

**DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL  
CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA**

**Área de Diagnóstico Fitosanitario  
Laboratorio de Micología**

**Protocolo de Diagnóstico:**

*Guignardia bidwellii*, Anamorfo: *Phyllosticta ampellicida*  
(Pudrición negra de la vid)

**Tecámac, Estado de México, Octubre 2018**

**SENASICA nos protege a todos**

**SAGARPA**  
SECRETARÍA DE AGRICULTURA,  
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,  
PESCA Y ALIMENTACIÓN



**SENASICA**  
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,  
INOCUIDAD Y CALIDAD  
AGROALIMENTARIA

## Aviso

El presente protocolo de diagnóstico fitosanitario fue desarrollado en las instalaciones de la Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), con el objetivo de diagnosticar específicamente la presencia o ausencia de *Guignardia bidwellii*, Anamorfo: *Phyllosticta ampellicida*. La metodología descrita, tiene un sustento científico que respalda los resultados obtenidos al aplicarlo. La incorrecta implementación o variaciones en la metodología especificada en este documento de referencia pueden derivar en resultados no esperados, por lo que es responsabilidad del usuario seguir y aplicar el protocolo de forma correcta.

La presente versión podrá ser mejorada y/o actualizada quedando el registro en el historial de cambios.

## I. ÍNDICE

<b>1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
2.1 Información sobre la plaga .....	1
2.2 Información taxonómica.....	2
2.3 Flujo de trabajo.....	3
<b>3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN</b> .....	<b>4</b>
3.1 Identificación morfológica .....	4
3.1.1 Cortes histológicos.....	4
3.1.1.1 Interpretación de resultados .....	4
3.1.2 Incubación en papel secante.....	5
3.1.2.1 Interpretación de resultados .....	6
3.1.3 Aislamiento en medios de cultivo .....	6
3.1.3.1 Interpretación de resultados .....	6
3.2 Descripción morfológica .....	7
3.2.1 Fase sexual (Teleomorfo) .....	7
3.2.2 Fase asexual (Anamorfo) .....	7
3.2.3 Descripción colonial .....	8
3.3 Identificación molecular .....	9
3.3.1 Extracción de DNA.....	10
3.3.1.1 A partir de cultivos puros .....	10
3.3.1.2 A partir de tejido vegetal .....	11
3.3.2 Verificación de la calidad del DNA .....	11
3.3.3 PCR punto final .....	12
3.3.3.1 Ensayo control endógeno.....	12
3.3.3.2 Ensayo con primers específicos .....	13
3.3.3.3 Controles para las pruebas moleculares .....	15
3.3.4 Interpretación de resultados para los ensayos de PCR punto final.....	15
3.4 Identificación del patógeno .....	17
<b>4. RESULTADOS DE VALIDACIÓN</b> .....	<b>17</b>
<b>5. REGISTROS</b> .....	<b>18</b>
<b>6. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL</b> .....	<b>19</b>
<b>7. RECONOCIMIENTO</b> .....	<b>19</b>
<b>8. REFERENCIAS</b> .....	<b>19</b>
<b>9. ANEXOS</b> .....	<b>21</b>
9.1 Signos y síntomas.....	21
9.2 Ciclo de la enfermedad .....	22
9.3 Elaboración de montajes .....	23
9.3.1 Preparaciones temporales con cubreobjetos.....	23
9.3.2 Preparaciones temporales con cinta adhesiva .....	23
9.3.3 Preparaciones permanentes .....	23

9.4 Medios de montaje .....	24
9.5 Medios de cultivo .....	25
9.7 Corroboración mediante Filogenia Molecular .....	26
9.7.1 Interpretación de resultados .....	29

## II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de reproducción. ....	7
Figura 2. Descripción morfológica. ....	8
Figura 3. Crecimiento de <i>Phyllosticta ampelicida</i> en medios de cultivo .....	9
Figura 4. Ensayo de control endógeno con el par de primers ITS-1 e ITS-4. ....	16
Figura 5. Amplificación de los productos de PCR. ....	16
Figura 6. Síntomas en vid. ....	21
Figura 7. Ciclo biológico de <i>Guignardia bidwellii</i> ( <i>Phyllosticta ampelicida</i> ) .....	22
Figura 8. Alineamiento de secuencias utilizando Nucleotide BLAST. ....	27
Figura 9. Alineamiento múltiple de secuencias. ....	29
Figura 10. Filogenia molecular. ....	30

## III. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Morfología colonial de <i>G. bidwellii</i> ( <i>P. ampelicida</i> ) en medios de cultivo PDA, MEA y OA .....	9
Cuadro 2. Primers utilizados en el ensayo de PCR punto final para la detección del gen endógeno ribosomal ..	12
Cuadro 3. Preparación de la mezcla de reacción para el ensayo de PCR punto final del control endógeno .....	12
Cuadro 4. Programa del termociclador para la detección del control endógeno .....	12
Cuadro 5. Primers específicos diseñados en el Laboratorio de Micología del CNRF .....	13
Cuadro 6. Preparación de la mezcla de reacción para los primers Bidwell-1 y Ampel-2 .....	13
Cuadro 7. Programa del termociclador para el ensayo con los primers Bidwell-1 y Ampel-2 .....	14
Cuadro 8. Preparación de la mezcla de reacción para los primers Ampel-1 y Ampel-2 .....	14
Cuadro 9. Programa del termociclador para el ensayo con los primers Ampel-1 y Ampel-2 .....	14

## 1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO

Describir los procedimientos para la identificación de *Guignardia bidwellii* (anamorfo: *Phyllosticta ampelicida*) mediante caracterización morfológica y técnicas moleculares.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Información sobre la plaga

La pudrición negra de la vid es una enfermedad endémica de Norteamérica que afecta principalmente a la vid (*Vitis* spp.) y hospedantes alternos de la familia Vitaceae (*Parthenocissus* spp., *Ampelopsis* spp. y *Cissus* spp.). Actualmente, se ha distribuido a diversos países de Europa. En México se considera una plaga cuarentenaria que no está presente en territorio nacional (SENASICA, 2015; Witch et al., 2012).

En tejidos como hojas, peciolo, tallos, inflorescencias, zarcillos, se observan lesiones pequeñas y circulares de color café con margen de color café rojizo, dentro de las que sobresalen diminutas fructificaciones esféricas (picnidios) de color negro; sin embargo, estas lesiones pueden ser alargadas en peciolo y tallos, y en estos últimos con apariencia hundida; además, las lesiones pueden fusionarse y causar canchales o marchitez en hojas (Department of Primary Industries, 2013; Gobierno de España, 2014; SPHDS, 2016). En frutos, las lesiones son de color café chocolate; y en infecciones severas, los frutos se momifican y permanecen en el racimo (Anexo 8.1, Figura 6) (Rego et al., 2012; SPHDS, 2016).

Este hongo presenta una fase sexual (*Guignardia bidwellii*) con ascosporas que se desarrollan dentro de pseudotecios (Figura 1 a, b, c), y una fase asexual (*Phyllosticta ampelicida*) en la que se desarrollan las picniosporas o conidios dentro de picnidios (Figura 1 d, e, f) (Agrios, 2005; Pearson y Goheen, 1994).

Durante la primavera, las ascosporas son expulsadas y diseminadas por la lluvia y viento a hojas, flores y frutos jóvenes, luego germinan en presencia de humedad en un periodo de 36 a 48 horas, penetran los tallos y hojas jóvenes y causan la infección primaria; sin embargo, se requiere de 8 a 25 días para que la infección sea visible (SPHDS, 2016; Agrios, 2005). A principios del verano, se forman las picniosporas (responsables de infecciones recurrentes), al final del verano se desarrollan las ascosporas sobre frutos momificados y son liberadas durante la primavera siguiente (Department of Primary Industries; 2013; Liberato y Shivas, 2006). Cuando el ambiente es húmedo, las ascosporas son producidas y liberadas a través de toda la primavera y verano, ocasionando infecciones continuas (Anexo 8.2) (SPHDS, 2016; Agrios, 2005).

El efecto más perjudicial de la pudrición negra es sobre la fruta, ya que disminuye su producción y no puede ser utilizada en la producción de vinos debido a que causa un sabor desagradable. (Pezet y Jermini, 1989).

Si la enfermedad se presenta en México, podría afectar la producción de la vid y la industria procesadora de productos derivados de la uva; de acuerdo con SIAP (2017) la superficie agrícola sembrada fue de 33 093 ha y la cosechada fue de 30 093 ha, con una producción de 418 511 toneladas y un valor de producción de más de 435 millones de pesos (SENASICA, 2015).

## 2.2 Información taxonómica

**Nombre Teleomorfo:** *Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala y Ravaz, 1892

**Nombre Anamorfo:** *Phyllosticta ampellicida* (Engelm.), 1973

**Sinónimos Teleomorfo:** *Sphaeria bidwellii* Ellis, 1880

*Physalospora bidwellii* Ellis, 1882

*Laestadia bidwellii* Ellis, 1888

*Phyllachorella bidwellii* Ellis, 1919

*Botryosphaeria bidwellii* Ellis, 1958

*Carlia bidwellii* Ellis, 1989

**Sinónimos Anamorfo:** *Naemospora ampellicida* Engelm., 1863

*Septoria viticola* Berk. y M. A. Curtis, s. f.

