

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

**Área de Diagnóstico Fitosanitario
Laboratorio de Micología**

Protocolo de Diagnóstico:

Detección e identificación de hongos fitopatógenos a partir de semillas

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 hongos fitopatógenos a partir de semillas. 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 Flujo de trabajo	2
3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN.....	3
3.1 Técnicas para la identificación morfológica	3
3.1.1 Observación directa	3
3.1.1.1 Interpretación de resultados	4
3.1.2 Hidrólisis del endospermo	4
3.1.2.1 Interpretación de resultados	4
3.1.3 Lavado filtración	5
3.1.3.1 Interpretación de los resultados	6
3.1.4 Filtración y Centrifugado	7
3.1.4.1 Interpretación de los resultados	7
3.1.5 Incubación en papel secante (Cámara húmeda)	8
3.1.5.1 Interpretación de resultados	8
3.1.6 Incubación en papel secante y congelación.....	9
3.1.6.1 Interpretación de resultados	9
3.1.7 Incubación en medio de cultivo	10
3.1.7.1 Interpretación de resultados	10
3.1.8 Extracción de embriones	11
3.1.8.1 Interpretación de resultados	12
3.2 Identificación morfológica.....	12
3.3 Identificación molecular	12
3.3.1 Extracción de ADN.....	13
3.3.1.1 Extracción de DNA de estructuras de hongos	13
3.3.1.2 Extracción de DNA a partir de semillas	14
3.3.2 Amplificación con primers universales.....	14
3.3.3 Amplificación mediante primers específicos	15
3.3.3.1 Interpretación de resultados	15
3.3.4 Secuenciación y filogenia molecular	15
3.3.4.1 Análisis de secuencia y filogenia molecular	16
3.3.2.1 Interpretación de resultados	17
3.4 Identificación del patógeno	17
4. REGISTROS	18
5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL.....	19
6. RECONOCIMIENTO	19
7. REFERENCIAS	19
8. ANEXOS.....	22
8.1. Elaboración de montajes	22
8.2.1 Montajes temporales con cubreobjetos	22
8.2.2 Montajes temporales con cinta adhesiva.....	22

8.2.3 Montajes permanentes	22
8.2 Medios de Cultivo.....	23

II. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Medios de cultivo para hongos	23
---	----

1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO

Describir la metodología para la detección e identificación de hongos fitopatógenos a partir de semillas utilizada en el Laboratorio de Micología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF).

2. INTRODUCCIÓN

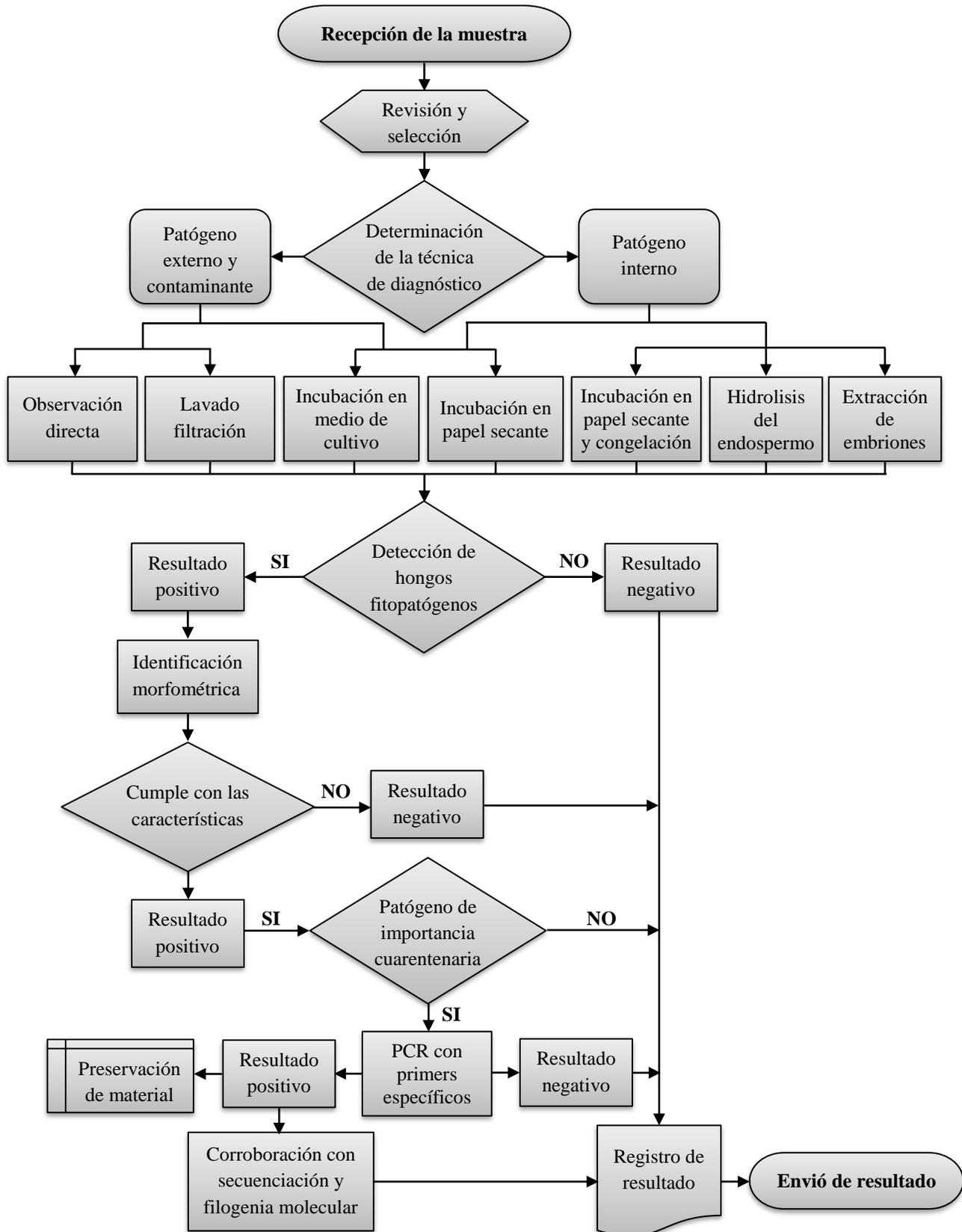
Los hongos fitopatógenos pueden ser capaces de causar nuevas infestaciones al ser transportados o transmitidos dentro o sobre las semillas que se emplean para el establecimiento de nuevos cultivos (CIPF, 2017), afectando los procesos de germinación y desarrollo (Baker, 1979).

Cuando el hongo se encuentra superficialmente en las semillas forma esclerocios, esporas, cuerpos fructíferos o micelio (Baker, 1979; Dhingra y Sinclair, 1995). Por otro lado, al encontrarse dentro de los tejidos de la semilla, la transmisión es más eficiente, ya que éstos le brindan protección contra factores ambientales adversos y garantizan las condiciones óptimas para la infección (Agarwal y Sinclair, 1987). He inclusive algunos hongos pueden remplazar a la semilla como el caso de *Claviceps africana* en sorgo, el cual invade el ovario de la flor y desarrolla un esclerocio impidiendo la formación de la semilla (CABI, 2018).

