en la cual se observan zonas de color verde normal alternado con áreas verde pálido o amarillentas; estas decoloraciones son resultado de los niveles de variación en la concentración de la clorofila en la hoja (Grisham, 2000; CONADESUCA, 2015).

El Virus del mosaico de la caña pertenece al género Potyvirus de la familia de Potyviridae, las partículas virales son filamentosas, miden de 11 a 15 nanómetros de diámetro y alrededor de 650 a 900 nanómetros de largo. Es un virus de ssARN o ARN de cadena

única por sus siglas en inglés. El *virus del mosaico de la caña de azúcar* mide 11 por 750 nm (nanómetros). Se sabe que la infección en plantas ocurre durante su propagación en el campo y es transmitido por varias especies de áfidos. También puede ocurrir que el virus se mantenga a lo largo de las temporadas o en plantas que crecen en los alrededores de los cultivos.

El virus es transmitido por áfidos (Fig. 1) de una manera no persistente. Esto es porque el virus no sobrevive adentro del insecto. Es transmitido cuando un áfido se alimenta de una planta infectada.

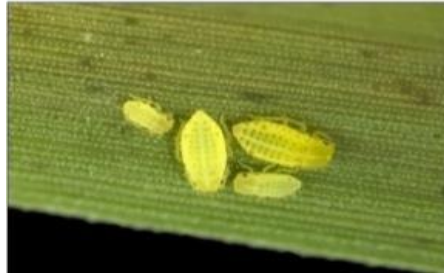


Fig. 1. Vector del SCMV alimentándose de una hoja de caña de azúcar.

Tomado de: Detection of *Sugarcane mosaic virus (SCMV)* in *Saccharum spp.* in Mexico and phylogenetic origin of one isolate from Jalisco. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 16-34.

Información taxonómica

Nombre común: Virus mosaico de la caña de azúcar

Nombre científico: *SCMV*

Taxonomía:

Familia: Potyviridae

Género: *Potyvirus*

(SEF, 2017)

7. Procedimiento

Detección del SCMV por RT-PCR y PCR.

7.1 Preparación de la muestra.

- El muestreo de las hojas es realizado a conveniencia, dentro de una parcela definida se toman muestras de las hojas que presentan síntomas característicos como decoloración de la hoja, esta se denota por las líneas de color amarillo pálido o verde claro (Fig. 2 A y B).

- Para la toma de la muestra se utiliza tijeras que se flamean con etanol. Luego la hoja se corta en secciones más pequeñas, a modo de evitar doblarlas adentro de la bolsa hermética. Las hojas se transportan en una hielera (-4 C), cada bolsa debe ser debidamente identificada con la fecha, lugar de colecta y variedad de caña de azúcar. Se toma hojas con síntomas de mosaico hojas sin síntomas de mosaico como control negativo. El material vegetal se almacena como hoja entera en refrigeradora de 4 C y hojas trituradas en micro tubos a -80 C.



Figura 2. A: Diversidad de síntomas de mosaico en hojas de caña de azúcar.



Fig. 2. B) Diversidad de síntomas (patrón de mosaico, lesiones por pústulas, clorosis, necrosis, mancha café y hoja corrugada) en hojas de caña de azúcar positivas al SCMV por RT-PCR.

7.2 Realización del ensayo

Extracción de ARN: El tejido de hojas de caña de azúcar se corta en pedazos más pequeños y se pesa 0.1 g de material vegetal. Luego en un micro tubo de 2 ml se congela la muestra utilizando nitrógeno líquido y se tritura utilizando un palillo de madera esterilizado. El material triturado puede ser almacenado a 4 C. o es utilizado inmediatamente.

El primer paso para la extracción es mezclar el material vegetal con 500 µL de solución de lavado (EDTA 1Mm, NaCl 2 M, BSA 0.05% (p/v) y Tris-HCl 10 Mm), Se agita vigorosamente y se realiza una centrifugación a 14,000 rpm durante 5 minutos. Luego de extraer con una pipeta la solución de lavado se agrega 600 µL de la solución de extracción (CTAB 5% (p/v), 2- mercaptoctanol 2.5% (p/v), Tris-HCl 0.1 Mm y NaCl 1.4 M). Luego se incuba en un baño María previamente calentado a 55 C. Se mezcla la solución cada 10 min.

Al terminar el tiempo de incubación se agrega 400 μL de una solución de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción 25:24:1. Se vuelve a centrifugar utilizando las mismas condiciones mencionadas anteriormente y se transfiere la fase acuosa a un micro tubo nuevo. Se agrega 500 μL de isopropanol frío (-20 C) y 50 μL de acetato de amonio 7.5 M. Se mezcla por inversión y se incuba por 20 min a -20 C . Se precipita el ARN centrifugando a 14,000 rpm por 5 Min. Luego de decantar el sobrenadante se agrega 100 μL de etanol 70% (v/v) y se incuba durante 15 min a -20 C . Se recupera el ARN de la misma manera mencionada anteriormente y se elimina el alcohol por evaporación, incubando a temperatura ambiente durante 30-50 min. Se re suspende el pellet de ARN en 50 μL de agua ultra pura o agua DEPC. Almacenar el ARN a 4 C el menor tiempo posible antes de su utilización.

Cuantificación de ARN: Para la cuantificación de ARN se utiliza una dilución de 1:200 dependiendo del valor observado se cambia la dilución para su cuantificación. Para muestras con poco ARN se utiliza una dilución 1:100. Las muestras se miden a 260,280 y 320 nm en celdas de cuarzo de 1 cm de largo. Luego se calcula la concentración del ARN asumiendo que 1 O.D equivale a 40 $\text{ng}/\mu\text{L}$. La concentración de ARN se calcula utilizando la Fórmula 1. Para la pureza del ARN se utiliza la Formula 2.

PCR: Es una técnica molecular desarrollada por Kary Mullins en 1980. La reacción involucra muchas proteínas utilizadas como andamio para iniciar la reacción, una secuencia de ADN con un grupo OH 3 accesible (llamados cebadores), otra hebra de ADN que actúa como sustrato, y los Desoxinucleótidos trifosfato (Dntp). Esta enzima cataliza la formación de una cadena de polinucleótidos a partir de Dntp. Para que ocurra la reacción la enzima necesita de una cadena de ADN como sustrato, para agregar uno de los nucleótidos complementarios A, T, C o G (Adenina, Tirosina, Citosina o Guanina). De esta manera repitiendo el ciclo de la reacción permite generar millones de copias de un fragmento de interés.

Para el análisis de secuencias de ARN, como lo son algunos virus. Primero se transcribe el ARN en ADN por la enzima transcriptasa inversa, utilizando una RNA polimerasa. Esto permite generar copias de doble hebra de ADN, también llamada ADN complementario (ADN c). Luego estos fragmentos se visualizan por tamaño en un gel de agarosa. La detección por PCR es una de las técnicas más específicas y permite obtener información sobre la composición nucleotídica del virus.

La reacción de transcripción inversa (RT) del RNA total se realizó utilizando el kit "Reverse Transcription System" (PROMEGA). El RNA fue desnaturalizado a 70 C durante 10 minutos; la mezcla de reacción RT se llevó a cabo en un volumen de 20 μL conteniendo 5 Mm de MgCl_2 , amortiguador RT 1X, 1 Mm de cada Dntp, 1 μL de inhibidor de ribonucleasa RNasin recombinante, 15 μg de transcriptasa inversa AMV, 0.5 μg de mezcla de oligonucleótidos por μg de RNA y 5 μL de RNA total (1.5 μg aproximadamente). La mezcla anterior se debe incubar a temperatura ambiente por 10 minutos y luego a 42 C durante 45 minutos. Inmediatamente después se incubo a 95 C durante 5 minutos y

finalmente 0-5 C por 5 minutos. Los CDNA resultantes fueron utilizados como molde para la amplificación por PCR con los oligonucleótidos descritos por Xie et al. (2009). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 µL, conteniendo 12.5 µL de REDTaq ReadyMix (SIGMA-ALDRICH), 1 µM de cada oligonucleótido, 3 µL de cDNA y H₂O grado molecular. La mezcla de reacción se incubó en un termociclador (Labnet) con el siguiente programa: un ciclo de 50°C por 30 min y 94°C por 2 min; 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 56°C por 30 seg y 72°C por 1 min seguido de una extensión final a 72°C por 5 min. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1 X y fueron cargados 12.5 µL de los productos de PCR; las muestras se corrieron con un voltaje de 120 V. Finalmente los geles se tiñeron con BrEt y se visualizaron en un transiluminador con luz UV (UVP) para el análisis de los resultados.

8. Resultados

- Si el resultado es positivo se reporta como positivo
- Si el resultado es negativo se reporta como negativo

9. Control de Calidad

El control de calidad en un laboratorio, debe evaluar y documentar el desempeño de todos los aspectos de sus procedimientos. Esto incluye la calidad de la muestra, la eficiencia de los reactivos, los medios de cultivo, el funcionamiento de los diversos instrumentos o equipos y la verificación o validación de los resultados obtenidos.

9.1 Control de calidad de las muestras

Uno de los aspectos más importantes en un laboratorio es la apropiada selección, recolección y transporte de las muestras. Por lo que todo el personal relacionado con estas responsabilidades, debe comprender lo determinante que es el mantenimiento de la calidad de la muestra, en la evaluación e informe de un espécimen.

A pesar de que algunos tipos de muestras requieren metodología de recolección y transporte muy especiales, se pueden enumerar algunos aspectos generales que deben tenerse en cuenta al recolectar las muestras.

- La muestra debe ser representativa
- Al tomar una muestra, es importante evitar la contaminación con microorganismos
- Se debe recolectar un volumen apropiado de muestra para evitar los resultados falsos negativos.
- Se debe identificar cada muestra su nombre y su número de identificación.

- Se debe colocar la muestra en un recipiente adecuado para su transporte, con el fin de asegurar la sobrevivencia del posible agente infeccioso.
- Por último, se debe evitar derramar la muestra y mantener en todo momento las medidas de bioseguridad apropiadas.

9.2 Control de calidad de los medios de cultivo

- Se debe mantener un registro de cada frasco de medio de cultivo, con el nombre del producto, nombre de la casa proveedora, fecha de recibo, fecha de expiración, número de lote y fecha en que se abrió el frasco
- Cada lote preparado de medio de cultivo se debe probar antes de su uso rutinario, mediante la inoculación de microorganismos
- Las pruebas básicas de control de calidad de los medios preparados deben incluir: medición del pH, pruebas de esterilidad, capacidad de crecimiento y reacción, aspecto, dureza y profundidad del agar.

9.3 Control de Calidad de reactivos

- Un elemento fundamental en el trabajo diario del laboratorio lo constituyen los reactivos, tanto comerciales como de preparación doméstica, que son utilizados en la caracterización de microorganismos. Por ello, deben efectuarse controles diarios con las bacterias tipo y seguir estrictamente las indicaciones en cuanto a almacenamiento de los reactivos, metodología de la prueba y tiempo de lectura. Es recomendable que los reactivos comerciales sean examinados inmediatamente cuando se abre un nuevo lote o vial y llevar un registro de su funcionamiento.
- El registro de funcionamiento debe efectuarse en forma diaria o al menos cada vez que se efectúa la prueba.