*Phoma ustulata* Berk. y M. A., Curtis, 1873

*Depazea labruscae* Engel., 1877

*Phoma uvicola* var. *labruscae* Thüm., 1878

*Phyllosticta viticola* Thüm., 1878

*Phyllosticta labrusca* Thüm., 1878

*Phyllosticta ampelopsidis* Ellis y G. Martin, 1886

*Phyllostictina clemensae* Petr., 1928

**Nombres comunes:** Pudrición negra de la vid (español)

Grape black rot (inglés)

Black rot of grape (inglés)

Le Black rot de la vigne (francés)

**Posición taxonómica:**

**Dominio:** Eukaryota

**Reino:** Fungi

**Phylum:** Ascomycota

**Clase:** Dothideomycetes

**Orden:** Botryosphaeriales

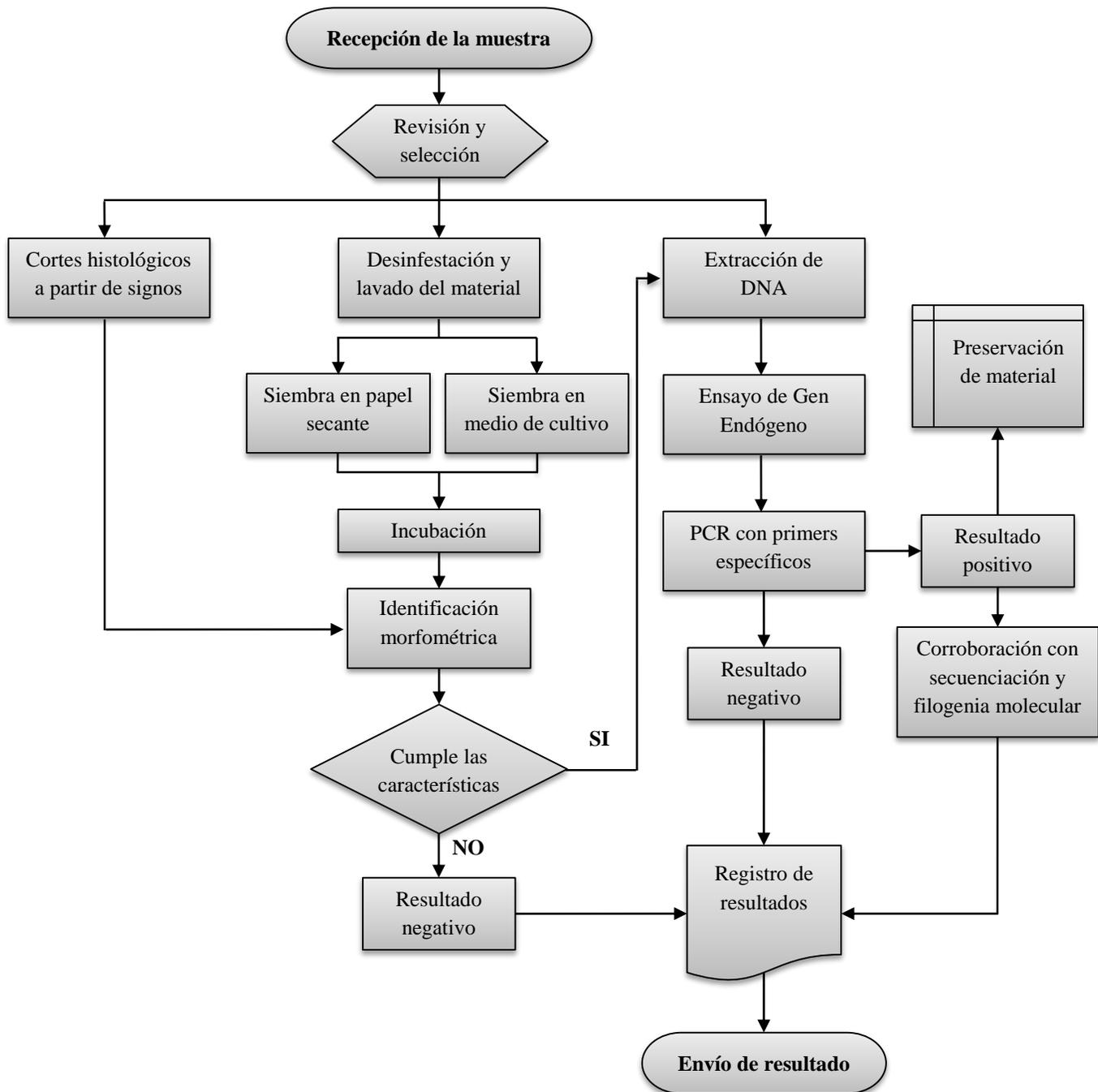
**Familia:** Botryosphaeriaceae

**Género:** *Guignardia*

**Especie:** *Guignardia bidwellii*.

(Robert, Stegehuis y Stalpers, 2005)

## 2.3 Flujo de trabajo



### 3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Para determinar la presencia de la fase asexual (*Phyllosticta ampelicida*) o fase sexual (*Guignardia bidwellii*) del hongo, es necesario contar con material vegetal que presente signos y síntomas característicos (Anexo 8.1):

Para la fase sexual se requiere que la muestra conste de frutos momificados o cercanos a la momificación, así como hojas o ramas que permanecen en el suelo del cultivo y que presenten manchas necróticas con puntuaciones oscuras (pseudotecios) o micelio alrededor del tejido.

Para la determinación de la fase asexual son necesarias hojas, zarcillos, pedicelos o ramas con síntomas y signos característicos donde se pueden presentar los picnidios.

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”.

#### 3.1 Identificación morfométrica

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

##### 3.1.1 Cortes histológicos

- 1) Partir de hojas, ramas, zarcillos, pedicelos o bayas con presencia de síntomas y observar con un microscopio estereoscópico la presencia de signos del hongo (picnidios o pseudotecios).
- 2) Obtener fragmentos de aproximadamente 0.5 mm de grosor, utilizando navaja de bisturí o navaja de afeitar.
- 3) Elaborar montajes temporales o permanentes (Anexo 8.3) 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 del hongo (picnidios, conidios o pseudotecios, ascas y ascosporas) y obtener el ancho y largo de éstos, y comparar las dimensiones obtenidas con la literatura de referencia, con el fin de definir el género y especie de acuerdo a la descripción morfométrica (Sección 3.2).

##### 3.1.1.1 Interpretación de resultados

En caso de que los signos en el tejido vegetal correspondan a picnidios o pseudotecios y la observación de los mismos coincida con la descripción de *Phyllosticta ampelicida* o *Guignardia*

*bidwellii*, se utiliza otra técnica de diagnóstico como aislamiento e incubación en medio de cultivo y papel secante; y detección por ensayo de PCR.

Si no se detecta presencia de estructuras características de *Phyllosticta ampellicida* o *Guignardia bidwellii*, se debe reportar el diagnóstico para esta técnica como negativo y verificar el resultado por las técnicas descritas en las secciones de Incubación en papel secante 3.1.2 y Aislamiento en medios de cultivo 3.1.3.

### 3.1.2 Incubación en papel secante

- 1) A partir de tejido vegetal con o sin síntomas y signos del hongo, obtener fragmentos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> y en condiciones de asepsia, 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.
- 2) Armar cámaras húmedas. 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 minutos a 121 °C y 15 libras o durante 2 horas a 160 °C con calor seco. Una vez estériles y frías, humedecer el papel filtro con agua destilada estéril (evitar tener exceso de agua) y marcar con plumón permanente (bajo condiciones asépticas) las cajas con los datos de identificación de la muestra.
- 3) Colocar en la cámara húmeda de 5 a 6 fragmentos de material vegetal seco. Incubar durante 5 días a 25 °C, bajo condiciones de 80% de humedad.
- 4) Observar con un microscopio estereoscópico si hay estructuras del hongo, realizar el montaje para visualizar sus características (Anexo 8.3) y obtener aislamientos puros en medio de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar, Papa Dextrosa Agar), MEA (Malt Extract Agar, Extracto de Malta Agar) u OA (Oatmeal Agar, Harina de Avena Agar) (para la preparación de medios de cultivo ver Anexo 8.5).
- 5) Incubar los aislamientos puros durante 12 días 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 (picnidios, pseudotecios, conidios ascas o ascosporas).
- 6) A partir de las estructuras, obtener montajes temporales o permanentes para su observación con un microscopio compuesto. Medir las estructuras del hongo (picnidios, conidios o pseudotecios, y ascosporas) 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 morfológicas que presenten (Sección 3.2).

### 3.1.2.1 Interpretación de resultados

Si se obtienen estructuras típicas de la incubación en papel secante del hongo sobre el tejido vegetal que correspondan a *Phyllosticta ampellicida* o *Guignardia bidwellii*, es necesario comparar los resultados obtenidos mediante la técnica de aislamiento en medio de cultivo y detección por ensayo de PCR.

Si no se detecta presencia de estructuras características de *Phyllosticta ampellicida* o *Guignardia bidwellii*, se debe reportar el diagnóstico para esta técnica como negativo y verificar el resultado por las técnicas descritas en las secciones de Aislamiento en medios de cultivo 3.1.3. e Identificación molecular 3.3.

### 3.1.3 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 cm<sup>2</sup>, desinfectarlos y secarlos.
- 2) Sembrar de 5 a 6 fragmentos secos en cajas Petri con medio de cultivo PDA (para la preparación de medios de cultivo ver Anexo 8.5) e incubar a 25 °C ± 3 °C durante 5 días.
- 3) A partir de colonias típicas del hongo (Anexo 3.2.3) aislarlas en medio de cultivo MEA y OA para obtener cultivos puros, incubar durante 12 días y observar la presencia de picnidios o pseudotecios con un microscopio estereoscópico.
- 4) Obtener preparaciones temporales o permanentes (Anexo 8.3) de las estructuras y observar con un microscopio compuesto.
- 5) Medir las estructuras del hongo (picnidios, conidios o pseudotecios, ascas y ascosporas) y obtener el intervalo y promedio del ancho y largo de éstos. Comparar las dimensiones obtenidas con la literatura de referencia para definir el género y especie del hongo (Sección 3.2).

#### 3.1.3.1 Interpretación de resultados

Para determinar la presencia del patógeno se deben obtener colonias con micelio compacto, de color verde olivo oscuro y aspecto húmedo (Figura 3), con desarrollo de picnidios con conidios característicos de *Phyllosticta ampellicida*; así como observar las estructuras características del hongo descritas en las siguientes secciones.

Si no se detecta presencia de estructuras características de *Phyllosticta ampellicida* o *Guignardia bidwellii*, se debe reportar el diagnóstico para esta técnica como negativo y verificar el resultado por las técnicas descritas en la sección 3.1.3 aislamiento en medio de cultivo.