Las semillas afectadas por hongos fitopatógenos pueden presentar esclerotización, estromatización, decoloración, necrosis, pudrición de la radícula, reducción de tamaño, aborto e incapacidad germinativa (Ellis y Gálvez, 1980; Agarwal y Sinclair, 1987); además, incrementan la cantidad de inóculo en campo y reducen el valor comercial del cultivo. Sin embargo, muchas veces no producen síntomas, por lo que es necesario utilizar técnicas de detección específicas (Neergaard, 1977; Baker, 1979) que determinen su condición fitosanitaria (ISTA, 2018).

Los protocolos estandarizados por la Asociación Internacional de Ensayos de Semillas (ISTA por sus siglas en inglés, International Seed Testing Analysis) sirven de referencia a los laboratorios de diagnóstico fitosanitario para la creación de protocolos que determinen la presencia de fitopatógenos en semillas (Jones, 2013).

2.1 Flujo de trabajo



3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

La muestra debe ser representativa del lote en heterogeneidad y tamaño, del total se seleccionan las semillas que presenten diferencias en color, tamaño o signos. Los estudios realizados para el aislamiento de hongos fitopatógenos en semillas parten de 400 semillas; sin embargo, el número de semillas puede variar dependiendo de la técnica utilizada, el patógeno, el tamaño de la semilla y el tamaño del lote, en tales casos se utiliza el 80% de la muestra (Dhingra y Sinclair, 1995; CIPF, 2017).

Las muestras son rechazadas en caso de que las semillas se encuentren degradadas, sean insuficientes para el diagnóstico o carezcan de los datos de colecta e identificación. El rechazo se registra como “Material en mal estado” o “Material insuficiente”.

3.1 Técnicas para la identificación morfológica

Para determinar la técnica de diagnóstico apropiada, se debe considerar el lugar donde se encuentra localizado el patógeno en la semilla. Si se encuentra externamente o como contaminante, se utilizan las técnicas de Observación directa (Sección 3.1.1), Incubación en papel secante (Sección 3.1.4), Incubación en papel secante y congelación (Sección 3.1.5) y Lavado Filtración (Sección 3.1.3). Si se localiza en el interior de la semilla se utilizan las técnicas de Incubación en papel secante (Sección 3.1.4), Incubación en papel secante y congelación (Sección 3.1.5), Hidrólisis del endospermo (Sección 3.1.2) e Incubación en medio de cultivo (Sección 2.2).

3.1.1 Observación directa

Permite determinar la presencia de signos o síntomas causados por hongos, para ello se requiere de un microscopio estereoscópico (Dhingra y Sinclair, 1995). Además, es necesario contar con personal técnico capacitado que distinga entre las estructuras de distintos géneros o especies de hongos, a fin de realizar un diagnóstico adecuado (Neergaard, 1977; NSHS, 2017).

- 1) Revisar cada una de las semillas del total de la muestra para identificar síntomas como cambio de color, textura, forma y dureza.
- 2) Determinar la presencia de signos como micelio, masas de esporas, esclerocios, teliosporas, acérvulos, picnidios o peritecios, entre otros (Wharham et al., 1997; Mezzalama, 2012).
- 3) Separar las semillas con presencia de síntomas y signos para su diagnóstico.
- 4) Si existe la presencia de signos, tomar las estructuras y realizar montajes permanentes o temporales (Anexo 8.1) y observar un con microscopio compuesto, para su identificación.

3.1.1.1 Interpretación de resultados

Para determinar la presencia de hongos fitopatógenos, se deben observar signos, síntomas o estructuras que correspondan a las descritas por la literatura de referencia y reportar el resultado de acuerdo a la Sección 3.4.

Si no se detecta evidencia de la presencia de hongos fitopatógenos, se debe reportar el diagnóstico para esta técnica como negativo (Sección 3.4).

3.1.2 Hidrólisis del endospermo

De acuerdo con Agarwal y Verma (1983), esta técnica permite detectar infecciones de *Tilletia indica* en semillas asintomáticas (ver protocolo de diagnóstico de *Tilletia indica* Carbón Parcial del Trigo), las semillas permanecen en una solución de hidróxido de sodio (NaOH), con el fin de aclarar el endospermo y visualizar las teliosporas que se encuentran presentes (Kashyap y Kaur, 2011). Es útil especialmente para analizar los lotes de semillas sometidas a tratamiento químico con colorantes que ocultan los síntomas (Agarwal y Mathur, 1992; Mathur y Cunfer, 1993).

- 1) Sumergir de 50 a 100 g de semillas en una solución de NaOH. La CIPF, 2016 señala una concentración de 0.2% durante 24 horas a 20 °C; sin embargo, se ha observado que aumentando la concentración al 2% durante 2 horas a 20 °C, se pueden observar las teliosporas debajo de la epidermis.
- 2) Posteriormente, decantar el líquido y lavar las semillas con agua destilada (Kashyap, et al., 2011).
- 3) Observar las semillas en un microscopio estereoscópico para detectar la presencia de teliosporas debajo de la cubierta de la semilla.
- 4) Realizar el montaje de las teliosporas en portaobjetos y observar con un microscopio compuesto.
- 5) Medir 10 teliosporas para realizar la identificación morfológica y determinar la especie.

3.1.2.1 Interpretación de resultados

En caso de detectar esporas, que correspondan a la morfología descrita en la literatura, el resultado se determina como positivo. Señalando de la siguiente manera la especie encontrada:

- Positivo a semillas infectadas por *Tilletia indica* e indicando el número de semillas infectadas.

- En caso de no detectar teliosporas dentro de las semillas, el resultado se determina como negativo para esta técnica (Sección 3.4).

3.1.3 Lavado filtración

Este método, es utilizado para la detección de esporas de hongos carbonosos y mildiú veloso por medio del lavado de las semillas y la filtración por tamices para retener teliosporas u oosporas sobre un papel filtro e identificar la especie (Neergaard, 1977; Warham, et al 1997).

Para ello, se requiere primero lavar las semillas y después filtrar el agua de lavado a través de tamices o mallas, que inicialmente permitan separar las esporas de hongos del material vegetal, así como discriminar el tamaño de las esporas a fin de retenerlas en la última malla o tamiz. Una alternativa rápida, es usar la Técnica de filtración y centrifugado (3.3.2), la cual se recomienda para retener y visualizar las teliosporas o cuando el tamaño de muestra es muy pequeña.

Previamente, se necesario desinfectar el material utilizado con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1.6% durante 3 minutos. Esta solución les confiere un aspecto hialino a las teliosporas, en contraste con el aspecto normal oscuro y pigmentado. Posteriormente, enjuagar el material con agua corriente (CIPF, 2016).

