

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**ÁREA INTEGRADA**



**TRABAJO DE GRADUACIÓN**  
**“DETECCIÓN MOLECULAR MEDIANTE PCR CONVENCIONAL DE TRES ESPECIES DEL NEMATODO *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. enterolobii* EN EL CULTIVO ORNAMENTAL DEL GÉNERO *Epipremnum*, EN EL LABORATORIO VISARMAGA, KILÓMETRO 22, CARRETERA AL PACÍFICO, VILLA NUEVA, GUATEMALA, C.A.”**

**YEIMY KARINA CUADRA SOLARES**

**Guatemala, abril de 2017**



**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
ÁREA INTEGRADA**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN**

**“DETECCIÓN MOLECULAR MEDIANTE PCR CONVENCIONAL DE TRES ESPECIES DEL NEMATODO *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. enterolobii* EN EL CULTIVO ORNAMENTAL DEL GÉNERO *Epipremnum*, EN EL LABORATORIO VISARMAGA, KILÓMETRO 22, CARRETERA AL PACÍFICO, VILLA NUEVA, GUATEMALA, C.A.”**

**PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

**POR**

**YEIMY KARINA CUADRA SOLARES**

**EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO**

**INGENIERA AGRÓNOMA**

**EN**

**SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

**EN EL GRADO ACADÉMICO DE**

**LICENCIADA**

**Guatemala, abril de 2017**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**RECTOR MAGNÍFICO**

**Dr. Carlos Guillermo Alvarado Cerezo**

**JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA**

Decano:	Ing. Agr. Mario Antonio Godínez López
Vocal Primero:	Dr. Tomás Antonio Padilla Cámara
Vocal Segundo:	Ing. Agr., M.A. César Linneo García Contreras
Vocal Tercero :	Ing. Agr., M.Sc. Erberto Raúl Alfaro Ortiz
Vocal Cuarto:	P. Agr. Walfer Yasmany Godoy Santos
Vocal Quinto:	P. Agr. Cristian Alexander Méndez López
Secretario:	Ing. Agr. Juan Alberto Herrera Ardón

Guatemala, abril de 2017

Guatemala, abril de 2017

Honorable Junta Directiva  
Honorable Tribunal Examinador  
Facultad de Agronomía  
Universidad de San Carlos de Guatemala

Honorables miembros:

De conformidad con las normas establecidas por la ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el trabajo de graduación:

**“DETECCIÓN MOLECULAR MEDIANTE PCR CONVENCIONAL DE TRES  
ESPECIES DEL NEMATODO *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. enterolobii* EN  
EL CULTIVO ORNAMENTAL DEL GÉNERO *Epipremnum*, EN EL LABORATORIO  
VISAR-MAGA, KILÓMETRO 22, CARRETERA AL PACÍFICO, VILLA NUEVA,  
GUATEMALA, C.A.”**

Presentado como requisito previo a optar el título de Ingeniera Agrónoma en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciada.

Esperando que el mismo llene los requisitos necesarios para su aprobación, me es grato suscribirme.

Atentamente.

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

Yeimy Karina Cuadra Solares.