## 3.2 Descripción morfológica

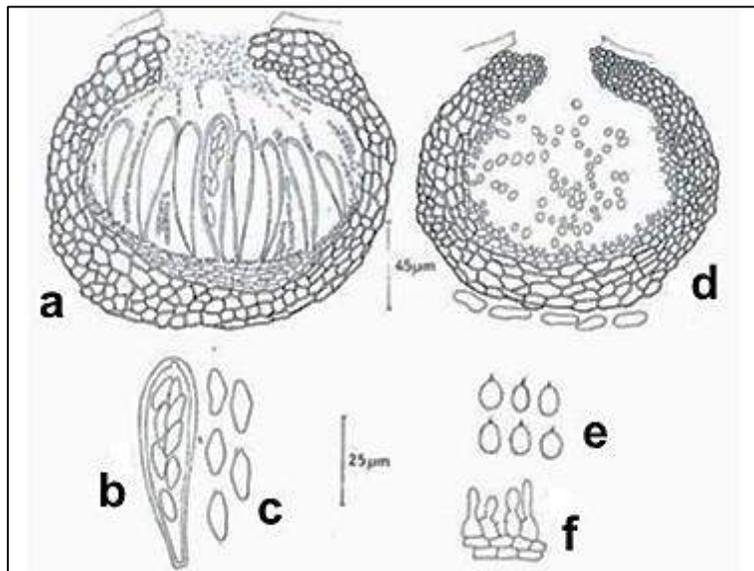
La pudrición negra de la vid presenta fase sexual (*Guignardia bidwellii*) y fase asexual (*Phyllosticta ampellicida*), las cuales tienen diferentes características morfológicas (Figura 1):

### 3.2.1 Fase sexual (Teleomorfo)

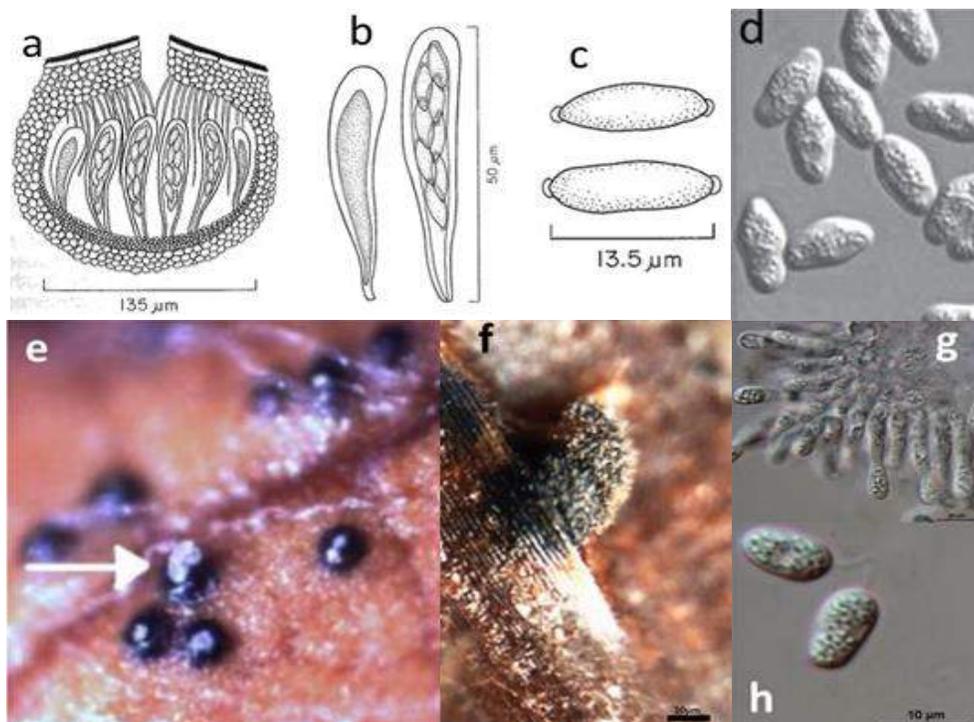
De acuerdo con Hanlin (2001); Pearson y Goheen, 1994, *Guignardia bidwellii* (fase sexual) presenta pseudotecios periteciales, solitarios o agregados, inmersos en el tejido vegetal del hospedante o errumpentes de color café oscuro (Figura 2 a), de forma globosa a subglobosa, ostiolados, con papila o cuello ostiolar, de 61-199 (130-230 en promedio)  $\mu\text{m}$ . Las ascas son bitunicadas, clavadas a cilíndricas (Figura 2 b), con tallo corto, de 36-56 x 12-17  $\mu\text{m}$  y contiene 8 ascosporas. Las ascosporas son hialinas, unicelulares, rectas o curvadas, ovoides, elipsoides o romboidales, gutuladas, usualmente más anchas por su parte media con ápices redondeados y rodeados por mucilago, de 10.6-18.4 (12-17) x 4.8-9.0 (6-7.5)  $\mu\text{m}$  (Figura 2 c y d).

### 3.2.2 Fase asexual (Anamorfo)

*Phyllosticta ampellicida* presenta picnidios semi-inmersos en el tejido vegetal del hospedante (Figura 2 e y f), miden de 59-196  $\mu\text{m}$ , (70-180 en promedio)  $\mu\text{m}$  de diámetro con ostiolo apical, células conidiogénicas holoblásticas. Conidios de 7.1-14.6, con un promedio de (5-12) x 5.3-9.3 (4-7)  $\mu\text{m}$ , unicelulares, elipsoides, hialinos, con ápices redondeados, rodeados por un mucílago hialino de aproximadamente 0.5  $\mu\text{m}$  de grosor, un apéndice apical (Figura 2 h) de 5-12  $\mu\text{m}$  de largo, cicatriz basal derivada de la unión del conidio al conidióforo (Figura 2 g) (Roger y Gohenn, 1994; SPHDS).



**Figura 1. Estructuras de reproducción.** Fase sexual (*Guignardia bidwellii*): a. Pseudotecio; b. Ascas; c. Ascosporas. Fase asexual (*Phyllosticta ampellicida*): d. Picnidio; e. Picniosporas (conidios); f. Células conidiogénica. (Modificado y traducido de Pearson y Goheen, 1994).



**Figura 2. Descripción morfológica.** *Guignardia bidwellii*: a. Pseudotecio peritecial inmerso; b. Ascas bitunicadas y clavadas; c. y d. Ascosporas con mucilago en los ápices. *Phyllosticta ampelicida*: e. y f. Picnidios semi inmersos en tejido vegetal; g. Conidióforos; h. Conidios unicelulares con flagelo apical, rodeados por un mucilago hialino. (Fuente: Hanlin, 2001 y Zhang et al., 2013).

### 3.2.3 Descripción colonial

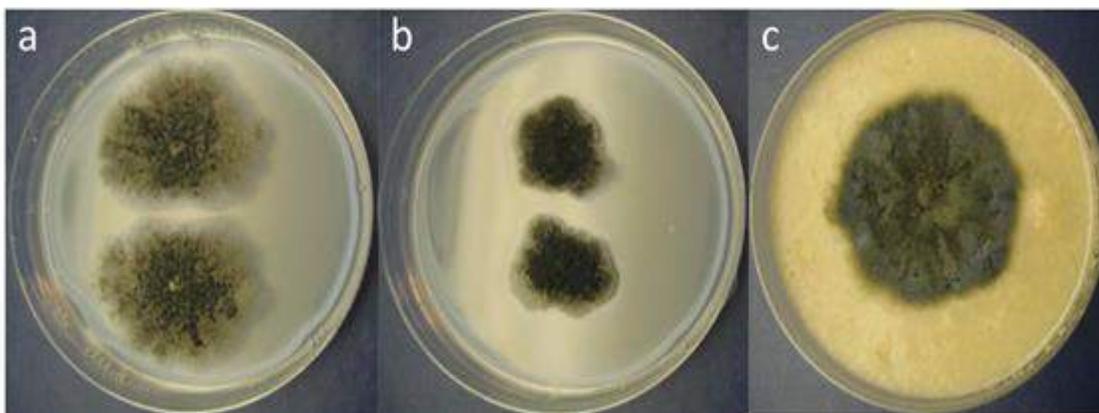
La tasa de crecimiento y apariencia del hongo difieren de acuerdo con el medio de cultivo en el que se siembre, estas características se describen en el Cuadro 1 y Figura 3; sin embargo, de forma general el crecimiento micelial es compacto, de color verde olivo oscuro y con aspecto húmedo.

El medio ½ PDA es óptimo para la identificación y producción de conidios, la tasa de crecimiento micelial oscila entre 1- 2 mm/día de apariencia moteada e irregular, la formación de picnidios ocurre dentro de 7 a 15 días. En medio de cultivo de Extracto de Malta Agar, las colonias crecen aproximadamente 0.5 mm/día (Figura 8) en un patrón circular, los picnidios se desarrollan dentro de 7 a 15 días y están densamente distribuidos, aunque producen menos conidios que en ½ PDA. Las colonias crecen a 1-2 mm / día en Harina de Avena Agar (Figura 9) y son circulares con una apariencia picnidios (SPHDS, 2016).

**Cuadro 1. Morfología colonial de *G. bidwellii* (*P. ampelica*) en medios de cultivo PDA, MEA y OA**

Medio de cultivo	Tasa de Crecimiento (mm/día)	Apariencia	Formación de cuerpos fructíferos (dds)	Abundancia de cuerpos fructíferos
PDA	1-2	Moteado irregular	15	Poca
MEA	0.5	Circular	15	Mucha
OMA	1-2	Circular verde oscuro cremoso	15	Poca

PDA= Papa Dextrosa Agar, MEA= Extracto de Malta Agar, OA= Harina de Avena Agar; dds= Días después de la siembra.



**Figura 3. Crecimiento de *Phyllosticta ampelica* en medios de cultivo. 25 °C durante 15 días, a. Papa Dextrosa Agar; b. Extracto de Malta Agar; c. Harina de Avena Agar (Fuente: SPHDS, 2016).**

### 3.3 Identificación molecular

La base del diagnóstico molecular de *Guignardia bidwellii* (*Phyllosticta ampelica*) son métodos que utilizan la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction). Esta técnica permite la detección y amplificación de regiones de DNA específicas del hongo. Se debe considerar que este método molecular puede detectar y diferenciar a *Guignardia bidwellii* (*Phyllosticta ampelica*) de entre más de 50 especies del género, pero no tiene la facultad para separar entre anamorfo y teleomorfo; por lo que, el resultado final debe estar basado en conjunto con lo observado en la caracterización morfológica.

**Nota:** para la estandarización de este protocolo se utilizaron diversos reactivos y equipos, éstos se pueden remplazar por otras marcas siempre y cuando sean homólogos y cumplan con la misma función.

### 3.3.1 Extracción de DNA

#### 3.3.1.1 A partir de cultivos puros

La extracción se debe realizar a partir de cultivos puros en medio PDA o MEA, previamente caracterizados morfológicamente.

**Nota:** cualquier kit comercial de extracción de DNA puede resultar óptimo para tal fin, para ello es importante obtener una buena calidad, cantidad e integridad del DNA.

Se sugiere la metodología propuesta por Cenís (1992) modificada, se describe a continuación:

- 1) En un tubo con perlas de cerámica (MagNA Lyser Green Beads 03358941001 de Roche) transferir 0.01 g de micelio de una caja Petri de la muestra de interés.