9.4 Control de calidad de las tinciones

- La concentración de las soluciones de tinción, por efecto de la evaporación de los solventes o las variaciones introducidas en los métodos recomendados, pueden afectar los resultados de las tinciones

para diferenciar microorganismos por su reacción a la tinción de Gram y la morfología, tintes para cápsulas, esporas, etc.

- El control de calidad de estos tintes debe realizarse primero con cada nuevo lote, luego basta con un control semanal para mantener un grado de seguridad apropiado en su uso. Para facilitar el control de los tintes, se recomienda preparar placas con microorganismos aislados en el trabajo rutinario o cepas de la ATCC frescas, tomado en cuenta aquellos que pudieran ser más útiles según la tinción a evaluar.
- Para el control diario de la tinción de Gram, se recomienda el uso de una cepa ATCC de *Staphylococcus aureus* y de *Escherichia coli*.
- Es necesario llevar un registro de estos controles.

9.5 Control de calidad de antisueros y otros productos comerciales como kits de identificación

- Existen cada vez más productos comerciales que tienen como objetivo ayudar en el diagnóstico de agentes etiológicos de enfermedades en el menor tiempo posible, con el mayor grado de especificidad y sensibilidad. Estos antisueros deben ser probados cada vez que se recibe un nuevo lote y cada vez que se utilicen, deben de analizarse los controles positivo y negativo que vienen con cada juego de reactivos. Se deben llevar registros con la fecha de expiración del lote, casa comercial, fecha en que ingresó al laboratorio, fecha en que se abrió el juego y el registro de los controles realizados.

9.6 Control de calidad de la prueba de sensibilidad

- Se debe monitorear la precisión y exactitud del procedimiento de la prueba de susceptibilidad, el comportamiento de los reactivos utilizados en la prueba y el desempeño de las personas que llevan a cabo las pruebas y sus resultados.
- Al hacer el control de calidad de discos, tiras de E-test o métodos de sensibilidad para sistemas automatizados o semi automatizados, se recomienda utilizar cepas ATCC. Cada nuevo lote de estos insumos debe evaluarse antes de su uso rutinario y luego una vez al mes, si no existe cambio de lote en ese periodo.

9.7 Control de calidad de equipos

- Todos los instrumentos utilizados en el laboratorio deben estar respaldados por un programa de control de calidad y de mantenimiento preventivo y correctivo, basados en las instrucciones del fabricante y los procedimientos establecidos. Debe mantenerse un registro de todo lo realizado al respecto, con el nombre del instrumento, fecha, resultado y comentarios.

9.8 Supervisión del personal

- El personal es el factor más importante en la calidad del trabajo en el laboratorio. Este personal debe tener una dedicación y actitud positiva hacia el trabajo, capacidad académica, actualización constante y contar con los elementos indispensables para su labor.

9.9 Control de calidad externo

- Es recomendable que los laboratorios puedan participar en programas de evaluación externa. Estos programas miden la capacidad del laboratorio para evaluar una muestra desconocida y llegar a un resultado seguro.
- Estos controles de calidad externos pueden ser nacionales o internacionales.

10. Disposición Final de la Muestra.

- Si el resultado es positivo se incinera la muestra y los materiales utilizados se someten a autoclave para su descontaminación.
- Si el resultado es negativo se desecha en bolsas plásticas bien amarradas.

11. Cálculos

Formula 1: Cuantificación del ARN

$$\text{Concentración ARN} = \text{O.D.260 nm} + 40 \text{ ng}/\mu\text{L} * \text{Factor de dilución}$$

Formula 2: Cuantificación de la pureza del extracto de ARN

$$\text{Pureza ARN} = \text{O.D 260 nm} / \text{O.D 280 nm}$$

11. Registros

- el nombre científico de la plaga identificada
- el código o número de referencia de la muestra (para la rastreabilidad)
- la naturaleza del material infestado incluyendo el nombre científico del hospedante
- el origen (incluida la ubicación geográfica, si se conoce) del material infestado,
- la descripción de las signos o síntomas (incluyendo las fotografías, de ser pertinentes)
- los métodos, incluyendo los controles, utilizados en el diagnóstico y los resultados
- para los métodos morfológicos o morfométricos, las medidas, los dibujos o las fotografías
- para los métodos bioquímicos y moleculares, la documentación de los resultados de la prueba tales como fotografías del gel del diagnóstico o registros de los resultados de la prueba ELISA en los cuales se basó el diagnóstico
- cuando proceda, la magnitud de cualquier infestación (la cantidad de plagas individuales encontradas y de tejido dañado)
- el nombre del laboratorio y, cuando proceda, el nombre de las personas responsables del diagnóstico y/o quienes lo realizaron
- las fechas de recolección de la muestra, y de la detección e identificación de la plaga
- cuando sea apropiado, el estado de la plaga, viva o muerta, o la viabilidad de sus etapas de desarrollo

12. Puntos de contacto para información adicional

http://saber.ucv.ve/bitstream/10872/22420/1/SCMV-MB_ca%C3%B1a%20de%20az%C3%BAcar.pdf

13. Reconocimiento

Bermúdez-Guzmán MJ, Delgado-Virgen FJ, Cervantes-Preciado JF, García- Preciado JC, Farías-Cervantes VS. 2017. Detection of *Sugar cane Mosaic virus (SCMV)* in *Saccharum spp.* in Mexico and phylogenetic origin of one isolate from Jalisco. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 16-34.

14. Referencias

<https://www.cenicana.org/servicio-de-diagnostico-de-enfermedades/>

FIN DEL PROCEDIMIENTO

		Protocolo de Diagnóstico del <i>Virus de la hoja amarilla (SCYLV)</i> en Caña de Azúcar	
Elaborado por:	José Jeremías Paz Carpio	Versión:	
		Revisión:	
Aprobado por:	Ing. Anakely Romero de Huevo	Fecha aprobación	Página 1 de 10

1. Propósito.

Describir la metodología aplicada para la detección y diagnóstico del *Virus de la hoja amarilla (SCYLV)* de la caña de azúcar para ayudar al productor en el manejo de plagas y evitar pérdidas de producción.

2. Alcance.

Identificar la morfología y estructura del virus para dotar al técnico de información fiable en el proceso de detección.

3. Responsabilidades.

Actividad	Responsable
Preparación de la muestra	Técnico del Laboratorio
Ejecución del ensayo	Técnico del Laboratorio
Entrega de resultados	Técnico del Laboratorio

4. Documentos o registros.

Relación con otros documentos del SGC	Registros generados
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA <ul style="list-style-type: none"> Barbosa Villa, Cruz Jaramillo, Presencia del <i>sugarcane yellow leaf virus (SCYLV)</i> en caña de azúcar (<i>Saccharum spp.</i>) aislado de Colima, México, 2018. 	<ul style="list-style-type: none"> F.D 1.1.1. Bitácora de Trabajo de Diagnóstico Vegetal FD 1.1.2. Hoja de Resultados de Diagnóstico Vegetal

5. Equipo y materiales.

Equipo	<ul style="list-style-type: none">• espectrofotómetro NanoDrop• transiluminador con luz ultravioleta (UVP).• termociclador (Labnet)• secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer• software CLC Main Workbench
Materiales	<ul style="list-style-type: none">• tubos de 1.5 ml y KIT QIAquick Gel Extraction
Reactivos	<ul style="list-style-type: none">• Nitrógeno líquido• Tripure (Roche)• agua libre de RNasa• gel de agarosa al 1%• bromuro de etidio• CaCl₂
Protección	<ul style="list-style-type: none">• Gabacha de tela• Mascarilla desechable• Guantes de látex

6. Información de la Plaga

La enfermedad “*hoja amarilla de la caña de azúcar*” es causada por el *Virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar (Sugarcane yellow leaf virus, SCYLV)*, miembro de la familia Luteoviridae, genero Poleovirus. Se considera una de las principales causas de origen biótico que pueden reducir sustancialmente el rendimiento de la caña de azúcar.

El síntoma más característico de SCYLV es el amarillamiento del raquis o nervadura central de la hoja por el envés y de la lámina foliar; necrosis desde el ápice de la hoja; expansión gradual del amarillamiento desde la nervadura hacia los bordes y acortamiento de los entrenudos terminales. En algunos cultivares se produce también una coloración rojiza sobre el haz de la nervadura central de las hojas y, a su vez, presentan amarillamiento en el envés. Estos síntomas no son específicos y pueden tener origen biótico y abiótico. (Barbosa Villa, 2018)

Los grados Brix en jugo de la nervadura central de hojas infectadas pueden ser de dos a tres veces más altos en plantas con síntomas que en plantas sanas. Dos patógenos están asociados a los síntomas de amarillamiento, un virus y un fitoplasma, cuyos síntomas son idénticos. El fitoplasma del amarillo de la caña de azúcar (*Sugarcane yellows phytoplasma* o SCYP) también está asociado con los síntomas similares de amarillamiento en caña de azúcar, estos incrementan su severidad en el período seco de maduración y cosecha de la caña.

El virus SCYLV posee un genoma compuesto por ARN de una sola banda de cinco a ocho Kb; y al igual que los demás virus de este grupo se encuentra limitado al floema. La

proteína de la capsida tiene una masa molecular relativa de 27 KDa y no es glicosilada. Las partículas virales son de forma circular y poseen un diámetro de 22 a 24 nm (20). Inicialmente la enfermedad estaba asociada con dos patógenos, el fitoplasma *Sugarcane yellow phytoplasma (SCYP)* y el virus *Sugarcane yellow leaf virus (SCYLV)*.

Existen varios insectos vectores que transmiten el virus SCYLV de manera no persistente, entre los cuales se encuentran el afido blanco (*Melanaphis sachari Zehnt*), el áfido del maíz (*Rhopalosiphum maidis*) y el afido blanco del arroz (*R. rufiabdominales*); conociéndose además que no es transmitido mecánicamente. (Barbosa Villa, 2018)

Información Taxonómica

Nombre común: *Virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar*

Nombre científico: *Sugarcane Yellow Leaf Virus (SCYLV)*

Taxonomía:

Familia: Luteoviridae

Género: *Polerovirus*

(Cardozo Burgos, 2017)

7. Procedimiento

Técnica molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Inversa (RT-PCR)

7.1 Preparación de la muestra.

- Deben ser colectadas muestras foliares que presenten sintomatología típica de YLS o asintomática. Deben estar envueltas en bolsas plásticas y en hielera con refrigerante térmico para su traslado.

