

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA

Área de Diagnóstico Fitosanitario Laboratorio de Micología

Protocolo de Diagnóstico:

Verticillium dahliae

(Marchitez por *Verticillium*)

Tecámac, Estado de México, Julio 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 *Verticillium dahliae*. 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

1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO	1
2. INTRODUCCIÓN	1
2.1 Información sobre la plaga.....	1
2.2 Información taxonómica	2
2.3 Flujo de trabajo	3
3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN	4
3.1 Aislamiento e incubación.....	4
3.2 En medio de cultivo NP-10.....	4
3.2.1 Interpretación de resultados	5
3.3 En papel secante y congelación.....	5
3.3.1 Interpretación de resultados	6
3.4 Descripción morfométrica.....	6
3.5 Identificación de la plaga	8
4. REGISTROS	9
5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL.....	9
6. RECONOCIMIENTO	9
7. REFERENCIAS	10
8. ANEXOS.....	11
8.1 Ciclo de vida	11
8.2 Descripción morfológica de especies de <i>Verticillium</i>	12
8.2 Medio de cultivo	16
8.3 Elaboración de montajes	17
8.3.1 Preparaciones temporales con cubreobjetos	17
8.3.2 Preparaciones temporales con cinta adhesiva	17
8.3.3 Preparaciones permanentes	18

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de <i>V. dahliae</i>	7
Figura 2. Microesclerocios de <i>Verticillium dahliae</i>	7
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Verticillium dahliae</i>	11
Figura 4. Descripción morfológica de <i>V. dahliae</i>	12
Figura 5. Descripción morfológica de <i>V. alboatrum</i>	13
Figura 6. Descripción morfológica de <i>V. tricorpus</i>	14

III. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción morfológica de especies de <i>Verticillium</i> patógenas de plantas.....	15
Cuadro 2. Componentes del recipiente A medio NP-10	16
Cuadro 3. Componentes del recipiente B medio NP-10	16
Cuadro 4. Componentes del recipiente A+B medio NP-10	16

1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO

Describir la metodología aplicada en el Laboratorio de Micología del Centro Nacional de Referencia para la detección e identificación de *Verticillium dahliae* mediante caracterización morfométrica, a partir de semilla de espinaca.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Información sobre la plaga

Verticillium dahliae tiene un amplio rango de hospedantes, entre los que se encuentran más de 400 especies de plantas leñosas, herbáceas, anuales y perennes. La marchitez por *Verticillium* es favorecida por suelos con alto contenido de humedad y temperatura en un intervalo de entre 21 °C y 27 °C, condiciones que permiten al microsclerocio (estructura de resistencia) persistir por largos periodos hasta ser estimulado por exudados en la raíz y penetrar en ésta (Anexo 8.1). Los síntomas más comunes son clorosis y necrosis foliar prematura, y la decoloración en raíces y tallos, éstos pueden variar dependiendo del hospedante que infecte (Berlanger y Powelson, 2000).

Este hongo se encuentra distribuido en casi todos los continentes: quince países en África, diez países en América, catorce países en Asia, veintinueve países en Europa y en la mayoría de los estados de Oceanía. En México se encuentra como plaga no cuarentenada reglamentada y está presente solo en algunas regiones; sin embargo, debido a su amplio espectro de hospedantes y a sus estructuras de resistencia, representa una gran problemática fitosanitaria (SENASICA, s.f.).

Snyder y Wilhelm (1962) reportaron la transmisión de *Verticillium dahliae* a través de semilla de espinaca, representando una fuente de dispersión e introducción del patógeno hacia nuevas áreas durante la siembra y establecimiento del cultivo. California produce cerca del 78% de la semilla producida en Estados Unidos de Norteamérica y México es uno de los países importadores, siendo el único país que requiere la certificación de la semilla de espinaca con un umbral no mayor al 10% de semilla infectada por *Verticillium dahliae*.

2.2 Información taxonómica

Nombre científico: *Verticillium dahliae* Kleb, 1913

Nombre común: Marchitez por *Verticillium* (español)

Marchitez de la espinaca (español)

Verticilosis (español)

Verticillium wilt (inglés)

Sinónimos: *Verticillium albo-atrum* var. *dahliae* Kleb, 1950

Verticillium tracheiphilum Curzi, 1925

Verticillium ovatum Berk y Jacks, 1926

Posición taxonómica:

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Glomerellales

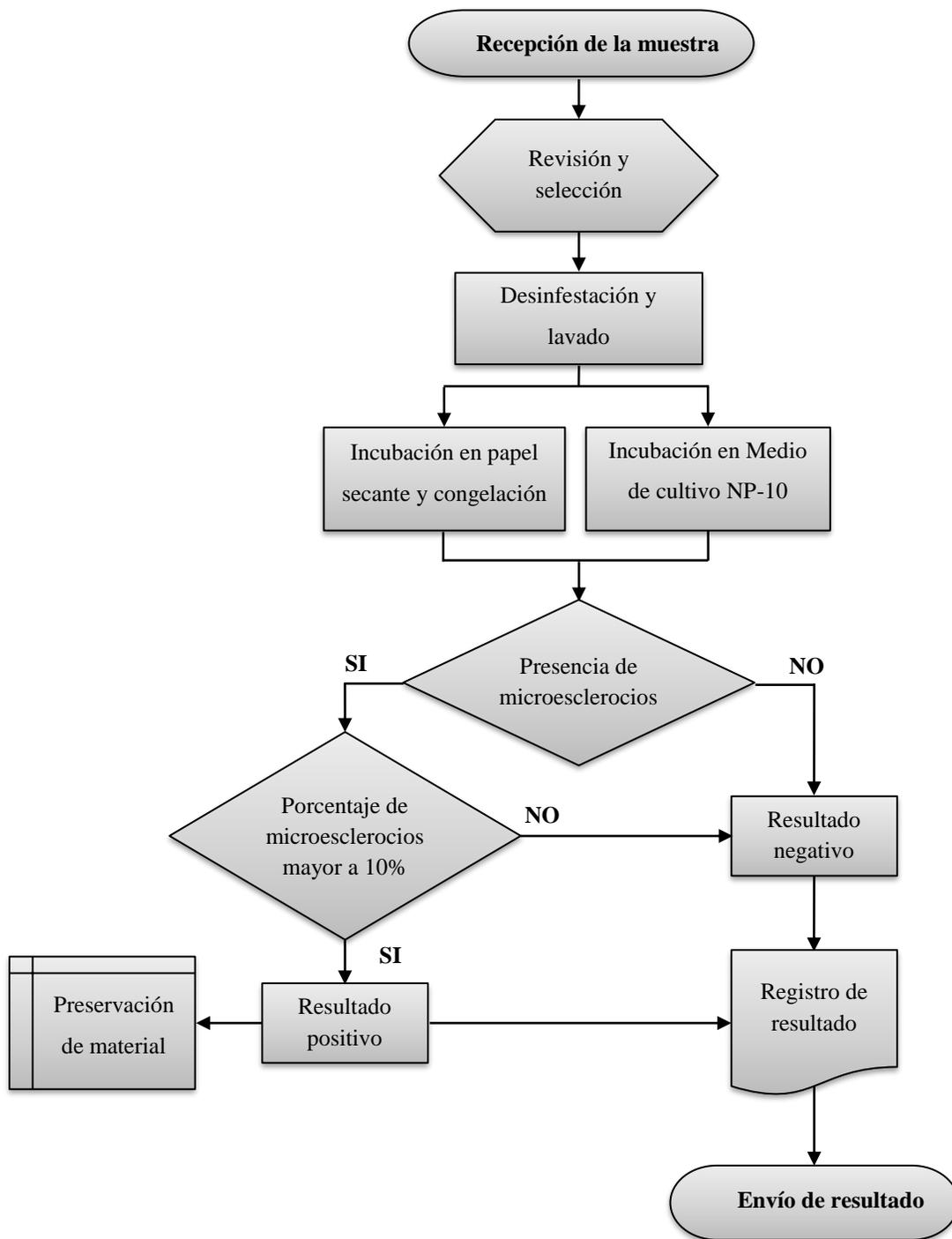
Familia: Plectosphaerellaceae

Género: *Verticillium*

Especie: *Verticillium dahliae*

(Robert, Stegehuis y Stalpers, 2005)

2.3 Flujo de trabajo



3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

3.1 Aislamiento e incubación

De acuerdo con la Asociación Internacional de Ensayos de Semillas (ISTA, por sus siglas en inglés International Seed Testing Association, 2018), para el aislamiento y diagnóstico de *Verticillium dahliae* se puede utilizar la técnica de incubación en medio selectivo NP-10 agar cuando la semilla no ha recibido un tratamiento (NSHS, 2012 a).

Si la semilla ha recibido algún tipo de tratamiento, ya sea de naturaleza física, biológica o química, es recomendable utilizar la técnica de incubación en papel secante y congelación; ya que los fungicidas pueden reaccionar con los componentes del medio de cultivo y propiciar una alteración en los resultados (NSHS, 2012 b). Algunas veces es difícil saber si la semilla ha recibido algún tratamiento o no; por lo que para fines prácticos, el Laboratorio de Micología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria realiza los dos métodos concertadamente, utilizando la mitad de las semillas para cada método.

3.2 En medio de cultivo NP-10

Basado en el protocolo NSHS (2012 a):

- 1) Desinfectar 200 semillas de espinaca sumergiéndolas en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 60 segundos con agitación constante, decantar y enjuagar tres veces con agua destilada estéril durante 1 minuto.
- 2) Colocar las semillas sobre papel secante estéril para permitir su secado aproximadamente de 1 a 2 horas.
- 3) Una vez secas, sembrar las semillas en medio de cultivo NP-10, depositando 25 semillas por caja Petri, hasta terminar con las 200 semillas, teniendo cuidado de presionar cada semilla para que quede fija en el medio de cultivo y evitar su desprendimiento.
- 4) Incubar a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 14 días, manteniendo las cajas en posición invertida durante la incubación para evitar condensación y contaminación.
- 5) Examinar con un microscopio estereoscópico cada una de las semillas a los 5, 9 y 14 días después de la siembra, en busca de crecimiento colonial y microesclerocios (3.3).

Nota: la incubación termina una vez desarrollados los microesclerocios; en caso contrario continuar la incubación hasta los 14 días.

- 6) Elaborar montajes temporales o permanentes de acuerdo con el Anexo 8.3.
- 7) Observar la disposición de los conidióforos y realizar 10 mediciones de cada estructura (conidióforos y conidios).
- 8) Comparar las mediciones con la literatura de referencia para determinar la especie.