**Nota:** para facilitar la obtención de sobrenadante, previamente sustraer del tubo un poco menos de la mitad de las perlas de cerámica; o la otra opción es duplicar los volúmenes de los reactivos que se mencionan a continuación.

- 2) Agregar 500  $\mu\text{L}$  de buffer TE 1X, incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, centrifugar 5 minutos a 17 940 g, decantar el sobrenadante con una micropipeta.

**Nota:** evitar decantar el buffer TE mediante inversión del tubo, ya que las perlas de cerámica y micelio se perderían también.

- 3) Adicionar 300  $\mu\text{L}$  de buffer de extracción y macerar el micelio hasta que quede pulverizado usando un disruptor de tejidos durante 10 minutos (Minibeadbeater-96 Cat. No. 1001 de Biospect Products o equipos con características similares).

**Nota:** el buffer de extracción consiste en 200 mM Tris-HCL pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA (Ácido Etilendiaminotetraacético) y 0.5% SDS (Dodecil Sulfato de Sodio).

- 4) Adicionar 150  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 3 M pH 5.2, invertir suavemente dos a tres veces el tubo y posteriormente colocar los tubos en refrigeración a una temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos.
- 5) Centrifugar los tubos durante 10 minutos a 15 290 g, transferir 250  $\mu\text{L}$  del sobrenadante a un tubo de 1.5 mL nuevo y estéril (evitar la resuspensión del sedimento).

- 6) Agregar 250  $\mu\text{L}$  de isopropanol frío (almacenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), invertir suavemente dos a tres veces el tubo y dejar reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos; posteriormente, centrifugar 10 minutos a 15 290 g.

**Nota:** al final del proceso puede ser o no visible la pastilla de DNA.

- 7) Decantar el isopropanol por inversión cuidando de no perder la pastilla. Agregar 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% y centrifugar durante 2 minutos a 15 290 g. Repetir el lavado con etanol al 70% una vez más. Secar la pastilla por inversión en papel secante estéril durante 3 horas o hasta que no se observen gotas en la pared del tubo.
- 8) Resuspender el DNA en 50  $\mu\text{L}$  de agua grado biología molecular o buffer TE 1X, y guardar la muestra en refrigeración a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La cantidad de DNA obtenida por este método debe ser la suficiente para cubrir el intervalo de trabajo del ensayo de PCR.

### 3.3.1.2 A partir de tejido vegetal

La extracción de DNA también puede realizarse directamente del tejido vegetal enfermo, hojas de vid con signos (picnidios o pseudotecios). Sin embargo, debe enfatizarse que la extracción de DNA debe realizarse principalmente de cultivos puros caracterizados previamente de manera morfológica como *Guignardia bidwellii* o *Phyllosticta ampellicida*. En general, para la extracción de DNA a partir de tejido vegetal, se sugiere el uso del kit comercial Concert™ Plant RNA Reagent.

**Nota:** los pasos de extracción son los indicados por el fabricante. Se puede prescindir de una centrifuga refrigerada y se debe evitar el uso de la DNAsa.

### 3.3.2 Verificación de la calidad del DNA

Al finalizar el proceso es importante verificar la calidad y cantidad del DNA obtenido; para ello se puede utilizar un espectrofotómetro modelo NanoDrop 2000c de Thermo Scientific™ (seguir las instrucciones del manual del fabricante para su uso) u otro equipo con la misma funcionalidad. La calidad óptima del DNA está dada por la absorbancia  $A_{260/280} = 1.8-2.0$  y  $A_{260/230} = 2.0-2.2$ . Para corroborar que el DNA obtenido es apto para ser amplificado debe realizarse un ensayo de control endógeno, evitando así falsos negativos. En la práctica, absorbancias fuera de los intervalos óptimos son permitidos solamente cuando amplifiquen exitosamente el control endógeno.

### 3.3.3 PCR punto final

#### 3.3.3.1 Ensayo control endógeno

Para verificar la calidad e integridad del DNA extraído, así como evitar falsos negativos, se debe realizar un ensayo de PCR de un control endógeno. Se utilizan los primers ITS-1 e ITS-4 propuestos por White, Lee y Taylor (1990), que reconocen regiones ribosomales conservadas (ITS rDNA). Las secuencias de los primers se observan en el Cuadro 2.

Es importante saber que el tamaño y el número de bandas obtenidas por PCR punto final en el ensayo de control endógeno es variable, debido a que el par de primers ITS-1/ITS-4 son universales y amplifican a la mayoría de organismos eucariotas; por lo que la extracción de tejido vegetal puede amplificar dos o más bandas. Lo fundamental a inferir es que el extracto de DNA sea amplificable.

**Cuadro 2. Primers utilizados en el ensayo de PCR punto final para la detección del gen endógeno ribosomal.**

Tipo	Nombre del primer	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Sentido	ITS-1	5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3'	Aprox. 650
Antisentido	ITS-4	5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'	

1) Preparar la reacción de PCR punto final de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 3.

**Cuadro 3. Preparación de la mezcla de reacción para el ensayo de PCR punto final del control endógeno**

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μL)
Buffer PCR	10 X	1 X	2.5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5
Primer ITS-1	10 μM	0.5 μM	1.25
Primer ITS-4	10 μM	0.5 μM	1.25
Taq DNA Pol	500 U	3 U	0.15
DNA	25 – 500 ng/μL	2 – 40 ng/μL	2.0
Agua grado biología molecular	-	-	16.6
<b>Volumen final</b>			<b>25</b>

2) A continuación, programar el termociclador de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 4:

**Cuadro 4. Programa del termociclador para la detección del control endógeno**

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 minutos	1
Desnaturalización	95°C	45 segundos	35
Alineamiento	58°C	45 segundos	
Extensión	72°C	45 segundos	
Extensión final	72°C	10 minutos	1

Los productos de PCR deben correrse durante 1 hora a 100 V en un gel de agarosa ultra pura al 2% en buffer TAE 1X, teñido con 0.6X de GelRed™ Biotum, u otro método adaptable que permita interpretar los resultados.

### 3.3.3.2 Ensayo con primers específicos

Si la muestra amplifica correctamente en el ensayo de control endógeno se puede proceder a los subsecuentes ensayos de PCR punto final. Para la detección de *Guignardia bidwellii*, mediante la técnica de PCR punto final, se diseñaron tres primers que, en combinación, amplifican respectivamente una región del ITS del DNA ribosomal (Cuadro 5).

Los tres oligonucleótidos forman dos combinaciones distintas: Bidwell-1 y Ampel-2 amplifican un producto de 173 pb específico a *G. bidwellii* f. sp. *euvitis*, *G. bidwellii* f. sp. *parthenocissi* y *Phyllosticta parthenocissi*; mientras que la combinación Ampel-1 y Ampel-2 amplifican un producto de 220 pb únicamente para *G. bidwellii* f. sp. *euvitis*.

**Cuadro 5. Primers específicos diseñados en el Laboratorio de Micología del CNRF**

Tipo	Nombre del primer	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Sentido	Bidwell-1	5'- GAAAAGCCGTCCGAAAGAGCC -3'	173
Antisentido	Ampel-2	5'- CAGGACTTCACGAAATAATCG -3'	
Sentido	Ampel-1	5'- ACTGAAACCAGTAATTTCTTC -3'	220
Antisentido	Ampel-2	5'- CAGGACTTCACGAAATAATCG -3'	

- 1) Preparar la reacción de PCR punto final para el par de primers Bidwell-1/Ampel-2 de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 6:

**Cuadro 6. Preparación de la mezcla de reacción para los primers Bidwell-1 y Ampel-2**

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer PCR	10 X	1 X	2.5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5
Primer Bidwell-1	10 µM	0.5 µM	1.25
Primer Ampel-2	10 µM	0.5 µM	1.25
Taq DNA Pol	500 U	3 U	0.15
DNA	0.5 – 500 ng/µL	0.04 - 40	2.0
Agua grado biología molecular	-	-	16.6
<b>Volumen final</b>			<b>25</b>

2) A continuación, programar el termociclador de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 7:

**Cuadro 7. Programa del termociclador para el ensayo con los primers Bidwell-1 y Ampel-2**

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	1
Desnaturalización	95°C	45 segundos	35
Alineamiento	62°C	30 segundos	
Extensión	72°C	30 segundos	
Extensión final	72°C	5 minutos	1

3) Preparar la reacción de PCR punto final para el par de primers Ampel-1/Ampel-2 de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 8:

**Cuadro 8. Preparación de la mezcla de reacción para los primers Ampel-1 y Ampel-2**

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer PCR	10 X	1 X	2.5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5
Primer Ampel-1	10 µM	0.5 µM	1.25
Primer Ampel-2	10 µM	0.5 µM	1.25
Taq DNA Pol	500 U	3 U	0.15
DNA	0.5 – 500 ng/µL	0.04 – 40 ng/µL	2.0
Agua grado biología molecular	-	-	16.6
<b>Volumen final</b>			25

4) A continuación, programar el termociclador de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 9:

**Cuadro 9. Programa del termociclador para el ensayo con los primers Ampel-1 y Ampel-2**

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	1
Desnaturalización	95°C	45 segundos	40
Alineamiento	52°C	45 segundos	
Extensión	72°C	45 segundos	
Extensión final	72°C	5 minutos	1

**Nota:** para los primers Bidwell-1, Ampel-1 y Ampel-2 la amplificación de PCR ha demostrado ser confiable en un intervalo de trabajo de 0.3 a 3000 ng/µL de DNA; sin embargo, se recomienda utilizar concentraciones iniciales de 0.5 a 500 ng/µL.

### 3.3.3.3 Controles para las pruebas moleculares

En todos los ensayos de PCR punto final descritos en este protocolo, es necesario incluir los siguientes controles:

**Control positivo:** provee un patrón de referencia con el cual comparar los resultados positivos en las muestras. Puede ser DNA genómico o el fragmento clonado del hongo, y este deberá estar confirmado mediante secuenciación.

**Control negativo de matriz:** este control corresponde a un extracto de matriz sin el hongo (hoja de vid sana). Asegura que no exista reacción cruzada con la matriz o contaminación durante la extracción. Aplica solamente cuando la extracción se realice a partir de tejido vegetal.

**Control negativo de reactivos:** es la mezcla de reacción sin molde (DNA/RNA/clona). Descarta falsos positivos y contaminación de la reacción.