- 1) Homogeneizar las semillas dentro de su empaque original mediante agitación, pesar 50 gr si la cantidad de la muestra lo permite, si la muestra es menor procesar el total de la muestra.
- 2) Depositar las semillas en un matraz Erlenmeyer de 250-300 mL y adicionar agua al doble del volumen de las semillas, agregar dos gotas de TWEEN® 20 (monolaurato de polioxietilensorbitano) para liberar la tensión superficial que existe entre las teliosporas y las semillas.
- 3) Colocar el matraz sobre un agitador orbital durante 5 minutos a 200 rpm o en un agitador de brazos a una velocidad media durante 30 minutos para liberar las teliosporas.
- 4) En un matraz Kitasato de 500 mL o de mayor capacidad, colocar un embudo Büchner y sobre éste una malla o papel filtro Whatman™ del número 1, en caso de utilizar papel es necesario mojarlo con el fin de fijarlo en el embudo.
- 5) Sobre el matraz Kitasato filtrar el agua a través de un tamiz de 60 o 53 µm para separar de esporas de otros hongos más grandes.
- 6) Enjuagar el matraz que contenía la muestra y verter el líquido de la misma forma. Esperar a que se filtre completamente el agua.

Nota: se puede utilizar una bomba de vacío conectada al matraz para filtrar el agua con mayor rapidez, en caso de utilizar papel filtro tener cuidado de no romperlo para evitar la pérdida de esporas.

- 7) Con ayuda de pinzas de disección, retirar la malla o papel filtro y colocarlo dentro de la base de una caja Petri.
- 8) Si se utiliza malla observarla directamente en un microscopio estereoscópico o en un microscopio óptico compuesto en busca de las esporas para su identificación. Si se utiliza papel filtro, éste debe observarse primero con un microscopio estereoscópico para localizar esporas sospechosas y recolectarlas con un alfiler entomológico.
- 9) Realizar el montaje de las esporas, observarlas en un microscopio compuesto e identificar al menos 10 esporas para obtener el rango y promedio de su tamaño y características morfológicas (forma, color y ornamentación) para determinar la especie.

Nota: en caso de no detectar 10 esporas repetir el tamizado, si la muestra lo permite.

3.1.3.1 Interpretación de los resultados

Para determinar la presencia de hongos fitopatógenos, se deben observar esporas que correspondan a las características morfométricas descritas en la literatura de referencia y reportar el resultado de acuerdo a la Sección 3.4.

Si no se detecta la presencia de estructuras correspondientes a hongos fitopatógenos, se debe reportar el diagnóstico para esta técnica como negativo (Sección 3.4).

En el análisis específico de *Tilletia indica* (consultar el protocolo de diagnóstico de *Tilletia indica*, Carbón Parcial del Trigo), el resultado se debe basar en la Norma Oficial Mexicana NOM-001-FITO-2000, en la que se establece la campaña contra el carbón parcial del trigo, misma que señala como detección positiva a *Tilletia indica*, la presencia de semilla infectada; sin embargo, se debe aludir la detección de teliosporas, ya que son una fuente importante de diseminación de la enfermedad.

Por lo que, si no se encuentra semilla infectada, el resultado se registra como “negativo” y se señala la presencia de teliosporas siempre y cuando, el número de teliosporas sea igual o mayor a 10 y cumplan con las características morfométricas de *T. indica*:

- “Negativo a semilla infectada, con presencia de teliosporas características de *Tilletia indica*”.

Si el número de teliosporas es menor a 10, o las características morfológicas no son determinantes para *Tilletia indica*, el resultado se determina como:

- “Negativo a *Tilletia indica*” sin presencia de semilla infectada ni teliosporas.

3.1.4 Filtración y Centrifugado

Esta metodología se utiliza para la detección rápida de esporas de hongos, como las teliosporas de *Tilletia indica*. A partir del agua de lavado de la semilla que se filtra primero a través de un tamiz con apertura de 60 μm y después en un tamiz de 20 μm , las esporas son retenidas en este último, luego recuperadas con el lavado de éste y sedimentadas por centrifugación (Kashyap et al., 2011), lo que facilita su montaje.

- 1) Después de lavar las semillas, filtrar el agua de lavado a través de un tamiz con una apertura de tamaño mayor al de las esporas, por ejemplo, de 60 o 53 μm ; y enseguida filtrarla a través de un tamiz de 20 μm o de menor tamaño a las esporas que se desean recuperar.
- 2) Enjuagar el matraz que contenía la muestra y filtrar el líquido de la misma forma. Esperar a que se filtre completamente el agua.
- 3) Lavar el tamiz de 20 μm inclinándolo en un ángulo de 45°, arrastrar los residuos de la superficie con una piseta con agua destilada, desde la parte superior hacia abajo del tamiz, con un movimiento de barrido lateral en uno y otro sentido, con el fin de recuperar las esporas, vaciar y reservar el líquido en un tubo para centrífuga.
- 4) Centrifugar la suspensión a 1200 g durante 3 minutos, retirar el sobrenadante cuidadosamente, sin perturbar el sedimento.
- 5) Recuperar el sedimento con una micropipeta, y realizar el montaje en portaobjetos.
- 6) Examinar los montajes con microscopio compuesto y observar las características morfológicas y morfométricas para determinar la especie del hongo.

3.1.4.1 Interpretación de los resultados

Para determinar la presencia de hongos fitopatógenos, se deben observar esporas que correspondan a las características morfométricas descritas en la literatura de referencia y reportar el resultado de acuerdo a la Sección 3.4.

Si no se detecta la presencia de estructuras correspondientes a hongos fitopatógenos, se debe reportar el diagnóstico para esta técnica como negativo (Sección 3.4).

Para el caso de *Tilletia indica* al igual que la Sección 3.1.3.1 se debe señalar la detección de teliosporas, debido a su importancia como fuente de diseminación de la enfermedad.

3.1.5 Incubación en papel secante (Cámara húmeda)

La incubación de las semillas en cámara húmeda permite el desarrollo de los síntomas y signos de la enfermedad (Arriagada, s. f.), para ello las semillas se colocan sobre un papel absorbente grueso, blanco y liso que permita una adecuada observación y retenga suficiente humedad para el hinchamiento y germinación de las semillas, así como el desarrollo del patógeno (Faraj et al., 2016).

- 1) Armar cámaras húmedas colocando papel filtro Whatman® del número 4 (entre otro tipo de papel filtro o papel absorbente) en cajas Petri de cristal, posteriormente esterilizar a 121 °C durante 20 minutos a 15 libras o en calor seco durante 2 horas a 160 °C. Dejar enfriar.
- 2) Desinfestar 400 semillas con hipoclorito de sodio al 0.5% durante dos minutos.
- 3) Enjuagar en tres ocasiones con agua destilada estéril por dos minutos cada enjuague.
- 4) Colocar las semillas sobre papel absorbente durante una hora a temperatura ambiente para eliminar el exceso de humedad.
- 5) Una vez estériles, bajo condiciones asépticas, humedecer el papel filtro con agua destilada estéril, evitando tener exceso de agua. Sembrar las 400 semillas dentro de las cajas Petri.
- 6) Incubar durante 7 a 10 días a 25 °C (Yago et al., 2011).