3.2.1 Interpretación de resultados

Para determinar la presencia de *Verticillium dahliae* se deben observar colonias con microesclerocios en arreglo concéntrico en medio NP-10, con conidióforos verticilados y conidios característicos (3.4, 8.2 y Cuadro 1). Realizar el conteo de semillas con presencia de microesclerocios con un porcentaje de incidencia mayor de 10%.

Si no se detecta la presencia de microesclerocios o las estructuras no corresponden con *Verticillium dahliae*, se debe reportar el diagnóstico para esta técnica como negativo y se observa el resultado de la técnica de incubación en papel secante (3.3).

3.3 En papel secante y congelación

Basado en el protocolo NSHS (2012 b).

- 1) Desinfectar 200 semillas de espinaca sumergiéndolas en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 minuto con agitación constante, decantar y enjuagar tres veces con agua destilada estéril durante 1 minuto.
- 2) Colocar las semillas sobre papel secante estéril para permitir su secado aproximadamente una 1 a 2 horas.
- 3) Depositar 25 semillas por cámara húmeda, hasta terminar con las 200 semillas.
- 4) 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 15 libras o durante 2 horas a 160 °C con calor seco. Dejar enfriar.
- 5) Al momento de la siembra, bajo condiciones asépticas, humedecer el papel filtro de la caja Petri esterilizada con agua destilada estéril e incubar a 25 °C ± 2 °C durante 24 horas en oscuridad.

- 6) Transferir las cámaras húmedas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ en oscuridad y mantener en estas condiciones durante 24 horas para inhibir la germinación de las semillas.
- 7) Regresar a incubación a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12 días.
- 8) Examinar con un microscopio estereoscópico cada una de las semillas a los 5, 9 y 14 días después de la siembra, en busca de crecimiento colonial y microesclerocios (3.4).

Nota: la incubación termina una vez desarrollados los microesclerocios; en caso contrario continuar la incubación hasta los 14 días.
- 9) Elaborar montajes temporales o permanentes de acuerdo con el Anexo 8.3.
- 10) Realizar 10 mediciones de cada estructura (microesclerocio, conidióforos y conidios).
- 11) Comparar las mediciones con la literatura de referencia para determinar la especie.

3.3.1 Interpretación de resultados

Para determinar la presencia de *Verticillium dahliae* se deben observar microesclerocios sobre las semillas con un porcentaje de incidencia mayor a 10%, con conidióforos verticilados y conidios característicos de *V. dahliae* (3.4 y Cuadro 1).

Si no se detecta la presencia de microesclerocios o las estructuras no corresponden con *Verticillium dahliae*, se deberá reportar el diagnóstico para esta técnica como negativo.

3.4 Descripción morfológica

Para determinar la presencia de *Verticillium dahliae* se deben de identificar las siguientes características (Smith, 1965; EPPO, 2007; ISF, 2015):

- **Microesclerocios:** estructuras de sobrevivencia (Figura 1 a y b), compuestas por masas negras de células fungosas melanizadas de paredes gruesas (Figura 1 i, j y k), con un diámetro de 15-50 (-100) μm , crecen sobre las semillas infectadas y forman anillos concéntricos en medio de cultivo (Figura 2).
- **Conidióforos:** verticilados ramificados, raramente con ramificaciones secundarias, en forma de árbol, hialinos (Figura 1 d y e), con fiálides que nacen en forma de verticilos sobre el conidióforo (Figura 1 f y g), de 1-5 fiálides (generalmente 4). Fiálides retas a ligeramente curvas con un seto en la base.

- **Conidios:** hialinos, elipsoidales irregulares, sub-cilíndricos, unicelulares, raramente con un septo, nacidos individualmente en el ápice de la fiálide y a menudo agregado en cabezuelas de $2.5-8 \times 1.4-3.2 \mu\text{m}$ (Figura 1 h). Más detalles sobre su morfología ver Figura 4.

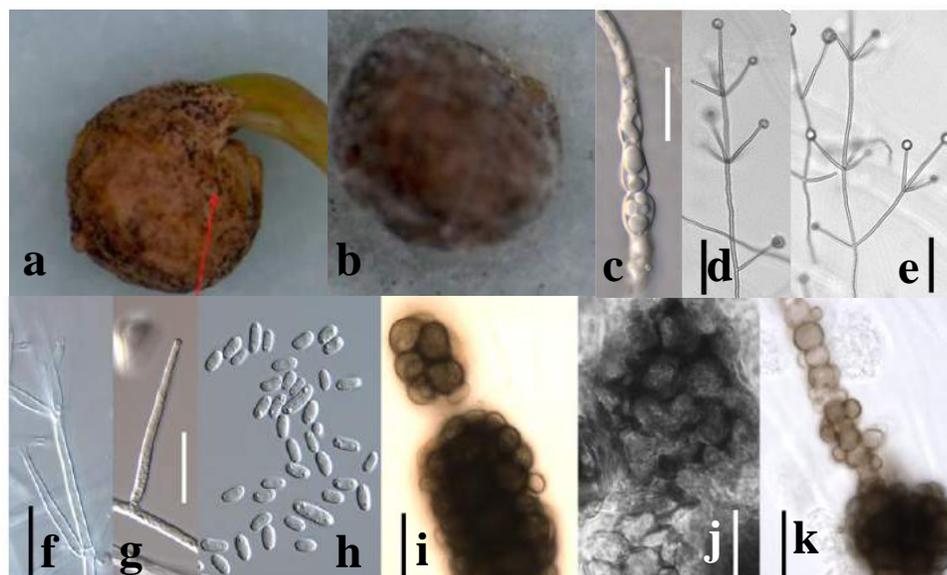


Figura 1. Estructuras de *V. dahliae*. a) Microesclerocios; b) Microesclerocios viables con conidióforos; c) micelio con células hinchadas; d) Conidióforo; e) Conidióforo ramificado; f) Fiálide verticilada; g) Fiálide solitaria; h) Conidios; i) Microesclerocio; j) Microesclerocio en tallo; k) Hifas cortas pigmentadas unidas a microesclerocio (Inderbitzin et al., 2011).