## ACTO QUE DEDICO

- A DIOS:** Gracias Dios por tu infinita misericordia en mi vida, por darme la fuerza y valentía de culminar este logro; concédeme señor que siempre se cumpla tu voluntad en mi vida y no la mía.
- A MIS ABUELOS:** Ricardo Salazar y Luisa Solares (†), Ernesto Cuadra y Jesús Peláez (†), por su amor y sabios consejos
- A MIS PADRES:** Edwin Cuadra y Aracely Solares. Por su apoyo incondicional, por su amor, por su cariño hacia mi persona y por sus consejos para guiar mis pasos, éste logro es de ustedes los amo.
- A MIS HERMANOS:** Robin Cuadra, Nancy Cuadra, Velmy Solares, Y Cindy Solares por sus muestras de afecto, los amo.
- A MIS SOBRINOS:** Edison Córdova, Bruce Rivera, Jefferson Cuadra y Andrea Cuadra, que son mi alegría.
- A UNA PERSONA EN ESPECIAL:** Darwin Noriega por sus muestras de amor y afecto, por pasar gratos momentos y darme palabras de aliento cuando más lo necesité, por compartir este triunfo a mi lado, te amo.
- A MIS TIOS:** Maritza Solares, William Morales, Geovanny Solares, Ricardo Solares, Maynor Cuadra, Carlos Cuadra, Elmer Cuadra, Jesús Cuadra, Hugo Cuadra, Bertilia Cuadra, Mirna Cuadra, Zulema Bonilla, Alicia Bonilla, Abelina Bonilla, Miguel Bonilla y Maro Bonilla (†) por sus muestras de afecto.
- A MIS PRIMOS:** Carmen Recinos, Pablo Morales, Candy Morales, Sara Robles, Susana Robles, Sandra Robles, Waleska Lima, Velmy Lima, Suly Ortiz, Nery Ortiz, Axel Aguilar, Darol Aguilar, Mario Aguilar, Miguel Bonilla, Joao Bonilla, Allan Bonilla, Ernesto Cuadra, y Dennis Cuadra por sus muestras de afecto.
- A MIS AMIGAS:** Natalia Quixtan, María José Labin, Jessica Esquivel, Gladys Arévalo, Miriam Escobar, Shirley Álvarez y Analy López por pasar gratos momentos y darme palabras de aliento cuando más lo necesité.

## TRABAJO DE GRADUACIÓN QUE DEDICO

A:

GUATEMALA, rodeado de lagos y volcanes.

TIQUISATE, pedacito de tierra que me vio nacer y crecer.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA, la casa de estudios que me hizo crecer como persona y profesionalmente.

FACULTAD DE AGRONOMÍA, lugar que me formó profesionalmente.

Personas que forman parte de la Dirección de Sanidad Vegetal VISAR-MAGA en especial al Ing. Agr. Guillermo Ortiz, Ing. Agr. Edil Rodríguez y Lic. Andrés Ávalos, por darme la oportunidad de realizar mi Ejercicio Profesional Supervisado (EPS) en el laboratorio VISAR-MAGA kilómetro 22, Bárcenas Villa Nueva.

Al ingeniero Mario Silva por su apoyo en las muestras recopiladas.

Los Ingenieros Agrónomos Mirna Díaz, Nelson García, y Francisco Blanco por compartir sus conocimientos en el área de Biología Molecular, el área de Fitopatología y el área Nematológico.

A los ingenieros Guillermo Hernández, Bernardo Mendoza, Teresa Hernández, Amílcar Toledo y Rubén Estrada por su constante apoyo durante mi formación profesional.

En especial a Johana Morales y Diana Gutiérrez por compartir sus conocimientos en mi formación profesional, por su afecto y amistad.

A la Dirección de Sanidad Vegetal del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación.

Al Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria, por financiar el Ejercicio Profesional Supervisado.

## AGRADECIMIENTOS

A:

**MI ASESOR, Dr. Amílcar Sánchez,** por compartir su conocimiento y guiarme en el proceso para terminar con éxito este trabajo de graduación.

**MI SUPERVISORA, Dra. Ligia Maribel Monterroso López,** por su valiosa colaboración, apoyo y motivación para culminar esta fase.

A las familias que marcaron mi vida, le agradezco por todo el afecto y apoyo moral en especial a la familia Duarte, Morales Gálvez, Bonilla Lima, Bonilla Sánchez, Calderón, Noriega López, Maldonado Noriega, Asencio y Barrientos Gaitán.



## ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
<b>CAPÍTULO I</b>	
Diagnóstico sobre la función actual del Laboratorio de Diagnóstico de la Dirección de Sanidad Vegetal, VISAR-MAGA del kilómetro 22, carretera al Pacífico, Bárcena, Villa Nueva.....	1
1.1. PRESENTACIÓN.....	2
1.2. MARCO REFERENCIAL.....	3
1.2.1. Antecedentes.....	3
1.2.2. Dirección de sanidad vegetal.....	4
1.2.3. Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario.....	5
1.3 OBJETIVOS.....	6
1.3.1. General.....	6
1.3.2. Específicos.....	6
1.4. METODOLOGÍA.....	7
1.5. RESULTADOS.....	8
1.5.1. Actividades que realiza el Laboratorio.....	8
1.5.2. Recurso humano.....	12
1.5.3. Ejecución de muestras.....	14
1.5.3.A. Recepción de muestras.....	14
1.5.3.B. Registro de muestras.....	14
1.5.3.C. Procesamiento de muestras.....	14
1.5.3.D. Tiempo requerido para el diagnóstico.....	15