Nota: el número y la distancia a la que se colocan las semillas en la cara húmeda dependerá del tamaño de la semilla.

- 7) Observar cada una de las semillas con un microscopio estereoscópico, en busca de estructuras de hongos (micelio, esclerocios, conidios, cuerpos fructíferos, etc.).
- 8) Realizar montajes temporales o permanentes de las estructuras encontradas (Anexo 8.2), para su observación con un microscopio compuesto e identificación (Sección 3.2).

3.1.5.1 Interpretación de resultados

Para determinar la presencia de hongos fitopatógenos, se deben observar estructuras diferenciales de hongos sobre las semillas, las cuales cumplan con las características señaladas por la literatura de referencia y reportar el resultado de acuerdo a la Sección 3.4.

Si no se detecta la presencia de estructuras correspondientes a hongos fitopatógenos, se debe reportar el diagnóstico para esta técnica como negativo (Sección 3.4).

3.1.6 Incubación en papel secante y congelación

La incubación en papel secante y congelación permite el desarrollo de las estructuras de hongos sin que sean inhibidos por la resistencia natural de la planta (Warham et al., 1997).

La esporulación del patógeno se puede estimular usando luz cercana a la ultravioleta, alternando ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Lo anterior, reduce el desarrollo de hongos saprofitos, facilitando así la observación de hongos fitopatógenos (Dhinga y Sinclair, 1995).

- 1) Desinfectar 400 semillas en hipoclorito de sodio al 0.5% durante dos minutos.
- 2) Enjuagar en tres ocasiones con agua destilada estéril durante dos minutos cada enjuague.
- 3) Colocar las semillas sobre papel absorbente durante una hora a temperatura ambiente para eliminar el exceso de humedad.
- 4) Colocar de 40-50 semillas en la cámara húmeda, incubar a 25 °C por 24 horas, después transferir a -20 °C durante 48 horas y finalmente a 25 °C en un periodo de 7 días, manteniéndolas en condiciones de 12 horas luz 12 horas oscuridad (de preferencia luz negra) (NSHS, 2017).

Nota: el número de semillas en cada caja Petri dependerá de su tamaño.

- 5) Revisar cada una de las semillas utilizando un microscopio estereoscópico en busca de estructuras de hongos.
- 6) Realizar montajes temporales o permanentes de las estructuras encontradas para su observación en un microscopio compuesto.

3.1.6.1 Interpretación de resultados

Para determinar la presencia de hongos fitopatógenos, se deben observar estructuras diferenciales de hongos sobre las semillas que cumplan con las características señaladas por la literatura de referencia y reportar el resultado de acuerdo a la Sección 3.4.

Si no se detecta la presencia de estructuras correspondientes de hongos fitopatógenos, se debe reportar el diagnóstico para esta técnica como negativo.

3.1.7 Incubación en medio de cultivo

La incubación sobre medios de cultivo ricos en nutrientes permite un adecuado desarrollo de los hongos patógenos que se encuentran dentro o sobre la semilla (Dhinga y Sinclair, 1995). No obstante, también favorece el desarrollo de hongos saprófitos, los cuales llegan a tener un crecimiento excesivo que impide el desarrollo y detección de los hongos de interés (Mezzalama, 2012).

- 1) Desinfestar 400 semillas con hipoclorito de sodio al 0.5% durante dos minutos, decantar el hipoclorito al término del tiempo y enjuagar en tres ocasiones con agua destilada estéril por dos minutos cada enjuague.
- 2) Colocar las semillas sobre papel absorbente estéril durante una hora a temperatura ambiente para eliminar el exceso de humedad.
- 3) Sembrar las semillas en cajas Petri con medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar) u otro medio no selectivo (Anexo 8.2), asegurando su fijación para evitar su desprendimiento.
- 4) Incubar a 25 °C, durante 4 a 7 días, bajo condiciones de 12 horas luz y 12 horas oscuridad (de preferencia luz negra).

Nota: las cajas deben permanecer cerradas y boca abajo para evitar la condensación de agua sobre el medio de cultivo y reducir el riesgo de contaminación.

- 5) Una vez terminado el periodo de incubación, revisar cada una de las semillas con un microscopio estereoscópico en busca de estructuras de hongos.
- 6) Si hay presencia de estructuras, realizar montajes (Anexo 8.2), observarlos con un microscopio óptico compuesto e identificar las estructuras que determinen el género y la especie.
- 7) Si las estructuras no permiten su identificación, aislar el hongo en una nueva caja con medio de cultivo, si se conoce el posible género o especie utilizar un medio selectivo (Anexo 8.1) e incubar bajo las mismas condiciones por un periodo de 6 a 8 días.
- 8) Posteriormente, observar nuevamente las estructuras para su identificación.

3.1.7.1 Interpretación de resultados

Para determinar la presencia de hongos fitopatógenos, se deben observar estructuras diferenciales de hongos, las cuales cumplan con las características señaladas por la literatura de referencia y reportar el resultado de acuerdo a la Sección 3.4.

Si no se detecta presencia de colonias o estructuras características de hongos fitopatógenos, se deberá reportar el diagnóstico para esta técnica como negativo (Sección 3.4).

3.1.8 Extracción de embriones

Permite la observación de las estructuras de hongos del género *Ustilago* situadas dentro de la semilla en el tejido meristemático, el embrión (escutelo) o en espacios intercelulares de la cubierta; además, hace posible la detección de patógenos obligados que pueden estar de forma asintomática en la semilla.

La técnica consiste en remojar, aclarar, macerar y teñir la semilla para detectar la presencia de signos de hongos en su interior. La identificación se hace mediante la observación de la forma, grosor y septación del micelio, así como la presencia de esporas específicas (Mezzalama, 2012).

- 1) Se requieren de 100-120 g de semillas dependiendo de su tamaño.
- 2) Colocar las semillas en una solución de hidróxido de sodio al 5% durante 24 horas a 20 °C (NSHS, 2017).
- 3) Lavar con agua tibia para separar los embriones del pericarpio.
- 4) Colectar los embriones en un tamiz de malla de 1 mm y transferirlos a una solución de glicerol al 50%.
- 5) Colocar en un vaso de precipitado 50 mL de solución de ácido láctico, glicerina y agua (en una proporción de 1:1:1) y llevar a punto de ebullición, adicionar los embriones a la solución y mantenerla por 5 minutos.

Nota: esta actividad debe realizarse en una cabina de flujo laminar y con equipo de protección para evitar la inhalación de gases.