Figura 2. Microesclerocios de *Verticillium dahliae*: a) Semilla de espinaca con microesclerocios viables; b y c) Distribución de microesclerocios en anillos concéntricos, sobre medio de cultivo NP-10 (Fotografías: G. Hiddink, citado por ISTA, 2018).

Verticillium dahliae puede ser fácilmente confundido con otras especies (Cuadro 1), como *Verticillium albo-atrum*; sin embargo, ésta última no forma microesclerocios y tiene una coloración oscura en la base del conidióforo (ISF, 2015) (Figura 5).

Otras especies de *Verticillium* que pueden ser detectadas sobre semillas de espinaca son *Verticillium nigrescens*, esta especie posee conidióforos parecidos a los de *V. dahliae* y forma pequeñas clamidosporas oscuras sobre medio NP-10 agar, que son mucho más pequeñas que los microesclerocios de *V. dahliae* (Cuadro 1) (ISF, 2015).

Verticillium tricorpus, forma un pigmento amarillo en medio el medio de cultivo y microesclerocios más grandes (Figura 6) que los de *V. dahliae* que tienden a estar dispersos en un patrón aleatorio sobre medio de cultivo, mientras que las *V. dahliae* tiende a formar microesclerocios en anillos concéntricos (Figura 2) (EPPO, 2007; ISF, 2015).

Para poder distinguir *V. dahliae* de otras especies, es importante observar la presencia de microesclerocios, así como su distribución, la ausencia de pigmentación sobre el medio de cultivo NP-10 agar y las características morfométricas de sus estructuras (Cuadro 1).

Nota: si las características no corresponden a las de *V. dahliae* y requiere determinar la especie, reaslar en medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar) para comparar la morfometría con otras especies (Cuadro 1 del Anexo 8.2).

3.5 Identificación de la plaga

Para el caso de semillas de espinaca en el Módulo de Requisitos Fitosanitarios se establece una tolerancia permitida de hasta el 10% de semillas infectada con *V. dahliae*, para ello, se requiere obtener el porcentaje de semillas con presencia microesclerocios:

- 1) Examinar con un microscopio estereoscópico la presencia de microesclerocios característicos de *Verticillium dahliae*, en cada una de las semillas.
- 2) Contar el número total de semillas con microesclerocios.
- 3) Calcular el porcentaje de incidencia de la muestra.

$$\frac{\text{No. de semillas con microesclerocios}}{\text{No. total de semillas}} \times 100 = \text{Porcentaje de incidencia}$$

Nota: en semilla tratada, es importante observar la presencia de conidióforos a partir de microesclerocios para determinar que se trata de *V. dahliae*. En caso de no presentar microesclerocios ni conidióforos a partir de éstos, se considera la identificación únicamente a nivel de género.

Si el porcentaje de incidencia de semillas con microesclerocios es mayor al 10%, debe reportarse el diagnóstico como positivo a *Verticillium dahliae*, señalando la siguiente leyenda:

- “El porcentaje de semillas con presencia de microesclerocios de *Verticillium dahliae* (%) sobrepasa el límite de tolerancia permitido”.

Si el porcentaje de incidencia de semillas con microesclerocios es igual o menor a 10%, el resultado se considera como negativo, señalando el porcentaje obtenido e indicando que no rebasa el límite de tolerancia permitido, con la siguiente leyenda:

- “El porcentaje de semilla con presencia de microesclerocios de *Verticillium dahliae* es de (%), por lo que no excede el porcentaje de tolerancia permitido de 10%”.

4. REGISTROS

Almacenar los registros y evidencia del proceso de diagnóstico de *Verticillium dahliae*. La muestra debe permanecer almacenada durante al menos un mes posterior a la emisión del resultado, en caso de requerirse una corroboración de los resultados o debido a controversia de los mismos; posterior a este tiempo se inactiva y desecha.

En caso de un resultado positivo:

- Resguardar las semillas que no se utilizaron en el diagnóstico y almacenarlas en su empaque original a temperatura ambiente, debidamente identificadas.
- Para el caso de semillas con presencia de microesclerocios, colocarlas dentro de un vial a temperatura ambiente, debidamente identificadas con los datos de la muestra.
- Mantener laminillas permanentes donde se observen las características morfológicas.
- Preservar la cepa del hongo, evitar la transferencia continua de la cepa, por lo que se pueden utilizar técnicas de preservación que garanticen la conservación de la viabilidad del hongo y mantenerla en las condiciones adecuadas, debidamente identificadas con los datos del patógeno y de la muestra.