7.2 Realización del ensayo

Purificación, cuantificación y determinación de la pureza e integridad del RNA

- Aproximadamente 200 mg de tejido foliar se pulverizan con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, el cual se deposita en tubos de 1.5 ml y homogeneizado con 500 µL de Tripure (Roche). Se siguen las recomendaciones del fabricante para la extracción del RNA total. Finalmente, el RNA obtenido fue re suspende en agua libre de RNasa (0.01% DEPC) y almacena a -70 °C. La cuantificación se realiza con un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific) utilizando 1 µL del RNA total extraído y se miden las relaciones de A260/280 y A230/280 para determinar su pureza. La integridad del RNA se corrobora mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X y visualizado con bromuro de etidio (BrEt) en un transiluminador

Control positivo y detección del SCYLV por RT-PCR

- La reacción de transcripción inversa (RT) del RNA total se realiza utilizando el kit 'Reverse Transcription System' (Promega) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Los cDNA resultantes son utilizados como molde para la amplificación por PCR con el juego de oligonucleótidos SCYLV-F/SCYLV-R descritos por Xie *et al.* (2009). El volumen final de la mezcla de reacción puede ser de 25 μ L, conteniendo 12.5 μ L de REDTaq® ReadyMix™ (SIGMA-ALDRICH), 1 μ M de cada oligonucleótido, 3 μ L de cDNA y H₂O grado molecular. La mezcla de reacción se incuba en un termociclador (Labnet) con el siguiente programa: un ciclo de 50 °C por 30 min y 94 °C por 2 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s y 72 °C por 1 min, seguido de una extensión final a 72 °C por 5 min.

La electroforesis se realiza en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1 X y son cargados 12.5 μ L de los productos de PCR, las muestras se corren con un voltaje de 120 V. Finalmente los geles se tiñen con BrEt y se visualizan en un transiluminador con luz UV (UVP) para el análisis de los resultados. Con el objetivo de contar con un control positivo para la detección del virus, el producto de PCR de 512 pb correspondiente a una muestra se purifica a partir del gel de agarosa con el kit 'QIAquick Gel Extraction' (QIAGEN).

El fragmento se clona con el sistema 'pGEM-T Easy' (Promega) y se transforma en células de *E. coli* JM109 (Promega), las cuales se hacen competentes previamente con CaCl₂ de acuerdo a Riley *et al.* (2008). La comprobación del inserto clonado en el vector se realiza mediante PCR y análisis restrictivo. La extracción de DNA plasmídico de las colonias recombinantes que se utiliza como molde para la PCR se lleva a cabo de acuerdo a Engebrecht *et al.* (2001), mientras que para la reacción de digestión se utilizan las enzimas de restricción EcoR I y Not I. (Barbosa Villa, 2018)

Secuenciación, edición y análisis de la secuencia

El DNA plasmídico del fragmento clonado en *E. coli* es secuenciado en un secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer en ambas direcciones por el método de terminación con el Big Dye (Applied Biosystems). La edición y el ensamblado de las secuencias 'forward' y 'reverse' se realiza con el programa CLC Main Workbench 7.0.3 (<https://www.qiagenbioinformatics.com>). Finalmente, se compara la similitud de las secuencias obtenidas contra las reportadas para SCYLV en la base de datos del 'National Center for Biotechnology information' (NCBI) empleando la herramienta 'Basic Local Alignment Search Tool' (BLAST). La secuencia es depositada en la base de datos del NCBI.

Análisis filogenético

Los análisis bioinformáticos se realizan con el software CLC Main Workbench versión 7.0.3. Se lleva a cabo el análisis BLAST en NCBI con la secuencia del SCYLV denominada ColMex-317 (NCBI: KT334298.1). Se seleccionan y descargan secuencias completas con los mayores porcentajes de identidad con ColMex-317 y se emplean otras más de la misma base de datos con distintos orígenes geográficos. Posteriormente se utiliza la herramienta de alineamiento múltiple de secuencias con el algoritmo MUSCLE y para la construcción del árbol filogenético se usa el método de máxima verosimilitud y UPGMA (Edgar, 2004). Se realiza un modelo de prueba para determinar el modelo de sustitución de nucleótidos más adecuado para los datos y se selecciona Kimura 80. El análisis bootstrap consistía de 1 000 réplicas y se agrega como grupo externo la región CP del PRSV (NCBI: AJ012650.1). Finalmente, el árbol filogenético se edita con el software TreeGraph 2.

Lo anterior, sugiere que la infección con el virus solamente tiene cierto grado de asociación con los síntomas de amarillamiento en campo (Fig. 1), ya que dicho síntoma es muy general para varias enfermedades de origen viral que afectan a plantas. En caña de azúcar, las deficiencias de micro y macro nutrientes, generan síntomas de amarillamiento (McCray *et al.*, 2006), los cuales podrían ser similares a los causados por el SCYLV. Además, el patrón de coloración también depende de variables como el genotipo y condiciones ambientales (Lockhart y Cronjé, 2000).



Figura 1. Síntomas del síndrome de la hoja amarilla en plantas de caña de azúcar. Se observa sintomatología característica de amarillamiento intenso en nervaduras centrales asociados al SCYLV. Tomado de: (Barbosa Villa, 2018)

Por otra parte, la detección temprana del SCYLV en híbridos de *Saccharum spp.* es posible, mediante técnicas moleculares, debido a que puede haber niveles detectables del virus en etapas asintomáticas (Viswanathan *et al.*, 2009). En este estudio los productos de RT-PCR sometidos a electroforesis en gel de agarosa que muestran la amplificación de fragmentos de ~512 pb del SCYLV son considerados como positivos al virus (Figura 2).

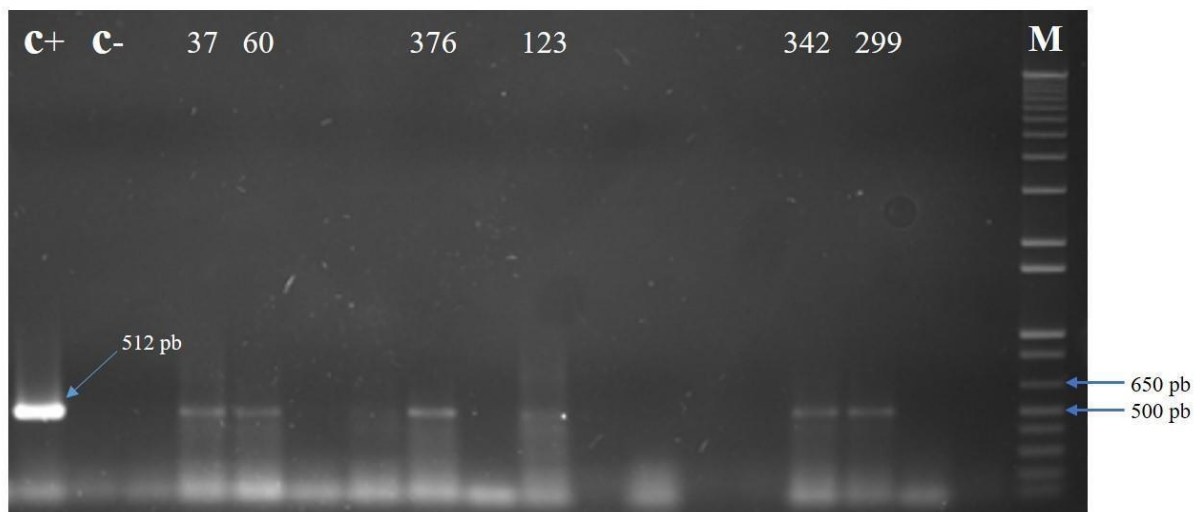


Figura 2. Detección del *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) mediante RT-PCR en muestras de caña de azúcar. C+= control positivo; C-= control negativo; M= marcador de peso molecular 1 Kb plus (Invitrogen). Los números corresponden a diferentes muestras positivas al virus. Tomado de: (Barbosa Villa, 2018)

8. Resultados

- Si el resultado es positivo se reporta como positivo
- Si el resultado es negativo se reporta como negativo

9. Control de Calidad

El control de calidad en un laboratorio, debe evaluar y documentar el desempeño de todos los aspectos de sus procedimientos. Esto incluye la calidad de la muestra, la eficiencia de los reactivos, los medios de cultivo, el funcionamiento de los diversos instrumentos o equipos y la verificación o validación de los resultados obtenidos.

9.1 Control de calidad de las muestras

Uno de los aspectos más importantes en un laboratorio es la apropiada selección, recolección y transporte de las muestras. Por lo que todo el personal relacionado con estas responsabilidades, debe comprender lo determinante que es el mantenimiento de la calidad de la muestra, en la evaluación e informe de un espécimen.

A pesar de que algunos tipos de muestras requieren metodología de recolección y transporte muy especiales, se pueden enumerar algunos aspectos generales que deben tenerse en cuenta al recolectar las muestras.

- La muestra debe ser representativa

- Al tomar una muestra, es importante evitar la contaminación con microorganismos
- Se debe recolectar un volumen apropiado de muestra para evitar los resultados falsos negativos.
- Se debe identificar cada muestra su nombre y su número de identificación.
- Se debe colocar la muestra en un recipiente adecuado para su transporte, con el fin de asegurar la sobrevivencia del posible agente infeccioso.
- Por último, se debe evitar derramar la muestra y mantener en todo momento las medidas de bioseguridad apropiadas.

9.2 Control de calidad de los medios de cultivo

- Se debe mantener un registro de cada frasco de medio de cultivo, con el nombre del producto, nombre de la casa proveedora, fecha de recibo, fecha de expiración, número de lote y fecha en que se abrió el frasco
- Cada lote preparado de medio de cultivo se debe probar antes de su uso rutinario, mediante la inoculación de microorganismos
- Las pruebas básicas de control de calidad de los medios preparados deben incluir: medición del pH, pruebas de esterilidad, capacidad de crecimiento y reacción, aspecto, dureza y profundidad del agar.

9.3 Control de Calidad de reactivos

- Un elemento fundamental en el trabajo diario del laboratorio lo constituyen los reactivos, tanto comerciales como de preparación doméstica, que son utilizados en la caracterización de microorganismos. Por ello, deben efectuarse controles diarios con las bacterias tipo y seguir estrictamente las indicaciones en cuanto a almacenamiento de los reactivos, metodología de la prueba y tiempo de lectura. Es recomendable que los reactivos comerciales sean examinados inmediatamente cuando se abre un nuevo lote o vial y llevar un registro de su funcionamiento.
- El registro de funcionamiento debe efectuarse en forma diaria o al menos cada vez que se efectúa la prueba.

9.4 Control de calidad de las tinciones

- La concentración de las soluciones de tinción, por efecto de la evaporación de los solventes o las variaciones introducidas en los métodos recomendados, pueden afectar los resultados de las tinciones para diferenciar microorganismos por su reacción a la tinción de Gram y la morfología, tintes para cápsulas, esporas, etc.
- El control de calidad de éstos tintes debe realizarse primero con cada nuevo lote, luego basta con un control semanal para mantener un grado de seguridad apropiado en su uso. Para facilitar el control de los tintes, se recomienda preparar placas con microorganismos aislados en el trabajo rutinario o cepas de la ATCC frescas, tomado en cuenta aquellos que pudieran ser más útiles según la tinción a evaluar.
- Para el control diario de la tinción de Gram, se recomienda el uso de una cepa ATCC de *Staphylococcus aureus* y de *Escherichia coli*.
- Es necesario llevar un registro de estos controles.