- 6) Transferir los embriones a un recipiente con glicerol durante 1 a 2 horas, para su posterior análisis, realizar montajes temporales con cubreobjetos (Anexo 8.2.1) y observar los embriones con microscopio compuesto.
- 7) Localizar el micelio en el tejido del escutelo. La coloración y grosor del micelio son características determinantes para la identificación de los hongos.

3.1.8.1 Interpretación de resultados

Para determinar la presencia de hongos fitopatógenos, se deben detectar estructuras como micelio o esporas diferenciales en el tejido interno de las semillas con las características reportadas por la literatura de referencia y reportar el resultado de acuerdo a la Sección 3.4.

Si no se detecta la presencia de estructuras correspondientes de hongos fitopatógenos, se debe reportar el diagnóstico para esta técnica como negativo (Sección 3.4).

3.2 Identificación morfológica

La identificación morfológica se basa en la observación y medición de estructuras diferenciales que permitan asociar a los especímenes con los grupos taxonómicos de hongos (Carris et al., 2012). Entre las principales características que se consideran para la clasificación e identificación de los hongos están:

- Color y morfología de la colonia.
- Tipo de micelio (septado o cenocítico, toruloso o liso).
- Origen de las esporas (sexuales o asexuales).
- Diferenciación de estructuras especializadas (esporangios, conidióforos o cuerpos fructíferos).
- Presencia o ausencia de esporas de resistencia (teliosporas o esclerocios).
- Septación, forma, color, tamaño y ornamentación de las esporas.
- Presencia, ausencia, número y tamaño de flagelos.

- 1) Localizar estructuras características del hongo y elaborar montajes (Anexo 8.1).
- 2) Observar los montajes con un microscopio óptico compuesto para determinar el género y la especie del hongo comparando las características encontradas con las reportadas en la literatura de referencia.

3.3 Identificación molecular

El diagnóstico molecular de hongos asociados a semillas, comprende la amplificación de genes específicos, secuenciación y filogenia molecular. Se utiliza cuando no se puede determinar el resultado por las técnicas descritas en la Sección 3.1 o se requiera confirmar la identificación posterior a la caracterización morfológica descrita en la Sección 3.2.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) por sus siglas en inglés, Polymerase Chain Reaction, es una herramienta de detección basada en ácidos nucleicos, rápida y altamente sensible. Dentro de sus campos de aplicación se encuentra la detección de patógenos de plantas, siendo capaz de discriminar entre diversas especies, razas, formas especiales u otras jerarquías infraespecie (Vincelli et al., 2008).

3.3.1 Extracción de ADN

La extracción de DNA se puede realizar directamente del conjunto de esporas y micelio o del macerado de las semillas; la cantidad de semilla depende de la especie y tamaño de muestra.

3.3.1.1 Extracción de DNA de estructuras de hongos

Para la extracción se sugiere el método propuesto por Cenis (1992).

- 1) Colocar micelio de cultivos puros o monospóricos y para hongos no cultivables una masa de espora en un tubo con la mitad de perlas de cerámica (Magna Lyser Green Beads 03358941001 de Roche).
- 2) Agregar 500 μL de Buffer TE 1X, incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos, posteriormente centrifugar 5 minutos a 17 940 g y retirar el sobrenadante.
- 3) Adicionar 300 μL de buffer de extracción (200 mM Tris HCL pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, y 0.5% SDS). Macerar el micelio mediante un disruptor de tejidos (Minibeadbeater-96 Cat. No. 1001 de Biospect Products).
- 4) Adicionar 150 μL de acetato de sodio 3 M pH 5.2, invertir de dos a tres veces el tubo y colocarlos 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 el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL (tomar 250 μL para evitar la resuspensión del sedimento).
- 6) Agregar 250 μL de isopropanol (almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), invertir dos a tres veces el tubo y dejar reposar a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos, centrifugar 10 minutos a 15 290 g.
- 7) Decantar el isopropanol por inversión cuidando de no perder la pastilla formada. Agregar 500 μL de etanol al 70% y centrifugar durante 2 minutos a 15 290 g. Repetir el lavado con etanol. Decantar el etanol y dejar secar la pastilla por inversión.
- 8) Resuspender el DNA en 50 μL de agua grado biología molecular o Buffer TE 1X y almacenar la muestra a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 9) Cuantificar la calidad y cantidad del DNA obtenido, mediante un espectrofotómetro modelo NanoDrop 2000c de Thermo Scientific™.
- 10) La calidad óptima del DNA está dada por la absorbancia $A_{260/280}=1.8$ y $260/230=2.0-2.2$.

- 11) Corroborar que el DNA obtenido sea apto para ser amplificado mediante el ensayo de gen endógeno) Sección 3.3.2.

Nota: los equipos mencionados pueden ser reemplazados por otros con características similares, sígase las instrucciones del fabricante para su uso.

3.3.1.2 Extracción de DNA a partir de semillas

En general, cualquier kit comercial de extracción de DNA puede resultar óptimo para su uso en semillas, lo importante es obtener DNA de calidad e íntegro. Se sugiere el uso del kit comercial Concert™ Plant RNA Reagent, del cual se puede prescindir de una centrifuga refrigerada y se debe evitar el uso de la DNAsa.

3.3.2 Amplificación con primers universales

Para verificar la calidad e integridad del DNA extraído se debe realizar la amplificación con primers universales (ensayo de gen endógeno). Los primers utilizados están en función del género del hongo, siendo los más utilizados la región del DNA ribosomal (Región 18S, ITS1, 5.8S, ITS28, IGS), el gen factor de elongación (EF-1 α), el Gen RNA polimerasa subunidad II (RPB2) y el gen Beta Tubulina (β -Tub).

Nota: el gen a elegir debe ser el que tenga mayor polimorfismo para separar entre especies de un mismo género, lo anterior en función de que el producto amplificado en el ensayo de gen endógeno es también el producto que se secuenciará para la corroboración con filogenia molecular.

- 1) Realizar amplificación de PCR con el kit Taq DNA Polymerase Recombinant Invitrogen™ (o marcas con características similares). Utilizar los componentes de reacción con base en las recomendaciones del fabricante.
- 2) Debe incluirse un control de referencia (un DNA que en ensayos previos haya tenido una amplificación exitosa), además de un control blanco (reacción sin DNA).
- 3) Correr el producto de PCR a 100 V por una hora en un gel de Agarosa Ultra Pura al 2% en Buffer TAE 1X, teñido con 0.6X de GelRed™ Biotum.
- 4) Revelar el gel con un fotodocumentador Gel Doc™ EZ Gel Documentation System Biorad.
- 5) El tamaño del fragmento está en función del gen amplificado, la banda debe ser visible en el control positivo y en todas las muestras que sean positivas al hongo fitopatológico, mientras

que el control blanco debe permanecer sin ningún tipo de amplificación; en caso contrario repetir la reacción de PCR o la extracción de DNA.