5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL

Correo: lab.micologia@senasica.gob.mx

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

6. RECONOCIMIENTO

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

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

7. REFERENCIAS

- Berlanger, I. and Powelson, M. L. 2000. *Verticillium* wilt. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-0801-01.
- EPPO. (2007). *Diagnostic Verticillium albo-atrum and V. dahliae on hop*. European and Mediterranean Plant Protection Organization. Bolletín 37, 528-535.
- Inderbitzin, P., Bostock, R. M., Usami, T. and Subbarao, K. V. (2011). Phylogenetics and Taxonomy of the Fungal Vascular Wilt Pathogen *Verticillium*, with the Descriptions of five New Species. PLoS ONE, 6 (12): e28241.
- ISF. (2015). Methods for detection of *Verticillium dahliae* on spinach seed. Version 1.0. International Seed Federation.
- ISTA (2018). International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Association. Bassersdorf, Switzerland. Available online: <https://www.seedtest.org/en/home.html>
- ISTA (2018a). 7-032: Detection of *Verticillium dahliae* on *Spinacia oleracea* (spinach) seed. International Seed Testing Association.
- NSHS (2012a). Lcb 4.2 *Verticillium dahliae*-NP-10 agar. Versión 1.0
- NSHS (2012b). Lcb 4.1 *Verticillium dahliae*-Freeze blotter. Versión 1.0
- Robert, V., Stegehuis, G. and Stalpers, J. (2005). The MycoBank engine and related databases. Recuperado de: <http://www.mycobank.org/MB/196942>
- SENASICA. (s.f.). Ficha técnica. Marchitez por *Verticillium*. *Verticillium dahliae* Klebahn.
- Smith, H. C. (1965). The morphology of *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae*, and *V. tricorpus*. *New Zealand Journal of Agriculture Research*. Plant Diseases Division, Department of Scientific and Industrial Research, Lincoln. 8: 450-78.
- Snyder, W. C., and Wilhelm, S. (1962). Seed transmission of *Verticillium* wilt of spinach *Phytopathology* 52:365.

Forma recomendada de citar:

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2018). Protocolo de Diagnóstico: *Verticillium dahliae* (Marchitez por *Verticillium*) [Versión 1.0]. Tecámac, México: Autor.

8. ANEXOS

8.1 Ciclo de vida

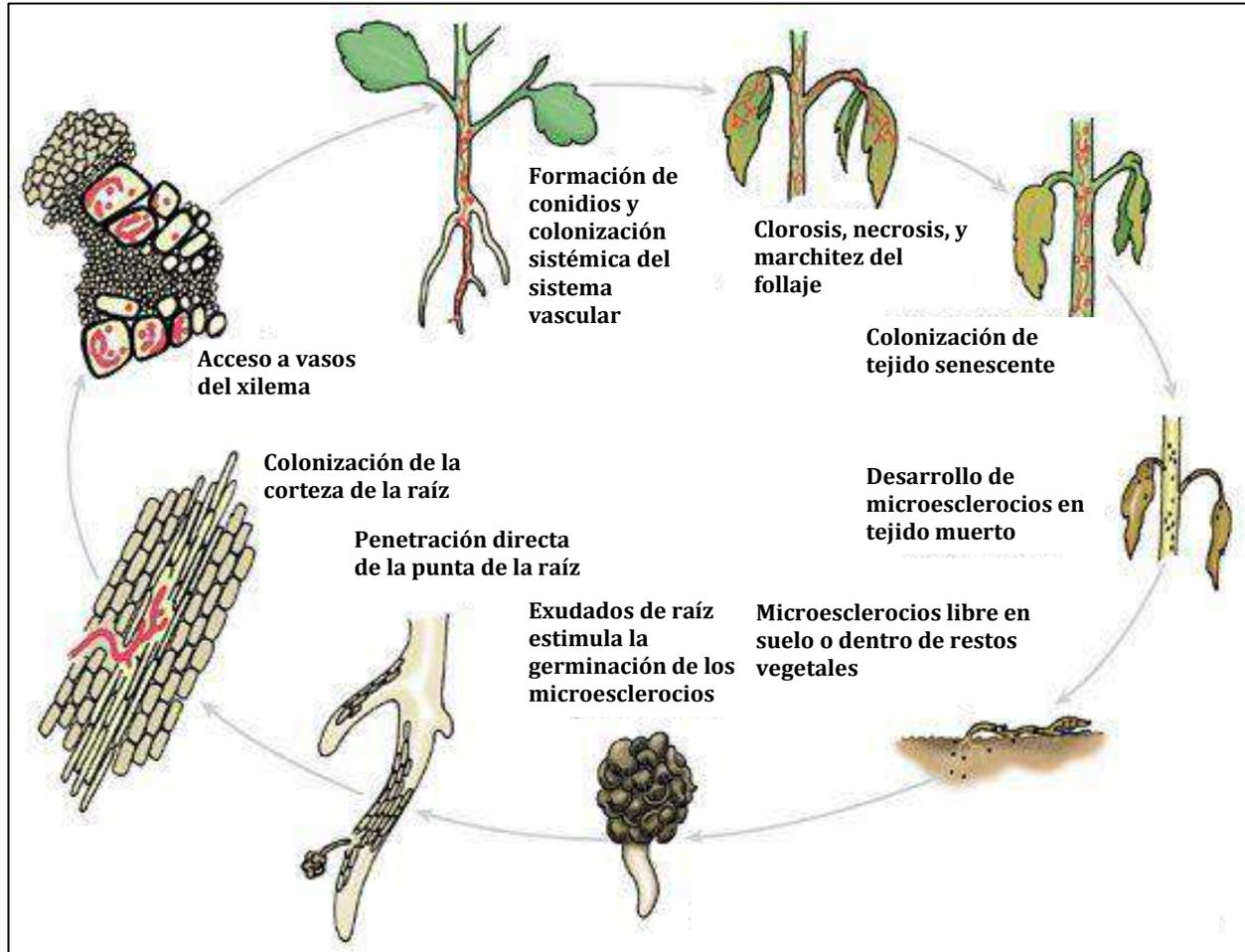


Figura 3. Ciclo de vida de *Verticillium dahliae*. Imagen original: Berlangier y Powelson, 2000.