CONTENIDO	PÁGINA
1.5.3.E. Entrega de resultados.....	15
1.5.3.F. Muestras procesadas.....	16
1.5.3.G. Costos.....	16
1.5.4. Problemas identificados.....	17
1.6. ANÁLISIS FODA.....	18
1.7. CONCLUSIONES.....	19
1.8. RECOMENDACIONES.....	20
1.9. BIBLIOGRAFÍA.....	21
<b>CAPÍTULO II</b>	
Detección Molecular Mediante PCR convencional de tres especies del nematodo <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>M. javanica</i> y <i>M. enterolobii</i> en el cultivo ornamental del género <i>Epipremnum</i> , en el laboratorio VISAR-MAGA, kilómetro 22 carretera al Pacífico, Villa Nueva, Guatemala, C.A.....	22
2.1. PRESENTACIÓN.....	23
2.2. MARCO TEÓRICO.....	25
2.2.1. Marco conceptual.....	25
2.2.1.1. Cultivo ornamental <i>Epipremnum</i> .....	25
2.2.2.2. Clasificación taxonómica.....	25
2.2.2.A. Características del cultivo <i>Epipremnum</i> .....	26
2.2.2.B. Ecología del cultivo <i>Epipremnum</i> .....	26
2.2.2.C. Cuidados de la planta <i>Epipremnum</i> .....	26
2.2.2.D. Propagación de la planta <i>Epipremnum</i> .....	27
2.2.3. Plagas y enfermedades.....	27
2.2.4. Exportación de plantas ornamentales en Guatemala.....	28
2.2.5. Nematodos.....	28
2.2.6. <i>Meloidogyne</i> spp.....	30
2.2.7. Morfología.....	30

CONTENIDO	PÁGINA
2.2.8. Ciclo de vida.....	31
2.2.9. Especificidad hospedera para las especies de <i>Meloidogyne spp.</i> .....	31
2.2.10. Distribución mundial de especies de nematodos.....	32
2.2.11. Síntomas del nematodo <i>Meloidogyne sp.</i> .....	33
2.2.11.A. Formas de la hembra del <i>Meloidogyne</i> .....	33
2.2.12. Diferencias para las características de los diseños en patrones perineales (mm).....	35
2.2.12.A. <i>Meloidogyne incognita</i> .....	35
2.2.12.B. <i>Meloidogyne javanica</i> .....	36
2.2.12.C. <i>Meloidogyne enterolobii</i> .....	37
2.2.13. Métodos de identificación en especies de nematodos <i>Meloidogyne</i> <i>spp.</i> .....	38
2.3. MARCO REFERENCIAL.....	43
2.3.1. Geografía.....	43
2.3.2. Condición climática del municipio de Villa Nueva.....	44
2.3.3. Suelos.....	44
2.4. HIPÓTESIS.....	45
2.5. OBJETIVOS.....	45
2.6. METODOLOGÍA.....	46
2.6.1. Pasos para la extracción de nematodos desde la raíz según Hartman y Sasser, 1985.....	46
2.6.2. Pasos para la identificación morfológica de nematodos de <i>Meloidogyne</i> <i>spp</i> a través de sus patrones perineales según Hartman y Sasser, 1985.....	48
2.6.3. Pasos para la extracción de ADN según Stanton, J. M., McNicol, C.G., and Steele, V. 1998.....	49
2.6.4. Pasos para la amplificación de ADN de los nematodos según Hu, M. X., Zhuo, K., and Liao, J. L. 2011.....	51
2.7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	53