- 6) Lo fundamental a inferir en la amplificación con primers universales es que el extracto de DNA sea amplificable. La determinación final de la identidad del organismo debe ser dada por la amplificación con primers específicos; y se corrobora con el análisis filogenético de las secuencias obtenidas (Sección 3.3.4.1).

3.3.3 Amplificación mediante primers específicos

Los primers específicos son secuencias de 18 a 27 bases nucleotídicas que son complementarias a un fragmento único del material genético, lo que les atribuye alta especificidad. Pueden detectar diferencias de hasta 1 base en la secuencia objetivo, permitiendo determinar con gran precisión polimorfismos de un solo nucleótido.

- 1) Previamente realizar la amplificación exitosamente con primers universales (Sección 3.3.2).
- 2) Realizar la amplificación con la combinación de primers específicos, los cuales son diseñados en función de la especie de hongo. Siempre se debe incluir un control positivo y un control negativo.
- 3) Una vez realizada la amplificación para ambas combinaciones de primers, los productos de PCR deben correrse en un gel de Agarosa Ultra Pura al 2% en Buffer TAE 1X, teñido con 0.6X de GelRed™ Biotum.
- 4) Al revelar el gel se debe verificar la presencia de un amplicón en los controles positivos (el tamaño del fragmento depende de los primers utilizados); además no debe observarse ninguna banda en el control negativo.

3.3.3.1 Interpretación de resultados

Se considerarán como positivas todas aquellas muestras dónde se observe amplificación del fragmento esperado.

Nota: el resultado final debe estar basado en conjunto con lo observado en la caracterización morfológica, reportar el resultado de acuerdo a la Sección 3.4.

3.3.4 Secuenciación y filogenia molecular

El diagnóstico con secuenciación y reconstrucción filogenética es una herramienta que permite inferir las relaciones evolutivas entre organismos o genes de acuerdo a sus diferencias y similitudes a nivel de regiones particulares o genomas completos (Brown, 2002).

El análisis de secuencias y filogenia molecular debe realizarse como prueba de corroboración, para lo cual es necesario secuenciar el fragmento amplificado en el ensayo de PCR con primers universales de las muestras que hayan resultado positivas en el ensayo de PCR con primers específicos a hongos fitopatógenos de importancia cuarentenaria.

- 1) Los productos de PCR se envían a secuenciar siguiendo las especificaciones de la institución a la que se le solicite el servicio.
- 2) Una vez obtenidas las secuencias, ingresar a la herramienta de alineamiento Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information), a través de la siguiente dirección: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- 3) Insertar la secuencia de interés y realizar el alineamiento con los parámetros predeterminados.
- 4) Verificar que los porcentajes de cobertura e identidad se aproximen a 100% y que el valor de E tienda a cero (Benson et al., 2013).

3.3.4.1 Análisis de secuencia y filogenia molecular

Para el análisis filogenético, se debe partir de secuencias bien caracterizadas para determinar con un 100% de exactitud la identidad del organismo en cuestión, esto debido a que la diferenciación entre especies, formas especiales o razas reside en un número limitado de inserciones, deleciones (INDELS) y polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's).

- 1) 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).
- 2) En el alineamiento múltiple de secuencias incluir la secuencia de los primers forward y reverse en su inverso complementario (secuencia consenso).
- 3) Utilizar el algoritmo ClustalW para el alineamiento de todas las secuencias.
- 4) Para la reconstrucción filogenética utilizar un método que esté basado en distancias génicas (Neighbor-joining NJ) o en métodos probabilísticos (Maximum likelihood o inferencia Bayesiana), de acuerdo a la literatura de referencia para cada género de hongo.
- 5) El árbol filogenético obtenido debe mostrar la identidad final de la muestra de interés. El resultado obtenido puede ser confirmado mediante los análisis de INDELS y SNP's observados directamente en el alineamiento múltiple de secuencias.

3.3.2.1 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 para el hongo de interés. Reportar el resultado de acuerdo a la Sección 3.4.

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 con base al clado en el cual se agrupe la secuencia de la muestra y debe registrarse en el resultado final.

3.4 Identificación del patógeno

Si no se detectó la presencia de hongos fitopatógenos por ninguna de las técnicas de diagnóstico, el resultado se determina como “negativo”, señalando lo siguiente:

- Negativo a Hongos Fitopatógenos.

Para reportar una identificación positiva a hongos en semillas, es necesaria la detección por medio de técnicas de identificación morfológica. De ser necesario determinar la especie del hongo por medio de técnicas moleculares, se requiere la amplificación positiva del ensayo de PCR con los primers específicos; y en ocasiones es indispensable corroborar el resultado por secuenciación y filogenia molecular:

- Positivo a señalar la identidad del hongo.

Semilla de importación

En caso de material de importación se debe de consultar el **Módulo de Requisitos Fitosanitarios u otro marco legal**, donde especifique que la semilla debe estar libre de ciertas especies de hongos de importancia cuarentenaria. Si el resultado es negativo, incluir la leyenda:

- “Negativo a plagas reglamentadas de acuerdo a *señalar el marco legal*”.

Si el resultado es positivo a hongos fitopatógenos de importancia cuarentenaria, se debe señalar el marco legal en el que se encuentra reglamentado:

- “Positivo a *especie del hongo* de acuerdo a *señalar el marco legal*”.

De acuerdo al Módulo de Requisitos Fitosanitarios, para algunas especies de hongos existe un porcentaje de tolerancia permitido, ejemplos:

En el caso de semillas de espinaca con presencia de microesclerocios de *Verticillium dahliae* (ver protocolo de diagnóstico de *Verticillium dahliae*), el porcentaje de tolerancia permitido es de hasta 10%, por lo que el resultado positivo se registra de la siguiente forma:

- “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%”.

Para semilla de soya infectada con *Cercospora kikuchii* existe una tolerancia de 2%, si el resultado es positivo se señala el porcentaje obtenido:

- “El porcentaje de semillas con *Cercospora kikuchii* (%) sobrepasa el límite de tolerancia permitido”.

Si el porcentaje de incidencia de semillas con *Cercospora kikuchii* es igual o menor a 2%, el resultado se considera como negativo:

- “El porcentaje de semillas con *Cercospora kikuchii* (%) no sobrepasa el límite de tolerancia permitido de 2%”.

4. REGISTROS

Almacenar los registros y evidencias del proceso de diagnóstico.

La muestra que no se utilizó en el diagnóstico debe ser almacenada en su empaque original a temperatura ambiente durante al menos un mes posterior a la emisión del resultado con los datos de la muestra, a fin de contar con material en caso de requerirse la corroboración del resultado.

En caso de obtener un resultado negativo:

- Inactivar y desechar.

En caso de detectar la presencia de hongos fitopatógenos:

- Contar con evidencia fotográfica de los signos y síntomas de la muestra, así como de los aislamientos en medio de cultivo.
- Conservar los montajes permanentes, donde se encuentren estructuras distintivas del hongo, como evidencia de la identificación morfológica.
- Conservar el aislamiento puro mediante técnicas de preservación que garanticen la viabilidad del hongo, para evitar la transferencia continua del aislamiento.
- Resguardar los resultados de las pruebas moleculares (fotografía del gel y secuencias).