8.2 Descripción morfológica de especies de *Verticillium*

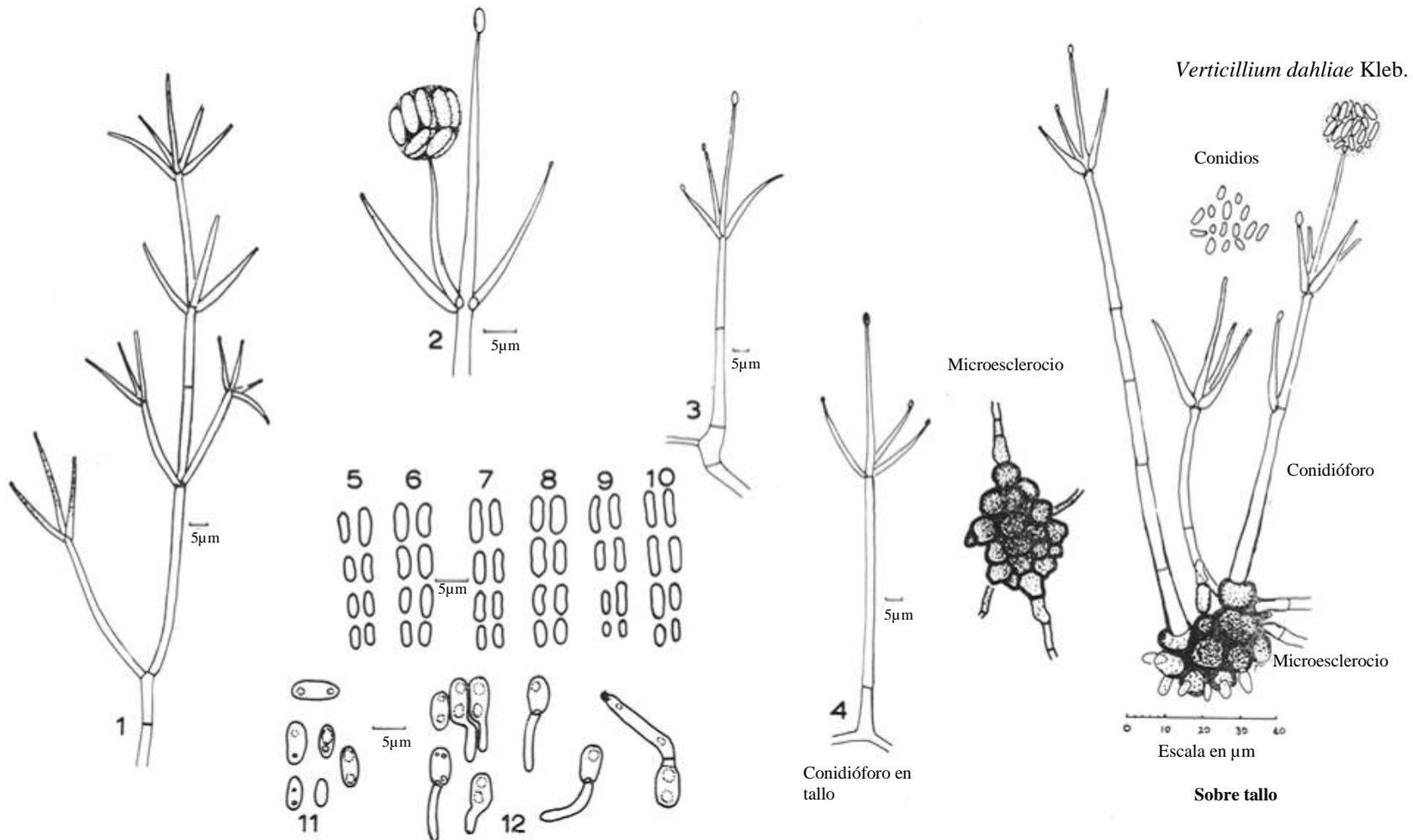


Figura 4. Descripción morfológica de *V. dahliae*. 1) Conidióforos desarrollados en micelio aéreo; 2) Verticilos, fiálides y conidios agrupados. 3 y 4) Conidióforos desarrollados en epidermis de tallo; 5-10) Conidios montados en lactofenol; 11) Conidios montados en agua; 12) Conidios germinados después de 10 horas en agua; dibujos restantes: microesclerocios, conidióforos, y conidios en tejido de tallo. Tomado y modificado de Smith (1965).

Verticillium tricorpus Isaac.