9.5 Control de calidad de antisueros y otros productos comerciales como kits de identificación

- Existen cada vez más productos comerciales que tienen como objetivo ayudar en el diagnóstico de agentes etiológicos de enfermedades en el menor tiempo posible, con el mayor grado de especificidad y sensibilidad. Estos antisueros deben ser probados cada vez que se recibe un nuevo lote y cada vez que se utilicen, deben de analizarse los controles positivo y negativo que vienen con cada juego de reactivos. Se deben llevar registros con la fecha de expiración del lote, casa comercial, fecha en que ingresó al laboratorio, fecha en que se abrió el juego y el registro de los controles realizados.

9.6 Control de calidad de la prueba de sensibilidad

- Se debe monitorear la precisión y exactitud del procedimiento de la prueba de susceptibilidad, el comportamiento de los reactivos utilizados en la prueba y el desempeño de las personas que llevan a cabo las pruebas y sus resultados.

- Al hacer el control de calidad de discos, tiras de E-test o métodos de sensibilidad para sistemas automatizados o semi automatizados, se recomienda utilizar cepas ATCC. Cada nuevo lote de estos insumos debe evaluarse antes de su uso rutinario y luego una vez al mes, si no existe cambio de lote en ese periodo.

9.7 Control de calidad de equipos

- Todos los instrumentos utilizados en el laboratorio deben estar respaldados por un programa de control de calidad y de mantenimiento preventivo y correctivo, basados en las instrucciones del fabricante y los procedimientos establecidos. Debe mantenerse un registro de todo lo realizado al respecto, con el nombre del instrumento, fecha, resultado y comentarios.

9.8 Supervisión del personal

- El personal es el factor más importante en la calidad del trabajo en el laboratorio. Este personal debe tener una dedicación y actitud positiva hacia el trabajo, capacidad académica, actualización constante y contar con los elementos indispensables para su labor.

9.9 Control de calidad externo

- Es recomendable que los laboratorios puedan participar en programas de evaluación externa. Estos programas miden la capacidad del laboratorio para evaluar una muestra desconocida y llegar a un resultado seguro.
- Estos controles de calidad externos pueden ser nacionales o internacionales.

10. Disposición Final de la Muestra.

- Si el resultado es positivo se incinera la muestra y los materiales utilizados se someten a autoclave para su descontaminación.
- Si el resultado es negativo se desecha en bolsas plásticas bien amarradas

11. Registros

- el nombre científico de la plaga identificada
- el código o número de referencia de la muestra (para la rastreabilidad)
- la naturaleza del material infestado incluyendo el nombre científico del hospedante
- el origen (incluida la ubicación geográfica, si se conoce) del material infestado,
- la descripción de las signos o síntomas (incluyendo las fotografías, de ser pertinentes)
- los métodos, incluyendo los controles, utilizados en el diagnóstico y los resultados
- para los métodos morfológicos o morfométricos, las medidas, los dibujos o las fotografías
- para los métodos bioquímicos y moleculares, la documentación de los resultados de la prueba tales como fotografías del gel del diagnóstico o registros de los resultados de la prueba ELISA en los cuales se basó el diagnóstico
- cuando proceda, la magnitud de cualquier infestación (la cantidad de plagas individuales encontradas y de tejido dañado)
- el nombre del laboratorio y, cuando proceda, el nombre de las personas responsables del diagnóstico y/o quienes lo realizaron
- las fechas de recolección de la muestra, y de la detección e identificación de la plaga
- cuando sea apropiado, el estado de la plaga, viva o muerta, o la viabilidad de sus etapas de desarrollo

12. Puntos de contacto para información adicional

[https://www.researchgate.net/publication/330293514 Diagnostico del virus de la hoja amarilla SCYLV Polerovirus mediante PCR en tiempo real RT-qPCR](https://www.researchgate.net/publication/330293514_Diagnostico_del_virus_de_la_hoja_amarilla_SCYLV_Polerovirus_mediante_PCR_en_tiempo_real_RT-qPCR)

13. Reconocimiento

Barbosa Villa, Cruz Jaramillo, Presencia del *sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) en caña de azúcar (*Saccharum spp.*) aislado de Colima, México, 2018.

14. Referencias

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522014000300003

FIN DEL PROCEDIMIENTO

		Protocolo de Diagnóstico de la bacteria <i>Xanthomonas albilineans</i> en Caña de azúcar	
Elaborado por:	José Jeremías Paz Carpio	Versión:	
		Revisión:	
Aprobado por:	Ing. Anakely Romero de Huevo	Fecha aprobación	Página 1 de 10

1. Propósito.

Describir la metodología aplicada para la detección y diagnóstico de *Xanthomonas albilineans* y colaborar así en la prevención de pérdidas de producción.

2. Alcance.

Identificar la morfología y estructura de la bacteria para dotar al técnico de información fiable en el proceso de detección.

3. Responsabilidades.

Actividad	Responsable
Preparación de la muestra	Técnico del Laboratorio
Ejecución del ensayo	Técnico del Laboratorio
Entrega de resultados	Técnico del Laboratorio

4. Documentos o registros.

Relación con otros documentos del SGC	Registros generados
<p>REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA</p> <ul style="list-style-type: none"> • SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). Guía de síntomas y daños de <i>Sugarcane yellow leaf virus</i>, <i>Pantoea stewartii</i>, <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i>, <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>, <i>Acidovorax avenae</i> y <i>Xanthomonas albilineans</i>. México, 2019. • Jean Heinrich Daugrois, Rosaine Bois-Noc, Patrice Champoiseau, Philippe Rott. Global Science Books, The Revisited Infection Cycle of <i>Xanthomonas</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • F.D 1.1.1. Bitácora de Trabajo de Diagnóstico Vegetal • FD 1.1.2. Hoja de Resultados de Diagnóstico Vegetal

<p><i>albilineans</i>, the Causal Agent of Leaf Scald of sugarcane. United States, 2011.</p> <ul style="list-style-type: none"> • H.Salomón García-Juárez. Campus Tabasco, Colegio de Postgraduados. Periférico Carlos A. Molina S/N. 86500, H. Cárdenas, Tabasco, México. PRESENCIA DE <i>Xanthomonas albilineans</i> (Ashby) Dowson EN CAÑA DE AZÚCAR EN LA CHONTALPA, TABASCO, MÉXICO. 2015. • TIBAYDE M. SÁNCHEZ G. UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA. DIAGNÓSTICO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>Xanthomonas albilineans</i> (ASHBY) DOWSON EN VARIEDADES COMERCIALES DE CAÑA DE AZÚCAR <i>Saccharum spp.</i>, EN VENEZUELA, 2011. 	
---	--

5. Equipo y materiales.

Equipo	<ul style="list-style-type: none"> • lector de ELISA LABSYSTEMS MULTISKAN – EX Versión 1.0. Tipo 355
Materiales	<ul style="list-style-type: none"> • gasa estéril • placa de Petri • placa de micro titulación o Elisa • Leche descremada 5% • papel absorbente • tubos de centrifuga tipo Eppendorf • Kit ELISA
Reactivos	<ul style="list-style-type: none"> • alcohol al 70% • hipoclorito al 2% • agua destilada estéril • solución buffer fosfato (PBS) • buffer carbonato bicarbonato • PBST • fosfatasa alcalina • Reacción enzima conjugado - Anti-rabbit • p-nitrofenilphosphate disodium salt • diethanolamina al 10%. • antisuero primario • antisuero secundario
Protección	<ul style="list-style-type: none"> • Gabacha de tela • Mascarilla desechable • Guantes de látex

6. Información de la plaga

La *escaldadura foliar* (Fig. 1), *LSD* (por sus siglas en inglés, *leaf scald disease*), es considerada una enfermedad de importancia potencial por las pérdidas que ocasiona en la fase aguda, estimadas entre el 90 – 100%.

La *escaldadura foliar* es causada por la bacteria *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson (Fig. 2), fue identificada en la segunda década del siglo pasado por Wilbrink en Java (Wilbrink, 1920) y North en Australia y Fiji (North, 1926).

Según la clasificación actual de los seres vivos (Woese *et al.*, 1990; Maidak *et al.*, 1999), el dominio Bacteria está dividido en 13 grupos clasificados (Madigan *et al.*, 2000), dentro de los cuales Proteobacteria, contiene un gran número de bacilos y cocos Gram negativos y engloba a la mayoría de las bacterias fitopatógenas (Córdova Luz, 2000).

El género *Xanthomonas*, comprende un grupo de bacterias fitopatógenas de gran importancia económica, y se caracteriza por presentar una sorprendente diversidad patogénica y una contrastante uniformidad fenotípica (Dye, 1962; Van den Mooter y Swings, 1990; Yang *et al.*, 1993a), lo cual ha provocado que sea objeto de múltiples estudios taxonómicos.

El daño económico de esta enfermedad en la producción azucarera va a depender mucho del nivel de susceptibilidad de la variedad afectada, así como también de las condiciones ambientales existentes en la zona y de la virulencia que presente el organismo causal (Ricaud y Ryan, 1989).

La enfermedad se ha observado con mayor severidad en variedades susceptibles sembradas en zonas con altas precipitaciones y sobre todo cuando éstas siguen de un período de sequía, en contraste con los efectos producidos en zonas de ambiente estable donde la enfermedad no reviste mayor importancia, principalmente en variedades con cierto nivel de resistencia (Ricaud, 1975).

Su diagnóstico puede ser difícil debido a que presenta estados diferentes de infección:

Fase crónica: presenta el síntoma clásico caracterizado por estrías continuas blancas y finas, bien definidas, de 1-2 mm de ancho, manifiesta una o varias estrías paralelas a lo largo de toda la hoja, algunas veces pueden llegar hasta la vaina, en ocasiones las estrías blancas pueden presentar partes con necrosis rojiza, en una misma cepa pueden presentarse tallos sanos y tallos infectados, 8 tallos maduros pueden presentar los brotes laterales con hojas cloróticas y estrías características, internamente los tallos afectados pueden presentar rayas cortas de color rojo oscuro debido a la necrosis de los haces vasculares, preferiblemente a nivel de los nudos.

Fase aguda: caracterizada por la muerte súbita de la planta sin que ésta haya presentado síntomas crónicos, en ocasiones los tallos afectados presentan pequeños brotes laterales con estrías típicas de la enfermedad, esta fase generalmente ocurre cuando la caña ha pasado por condiciones de tiempo seco seguido por un período lluvioso.

Fase latente: en este caso no se observan síntomas en el follaje que permitan sospechar la presencia de la bacteria causal en los tejidos internos, generalmente se presenta en variedades resistentes o tolerantes (Victoria, 1994; China y col., 2000; China, 2004).

Fase eclipse: ocurre al mismo tiempo que la fase de latencia; durante el crecimiento de la planta, aparecen y desaparecen líneas blancas foliares que dejan de ser visibles después de la senescencia y la muerte de las hojas más viejas, mientras que las hojas nuevas ya no presentan ningún síntoma. Así, una planta puede ser señalada enferma o sana según el momento de la inspección (Martín *et al.*, 2000).