CONTENIDO	PÁGINA
2.7.1. Caracterización morfológica de las muestras de nematodos extraídos de muestras de raíces de la planta <i>epipremnum</i> .....	53
2.7.2. Detección para el diagnóstico molecular de <i>Meloidogyne spp.</i> , descritas por Meng et al. 2004 y Long et al. 2004.....	61
2.8. CONCLUSIONES.....	66
2.9. RECOMENDACIONES.....	67
2.10. BIBLIOGRAFÍA.....	68
<b>CAPÍTULO III</b>	
Servicios del Laboratorio de Diagnóstico de la Dirección de Sanidad Vegetal, VISAR-MAGA del kilómetro 22, carretera al Pacífico, Bárcena, Villa Nueva.....	72
3.1. PRESENTACIÓN.....	73
3.2 SERVICIO 1. SISTEMA DE INVENTARIO COMPUTARIZADO EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	75
3.2.1. OBJETIVOS.....	75
3.2.2. METODOLOGÍA.....	76
3.2.3. RESULTADOS.....	76
3.2.3.A. Inventario de equipos, materiales e insumos.....	77
3.2.3.B. Sistema de alerta del inventario de puntas y tubos.....	85
3.2.4. EVALUACIÓN.....	86
3.2.5. BIBLIOGRAFÍAS.....	87
3.3. SERVICIO 2. APOYO A LA IMPLEMENTACIÓN DE LA PRUEBA DE ANÁLISIS ELISA.....	88
3.3.1. OBJETIVOS.....	88
3.3.2. METODOLOGÍA.....	89
3.3.3. RESULTADOS.....	89

CONTENIDO	PÁGINA
3.3.3.A. Listado de patógenos de la prueba ELISA.....	90
3.3.3.B. Cotizaciones de tres proveedores diferentes para la prueba ELISA.....	91
3.3.3.C. Información de protocolo para cada patógeno en uso de reactivos y lavado de cristalería.....	92
3.3.3.D. Preparación del control.....	129
3.3.3.E. Recomendaciones del control.....	129
3.3.3.F. Protocolo de lavado de cristalería de ELISA.....	129
3.3.3.G. Listado de todos los reactivos a utilizar con cada patógeno específico.....	130
3.3.3.H. Proyecciones por año el inicio de actividades que se realizaran en la prueba de ELISA.....	130
3.3.4. EVALUACIÓN.....	131
3.3.5. BIBLIOGRAFÍA.....	132
<b>3.4. SERVICIO 3. PROTOCOLO SOBRE EL PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DEL NEMATODO HEMBRA <i>MELOIDOGYNE INCOGNITA</i>, <i>M. JAVANICA</i> Y <i>M. ENTEROLOBII</i> EN MUESTRAS DE RAÍZ.....</b>	<b>133</b>
3.4.1. OBJETIVOS.....	133
3.4.2. METODOLOGÍA.....	134
3.4.3. RESULTADOS.....	135
3.4.3.A. Extracción del nematodo hembra.....	135
3.4.3.B. Extracción del ADN (Stanton, J. M., McNicol, C. G., and Steele, V. 1998).....	136
3.4.4. Concentraciones de Reactivos.....	136
3.4.5. Amplificación a partir del ADN de los nemátodos <i>Meloidogyne general</i> , <i>M. incógnita</i> , <i>M. Javanica</i> , <i>M. enterolobii</i> y <i>múltiple</i> , mezclando los componentes de la reacción.....	139
3.4.6. BIBLIOGRAFÍA.....	151
a. ANEXOS.....	152

## ÍNDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Estructura del personal del Departamento de Sanidad Vegetal.....	13
Cuadro 2. Análisis FODA para el Laboratorio de Diagnóstico de la Dirección de Sanidad Vegetal, VISAR-MAGA.....	18
Cuadro 3. Clasificación taxonómica de la planta <i>Epipremnum</i> .....	25
Cuadro 4. Clasificación taxonómica de nematodos.....	29
Cuadro 5. Condiciones de protocolo para la amplificación en PCR múltiple con iniciadores para identificación del género <i>Meloidogyne</i> y cebadores para <i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i> y <i>M. enterolobii</i> .....	61
Cuadro 6. Resumen de resultados obtenidos en PCR de <i>Meloidogyne múltiple</i> .....	64
Cuadro 7. Resumen de resultados obtenidos en PCR de <i>Meloidogyne múltiple</i> .....	65
Cuadro 8. Resultados de la cantidad de aparatos en uso del Laboratorio Biología Molecular.....	77
Cuadro 9. Resultados de la cantidad de pipetas en uso del Laboratorio Biología Molecular.....	78
Cuadro 10. Resultados de la cantidad de puntas del Laboratorio Biología Molecular.....	79
Cuadro 11. Resultados de la cantidad de tubos del Laboratorio Biología Molecular.....	81
Cuadro 12. Resultados de la cantidad de cristalería del Laboratorio Biología Molecular.....	82
Cuadro 13. Resultados de la cantidad de reactivos sellados y en uso de Laboratorio Biología Molecular.....	83
Cuadro 14. Resultados de la cantidad de puntas y tubos que están sellados y en uso del Laboratorio Biología Molecular como sistema de alerta.....	85
Cuadro 15. Listado de patógenos con mayor demanda en el Laboratorio de Diagnóstico de Sanidad Vegetal.....	90