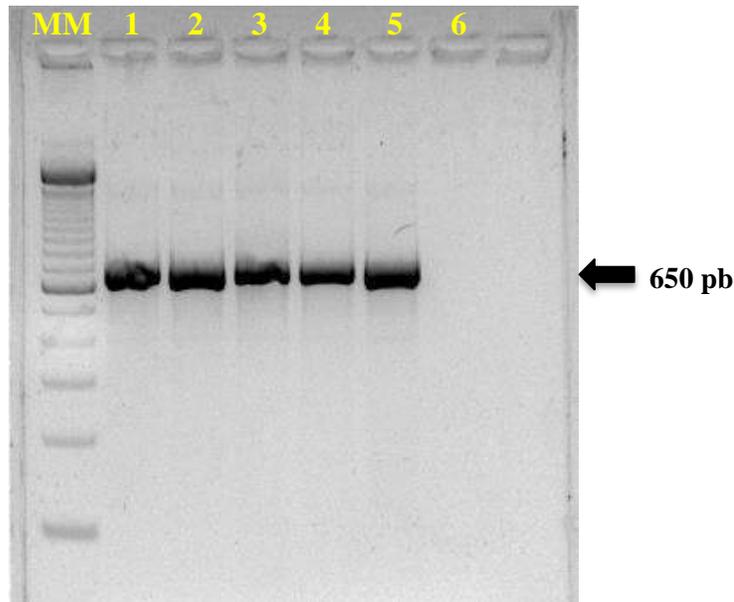
### 3.3.4 Interpretación de resultados para los ensayos de PCR punto final

Los resultados son válidos solamente bajo los siguientes criterios:

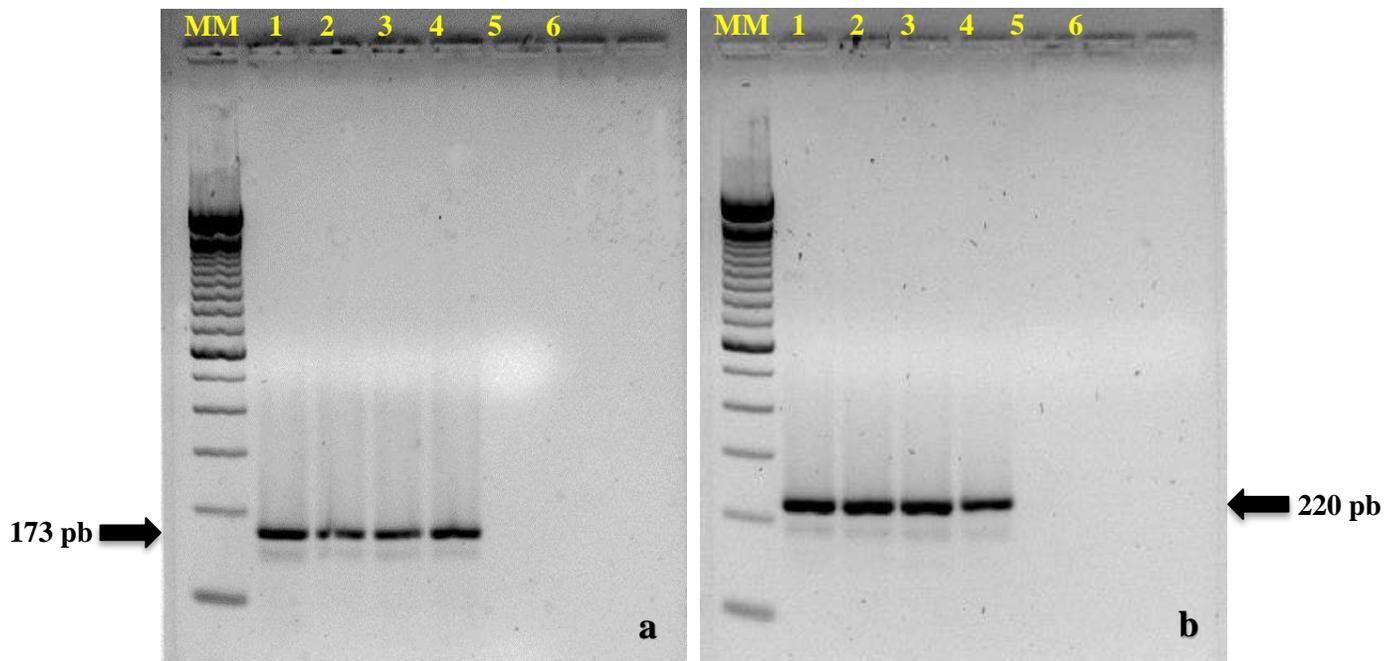
- En el ensayo de control endógeno, el control positivo (DNA) y cada una de las muestras se debe de generar una banda de tamaño de 650 pb (Figura 4).
- El control negativo de reactivos no debe de generar bandas en ningún ensayo de PCR (Figura 5).
- El control positivo para el ensayo de PCR con el par de primers Bidwell-1/Ampel-2 debe de generar una banda de tamaño de 175 pb (Figura 5 A).
- El control positivo para el ensayo de PCR con el par de primers Ampel-1/Ampel-2 debe de generar una banda de tamaño de 220 pb (Figura 5 B).

Se considera como resultado positivo aquellas muestras que amplifiquen el fragmento de 175 pb con los primers Bidwell-1/Ampel-2.

El resultado es negativo si no hay amplificación del fragmento de 175 pb con los primers Bidwell-1/Ampel-2



**Figura 4. Ensayo de control endógeno con el par de primers ITS-1 e ITS-4.** 1: control positivo de *Phyllosticta ampellicida*; 2-4: muestras; 5: DNA de *Phyllosticta capitalensis* y 6: control negativo de reactivos. MM: marcador molecular TrackIt™ 100 pb DNA Ladder de Invitrogen. Ensayo a partir de cultivos puros.



**Figura 5. Amplificación de los productos de PCR.** a) Par de primers Bidwell-1/Ampel-2; b) Par de primers Ampel-1/Ampel-2. 1: control positivo de *Phyllosticta ampellicida*; 2-4: muestras; 5: DNA de *Phyllosticta capitalensis* y 6: control negativo de reactivos. MM: marcador molecular TrackIt™ 100 pb DNA Ladder de Invitrogen.

### 3.4 Identificación del patógeno

Para reportar una identificación positiva de *Guignardia bidwellii* o *Phyllosticta ampelicida*, es necesario la detección en conjunto de las siguientes pruebas: aislamiento y caracterización de la colonia, caracterización morfológica de las estructuras distintivas del hongo, y la amplificación positiva del ensayo de PCR punto final con los primers Bidwell-1/ Ampel-2. Adicionalmente, si se requiere determinar *Guignardia bidwellii* f. sp. *euvitis* debe haber amplificación positiva con los primers Ampel-1/ Ampel-2.

Como prueba de corroboración, se debe de secuenciar el fragmento obtenido en el ensayo de PCR punto final con los primers ITS-1/ITS-4, a partir del extracto de DNA de cultivos puros. Los casos en los que se debe de corroborar por secuenciación son:

- Detecciones en zonas reconocidas como libres del patógeno.
- Primeras detecciones en nuevos hospedantes.
- Cuando se necesite un sustento fitosanitario de mayor relevancia para la movilidad de tejido vegetal.

Los datos de secuenciación se deben de enviar al Laboratorio de Micología del CNRF para su análisis. En el Anexo 8.7 se detalla la metodología para el análisis, empleado por el Laboratorio de Micología del CNRF. En estos casos, se considera aceptada la identificación después de realizar el análisis de secuencias.

## 4. RESULTADOS DE VALIDACIÓN

Las técnicas de identificación descritas en el presente protocolo se encuentran revisadas y validadas por el Área de Validación de Protocolos (AVP) del CNRF.

### 1) Identificación Morfológica

- El presente protocolo permite la identificación de *Guignardia bidwellii*; *Phyllosticta ampelicida* mediante la caracterización morfológica y observación bajo microscopio estereoscópico de cepas puras.

### 2) Técnicas moleculares

Los parámetros de desempeño de las técnicas evaluadas cuentan con los siguientes porcentajes:

#### a) Gen endógeno

<i>Precisión: Repetibilidad</i>	100 %
<i>Precisión: Reproducibilidad</i>	100 %

#### b) PCR con Bidwell-1 / Ampel-2

<i>Selectividad/Especificidad</i>	100 %
<i>Sensibilidad</i>	95 %
<i>Precisión: Repetibilidad</i>	>88 %

<i>Precisión: Reproducibilidad</i>	88 %
<i>Límite de Detección</i>	0.1 ng/ $\mu$ L.

c) PCR con Ampel-1 / Ampel-2

<i>Selectividad/Especificidad</i>	89 %
<i>Sensibilidad</i>	100 %
<i>Precisión: Repetibilidad</i>	>90 %
<i>Precisión: Reproducibilidad</i>	90 %
<i>Límite de Detección</i>	0.1 ng/ $\mu$ L.

- El presente protocolo se limita a situación en las que no se requiera una especificidad del 100% con los oligonucleótidos Ampel-1 / Ampel-2.
- Los límites de Detección se obtuvieron a partir de controles de DNA plasmídico.

## 5. REGISTROS

Almacenar los registros y evidencias del proceso de diagnóstico de *Guignardia bidwellii* o *Phyllosticta ampellicida*.

- 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 signos 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.
- Contar con evidencia fotográfica de los signos y síntomas, aislamientos y estructuras del hongo.
- 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).

## 6. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL

**Correo:** lab.micologia@senasica.gob.mx

**Teléfono:** 01 (52) 55 5905 1000, **Ext.** 51424, 51409 y 51373.

## 7. RECONOCIMIENTO

Este protocolo fue elaborado por el Laboratorio de Micología (Lervin Hernández Ramos, Magnolia Moreno Velázquez y Nayeli Carrillo Ortiz), revisado por el Departamento de Fitopatología (María del Rocío Hernández Hernández) y editado por el Grupo DiaFi (Ana Karen Preuss Ángeles y Ariana Guadalupe Robles Zárate).

Agradecimiento a quienes participaron en la elaboración y revisión de las versiones anteriores del Protocolo: Antonio Cárcamo Rodríguez, David Bonilla López, Edith Angélica Gutiérrez Tlaque, Edith Luna Martínez, Grisel Negrete Fernández, Israel David Rivas Avilés, José Gustavo Torres Martínez, Monserrat Valdés García y Óscar Morales Galván.