Figura 1. Daño foliar de *X. albilineans*
Tomado de: (Plant Disease, 2017).

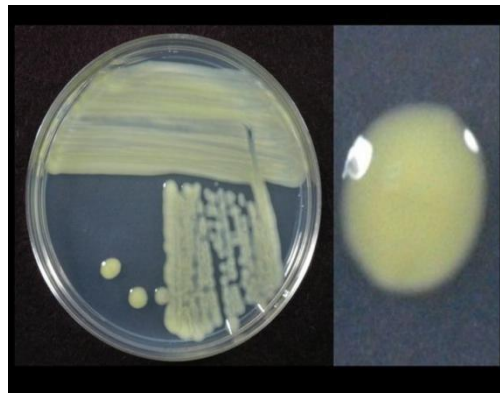


Figura 2. *X. albilineans* en caja Petri

Información Taxonómica

Nombre común: Escaldadura Foliar de la Caña de azúcar

Nombre científico: *Xanthomonas albilineans*

Taxonomía:

Dominio: Bacteria

Reino: Protista

Filo: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Xanthomonadales

Familia: Xanthomonadaceae

Género: Xanthomonas

Especie: *Xanthomonas albilineans*

(Ashby 1929, Dowson 1943)

7. Procedimiento

ELISA normal

La técnica inmunoenzimática ELISA se basa en la interacción específica de un antígeno y un anticuerpo, la reacción se visualiza a través de la acción de un conjugado enzima-anticuerpo sobre un sustrato. Se utilizan micro placas de 96 pocillos de plástico tratado para aumentar su capacidad de adsorción (fenómeno de superficie) de moléculas y con fondos de pocillo ópticamente claros para poder realizar las medidas de densidad óptica en instrumentos específicos, espectrofotómetros de lectura de placas que han recibido el nombre de lectores ELISA.

El sistema de detección emplea dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno y uno secundario marcado contra el primario; la detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpos secundarios por cada primario, pues un mismo secundario marcado y un mismo sistema enzimático permiten cuantificar una gran cantidad de antígenos.

7.1 Preparación de la muestra.

Las muestras foliares y esquejes se lavan suavemente con agua corriente. Se realizan pequeños cortes de tejido foliar del área circundante a la lesión (0.56 cm²) sobre una base de madera previamente esterilizada con alcohol al 70% y sometida a fuego. Los trocitos se desinfectan en hipoclorito al 2% durante 2 minutos y se enjuagan 3 veces en agua destilada estéril durante 1 minuto.

Luego se colocan sobre papel absorbente previamente esterilizado con la finalidad de eliminar el exceso de humedad. Finalmente 20 trocitos de área foliar se colocan en tubos de centrifuga tipo Eppendorf, agregándole a cada tubo 1,5 ml de solución buffer fosfato (PBS) y se guardan a temperatura de -20 C. Este procedimiento se realiza tanto para hojas sintomáticas como para asintomáticas.

Para la extracción de jugo se toman esquejes previamente lavados que fueron flameados, cortados en trocitos y colocados en un molino adaptado para la extracción. El jugo extraído se filtra utilizando una gasa estéril y almacenado a -20 C.

7.2 Realización del ensayo

- Macerar 0,1 g de hoja en 300 µl (dilución 1/10) de buffer carbonato bicarbonato (0,05M, pH 9,6). Centrifugar los trozos de hojas y coleccionar el jugo (Figura 3). Si se trata aislamientos bacterianos, se trabaja con cultivos puros de 72 h, cada placa de Petri se diluye con 1µl de agua destilada estéril (106 ufc/ ml) de allí se utiliza una dilución 1/10 con buffer carbonato - bicarbonato (0,05M, pH 9,6).

- Colocar 100 µl de aislamiento bacteriano, savia de las hojas maceradas o jugo de tallo centrifugado en cada una de los pozos de una placa de micro titulación o Elisa. En cada placa se colocaron controles positivos y negativos, como también blancos. Dejar incubar por 1 h a 37°C. Sensibilización.
- Adicionar a cada pozo 100 µl de PBS + Tween 0,05% + Leche descremada 5% y dejar incubando durante 30 minutos. Bloqueo.
- Después de la incubación y entre cada uno de los pasos a realizar, lavar la placa tres veces con PBS + Tween (PBST).
- Diluir el antisuero en PBST + Leche descremada 2,5% y adicionar a cada pozo 100 µl. Incubar por una hora (antisuero primario CENICAÑA dilución 1/2.000). Repetir el paso 4. Reacción antígena – anticuerpo.
- Después de la incubación con el antisuero primario (anti escaldadura), diluir el conjugado anti rabbit con fosfatasa alcalina (dilución 1/8.000) en PBST + Leche descremada 2,5% y adicionar a cada pozo 100 µl a cada pozo (antisuero secundario). Incubar por una hora. Repetir el paso 4. Reacción enzima conjugado – Anti-rabbit.
- Adicionar 100 µl a cada pozo de p-nitrofenilphosphate disodium salt (PNPP) 0,6 mg / ml en diethanolamina al 10%. Dejar incubando durante 45–60 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Reacción enzima - sustrato.
- Leer a 450 nm en el lector de ELISA LABSYSTEMS MULTISKAN – EX Versión 1.0. Tipo 355. Son positivos los pozos que presenten una coloración amarilla, valores mayores a 0,05 en el espectrofotómetro o tres veces el valor de la absorbancia de los controles negativos.

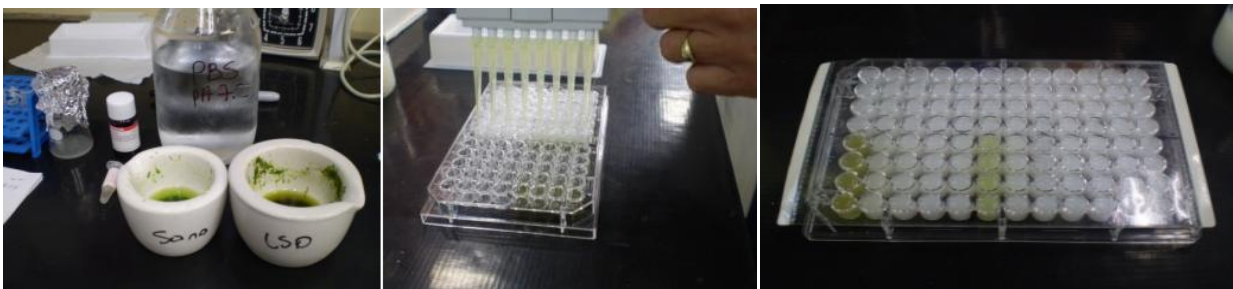


Figura 3. Elisa directa.

Tomado de: SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, México, 2019)

8. Resultados

- Si se obtiene un resultado positivo se reporta como positivo.
- Si se obtiene un resultado negativo se reporta como negativo.

9. Control de Calidad

El control de calidad en un laboratorio, debe evaluar y documentar el desempeño de todos los aspectos de sus procedimientos. Esto incluye la calidad de la muestra, la eficiencia de

los reactivos, los medios de cultivo, el funcionamiento de los diversos instrumentos o equipos y la verificación o validación de los resultados obtenidos.

9.1 Control de calidad de las muestras

Uno de los aspectos más importantes en un laboratorio es la apropiada selección, recolección y transporte de las muestras. Por lo que todo el personal relacionado con estas responsabilidades, debe comprender lo determinante que es el mantenimiento de la calidad de la muestra, en la evaluación e informe de un espécimen.

A pesar de que algunos tipos de muestras requieren metodología de recolección y transporte muy especiales, se pueden enumerar algunos aspectos generales que deben tenerse en cuenta al recolectar las muestras.

- La muestra debe ser representativa
- Al tomar una muestra, es importante evitar la contaminación con microorganismos
- Se debe recolectar un volumen apropiado de muestra para evitar los resultados falsos negativos.
- Se debe identificar cada muestra su nombre y su número de identificación.
- Se debe colocar la muestra en un recipiente adecuado para su transporte, con el fin de asegurar la sobrevivencia del posible agente infeccioso.
- Por último, se debe evitar derramar la muestra y mantener en todo momento las medidas de bioseguridad apropiadas.

9.2 Control de calidad de los medios de cultivo

- Se debe mantener un registro de cada frasco de medio de cultivo, con el nombre del producto, nombre de la casa proveedora, fecha de recibo, fecha de expiración, número de lote y fecha en que se abrió el frasco
- Cada lote preparado de medio de cultivo se debe probar antes de su uso rutinario, mediante la inoculación de microorganismos
- Las pruebas básicas de control de calidad de los medios preparados deben incluir: medición del pH, pruebas de esterilidad, capacidad de crecimiento y reacción, aspecto, dureza y profundidad del agar.

9.3 Control de Calidad de reactivos

- Un elemento fundamental en el trabajo diario del laboratorio lo constituyen los reactivos, tanto comerciales como de preparación doméstica, que son utilizados en la caracterización de microorganismos. Por ello, deben efectuarse controles diarios con las bacterias tipo y seguir estrictamente las indicaciones en cuanto a almacenamiento de los reactivos, metodología de la prueba y tiempo de lectura. Es recomendable que los reactivos comerciales sean examinados inmediatamente cuando se abre un nuevo lote o vial y llevar un registro de su funcionamiento.
- El registro de funcionamiento debe efectuarse en forma diaria o al menos cada vez que se efectúa la prueba.

9.4 Control de calidad de las tinciones

- La concentración de las soluciones de tinción, por efecto de la evaporación de los solventes o las variaciones introducidas en los métodos recomendados, pueden afectar los resultados de las tinciones para diferenciar microorganismos por su reacción a la tinción de Gram y la morfología, tintes para cápsulas, esporas, etc.
- El control de calidad de éstos tintes debe realizarse primero con cada nuevo lote, luego basta con un control semanal para mantener un grado de seguridad apropiado en su uso. Para facilitar el control de los tintes, se recomienda preparar placas con microorganismos aislados en el trabajo rutinario o cepas de la ATCC frescas, tomado en cuenta aquellos que pudieran ser más útiles según la tinción a evaluar.
- Es necesario llevar un registro de estos controles.

9.5 Control de calidad de antisueros y otros productos comerciales como kits de identificación

- Existen cada vez más productos comerciales que tienen como objetivo ayudar en el diagnóstico de agentes etiológicos de enfermedades en el menor tiempo posible, con el mayor grado de especificidad y sensibilidad. Estos antisueros deben ser probados cada vez que se recibe un nuevo lote y cada vez que se utilicen, deben de analizarse los controles positivo y negativo que vienen con cada juego de reactivos. Se deben llevar registros con la fecha de expiración del lote, casa comercial, fecha en que ingresó al laboratorio, fecha en que se abrió el juego y el registro de los controles realizados

9.6 Control de calidad de la prueba de sensibilidad

- Se debe monitorear la precisión y exactitud del procedimiento de la prueba de susceptibilidad, el comportamiento de los reactivos utilizados en la prueba y el desempeño de las personas que llevan a cabo las pruebas y sus resultados.
- Al hacer el control de calidad de discos, tiras de E-test o métodos de sensibilidad para sistemas automatizados o semi automatizados, se recomienda utilizar cepas ATCC. Cada nuevo lote de estos insumos debe evaluarse antes de su uso rutinario y luego una vez al mes, si no existe cambio de lote en ese periodo.