Cuadro 16. Resultado de la cotización de prueba de ELISA en AGDIA.....	91
Cuadro 17. Resultado de la cotización de prueba ELISA en SEDIAG.....	91
Cuadro 18. Resultado de la cotización de prueba ELISA en LOEWE.....	92
Cuadro 19. Listado de reactivos con su patógeno específico.....	130
Cuadro 20. Proyección de pruebas para un año de cotización AGDIA.....	130
Cuadro 21. Resumen del cálculos para el reactivo del buffer de extracción en ADN: NaOH a (10 Mm).....	136
Cuadro 22. Resumen del cálculo para el reactivo Tris-HCL pH 8.....	136
Cuadro 23. Resumen del cálculo para el reactivo de TAE 1 X para la mezcla del gel agarosa.....	137
Cuadro 24. Resumen del cálculo para el reactivo TAE 50 X para la concentración del TAE 1 X.....	137
Cuadro 25. Resumen del cálculo para la cantidad de reactivo en la mezcla de gel-red a una concentración de 10,000 X.....	138
Cuadro 26. Concentraciones del master mix utilizando buffer sin MgCl <sub>2</sub> para <i>Meloidogyne general</i> .....	139
Cuadro 27. Concentraciones del master mix utilizando buffer con MgCl <sub>2</sub> para <i>Meloidogyne general</i> .....	140
Cuadro 28. Concentraciones del master mix utilizando buffer sin MgCl <sub>2</sub> para <i>Meloidogyne incognita</i> .....	140
Cuadro 29. Concentraciones del master mix utilizando buffer sin MgCl <sub>2</sub> para <i>Meloidogyne javanica</i> .....	141
Cuadro 30. Concentraciones del master mix utilizando buffer sin MgCl <sub>2</sub> para <i>Meloidogyne enterolobii</i> .....	141
Cuadro 31. Concentraciones del master mix utilizando buffer con MgCl <sub>2</sub> para <i>Meloidogyne</i> múltiple ( <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>M. javanica</i> , <i>M. enterolobii</i> + <i>M. general</i> ).....	142
Cuadro 32. Tabla con cálculos para el master mix con buffer sin MgCl <sub>2</sub> para <i>Meloidogyne general</i> de 12.5 µl.....	143

Cuadro 33. Tabla con cálculos para el master mix con buffer con MgCl <sub>2</sub> para <i>Meloidogyne general</i> de 12.5 µl.....	144
Cuadro 34. Tabla con cálculos para el master mix con buffer sin MgCl <sub>2</sub> para <i>Meloidogyne incognita</i> de 12.5 µl.....	145
Cuadro 35. Tabla con cálculos para el master mix con buffer sin MgCl <sub>2</sub> para <i>Meloidogyne javanica</i> de 12.5 µl.....	146
Cuadro 36. Tabla con cálculos para el master mix con buffer sin MgCl <sub>2</sub> para <i>Meloidogyne enterolobii</i> de 12.5 µl.....	147
Cuadro 37. Cálculos para el master mix con buffer con MgCl <sub>2</sub> para <i>Meloidogyne múltiple</i> de 12.5 µl.....	148
Cuadro 38A. Resumen para información de iniciadores con fragmento amplificado.....	153
Cuadro 39A. Resumen de preparación para la concentración del iniciador de la especie <i>Meloidogyne general</i> .....	153
Cuadro 40A. Resumen de preparación para la concentración del iniciador de la especie <i>Meloidogyne general</i> reverso.....	154
Cuadro 41A. Resumen de preparación para la concentración del iniciador de la especie <i>Meloidogyne incognita</i> .....	154
Cuadro 42A. Resumen de preparación para la concentración del iniciador de la especie <i>Meloidogyne incognita</i> reverso.....	155
Cuadro 43A. Resumen de preparación para la concentración del iniciador de la especie <i>Meloidogyne javanica</i> .....	155
Cuadro 44A. Resumen de preparación para la concentración del iniciador de la especie <i>Meloidogyne javanica</i> reverso.....	156
Cuadro 45A. Resumen de preparación para la concentración del iniciador de la especie <i>Meloidogyne enterolobii</i> .....	156
Cuadro 46A. Resumen de preparación para la concentración del iniciador de la especie <i>Meloidogyne enterolobii</i> reverso.....	157
Cuadro 47A. Listado de 18 muestras que dieron positivas para el análisis morfológico y detección molecular de <i>Meloidogyne sp.</i> .....	157