## 8. REFERENCIAS

- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. Department of Plant Pathology. University of Florida: Elsevier Academic Press.
- Benson, A. D., Mark, C. K. C., Karsch-Mizrachi I., Lipman, J. D., Ostell, J., and Sayers, W. E. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research* 41: 36-42.
- Cenis, L. J. (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, 20: 2380.
- Department of Primary Industries. (2013). *Exotic Pest Alert: Black rot of grapes*. Government New South Wales, Australia.
- Gobierno de España. (2014). *Guía de gestión integrada de plagas para el cultivo de la uva de transformación*. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Madrid, España.
- Hanlin, R. T. (2001). *Illustrated genera of Ascomycetes*. (5<sup>th</sup> ed). Volume I. The American Phytopathological Society. APS Press. Minnesota, USA.
- Liberato, J. R. and Shivas, R. (2006). Black rot of grape (*Guignardia bidwellii*). Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/305348263\\_Black\\_rot\\_of\\_grape\\_Guignardia\\_bidwellii](https://www.researchgate.net/publication/305348263_Black_rot_of_grape_Guignardia_bidwellii)
- Pezet, R. and Jermini M. (1989). *Le Black rot de la vigne: Symptomes, epidemiologie et lutte*. *Revue Suisse Viticulture Arboriculture Horticulture* 21(1): 27-34.
- Ramsdell, D. C. and Millholland, R. D. (1988). *Black rot*. Compendium of Grape Diseases, APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, 15- 17.

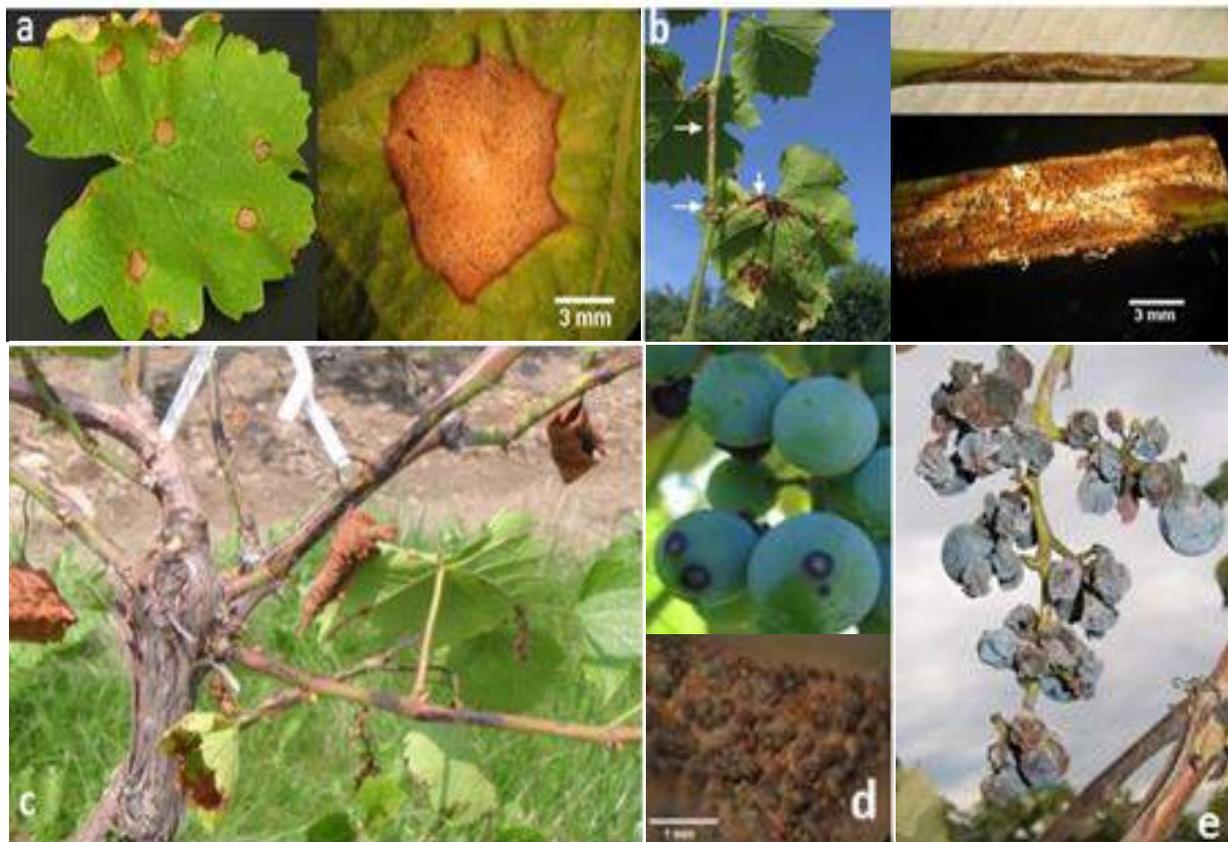
- Rego, C., Nascimento, T., Cabral, A. and Reis, P. (2012). *Caracterização fenotípica, molecular e patogenicidade de isolados de Guignardia bidwellii*. Cuaderno Técnico nº1: Black rot. Sustinia: 4-11.
- Robert, V., Stegehuis, G. and Stalpers, J. (2005). The MycoBank engine and related databases. Recuperado de: [http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycoBankNr\\_=119997](http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycoBankNr_=119997)
- SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2015). *Podredumbre negra de la vid Guignardia bidwellii*. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Dirección General de Sanidad Vegetal.
- Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México D. F. Ficha Técnica No. 63. pp. 19.
- SIAP. (2017). Avance de Siembras y Cosechas Resumen Nacional por Cultivo. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Recuperado de: [http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do)
- SPHDS. (2016). *Diagnostic Protocol for Guignardia bidwellii (Black rot on grapevine)*. NDP 13. V1.2, 20.
- White, J. T., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic Press. 315-322.
- Wicht, B., Petrini, O., Jermini, M., Gessler, C., Lodovico, G. and Broggin, A. (2012). *Molecular, proteomic and morphological characterization of the ascomycete Guignardia bidwellii, agent of grape black rot: a polyphasic approach to fungal identification*. Mycology 104 (5): 1036-1045.
- Wikee, S., Lombard, L., Nakashima, C., Motohashi, K., Chukeatirote, E., Cheewangkoon, R., McKenzie, E., Hyde, K., and Crous P. W. (2013). *A phylogenetic re-evaluation of Phyllosticta (Botryosphaerales)*. Studies in Mycology 76: 1–29.
- Zhang, K., Zhang, N. and Cai, L. (2013). *Typification and phylogenetic study of Phyllosticta ampellicida and P. vaccinii*. Mycologia 105(4):1050-1042.

#### **Forma recomendada de citar:**

- SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2018). Protocolo de Diagnóstico: *Guignardia bidwellii*, Anamorfo: *Phyllosticta ampellicida* (Podrición negra de la vid) [Versión 2.0]. Tecamac, México: Autor.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Signos y síntomas



**Figura 6. Síntomas en vid.** a. Lesiones en hojas, con margen café rojizo y fructificaciones (picnidios) del hongo; b. Lesiones en peciolo, alargadas con picnidios; c. Lesiones en tallo, alargadas de apariencia hundida y color negro; d. Lesiones en fruto, color café chocolate; e. Racimo con frutos momificados (Créditos: Sosnowski, W. Fuente: SPHDS, 2016).

## 9.2 Ciclo de la enfermedad

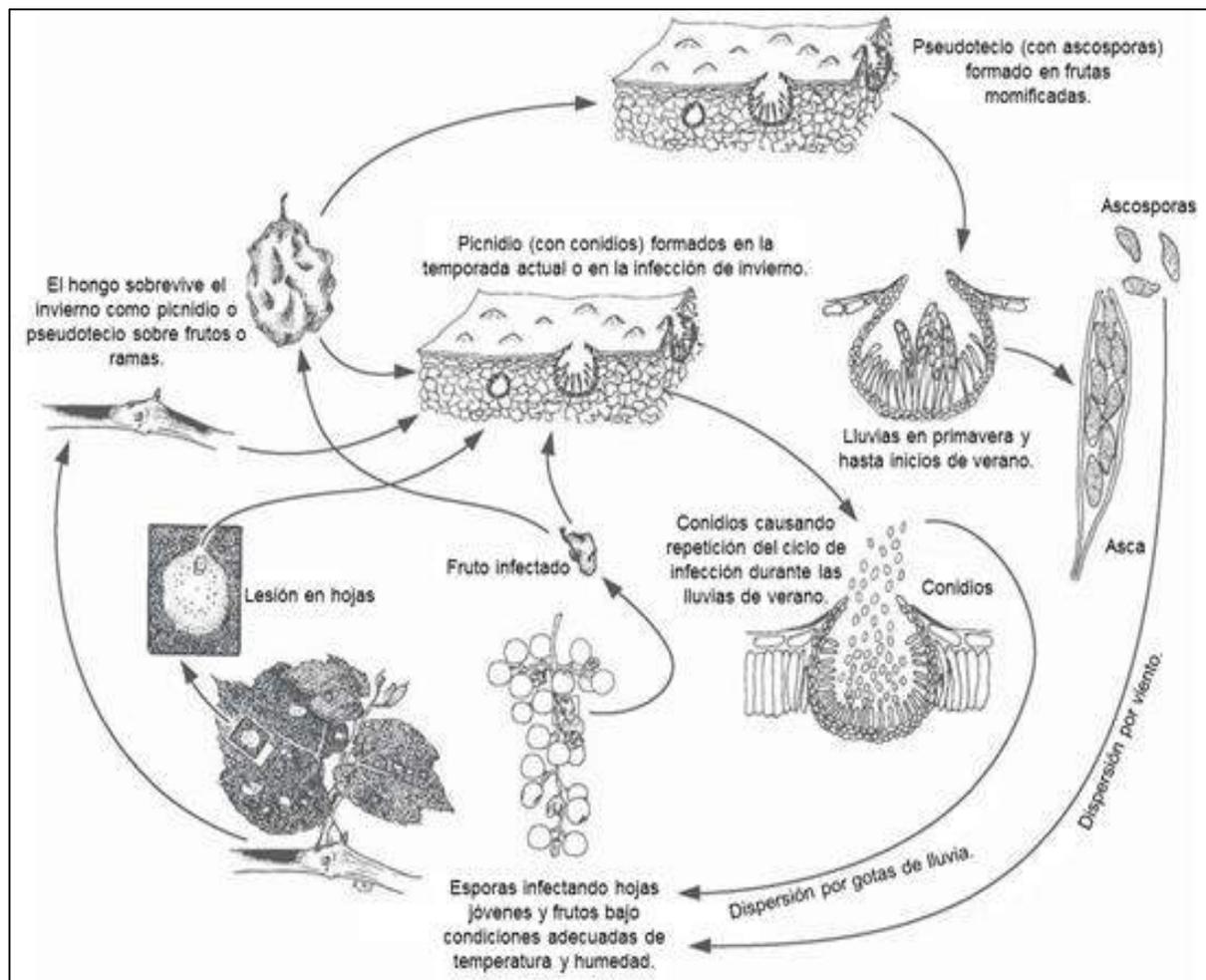


Figura 7. Ciclo biológico de *Guignardia bidwellii* (*Phyllosticta ampelica*) (Fuente: SPHDS, 2016).