9.7 Control de calidad de equipos

- Todos los instrumentos utilizados en el laboratorio deben estar respaldados por un programa de control de calidad y de mantenimiento preventivo y correctivo, basados en las instrucciones del fabricante y los procedimientos establecidos. Debe mantenerse un registro de todo lo realizado al respecto, con el nombre del instrumento, fecha, resultado y comentarios.

9.8 Supervisión del personal

- El personal es el factor más importante en la calidad del trabajo en el laboratorio. Este personal debe tener una dedicación y actitud positiva hacia el trabajo, capacidad académica, actualización constante y contar con los elementos indispensables para su labor.

9.9 Control de calidad externo

- Es recomendable que los laboratorios puedan participar en programas de evaluación externa. Estos programas miden la capacidad del laboratorio para evaluar una muestra desconocida y llegar a un resultado seguro.
- Pruebas interlaboratoriales
- Estos controles de calidad externos pueden ser nacionales o internacionales.

10. Disposición Final de la Muestra.

- Si el resultado obtenido es positivo o negativo la muestra se incinera en su totalidad.

11. Registros

- el nombre científico de la plaga identificada
- el código o número de referencia de la muestra (para la rastreabilidad)
- la naturaleza del material infestado incluyendo el nombre científico del hospedante
- el origen (incluida la ubicación geográfica, si se conoce) del material infestado,
- la descripción de las signos o síntomas (incluyendo las fotografías, de ser pertinentes)
- los métodos, incluyendo los controles, utilizados en el diagnóstico y los resultados
- para los métodos morfológicos o morfométricos, las medidas, los dibujos o las fotografías
- para los métodos bioquímicos y moleculares, la documentación de los resultados de la prueba tales como fotografías del gel del diagnóstico o registros de los resultados de la prueba ELISA en los cuales se basó el diagnóstico
- cuando proceda, la magnitud de cualquier infestación (la cantidad de plagas individuales encontradas y de tejido dañado)
- el nombre del laboratorio y, cuando proceda, el nombre de las personas responsables del diagnóstico y/o quienes lo realizaron
- las fechas de recolección de la muestra, y de la detección e identificación de la plaga
- cuando sea apropiado, el estado de la plaga, viva o muerta, o la viabilidad de sus etapas de desarrollo

12. Puntos de contacto para información adicional

https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2011000100003

13. Reconocimiento

SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria).
Guía de síntomas y daños de *Sugarcane yellow leaf virus*, *Pantoea stewartii*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vasculorum*, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, *Acidovorax avenae* y *Xanthomonas albilineans*. México, 2019.

14. Referencias

H.Salomón García-Juárez. Campus Tabasco, Colegio de Postgraduados. Periférico Carlos A. Molina S/N. 86500, H. Cárdenas, Tabasco, México

FIN DEL PROCEDIMIENTO

		Protocolo de Diagnóstico de la Bacteria <i>Acidovorax avenae</i> en Caña de azúcar	
Elaborado por:	José Jeremías Paz Carpio	Versión:	
		Revisión:	
Aprobado por:	Ing. Anakely Romero de Huevo	Fecha aprobación	Página 1 de 11

1. Propósito

Describir la metodología aplicada para la detección y diagnóstico de la bacteria *Acidovorax avenae* y prevenir afectaciones en cosecha al productor.

2. Alcance

Identificar la morfología y estructura de la bacteria para dotar al técnico de información fiable en el proceso de detección.

3. Responsabilidades.

Actividad	Responsable
Preparación de la muestra	Técnico del Laboratorio
Ejecución del ensayo	Técnico del Laboratorio
Entrega de resultados	Técnico del Laboratorio

4. Documentos o registros.

Relación con otros documentos del SGC	Registros generados
<ul style="list-style-type: none"> • <p>REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA</p> <ul style="list-style-type: none"> • SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). Guía de síntomas y daños de <i>Sugarcane yellow leaf virus</i>, <i>Pantoea stewartii</i>, <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i>, <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>, <i>Acidovorax avenae</i> y 	<ul style="list-style-type: none"> • F.D 1.1.1. Bitácora de Trabajo de Diagnóstico Vegetal • FD 1.1.2. Hoja de Resultados de Diagnóstico Vegetal

<p><i>Xanthomonas albilineans</i>. México, 2019.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fontana, P. Universidad Nacional de Tucumán, Argentina. Caracterización de <i>Acidovorax avenae</i> en el agro ecosistema caña de azúcar Estudios moleculares y análisis de secuencias relacionadas con la respuesta a estría roja en genotipos diferenciales. 2018. • Fontana, P. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. ESTRÍA ROJA EN CAÑA DE AZÚCAR CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS MOLECULAR DEL AGENTE ETIOLÓGICO. 2010. 	
--	--

5. Equipo y materiales.

Equipo	<ul style="list-style-type: none"> • heladera • peachímetro Altronix modelo TPX I • microscopio estereoscópico • cámara de flujo laminar
Materiales	<ul style="list-style-type: none"> • tubos estériles tipo Eppendorf • Placas Petri • Viales • kit de Britania • portaobjeto • discos de papel reactivo de Britania • tubos de ensayo • palillo estéril <p style="text-align: right;">Medios de cultivo</p> <ul style="list-style-type: none"> -Agar nutritivo -YDC -LB
Reactivos	<ul style="list-style-type: none"> • alcohol 70% • agua estéril • NaOH glicerol estéril • aceite de inmersión. • caldo LB • medio agar nutritivo semisólido
Protección	<ul style="list-style-type: none"> • Gabacha de tela • Mascarilla desechable
	<ul style="list-style-type: none"> • Gorro desechable • Guantes de látex

La estría roja es una enfermedad bacteriana de la caña de azúcar cuyo agente causal es *Acidovorax avenae* (Manns, 1909; Willems *et al.*, 1992; Schaad *et al.*, 2008). Es una bacteria de origen asiático distribuida en las principales regiones cañeras del mundo. La estría roja fue reportada por primera vez en 1922 por Lyon, en Hawái, como una enfermedad de las hojas de caña de azúcar conocida también como “podredumbre del cogollo o del brote terminal” (Edgerton, 1959). Sus síntomas, como estrías rojas finas con longitud de cinco a 60 cm de largo o pudrición del ápice de la planta, pueden evidenciarse juntos o aislados (Rott y Davis, 2000). En las hojas, los primeros síntomas son estrías acuosas que gradualmente toman la coloración rojiza (Fig. 1 y 2). En las lesiones nuevas es común observar exudados de la bacteria. Posteriormente los síntomas se extienden hacia el meristemo apical (Fig. 3 y 4) que se vuelve húmedo como consecuencia de la muerte de los tejidos, causando podredumbre del brote. En condiciones, favorables, la podredumbre del brote se extiende por todo el tallo causando grietas por donde escurre líquido de olor intenso (Fig. 5). Esta podredumbre puede alcanzar los nudos basales en variedades altamente susceptibles. Cañaverales así afectados generan un olor característico perceptible a varios metros de distancia (Maccheroni y Matsuoka, 2006).



Figura 1. Rayas de longitud variable **Figura 2.** Rayas unidas de color rojo intenso, síntoma típico. formando banda ancha

Tomado de: Fontana, P. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. ESTRÍA ROJA EN CAÑA DE AZÚCAR CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS MOLECULAR DEL AGENTE ETIOLÓGICO. 2010.



Fig. 3. Cogollos muertos

Fig. 4 Corte longitudinal de Cogollo muerto

Fig. 5. Pudrición que avanza a la base del tallo.

Tomado de: Fontana, P. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. ESTRÍA ROJA EN CAÑA DE AZÚCAR CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS MOLECULAR DEL AGENTE ETIOLÓGICO. 2010

Acidovorax avenae presenta células de 0,6-0,8 x 1,5-1,9 µm, es Gram-negativo, móvil y posee un flagelo polar. Las colonias son circulares, translúcidas, de coloración blanco-crema, convexas y aplanadas. La infección entre plantas se realiza por salpicaduras de lluvia y viento, y es favorecida por pequeñas heridas producidas por el roce entre las hojas. La diseminación a largas distancias es realizada por el viento que desprende y transporta pequeñas plaquetas de exudados bacterianos adheridas a las hojas. El inóculo sobrevive entre un ciclo y otro de cultivo en plantas “guachas”, en restos de hojas adheridos a las yemas (caña semilla), y en menor medida en hospederos alternativos que no cumplen un rol importante en la trasmisión (Grisham y Johnson 2015). Cabe mencionar que la trasmisión no se produce por semilla (caña semilla) ya que no es una enfermedad sistémica (Rott y Davis 2000).

Información taxonómica

Nombre común: Estría roja de la caña de azúcar.

Nombre científico: *Acidovorax avenae*

Taxonomía:

Dominio: Bacteria

Filo: Pseudomonadota

Clase: Betaproteobacteria

Orden: Burkholderiales

Familia: Comamonadaceae

Género: *Acidovorax*

Especie: *Acidovorax avenae*

(Manns 1990) Willems *et al*, 1992

7. Procedimiento

Aislamiento y caracterización de *Acidovorax avenae*

7.1 Preparación de la muestra.

- La muestra deben ser hojas de caña que exhiban síntomas típicos de estría roja.
- Las muestras se acondicionan en bolsas plásticas tipo “ziploc” con papel absorbente, para su conservación hasta el momento de su procesamiento. Se fraccionan hojas en sobres de papel para ser refrigerados entre 4 a 7º C para su uso inmediato y por otro lado se coloca otra porción a -20º C para su conservación a largo plazo. También se desecan hojas con la finalidad de confeccionar una exsicata.

7.2 Realización del ensayo

- El material de partida son hojas refrigeradas mantenidas por no más de 15 días en heladera entre 4 y 7°C. Este material debe ser seccionado en pequeños trozos y desinfectado mediante dos tratamientos de 1 min con alcohol 70% y un lavado de 1 min con agua estéril. A continuación, el material (aproximadamente 0,5 g) se macera manualmente en tubos estériles tipo Eppendorf utilizando como diluyentes distintas soluciones estériles. El sobrenadante obtenido se utiliza como primera dilución y a partir de éste se realiza sucesivas diluciones decimales para realizar los plaques sobre diferentes medios de cultivos (Cuadro 1), los que son incubados a 30°C durante 48-72h.
- Se realizan observaciones cada 24 h para evaluar el desarrollo de colonias. A partir de esos cultivos en placas se hacen sucesivos repiques al medio líquido (Cuadro 4) y nuevos plaques hasta obtener las colonias individuales y puras para su conservación y posterior identificación mediante pruebas preliminares. Algunos de los medios que se emplean, como así también las soluciones diluyentes y las condiciones de cultivo, se describen a continuación.