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fotografía de la entrada al área de Fitopatología.....	8
Figura 2. Fotografía del área de Diagnóstico Fitopatológico.....	9
Figura 3. Fotografía del área de Acarología y Entomología.....	9
Figura 4. Fotografía del área de Entomología y Diagnóstico de la mosca de la fruta.....	10
Figura 5. Fotografía de la cámara miss Chamber en el área general.....	10
Figura 6. Fotografía del embudo Bearman ubicado en los pasillos del Laboratorio.....	11
Figura 7. Fotografía del área de Bacteriología.....	11
Figura 8. Fotografía del área de Diagnóstico Molecular.....	12
Figura 9. Organigrama del Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario.....	13
Figura 10. Esquema de la distribución de la muestra.....	15
Figura 11. Formas de cuerpo de hembras en <i>Meloidogyne sp.</i> , A: cuerpo piriforme, B: cuerpo ovalado.....	34
Figura 12. Diseño de patrón perineal en hembra adulta del nematodo <i>Meloidogyne incognita</i> .....	35
Figura 13. Diseño de patrón perineal hembra adulta del nematodo <i>Meloidogyne javanica</i> .....	36
Figura 14. Diseño de patrón perineal en hembra adulta del nematodo <i>Meloidogyne enterolobii</i> .....	37
Figura 15. Esquema que muestra los pasos para realizar el montaje de patrones perineales.....	39
Figura 16. Imagen satelital donde se observa la delimitante del Laboratorio VISAR-MAGA.....	43
Figura 17. Serie de fotografías del protocolo para extracción de nematodos desde la raíz según Hartman y Sasser, 1985.....	47
Figura 18. Serie de fotografías del protocolo para identificación morfológica de patrones perineales según Hartman y Sasser, 1985.....	48

Figura 19. Serie de fotografías del protocolo para extracción de ADN según Stanton, J. M., McNicol, C. G., and Steele, V. 1998.....	49
Figura 20. Serie de fotografías del protocolo para amplificación de ADN en nematodos, según Hu, M. X., Zhuo, K., and Liao, J. L. 2011.....	51
Figura 21. Serie de fotografías de cortes perineales del nematodo <i>Meloidogyne</i> para identificación de sus tres especies.....	53
Figura 22. Serie de fotografías de cortes perineales del nematodo <i>Meloidogyne</i> para identificación de sus tres especies.....	54
Figura 23. Serie de fotografías de cortes perineales del nematodo <i>Meloidogyne</i> para identificación de sus tres especies.....	55
Figura 24. Serie de fotografías de cortes perineales del nematodo <i>Meloidogyne</i> para identificación de sus tres especies.....	56
Figura 25. Serie de fotografías de cortes perineales del nematodo <i>Meloidogyne</i> para identificación de sus tres especies.....	57
Figura 26. Serie de fotografías de cortes perineales del nematodo <i>Meloidogyne</i> para identificación de especies.....	58
Figura 27. Fotografía de una gel de agarosa de productos de PCR utilizando ADN extraído de nematodos.....	63
Figura 28. Fotografía de una gel de agarosa de productos de PCR utilizando ADN extraído de nematodos.....	63
Figura 29. Fotografía de gel de agarosa.....	150
Figura 30A. Flujograma del procedimiento extracción de nematodos formadores de agallas.....	152
Figura 31A. Pasos como realizar corte y montaje de patrón perineal en nematodos hembras.....	158
Figura 32A. Fotografía de una gel de agarosa de productos de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple.....	160