- Mantener el DNA aislado en congelación a -20°C (de ser posible a -70°C).

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, Grisel Negrete Fernández y Monserrat Valdés García.

7. REFERENCIAS

- Agarwal V. K. and Verman H. S. (1983). *A simple technique for the detection of Karnal bunt infection in wheat seed samples*. Seed Research, 11(1), 100-102.
- Agarwal, V. K. and Mathur, S. B. (1992). *Detection of karnal bunt in wheat seed samples treated with fungicides*. FAO. Plant Protection Bulletin. 40, 148-153.
- Agarwal, V. K. and Sinclair, J. B. (1987). *Principles of Seed Pathology* (2nd). U. T., India: CRC Press, 176-166.
- Arriagada, V. (s. f.). *Semillas: Inspección, análisis, tratamiento y legislación*. Venezuela: IICA, 19-46. Recuperado de: <http://repiica.iica.int/docs/bv/agrin/b/f03/XL2000600205.pdf>
- Baker, K. F. (1979). Seed Pathology-Concepts and Methods of Control. *Journal Seed Technology*, 4(2), 57-67.
- Benson, A. D., Mark, C. K. C., Karsch, M. I., Lipman, J. D., Ostell, J. and Sayers, W. E. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research* 41: 36-42.
- Brown, T. A. (2002). *Genomes* (2nd ed.). Oxford, U. K. 572.
- CABI. (2018). Invasive Species Compendium. *Claviceps africana* (ergot). Available online October, 2018. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/13787>
- Carris, L. M., Little, C. R. and Stiles, C. M. (2012). *Introduction to fungi*. The Plant Health Instructor. Recuperado el 20 abril de 2018: <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/IntroFungi.aspx>.
- Cenis, L. J. (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, 20: 2380.

- CIPF. Convención Internacional de Protección Fitosanitaria. (2017). *NIMF 38: Movimiento internacional de semillas*. Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias. Roma, Italia, 4-35. Recuperado de: http://www.worldseed.org/wp-content/uploads/2017/10/ISPM-38-Training-Manual-ES-vf_Final-Formatted.pdf
- Dhingra, O. D. and Sinclair, J. B. (1995). *Basic Plant Pathology Methods* (2nd ed.). U. S. A.: CAR Lewis Publishers, 434.
- Ellis, M. A. y Gálvez, G. E. (1980). Patología de la semilla. En: Schwartz, H. F. y Gálvez, G. E. (Eds.). *Problemas de producción del frijol: Enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de Phaseolus vulgaris*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO, 301-314.
- Faraj, A. A., Adel, O. A., Addalla, R. B. R. and Aldukali, A. A. (2016). Investigation of seed-borne fungi associated with cucurbit seeds in two different regions of Libya: *Al Sastil*, 10(15), 37-53.
- ISTA (International Seed Testing Association). (2018). Bassersdorf, Switzerland. Available online: <https://www.seedtest.org/en/home.html>
- Jones, S. (2013). Future seed testing needs for seed analysis and researchers- A personal view. *Seed technology*, 35(1), 15-20.
- Kashyap, P. L., Kaur, S., Sanghera, G. S., Kang, S. S. and Pannu, P. P. (2011). Novel methods for quarantine detection of karnal bunt (*Tilletia indica*) of wheat. *Elixir Agriculture*, 31, 1873-1876.
- Leslie, J. F. and Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Manhattan, U.S.A.: Blacwell Publishing, 156.
- Mathur S. B. and Cunfer B. M. (1993). *Seed-Borne Diseases and Seed Health Testing of Wheat*. Danish. Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, Copenhagen (DK), 31-43.
- Mezzalama, M. (2012). *Seed Health: Fostering the safe distribution of Maize and Wheat Seed*. (3rd ed.). Ciudad de México, México: CIMMYT.
- Neergaard, P. (1977). *Seed Pathology*. Vol 2: Mcmillan. 1191.
- NSHS. (2017). National Seed Health System. Seed Health Testing Methods. Available online: <http://seedhealth.org/seed-health-testing-methods/>
- Sosa, M. C., Pertomo, R. F., Brathwaite C. y Salazar C. J. (1997). Manual de técnicas para el diagnóstico de las enfermedades de las plantas. Venezuela: IICA.
- Vincelli, P. and Tisserat, N. (2008). Nucleic Acid-Based Pathogen Detection in Applied Plant Pathology. *Plant Disease*, 92 (5), 660-669.
- Wharham, E. J., Butler, L. D. y Sutton, R. C. (1997). *Ensayos para la semilla de maíz y trigo: manual de laboratorio*. México: CIMMYT.
- Yago, I. J., Roh, H. J., Bae, S., Yoon, N. Y., Kim, J. H. and Nam, M. (2011). The Effect of Seed-borne Mycoflora from Sorghum and Foxtail Millet Seeds on Germination and Disease Transmission. *Mycobiology*, 39(3), 206-218.

Forma recomendada de citar:

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2018).
Protocolo de Diagnóstico: Detección e identificación de hongos fitopatógenos a partir de
semillas [Versión 1.0]. Tecámac, México: Autor.

8. ANEXOS

8.1. Elaboración de montajes

Para la observación de organismos microscópicos, se requiere realizar montajes en portaobjetos de un grosor no mayor de 2 mm que permitan el paso de una luz incidente (Dhingra y Sinclair, 1995).

- 1) Partir de cultivos puros o en su caso del tejido vegetal con signos del hongo.
- 2) Colocar el tejido vegetal o estructuras del hongo en un portaobjeto o caja Petri de cristal, luego ponerlo sobre la platina del microscopio estereoscópico para observar a detalle el área a seccionar.
- 3) Realizar cortes de material vegetal con estructuras de hongos, de un grosor menor a 0.5 mm.
- 4) Los cortes pueden hacerse con navaja de bisturí o con navajas de afeitar y tomar con un alfiler entomológico del número 2 o una aguja de disección un fragmento de micelio o estructura del hongo a partir del tejido vegetal o cultivo del hongo para elaborar montajes.

8.2.1 Montajes temporales con cubreobjetos

- 1) Colocar una gota de medio de montaje sobre un portaobjetos y adicionar las estructuras del hongo.
- 2) Colocar sobre la gota un cubreobjetos y presionar ligeramente para distribuir el medio.
- 3) Observar el montaje con un microscopio compuesto.

8.2.2 Montajes temporales con cinta adhesiva

- 1) Colocar en un portaobjetos una gota de medio de montaje.
- 2) Con una sección de cinta adhesiva transparente, tocar la parte superficial de la semilla o del medio de cultivo, donde se encuentre crecimiento de hongos.
- 3) Pegar la cinta sobre el portaobjetos, cuidando que las estructuras del hongo queden dentro de medio de montaje y observar el montaje con un microscopio compuesto.