Medios de cultivo, Componentes, esterilización y determinación de pH.

Los componentes en gramos (g) para preparar 1 litro (L) de cada uno de los medios de cultivo se muestran en el Cuadro 1 y se describen a continuación. Salvo indicaciones especiales, todos son esterilizados en autoclave durante 20 minutos (min) a 121°C. El pH de los medios es ajustado adicionando NaOH 10 M. Las medidas de pH se efectúan con un peachímetro Altronix modelo TPX I.

1-Solución Fisiológica. Se utiliza para la homogeneización y preparación de diluciones en la mayoría de los aislamientos. 9,0 g de NaCl disueltos en 1 L de agua destilada, ajustar el pH en $7,0 \pm 0,2$.

2-Agar nutritivo. Medio de uso general. Es el medio más empleado por su simplicidad y fácil composición reflejada en Cuadro 2.

Cuadro 1. Componentes de medio de cultivo

Componentes	g/L
Peptona	5.0
Extracto de carne	3.0
NaCl	3.0
Agar	17.0
Agua csp	1 L
	pH: 7.0

3-Agar extracto de levadura-dextrosa-carbonato de calcio (YDC). Medio diferencial.

Cuadro 2. Componentes de medio Agar nutritivo

Componentes	g/L
Extracto de levadura	10.0
Glucosa	20.0
Carbonato de calcio	20.0
Agar	15.0
Agua csp	1 L
	pH: 6,9± 0,2

4-Caldo LB (del inglés Lysogeny Borth ex Luria Bertani). Este medio se utiliza para el crecimiento de la bacteria en condiciones de aerobiosis, en los repiques entre plaqueos y también para su conservación y obtención de cultivos de células puras y sus componentes se reflejan en Cuadro 3.

Cuadro 3. Componentes del caldo LB

Componentes	g/L
Extracto de levadura	5.0
Trypteina	10.0
NaCl	7.5
Agua csp	1 L
	pH: 7,4± 0,2

En la Cuadro 4 se detallan los diferentes medios de cultivo, general y diferencial con las respectivas condiciones de incubación.

Cuadro 4. Medios de cultivos generales y semiselectivos para el aislamiento de *Acidovorax avenae*.

Medio de cultivo	Condiciones de incubación
Agar nutritivo	48 h a 37 C
YDC	48 h a 30 C
LB	48 h a 30 C / aerobiosis con agitación

Conservación de las cepas

Los cultivos puros obtenidos a partir de los medios de cultivo indicados fueron crecidos en el medio líquido LB. Esto se realizó a 30°C y con agitación permanente para crear condiciones aeróbicas ya que se trata de un organismo que tiene un metabolismo aerobio

estricto. Un cultivo de 16 h aprox., se reparte en viales, recuperándose las células por centrifugación y re suspendiéndolas en medio fresco con 20% de glicerol estéril (agente crio protector). Las mismas se almacenan a -80°C hasta la identificación y caracterización fenotípica y genotípica de cada aislamiento. Asimismo, se emplea un método de conservación alternativo para el uso a corto plazo que consiste en re suspender las células el medio LB semisólido (0,7% agar) y mantener los mismo a temperatura ambiente.

Pruebas fenotípicas para la identificación de los aislamientos

Las colonias aisladas (entre 10 y 15 por placa) son caracterizadas en forma preliminar mediante las siguientes técnicas microbiológicas clásicas:

-Observación microscópica (en fresco): para la determinación de la morfología de las células bacterianas a partir de un cultivo en medio líquido, se emplea un aumento 100X en aceite de inmersión.

-Tinción de Gram: se utiliza el kit de Britania para tinción de la pared celular. A partir de un cultivo de células de 24 h en caldo LB, se coloca sobre portaobjeto 100 µL de la suspensión, se deja secar en cámara de flujo laminar y se procede de acuerdo a las instrucciones provistas por el fabricante.

-Actividad oxidasa: se emplean discos de papel reactivo de Britania. En este caso también se emplea un cultivo de células como en el punto anterior. El cambio de coloración (gris o rosado) en el disco en contacto con las células bacterianas, indica si la reacción es negativa o positiva, respectivamente.

-Pruebas de movilidad: se realiza en tubos de ensayo con medio agar nutritivo semisólido (0,7% agar), se siembra el inóculo con palillo estéril en el fondo del tubo, se incuba a 37 °C y se observa el crecimiento a las 48 h. El crecimiento más allá de la línea de punción indica que se trata de células móviles.

8. Resultados

- Si se obtiene un resultado positivo se reporta como positivo.
- Si se obtiene un resultado negativo se reporta como negativo

9. Control de calidad

El control de calidad en un laboratorio, debe evaluar y documentar el desempeño de todos los aspectos de sus procedimientos. Esto incluye la calidad de la muestra, la eficiencia de los reactivos, los medios de cultivo, el funcionamiento de los diversos instrumentos o equipos y la verificación o validación de los resultados obtenidos.

9.1 Control de calidad de las muestras

Uno de los aspectos más importantes en un laboratorio es la apropiada selección, recolección y transporte de las muestras. Por lo que todo el personal relacionado con estas responsabilidades, debe comprender lo determinante que es el mantenimiento de la calidad de la muestra, en la evaluación e informe de un espécimen.

A pesar de que algunos tipos de muestras requieren metodología de recolección y transporte muy especiales, se pueden enumerar algunos aspectos generales que deben tenerse en cuenta al recolectar las muestras.

- La muestra debe ser representativa
- Al tomar una muestra, es importante evitar la contaminación con microorganismos
- Se debe recolectar un volumen apropiado de muestra para evitar los resultados falsos negativos.
- Se debe identificar cada muestra su nombre y su número de identificación.
- Se debe colocar la muestra en un recipiente adecuado para su transporte, con el fin de asegurar la sobrevivencia del posible agente infeccioso.
- Por último, se debe evitar derramar la muestra y mantener en todo momento las medidas de bioseguridad apropiadas.

9.2 Control de calidad de los medios de cultivo

- Se debe mantener un registro de cada frasco de medio de cultivo, con el nombre del producto, nombre de la casa proveedora, fecha de recibo, fecha de expiración, número de lote y fecha en que se abrió el frasco
- Cada lote preparado de medio de cultivo se debe probar antes de su uso rutinario, mediante la inoculación de microorganismos
- Las pruebas básicas de control de calidad de los medios preparados deben incluir: medición del pH, pruebas de esterilidad, capacidad de crecimiento y reacción, aspecto, dureza y profundidad del agar.

9.3 Control de Calidad de reactivos

- Un elemento fundamental en el trabajo diario del laboratorio lo constituyen los reactivos, tanto comerciales como de preparación doméstica, que son utilizados en la caracterización de microorganismos.

Por ello, deben efectuarse controles diarios con las bacterias tipo y seguir estrictamente las indicaciones en cuanto a almacenamiento de los reactivos, metodología de la prueba y tiempo de lectura. Es recomendable que los reactivos comerciales sean examinados inmediatamente cuando se abre un nuevo lote o vial y llevar un registro de su funcionamiento.

- El registro de funcionamiento debe efectuarse en forma diaria o al menos cada vez que se efectúa la prueba.

9.4 Control de calidad de las tinciones

- La concentración de las soluciones de tinción, por efecto de la evaporación de los solventes o las variaciones introducidas en los métodos recomendados, pueden afectar los resultados de las tinciones para diferenciar microorganismos por su reacción a la tinción de Gram y la morfología, tintes para cápsulas, esporas, etc.
- El control de calidad de éstos tintes debe realizarse primero con cada nuevo lote, luego basta con un control semanal para mantener un grado de seguridad apropiado en su uso. Para facilitar el control de los tintes, se recomienda preparar placas con microorganismos aislados en el trabajo rutinario o cepas de la ATCC frescas, tomado en cuenta aquellos que pudieran ser más útiles según la tinción a evaluar.
- Para el control diario de la tinción de Gram, se recomienda el uso de una cepa ATCC de *Staphylococcus aureus* y de *Escherichia coli*.
- Es necesario llevar un registro de estos controles.

9.5 Control de calidad de antisueros y otros productos comerciales como kits de identificación

Existen cada vez más productos comerciales que tienen como objetivo ayudar en el diagnóstico de agentes etiológicos de enfermedades en el menor tiempo posible, con el mayor grado de especificidad y sensibilidad. Estos antisueros deben ser probados cada vez que se recibe un nuevo lote y cada vez que se utilicen, deben de analizarse los controles positivo y negativo que vienen con cada juego de reactivos. Se deben llevar registros con la fecha de expiración del lote, casa comercial, fecha en que ingresó al laboratorio, fecha en que se abrió el juego y el registro de los controles realizados.

9.6 Control de calidad de la prueba de sensibilidad

- Se debe monitorear la precisión y exactitud del procedimiento de la prueba de susceptibilidad, el comportamiento de los reactivos utilizados en la prueba y el desempeño de las personas que llevan a cabo las pruebas y sus resultados.
- Al hacer el control de calidad de discos, tiras de E-test o métodos de sensibilidad para sistemas automatizados o semi automatizados, se recomienda utilizar cepas ATCC. Cada nuevo lote de estos insumos debe evaluarse antes de su uso rutinario y luego una vez al mes, si no existe cambio de lote en ese periodo.

9.7 Control de calidad de equipos

- Todos los instrumentos utilizados en el laboratorio deben estar respaldados por un programa de control de calidad y de mantenimiento preventivo y correctivo, basados en las instrucciones del fabricante y los procedimientos establecidos. Debe mantenerse un registro de todo lo realizado al respecto, con el nombre del instrumento, fecha, resultado y comentarios.

9.8 Supervisión del personal

- El personal es el factor más importante en la calidad del trabajo en el laboratorio. Este personal debe tener una dedicación y actitud positiva hacia el trabajo, capacidad académica, actualización constante y contar con los elementos indispensables para su labor.

9.9 Control de calidad externo

- Es recomendable que los laboratorios puedan participar en programas de evaluación externa. Estos programas miden la capacidad del laboratorio para evaluar una muestra desconocida y llegar a un resultado seguro.
- Estos controles de calidad externos pueden ser nacionales o internacionales.

10. **Disposición Final de la Muestra.**

- Si el resultado obtenido es positivo la muestra se incinera en su totalidad.
- Si el resultado obtenido es negativo la muestra se introduce en bolsa bien amarrada y se desecha

11. Registros

- el nombre científico de la plaga identificada
- el código o número de referencia de la muestra (para la rastreabilidad)
- la naturaleza del material infestado incluyendo el nombre científico del hospedante
- el origen (incluida la ubicación geográfica, si se conoce) del material infestado,
- la descripción de las signos o síntomas (incluyendo las fotografías, de ser pertinentes)
- los métodos, incluyendo los controles, utilizados en el diagnóstico y los resultados
- para los métodos morfológicos o morfométricos, las medidas, los dibujos o las fotografías
- para los métodos bioquímicos y moleculares, la documentación de los resultados de la prueba tales como fotografías del gel del diagnóstico o registros de los resultados de la prueba ELISA en los cuales se basó el diagnóstico
- cuando proceda, la magnitud de cualquier infestación (la cantidad de plagas individuales encontradas y de tejido dañado)
- el nombre del laboratorio y, cuando proceda, el nombre de las personas responsables del diagnóstico y/o quienes lo realizaron
- las fechas de recolección de la muestra, y de la detección e identificación de la plaga
- cuando sea apropiado, el estado de la plaga, viva o muerta, o la viabilidad de sus etapas de desarrollo

12. Puntos de contacto para información adicional

<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-11-17-1842-PDN>

13. Reconocimiento

SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria).