## 9.3 Elaboración de montajes

### 9.3.1 Preparaciones temporales con cubreobjetos

- 1) Partir de tejido vegetal con signos del hongo, o de cultivos puros, colocar el tejido vegetal o estructuras en un portaobjeto o caja Petri de cristal, sobre la platina del microscopio estereoscópico para observar a detalle el área a seccionar o montar en laminillas.
- 2) Realizar cortes de material vegetal con estructuras del hongo, con navaja de bisturí o con navaja de afeitar, de un grosor menor a 0.5 mm o lo suficientemente delgado para dejar pasar la luz a través del tejido; también se puede tomar directamente un fragmento de micelio o las estructuras del hongo a partir del tejido vegetal o cultivo del hongo
- 3) Colocar los cortes o estructuras del hongo sobre un portaobjetos con la ayuda de una aguja de disección o de un alfiler entomológico. Adicionar una gota de medio de montaje (Anexo 8.4), hidratar completamente el tejido y evitar formación de burbujas de aire.
- 4) Cubrir la gota con un cubreobjetos y presionar ligeramente para que se distribuya la gota y en su caso salga el líquido excedente, secar con papel absorbente, cuidando que no se pierda el espécimen. Calentar por segundos para eliminar burbujas de aire. Observar el espécimen con microscopio compuesto. En caso de que no se aprecien las estructuras, deberá realizarse otra preparación, cuidando de que los cortes sean más finos.

### 9.3.2 Preparaciones temporales con cinta adhesiva

- 1) Colocar en un portaobjetos una gota de medio de montaje (Anexo 8.4).
- 2) Con un pedazo de cinta adhesiva transparente tocar con delicadeza y en forma superficial el área del tejido vegetal, o del medio de cultivo, con crecimiento de hongos para obtener las estructuras del mismo.
- 3) Pegar la cinta sobre el portaobjetos cuidando que las estructuras queden dentro de la gota.
- 4) Observar con un microscopio compuesto.

### 9.3.3 Preparaciones permanentes

- 1) Colocar una gota de medio de montaje (Anexo 8.4) sobre un portaobjetos.
- 2) Adicionar las estructuras del hongo dentro de la gota con ayuda de una aguja de disección o de un alfiler entomológico. Eliminar las burbujas que se formen con una aguja o calentado el portaobjetos.

- 3) Con ayuda de un sacabocados, formar un anillo de parafina alrededor de la gota. Para esto, calentar el extremo del sacabocados en un mechero e introducirlo en parafina sólida e inmediatamente colocarlo alrededor de la gota.

**Nota:** el diámetro del sacabocados debe ser mayor al de la gota.

- 4) Colocar un cubreobjetos sobre el anillo de parafina y calentar hasta que el anillo se derrita, cuidando que no queden burbujas de aire en la gota ni en la parafina.
- 5) Dejar enfriar y observar con microscopio compuesto.

## 9.4 Medios de montaje

### Lactofenol

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 una cantidad mínima de colorante y 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.

### Agua- glicerina

Glicerina	50 mL
Agua destilada	50 mL

Consiste en mezclar 50 partes de agua destilada y 50 partes de glicerina. Se puede 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 (KOH)**

Hidróxido de potasio	40 g
Creatina	0.3 g
Agua destilada	100 mL

Disolver en 75 mL de agua el KOH, 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.

## **9.5 Medios de cultivo**

A continuación, se señalan los medios de cultivo que de acuerdo con el SPHDS (2016) han permitido un óptimo desarrollo *in vitro* de *Phyllosticta ampellicida*.

### **Papa Dextrosa Agar- fuerza mediana (1/2 PDA)**

Papa Dextrosa Agar	9.8 g
Bacto Agar (agarosa granulada)	3.5 g
Agua destilada	500 mL

Procedimiento: mezclar los ingredientes en un matraz Erlenmeyer con 1 L y disolver con agitador magnético. Meter a autoclave a 121 °C por 15 minutos, vaciar en cajas Petri y dejar solidificar.

### **Extracto de Malta Agar (Malt Extrac Agar =MEA)**

Extracto de malta Agar	16.8 g
Agua destilada	500 mL

Procedimiento: mezclar los ingredientes en un matraz Erlenmeyer de 1 L, meter a autoclave a 121 °C por 15 minutos vaciar en cajas Petri y dejar solidificar.

### **Harina de Avena Agar (Oatmeal Agar =OA)**

Hojuelas de avena	20 g
Bacto Agar (agarosa granulada)	7.5 g
Agua destilada	500 mL

Procedimiento: moler las hojuelas de avena en licuadora. Mezclar con el resto de los ingredientes en un matraz Erlenmeyer de 1 L. Meter a autoclave a 121 °C por 15 minutos, vaciar en cajas Petri y dejar solidificar.

También se obtienen resultados adecuados con los tres medios preparados como se describe a continuación:

### **Papa Dextrosa Agar (Potato Dextrose Agar= PDA)**

Papa pelada y partida en cubos pequeños	100 g
Dextrosa	7.5 g
Agar nutritivo	9.0 g
Agua destilada	500 mL

Procedimiento: colocar los trozos de papa en un matraz Erlenmeyer con el agua y meter a autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Filtrar el agua de cocción y aforar a 500 mL. Agregar el agar y dextrosa, disolver con agitador magnético. Meter a autoclave a 121 °C por 20 minutos. Dejar enfriar, vaciar en cajas Petri y dejar solidificar.

### **Extracto de Malta Agar (Malt Extrac Agar =MEA)**

Extracto de malta	9.0 g
Agar	10.0 g
Agua destilada	500 mL

Procedimiento: mezclar los ingredientes en un matraz Erlenmeyer de 1 L y meter a autoclave a 121 °C por 15 minutos. Vaciar en cajas Petri y dejar solidificar.

### **Harina de Avena Agar (Oatmeal Agar =OA)**

Hojuelas de avena	10 g
Agar nutritivo	7.5 g
Agua destilada	500 mL

Procedimiento: remojar las hojuelas en 500 mL de agua durante al menos 2 horas y calentar moviendo constantemente evitando que se derrame. Filtrar el agua y aforar a 500 mL. Mezclar con el resto de los ingredientes en un matraz Erlenmeyer de 1 L. Meter a autoclave a 121 °C por 15 minutos. Vaciar en cajas Petri y dejar que solidifiquen.

## **9.7 Corroboración mediante Filogenia Molecular**

Para la secuenciación y análisis filogenético se deben utilizar cualquiera de los siguientes genes: la región ITS del rDNA, el gen Factor de Elongación 1 Alfa (TEF-1 $\alpha$ ), el gen de actina (Act) o el gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH). De acuerdo a Wikee et al., (2013) el análisis multilocus de los cuatro genes provee de un análisis filogenético robusto, sin embargo, en la práctica el análisis de un solo gen (especialmente la región ITS) es suficiente para la diferenciación de especies del género *Phyllosticta*. El Laboratorio de Micología del CNRF se basa en el análisis filogenético de la región ITS del rDNA amplificado con los primers ITS-1/ITS-4.

- 1) Los productos de PCR deberán ser enviados a secuenciar, siguiendo las especificaciones para el envío de muestras de la institución a la que se solicite el servicio.
- 2) Una vez obtenidas las secuencias ingrese a la herramienta de alineamiento Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Inserte la secuencia de interés y realice el alineamiento con los parámetros predeterminados.

**Nota:** el ensayo de control endógeno amplifica una región de aproximadamente 650 pb para *Phyllosticta*. Dentro de ésta región hibridan los primers Bidwell-1, Ampel-1 y Ampel-2; los cuales se unen a SNP's (Single Nucleotide Polymorphism) que permiten la identificación del patógeno. La secuencia mínima para realizar el análisis filogenético es la región de 175 pb, flanqueada por Bidwell-1 y Ampel-2.

- 3) Una vez realizado el alineamiento (Figura 8) revisar cuidadosamente las especies que aparecen en la parte superior de la tabla, revisar el porcentaje de cobertura e identidad (los porcentajes siempre deberán tender hacia el 100%), verificar el valor de E, el cual, representa el valor estadístico generado por BLAST a partir del alineamiento al azar de la secuencia de interés en la base de datos, dicho valor siempre deberá tender a cero (Benson et al., 2013); verifique también quien depositó las secuencias. Es importante mencionar que en esta base de datos existen muchas secuencias que han sido incorrectamente identificadas, por lo que el resultado obtenido (aún con 100% de cobertura e identidad) en ocasiones no resulta totalmente concluyente.

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Guignardia bidwellii strain ATCC 200578 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed s</a>	754	754	100%	0.0	100%	<a href="#">KC193586.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Guignardia bidwellii isolate Pensvl6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed space</a>	749	749	100%	0.0	99%	<a href="#">KF851315.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Guignardia bidwellii isolate Pensvl2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed space</a>	749	749	100%	0.0	99%	<a href="#">KF851314.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Guignardia bidwellii isolate G1.2 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene</a>	743	743	100%	0.0	99%	<a href="#">KF015253.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Guignardia bidwellii isolate Sb22.6 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA ge</a>	743	743	100%	0.0	99%	<a href="#">HM008728.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phyllosticta parthenocissi CBS 111645 ITS region: from TYPE material</a>	710	710	100%	0.0	98%	<a href="#">NR_147322.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phyllosticta ampelicida culture-collection CBS:111645 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal</a>	710	710	100%	0.0	98%	<a href="#">JN692542.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Guignardia bidwellii strain CBS111645 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed sp</a>	710	710	100%	0.0	98%	<a href="#">FJ824766.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phyllosticta parthenocissi strain CBS 111645 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcrib</a>	710	710	100%	0.0	98%	<a href="#">EU683672.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phyllosticta partricuspidaeae NBRC 9466 ITS region: from TYPE material</a>	708	708	100%	0.0	98%	<a href="#">NR_147355.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phyllosticta partricuspidaeae strain GZAAS6.1227 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal trans</a>	708	708	100%	0.0	98%	<a href="#">KR025418.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phyllosticta partricuspidaeae strain GZAAS6.1226 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal trans</a>	708	708	100%	0.0	98%	<a href="#">KR025417.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Guignardia bidwellii genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and 28S rRNA, partial and complete sequence, isolate</a>	708	708	100%	0.0	98%	<a href="#">AB454268.1</a>

**Figura 8. Alineamiento de secuencias utilizando Nucleotide BLAST.** De una muestra sospechosa a *Phyllosticta ampelicida*.