8.2.3 Montajes permanentes

- 1) En un portaobjeto, colocar una gota de montaje y sobre ella las estructuras del hongo.
- 2) Utilizar un sacabocado de mano, calentarlo con un mechero e introducirlo en parafina para formar un anillo sobre el portaobjeto, alrededor de la gota de medio de montaje.
- 3) Colocar un cubreobjetos sobre el anillo y calentar hasta que se derrita la parafina, cuidando que no queden burbujas de aire en el medio.
- 4) Dejar enfriar y observar al microscopio compuesto.

8.2 Medios de Cultivo

Los medios de cultivo se clasifican de acuerdo a su composición en: sintéticos, semisintéticos o naturales, así como en selectivos y no selectivos, tomando como base su efecto sobre los microorganismos. El medio Papa Dextrosa Agar (PDA), es el medio más utilizado en micología. Los medios selectivos poseen condiciones específicas en su composición química o pH y son utilizados para favorecer el crecimiento de cierto tipo de organismos e inhibir o retardar el crecimiento de otros (Sosa et al., 1997).

En el Cuadro 1, se describen medios de cultivo para el aislamiento de hongos fitopatógenos, referidos por Dhingra y Sinclair (1995), ISTA (2018), Leslie y Summerell (2006) y NSHS (2017).

Cuadro 1. Medios de cultivo para hongos

Medio de Cultivo	Ingredientes	Procedimiento
PDA (Papa-Dextrosa-Agar)	200 g Papa 20 g Dextrosa 20 g Agar 1 L Agua destilada	1) Colocar en trozos la papa en un matraz Erlenmeyer con el agua y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. 2) Filtrar el agua de cocción y aforar a 1 L. Agregar el agar y la dextrosa. Esterilizar en autoclave a 121°C por 20 minutos. 3) Dejar enfriar, vaciar en cajas Petri y dejar solidificar.
AA (Agar-Agua)	20 g Agar 1 L Agua destilada	1) Colocar un matraz el agua y el agar, esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 121 °C. 2) Dejar enfriar, vaciar en cajas Petri y dejar que solidificar.
FSM	15 g Peptona 1 g KH ₂ PO ₄ 0.5 g MgSO ₄ ·7H ₂ O 20 g Agar 1 L Agua destilada Antibióticos: 0.2 g Pentacloronitrobenzoceno 0.3 g Sulfato de estreptomizina	1) Mezclar en un matraz los ingredientes, excepto los antibióticos. 2) Esterilizar en autoclave a 121 °C por 20 minutos. 3) Disolver los antibióticos: Pentacloronitrobenzoceno en agua destilada estéril (25 mg/1 mL de agua) y el Sulfato de estreptomizina en alcohol al 96% (15 mg/1 mL de alcohol). 4) Dejar enfriar y adicionar los antibióticos. Vaciar en cajas Petri. 5) Dejar solidificar y almacenar bajo condiciones de oscuridad.
BA (Frijol Agar, Been Agar)	20 g Semillas de frijol o haba 15 g Agar 1 L Agua destilada	1) Colocar las semillas en un Matraz con el agua y esterilizar por 1 hora a 121 °C. Dejar reposar por 18 horas a temperatura ambiente. 2) Filtrar el agua de cocción a un matraz limpio y aforar a 1 L. 3) Adicionar el agar y esterilizar en autoclave por 20 minutos. 4) Enfriar, vaciar a cajas Petri y dejar solidificar.
PCA (Papa Zanahoria Agar, Potato Carrot Agar)	20 g Papa 20 g Zanahoria 20 g Agar 1 L Agua destilada	1) Cortar en trozos la papa y la zanahoria y colocarlos en un matraz Erlenmeyer con el agua y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Filtrar el agua de cocción y aforar a 1 L. 2) Agregar el agar y esterilizar en autoclave a 121 °C por 20 minutos. Dejar enfriar, vaciar en cajas Petri y dejar solidificar.
CLA (Hojas de Clavel Agar, Canation Leaf Agar)	Hojas de clavel 20 g Agar 1 L Agua destilada	1) Lavar las hojas con agua corriente para eliminar rastros de suelo. 2) Exponer el haz las hojas a luz UV durante 30 minutos y posteriormente el envés. Cortar en fragmentos de 1 cm. 3) Esterilizar en autoclave dos ciclos a 121 °C. 4) En 1 L de agua destilada adicionar 20 g de agar y esterilizar a autoclave a 121 °C durante 20 minutos a 15 lb. 5) Enfriar, vaciar a cajas Petri y antes de solidificar adicionar un fragmento de hoja de clavel por caja.

<p>SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar, Agar especial pobre en nutrientes)</p>	<p>1 g KH₂PO₄ 1 g KNO₃ 0.5 g MgSO₄·7H₂O 0.5 g KCL 0.2 g Glucosa 0.2 g Sucrosa 20 g Agar 1 L Agua destilada</p>	<p>1) Colocar en el matraz todos los ingredientes y meter a autoclave a 121 °C durante 20 minutos. 2) Dejar enfriar, vaciar en cajas Petri y dejar solidificar.</p>
<p>V8 (Jugo de verduras V8 Agar)</p>	<p>340 mL de Jugo de verduras V8 5 g CaCO₃ 15 g Agar 1 L Agua destilada</p>	<p>1) Mezclar los dos primeros ingredientes, vaciar en tubos Falcon™ de 15 mL con tapa y centrifugar por 20 minutos a 2800 g. 2) Decantar la solución y diluirla con agua destilada en proporción 1:4 de agua. 3) Adicionar el agar y esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Dejar enfriar, vaciar en cajas Petri y dejar solidificar.</p>
<p>NP10-Agar</p>	<p>Recipiente A: 5.0 g Acido poligalacturónico 1.2 g NaOH pellets 500 mL Agua destilada Recipiente B: 15 g Agar 1.0 g KNO₃ 1.0 g KH₂PO₄ 0.5 g KCl 0.5 g MgSO₄·H₂O 0.5 mL Tergitol NP-10 500 mL Agua destilada Antibióticos: 0.5 g Cloranfenicol 0.5 g Sulfato de estreptomicina 0.5 g Clorhidrato de clortetraciclina</p>	<p>1) Preparar por separado el contenido del recipiente A y el B y esterilizar en autoclave a 120 °C por 20 minutos a 15 lb. 2) Dejar enfriar ambos recipientes. 3) Preparar una solución de clortetraciclina (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. 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. 6) Mezclar utilizando un agitador magnético. 7) Vaciar el medio en cajas Petri y almacenar bajo condiciones de oscuridad.</p> <p>Durante la manipulación de los antibióticos deberá evitarse el contacto directo con la luz y temperaturas elevadas.</p>

Nota: para reducir la posibilidad de contaminación de los medios de cultivo con bacterias, puede adicionarse ácido láctico, previo al vaciado del medio en cajas Petri.