Guía de síntomas y daños de *Sugarcane yellow leaf virus*, *Pantoea stewartii*,

Xanthomonas axonopodis pv. *vasculorum*, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, *Acidovorax avenae*

14. Referencias

Fontana, P. Universidad Nacional de Tucumán, Argentina. Caracterización de *Acidovorax avenae* en el agro ecosistema caña de azúcar Estudios moleculares y análisis de secuencias relacionadas con la respuesta a estría roja en genotipos diferenciales. 2018.

FIN DEL PROCEDIMIENTO

7. Conclusiones

- La correcta búsqueda y hallazgo de información fiable beneficio la identificación de las plagas a estudiar para redactar protocolos coherentes según el cultivo en estudio.
- La definición de ácaros, bacterias, hongos, insectos y virus específicos a investigar fue clave para enfocar la búsqueda de pasos de detección e identificación.
- La Dirección de Sanidad Vegetal cuenta ahora con 10 Protocolos De Diagnóstico nuevos que serán de utilidad a los técnicos analistas en el momento oportuno.

8. Recomendaciones

- Se recomienda al personal del Laboratorio de Diagnóstico Vegetal continuar con la Redacción de más Protocolos que sean necesarios, pues su contribución a la correcta identificación de plagas es importante.
- Se recomienda asegurar la disposición en la posibilidad existente de los equipos, reactivos, y materiales necesarios para los analistas de Laboratorio en su correcta labor de identificación de plagas.
- Se recomienda la capacitación continua del personal en los tipos de realizaciones de ensayos redactados para su fortalecimiento técnico y adquisición de conocimientos actualizados.

Se recomienda incluir en cada Protocolo que el Laboratorio posee un apartado sobre las disposiciones de un plan del muestreo en campo para su buena conservación durante el transporte al Laboratorio.

9. Bibliografía

1.	Alcántara Veliz, Corina Dora. Ciclo biológico de <i>Carmenta foraseminis</i> Eichlin, en <i>Theobroma cacao</i> -en la zona de Satipo, Perú, 2013.
2.	Ana M ^a Aguado Martínez, Sonsoles Áernández-Cavada Labat, Miguel Cambra Álvarez, Fernando Escriu Paradell, M ^a Sol Luis Artiaga. Centro de Sanidad y Certificación Vegetal. El virus del mosaico del tomate, Tomato mosaic virus (<i>ToMV</i>). Zaragoza, España, 2014.
3.	Asinari, F. Universidad Nacional de Rio Cuarto, Argentina. Enfermedad del amarillamiento en cañaverales del noroeste Argentino: Distribución, efecto en el rendimiento y genotipos virales de <i>Sugarcane yellow leaf virus</i> , 2019.
4.	Bermúdez-Guzmán, Manuel de Jesús; Delgado-Virgen, Francisco Javier; Cervantes-Preciado, Jeovani Francisco; García-Preciado, José Concepción; Fariás-Cervantes, Vania Sbeyde Detección del Sugarcane mosaic virus (<i>SCMV</i>) en <i>Saccharum spp.</i> en México y origen filogenético de un aislado de Jalisco Revista mexicana de fitopatología, vol. 36, núm. 1, 2018, enero-abril, pp. 16-34. Sociedad Mexicana de Fitopatología A.C.
5.	Carrera González, Abigail. Tecnológico Nacional de México. Identificación y Daños del Acaro del Bronceado del Tomate (<i>Aculops lycopersici</i>) en condiciones de Invernadero. Oaxaca, México, 2018.
6.	Claudio Salas, Carlos Quiroz, Javier Puelles. INIA (Instituto de Investigaciones Agropecuarias). Ficha Técnica, Eriofido del tomate, <i>Aculops lycopersici</i> (Tryon). Chile, 2016.
7.	Cubillos, Gabriel. Compañía Nacional de Chocolates S.A.S. Manual del perforador de la mazorca del Cacao <i>Carmenta foraseminis</i> (Busck) Eichlin. Medellín, Colombia, 2013.
8.	Delgado Puchi, Nereida. Instituto de Zoología Agrícola, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Caracterización morfológica de los Sesiidae (Insecta: Lepidoptera) perforadores del fruto del cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.), presentes en la región costera del estado Aragua, Venezuela. 2005.
9.	Fontana, P. Universidad Nacional de Tucumán, Argentina. Caracterización de <i>Acidovorax avenae</i> en el agro ecosistema caña de azúcar Estudios moleculares y análisis de secuencias relacionadas con la respuesta a estría roja en genotipos diferenciales. 2018.
10.	Fontana, P. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Estría roja en Caña de azúcar caracterización y análisis molecular del agente etiológico, 2010

11.	Gamboa, J., Serna, F. y Morales, I. (2020). Estado actual del conocimiento taxonómico del género <i>Monalonion</i> Herrich-Schaeffer, 1850 (Hemiptera: Heteroptera: Miridae: Bryocorinae: Monaloniini). Bol. Cient. MusHist. Nat. U. de Caldas, 24 (2): 144-168, Colombia, 2020.
12.	H. Salomón García-Juárez. Campus Tabasco, Colegio de Postgraduados. Periférico Carlos A. Molina S/N. 86500, H. Cárdenas, Tabasco, México. Presencia de <i>Xanthomonas albilineans</i> (Ashby) Dowson en caña de Azúcar en la Chontalpa, Tabasco, México. 2015.
13.	Huerta, Maximiliano. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Aislamiento e Identificación de Hongos Secundarios al Acaro (<i>Aculops lycopersici</i>) en Tomate. Coahuila, México, 2017.
14.	Izquierdo, Josep. Bayer CropScience. Problemática del acaro del bronceado del tomate (<i>Aculops lycopersici</i>) y su gestión integrada. España, 2019
15.	JeanHenrich Daugrois, Rosaine Boiss-Noc, Patrice Champoiseau, Philippe Rott. Global Science Books, The Revisited Infection Cycle of <i>Xanthomonas albilineans</i> , the Causal Agent of Leaf Scald of sugarcane. United States, 2011.
16.	Jiménez Robledo, Luz Amalia. Ciclo biológico de <i>Carmenta foraseminis</i> (Busck) (Lepidoptera: Sesiidae), en condiciones de laboratorio. Tarapoto, Perú, 2019.
17.	Jordá, C., Vicente, E., Alfaro, A. (1979). La “goma” del tomate, un grave problema del fruto. INIA, 295-301. Chile, 2010
18.	María Inés Barbosa Villa, José Luis Cruz Jaramillo. Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Zamora. Carretera Zamora-La Piedad km 7, Zamora, Michoacán, México. Presencia del sugarcane yellow leaf virus (SCYLV) en caña de azúcar (<i>Saccharum spp.</i>) aislado de Colima, México. 2018.
19.	María P. Filippone*, María F. Perera*, Mariela Salgado*, María G. García*, Gabriel R. Vellisce* y Atilio P. Castagnaro. Diagnóstico molecular de enfermedades sistémicas de la caña de azúcar en la Argentina: ajuste metodológico y aplicaciones, Tucumán, Argentina, 2010.
20.	Molina, Luis; Victoriano Sut Biotecnólogo, Técnico en Biotecnología, Fito patólogo CENGICAÑA. Aplicación de la biotecnología para el diagnóstico y eliminación de patógenos en variedades introducidas de caña de azúcar. 2017-2018, Guatemala, 2018.
21.	Moran-Rosillo, J. L.; Castillo. Carrillo, P. S. 2020. El barrenador del fruto y tallo del cacao (<i>Carmenta theobromae</i> , Lepidoptera: Sesiidae) en el valle de Zarumilla, Tumbes, Perú. Revista Colombiana de Entomología 46, Colombia, 2020.

22.	Ortiz Delgado, Dayanna. Ramírez Suarez, Ahyme María. Estandarización de un método rápido de detección del Virus del mosaico del tomate (<i>ToMV</i>) mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR). México, 2019.
23.	Osmany de la C. Aday Díazl, María de la Luz La O-Hechavarríall. Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Distribución del Virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar en Cuba.2017
24.	Ovalle, Werner. Cengicaña. Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación. De la Caña de Azúcar. Guía para la identificación de enfermedades de la caña de azúcar. Guatemala, 2018.
25.	Riera Ruiz, Carlos Antonio. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Contribución al conocimiento de plagas del cacao: Situación actual y mecanismos de Antixenosis sobre <i>Monalonion dissimulatum</i> Distant, Guayaquil, Ecuador, 2012.
26.	SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). Guía de síntomas y daños de <i>Sugarcane yellow leaf virus</i> , <i>Pantoea stewartii</i> , <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i> , <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> , <i>Acidovorax avenae</i> y <i>Xanthomonas albilineans</i> . México, 2019.
27.	SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria) Dirección General de Sanidad Vegetal, Área de Diagnóstico Fitosanitario, Laboratorio de Micología. Protocolo de Diagnóstico: <i>Hemileia vastatrix</i> (Roya del cafeto), Tecámac, Estado de México, 2018.
28.	Serrano Cervantes, Leopoldo. Universidad de El Salvador. Detección de la Presencia del Ácaro (<i>Aculops lycopersici</i>) Causante del Bronceamiento del Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>) en El Salvador, América Central. El Salvador, 1991.
29.	Tibayde M. Sánchez G. Universidad Central de Venezuela. Diagnóstico y Caracterización Molecular de <i>Xanthomonas albilineans</i> (ASHBY) Dowson en variedades comerciales de caña de azúcar <i>Saccharum spp.</i> , en Venezuela , 2011
30.	Valarezo-Cely, O; Cañarte-Bermudez, E; Navarrete-Cedeño, B. 2012. Artículo, Artrópodos asociados al cultivo de Cacao en Manabí. Ecuador.
31.	Vargas Serna, Elsis Aquiles, Efecto de dosis del extracto acuoso foliar de <i>Clibadium</i> sp. "Huaca" en el control de <i>Monalonion dissimulatum</i> en una Plantación de <i>Theobroma cacao</i> , Yarinacocha, Perú, 2018.
32.	Villavicencio, Roberto. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador. Manejo del virus de la hoja amarilla (<i>Sugarcane Yellow Leaf Virus, SCYLV</i>) de la caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i>) mediante cultivo de tejidos y el uso de agentes inductores de Resistencia Sistémica Adquirida, SAR, 2009.