Debido a que existen al menos 50 especies del género *Guignardia/Phyllosticta* bien tipificadas a nivel global, es posible realizar un análisis filogenético con secuencias bien caracterizadas para determinar con un 100% de exactitud la identidad de *Guignardia bidwellii* f. sp. *euvitis*.

**Nota:** realice este procedimiento opcional únicamente si requiere determinar la *forma specialis* o corroborar los resultados obtenidos en BLAST.

Dado que en grupos de especies con un alto grado de parentesco molecular la diferenciación entre especies, formas especiales o razas reside en un número limitado de inserciones y deleciones (INDELS) y polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), es conveniente realizar un análisis filogenético para determinar con exactitud la identidad de las muestras de interés. La reconstrucción filogenética debe partir de secuencias bien caracterizadas de especies tipo y procedentes de una fuente fiable, se recomienda utilizar las secuencias de referencia publicadas por Wicht et al. (2012); Wikee, Lombard y Nakashima (2013) para la región ITS rDNA; a ellas agregar nuestras secuencias de la muestra de interés.

**Nota:** las secuencias de referencias para *Guignardia bidwellii* f. sp. *euvitis* son: KF851291, KF851289 y HM008727.

- 4) El alineamiento múltiple de secuencias y la posterior construcción de árboles filogenéticos se realizan con los Softwares BioEdit Sequence Alignment Editor v7.2.5 y MEGA7, (otros softwares pueden ser utilizados para el mismo propósito). En el alineamiento múltiple de secuencias incluir tanto la secuencia del primer forward como del primer reverse en su inverso complementario. Utilizar el algoritmo ClustalW para el alineamiento de todas las secuencias. Para la reconstrucción filogenética es recomendable utilizar un método que esté basado en distancias génicas (Neighbor-joining NJ) y otro que esté basado en métodos probabilísticos (Maximum likelihood o inferencia Bayesiana).
- 5) El árbol filogenético obtenido aquí puede ser confirmado mediante el análisis de los INDELS y SNPs observados directamente en el alineamiento múltiple de secuencias (Figura 9). Para ejemplificar la secuencia de la muestra de interés fue analizada mediante el método de Máxima Verosimilitud (Maximum likelihood), quedando agrupada en el clado junto con las secuencias de referencia de *G. bidwellii* f. sp. *euvitis*, *G. bidwellii* f. sp. *parthenocissi* y *Phyllosticta parthenocissi*; y específicamente al grupo de *G. bidwellii* f. sp. *euvitis* (Figura 10). Este resultado se confirma al observar los INDELS y SNP en el alineamiento múltiple de secuencias.

Nuevamente el resultado final debe estar basado en conjunto con lo observado en la caracterización morfológica, ya que la secuenciación y filogenia molecular tampoco tienen la

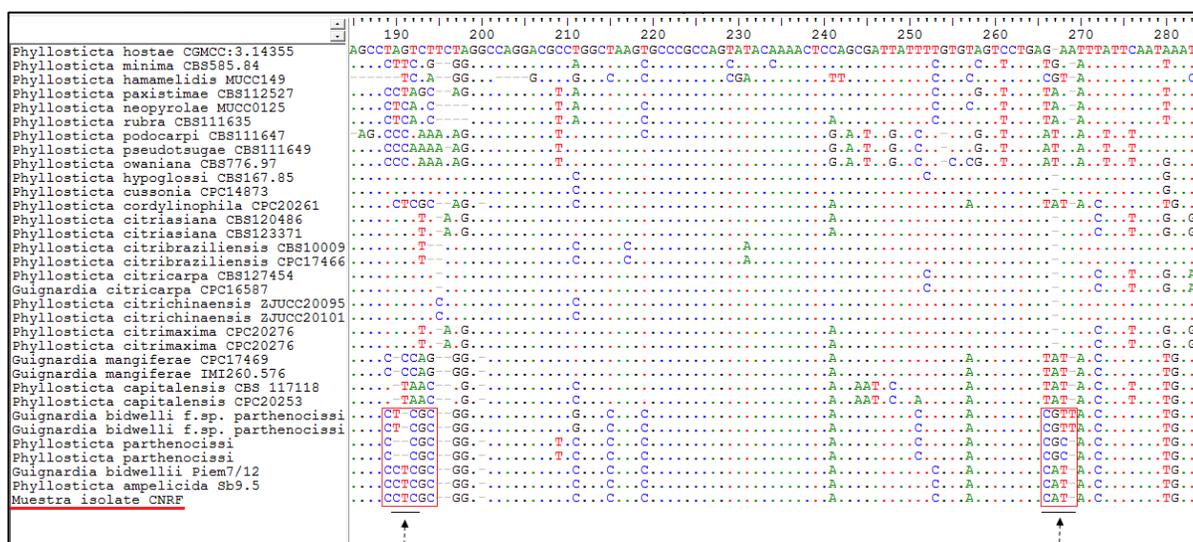
capacidad para diferenciar entre el Teleomorfo *Guignardia bidwellii* y el Anamorfo *Phyllosticta ampelicida*.

### 9.7.1 Interpretación de resultados

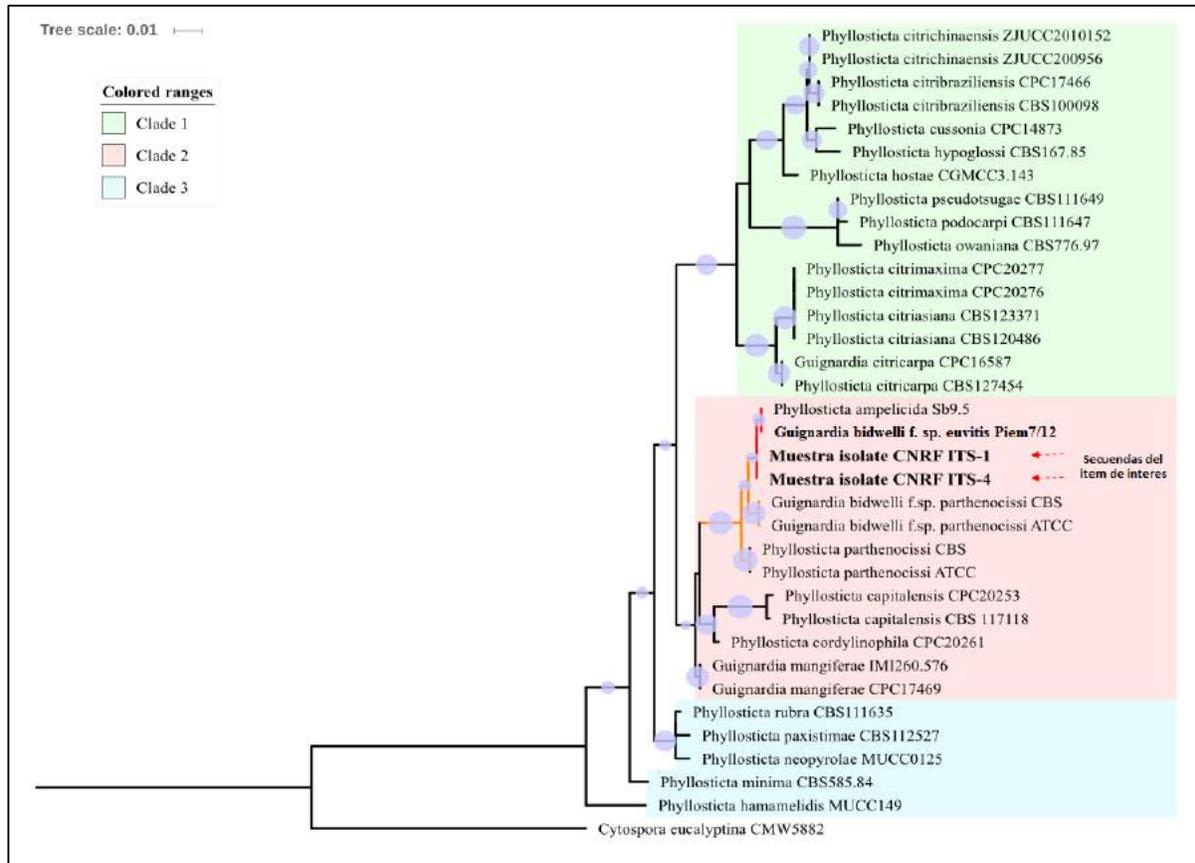
El resultado es positivo cuando la secuencia de la muestra quede agrupada exactamente en el mismo clado que las secuencias de referencia KF851291, KF851289 y HM008727.

El resultado es negativo cuando las secuencias de la muestra queden agrupadas en un clado distinto a las de las secuencias de referencia. En este caso la identidad del organismo es establecida en base al clado que se agrupe la secuencia de la muestra y debe registrarse en el resultado final.

El resultado final debe estar basado en conjunto con lo observado en la caracterización morfológica, ya que la secuenciación y filogenia molecular tampoco tienen la capacidad para diferenciar entre el teleomorfo *Guignardia bidwellii* y el anamorfo *Phyllosticta ampelicida*.



**Figura 9. Alineamiento múltiple de secuencias.** Se utilizaron la secuencias de la región ITS rDNA de 22 registros pertenecientes a especies del género *Guignardia* utilizando el algoritmo ClustalW, incluyendo además la muestra de interés denominado aislamiento CNRF. Obsérvese los INDELS y SNP's característicos de *G. bidwellii* f. sp. *euvtis* en una región parcial de 100 pb de la región amplificada por los primers ITS-1 e ITS-4.



**Figura 10. Filogenia molecular.** Inferida de una porción de la región ITS rDNA mediante el Modelo de Máxima Verosimilitud (Maximum likelihood) con 1000 réplicas soporte (Bootstrap) incluyendo secuencias de 22 especies del género *Guignardia/Phyllosticta* más la muestra denominada aislamiento CNRF. Se utilizó a *Cytospora eucalyptina* como nodo raíz externo al grupo.