**TRABAJO DE GRADUACIÓN**  
**“DETECCIÓN MOLECULAR MEDIANTE PCR CONVENCIONAL DE TRES ESPECIES DEL NEMATODO *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. enterolobii* EN EL CULTIVO ORNAMENTAL DEL GÉNERO *Epipremnum*, EN EL LABORATORIO VISAR-MAGA, KILÓMETRO 22, CARRETERA AL PACÍFICO, VILLA NUEVA, GUATEMALA, C.A.”**

**GRADUATION WORK**  
**"MOLECULAR DETECTION THROUGH CONVENTIONAL PCR OF THREE NEMATODE SPECIES *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. enterolobii* IN THE ORNAMENTAL CULTIVATION OF THE GENE *Epipremnum*, IN THE VISAR-MAGA LABORATORY, KILOMETER 22, ROAD TO THE PACIFIC, VILLA NUEVA, GUATEMALA, C.A."**

**RESUMEN**

La presente investigación fue realizada a través de la ayuda del Laboratorio VISAR-MAGA, kilómetro 22, carretera al Pacífico, Villa Nueva, Guatemala, C.A., financiado por la Organización Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria.

El diagnóstico realizado fue dirigido al laboratorio VISAR-MAGA, kilómetro 22 carretera al Pacífico, Villa Nueva, Guatemala, determinando la función actual del laboratorio, obteniendo información por medio de observación y revisión de documentos virtuales relacionados a las metodologías para el proceso de análisis de muestras.

La investigación, consistió en determinar molecularmente mediante PCR convencional a tres especies del nematodo *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. enterolobii* en el cultivo ornamental del género *Epipremnum*. Las plantas del género *Epipremnum*, son muy atacadas por los nematodos *Meloidogyne sp.*, esta fue la razón, para la selección de este género del nematodo y de la planta.

La investigación consistió, en extraer los individuos de las tres especies de nematodos *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. enterolobii* y realizar una caracterización morfológica, lo cual se realizaron medidas de patrón perineal. Posteriormente se realizó la extracción y amplificación del ADN de los nematodos en las dieciocho muestras de la planta *Epipremnum*.

Al final de la investigación, la comparación morfológica con la determinación molecular da el mismo resultado en dieciséis muestras de la planta *Epipremnum*, la presencia de nematodos de la especie *Meloidogyne incognita* y dos muestras con presencia de la especie *Meloidogyne javanica*.

Los servicios prestados al laboratorio de diagnóstico de sanidad vegetal VISAR-MAGA, consistieron en el apoyo al sistema de inventario computarizado en el laboratorio de biología molecular. Este servicio fue de útil información para tener una alerta de todos los suministros de reactivos y equipo de trabajo, que han sido utilizados. El servicio también brindo la oportunidad que se llevará a cabo las compras de insumos.

En el segundo servicio también se realizaron protocolos escritos especificados bajo los documentos de los equipos, también sobre material e insumos. Se realizó un listado de todos los patógenos que se pueden realizar en el ensayo ELISA y por último una proyección del presupuesto para el inicio de año de las actividades. El tercer servicio se realizó un manual de procedimientos para nematodos *Meloidogyne* para la de detección de las tres especies.

Estas actividades se desarrollaron durante un período de diez meses, los cuales forman parte del Ejercicio Profesional Supervisado en los meses de febrero a noviembre del 2016.

## **CAPÍTULO I**

**Diagnóstico sobre la función actual del Laboratorio de Diagnóstico de la Dirección de Sanidad Vegetal, VISAR-MAGA del kilómetro 22, carretera al pacífico, Bárcenas, Villa Nueva.**

## 1.1. PRESENTACIÓN

La Dirección de Sanidad Vegetal, fue creada por acuerdo gubernativo número 338-2010 del 19 de noviembre de 2010, adscrita al Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación, con el fin de proporcionar el análisis y asistencia técnica para conformar el Sistema de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria a personas particulares, instituciones privadas y gubernamentales, para evitar el ingreso y salidas de plagas y enfermedades cuarentenarias.