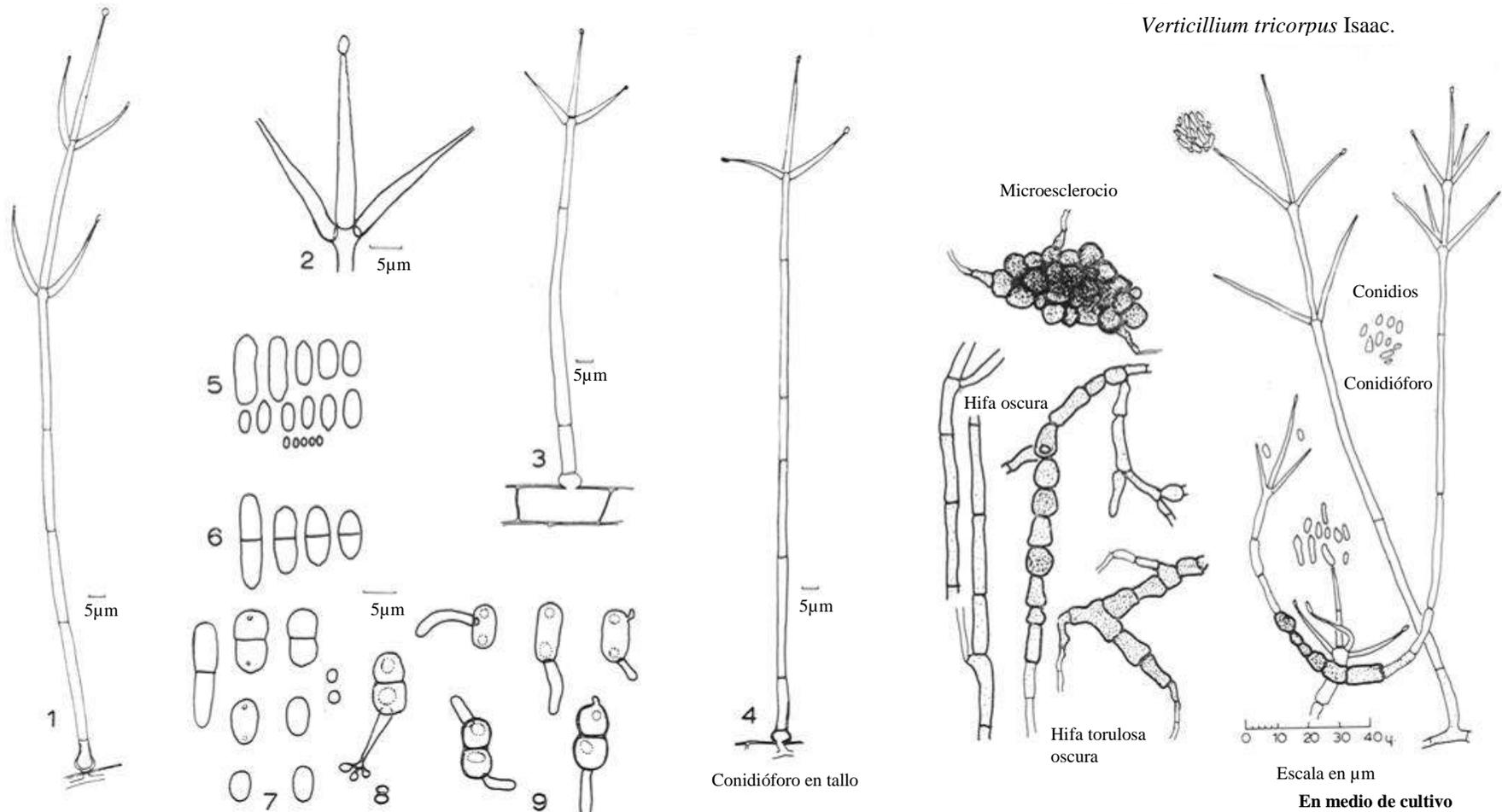


Figura 6. Descripción morfológica de *V. tricorpus*. 1-4) Conidióforos de células epidérmicas; 5) Conidios primarios y secundarios no septados; 6) Conidios con un septo (montados en lactofenol); 7) Conidios después de 30 minutos en agua; 8) Conidios septados que germina en el agua para formar fiálide ramificada y conidios secundarios; 9) Conidios germinados después de 10 horas en agua; dibujos restantes de microesclerocios, micelio toruloso y oscuros, conidióforos y conidios en medio de cultivo. Tomado y modificado de Smith (1965).

Cuadro 1. Descripción morfológica de especies de *Verticillium* patógenas de plantas (EPPO, 2007)

Características	<i>V. dahliae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>V. tricorpus</i>	<i>V. nigrescens</i>	<i>V. nubilum</i>	<i>V. theobromae</i>
Micelio						
Color del micelio	Negro	Negro grisáceo	Negro dorado	Negro pardusco	Negro pardusco	Negro grisáceo
Sectores hialinos	+	+	+	-	+	-
Micelio en reposo	-	3-7	3.5-7	-	-	2-3.5
Microesclerocios (µm)	15-50 (-100)	-	60-85	-	-	-
Clamidosporas	-	-	7.5-11	5.5-8 (-10)	8.5-17	-
Conidióforos						
Color	Hialino	Hialino con la base hinchada negra	Hialino	Hialino	Hialino	Hialino con la base café
No. de fiálides	3-5	2-4	3-4	1-3	1-3	3-6
Media de fiálides (µm)	16-35 x 1-2.5	20-30 (-50) x 1.4-3.2	12-25 x 2-3	20-35 (-50) x 1.5-3	25-35 (-40) x 1-2.5	14-37 x 1.5-5
Conidios						
Forma y color	Hialino, elipsoidal a irregular, sub-cilíndrico, unicelulares, raramente con un septo	Hialino, elipsoidal a irregular, sub-cilíndrico, unicelulares, raramente con un septo	Hialino, elipsoidal a irregular, sub-cilíndrico, unicelular	Hialino, elipsoidal a irregular, sub-cilíndrico, unicelular, ocasionalmente de un septo	Hialino, elipsoidal a irregular, sub-cilíndrico, unicelular, ocasionalmente de un septo	Hialino, elipsoidal a irregular, sub-cilíndrico, unicelular
Tamaño (µm)	2.5-8 x 1.4-3.2	3.5-10.5 (-12.5) x 2-4	3.5-10 x 1.5-3.5	4-8.5 x 1.5-2.5	4-10 (-12.5) x 2.5-3.5	3-8 x 1.5-3
Patogenicidad	Alta	Alta	Poca	Poca	Poca	Poca
Saprophytismo de suelo	-	-	+	+	+	-

Presencia (+); Ausencia (-)

Las colonias de *V. tricorpus* muestran un típico color amarillento en medio de cultivo tan pronto como las colonias se vuelven visibles (usualmente dentro de 1 semana). Descripción en cultivos crecidos en PDA a 20 °C durante 2-3 semanas (EPPO, 2007).

8.3 Medio de cultivo

El medio de cultivo NP-10 es un medio selectivo que permite obtener resultados satisfactorios cuando se pretende determinar la presencia de *V. dahliae* a partir de semillas.

Durante la preparación del medio de cultivo, debe tenerse especial cuidado en las condiciones en que se preparan e incorporan los antibióticos, ya que pueden ser inactivados con luz directa y altas temperaturas durante largos periodos exposición.

Cuadro 2. Componentes del recipiente A medio NP-10 agar

Componentes del recipiente A	Cantidad (en ml o g/ 500 mL)
Ácido poligalacturónico, Na sal de naranja grado SIGMA (P-3889)	5.0 g
NaOH pellets ^a (0.025N)	1.2 g
Adicionar agua destilada o desionizada	500 mL

^a La concentración de NaOH en el recipiente A debe ser aproximadamente de 0.025 N

Cuadro 3. Componentes del recipiente B medio NP-10 agar

Componentes del recipiente B	Cantidad (en ml o g/ 500 mL)
Agar	15 g
KNO ₃	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
KCl	0.5 g
MgSO ₂ .H ₂ O	0.5 g
Tergitol NP-10	0.5 mL
Adicionar agua destilada o desionizada	500 mL
Antibióticos	
Cloranfenicol ^b	0.5 g
Sulfato de estreptomina ^c	0.5 g
Clorhidrato de clortetraciclina ^d	0.5 g

^{b, c, d} Adicionar después de la esterilización en autoclave

Cuadro 4. Componentes del recipiente A+B medio NP-10 agar

Componentes del recipiente A +B	Cantidad
Recipiente A	500 mL
Recipiente B	500 mL
Volumen total	1000 mL

Preparación de medio NP-10 (modificado de medio NP-10 de Sorenson) (ISF, 2015):

- 1) Preparar por separado el contenido del recipiente A (Cuadro 2) y el recipiente B (Cuadro 3) y esterilizar en autoclave (120 °C por 20 minutos a 15 libras).
- 2) Dejar enfriar ambos recipientes (utilizar baño de agua fría).
- 3) Preparar una solución de clorotetraciclina (15 mg/mL de metanol o etanol al 96%), Cloranfenicol (100 mg/mL de metanol o etanol al 96%), y sulfato de estreptomicina (25 mg/mL de agua destilada estéril); y esterilizar por filtración. Se puede preparar un stock de soluciones y almacenar en refrigeración.
- 4) Adicionar la cantidad apropiada de cada solución de antibióticos en el recipiente B y mezclar.
- 5) Adicionar el contenido del recipiente A al recipiente B (Cuadro 4).
- 6) Mezclar utilizando un agitador magnético.
- 7) Vaciar el medio en cajas Petri y almacenar bajo condiciones de oscuridad.

8.4 Elaboración de montajes

8.4.1 Preparaciones temporales con cubreobjetos

- 1) Colocar una gota de medio de montaje (lactofenol, ácido láctico o glicerina, con colorante de azul de Nilo) sobre 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, eliminar el excedente del medio de montaje.
- 4) Observar las estructuras con un microscopio compuesto.
- 5) En caso de que no se aprecien las estructuras características, realizar otra preparación, cuidando que los conidióforos se mantengan intactos a fin de observar con claridad su disposición, tamaño y forma de conidios.

8.4.2 Preparaciones temporales con cinta adhesiva

- 1) Colocar en un portaobjetos una gota de medio de montaje con colorante (lactofenol, ácido láctico o glicerina, con colorante de azul de Nilo).
- 2) Con un pedazo de cinta adhesiva transparente tocar con delicadeza y en forma superficial el área de la semilla con crecimiento del hongo para obtener las estructuras.
- 3) Pegar la cinta sobre el portaobjetos cuidando que las estructuras queden dentro de la gota.
- 4) Observar con un microscopio compuesto.

8.4.3 Preparaciones permanentes

- 1) Colocar una gota de medio de montaje con colorante (lactofenol, ácido láctico o glicerina, con azul de Nilo) sobre 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 (sin sobrecalentar) en un mechero o plancha.
- 3) Con ayuda de un sacabocados, formar un anillo de parafina alrededor de la gota. Para esto, calentar el extremo del sacabocados 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 un microscopio compuesto.