Mediante el proceso de diagnóstico fue necesaria la revisión y recopilación de información que conforma el Laboratorio de Diagnóstico de Sanidad Vegetal (VISAR-MAGA), dando como énfasis al antecedente de la institución de como ha venido desarrollando y como fueron distribuidas todas las áreas y su función según su especialidad y personal. Se recopiló información del proceso de análisis de las muestras, tiempo requerido de los resultados y costos por servicios.

Finalmente el laboratorio presenta en lo problemas entre los que se pueden mencionar: la demora en la contratación y pago del personal, infraestructuras con espacios demasiados reducidos, falta de personal del área fitopatológica, manuales de diagnósticos desactualizados, falta de interés en la capacitación del personal. Además, se realizó un análisis FODA; la cual conlleva todas fortalezas y debilidades que tiene el laboratorio así mismo las ventajas y desventajas de cómo ir solucionando las debilidades y las amenazas que se presentan cada día. A partir del diagnóstico, se determinaron las líneas de la investigación y de los servicios durante el Ejercicio Profesional Supervisado EPS.

## **1.2. MARCO REFERENCIAL**

### **1.2.1. Antecedentes**

El Decreto Gubernativo número 14, del 24 de agosto de 1871, estableció un Ministerio de Fomento, adjudicándole como funciones la protección y mejora del comercio, agricultura, ganadería, artes, industrias, obras públicas, líneas telegráficas, caminos, puentes, puertos y además medios de comunicación. Este mismo Decreto suprimió el Consulado de Comercio, que venía desempeñando similares atribuciones (MAGA, 2016).

Por Acuerdo Gubernativo del 1 de agosto de 1899, fue creada una Dirección General de Agricultura, adscrita al Ministerio de Fomento y se nombró como Director General al señor Enrique Díaz Durán. Un Acuerdo Gubernativo del 2 de abril de 1920, creó la Secretaría de Estado en el Despacho de Agricultura y Trabajo, nombrando como titular al licenciado Mariano López Pacheco, pero esta Secretaría no llegó a funcionar, debido al cambio de gobierno ocurrido el 8 de abril de ese mismo año y los asuntos relacionados con la agricultura siguieron atendiéndose por la Secretaría de Fomento (MAGA 2016).

El Ministerio de Agricultura fue creado por el Decreto Legislativo No. 1042, de fecha 21 de mayo de 1920, que copiado literalmente dice: “decreto No 1042, la Asamblea Nacional Legislativa de la República de Guatemala, decreta: Artículo único. Se establece un ministerio de agricultura, para que este importante ramo, fuente principal de la riqueza del país, sea atendido como corresponde pase al ejecutivo para su cumplimiento. Dado en el palacio del poder legislativo en Guatemala el 21 de mayo de 1920. Arturo Ubico, presidente; Adrián Recinos, secretario; Ricardo C. Castañeda, secretario.- Palacio del poder ejecutivo: Guatemala, 24 de mayo de 1920 (MAGA 2016).

A pesar que de que el Decreto Legislativo 1042 dispuso la creación de un “Ministerio de Agricultura”, este organismo, como todos los demás similares que operaban dentro del gobierno, se llamó Secretaría del Despacho de Agricultura, o simplemente secretaria de

agricultura, esta denominación la conservó hasta el año de 1933. Durante los años 34 y 35, se denominó Secretaria de Agricultura y Caminos (MAGA, 2016).

De 1936 a 1944 llevó nuevamente el nombre de Secretaria de Agricultura. En el año de 1944 su nombre recibió dos cambios; el 4 de diciembre: Secretaria de Estado en el Despacho de Economía y Agricultura, por Decreto Gubernativo No. 28. El 26 del mismo mes de diciembre: Secretaria de Agricultura y Minería. El Decreto Legislativo No. 93, del 25 de abril de 1945, le llamo: Ministerio de Agricultura, nombre que conservó hasta 1981. Fue el Decreto Legislativo No 51-81 de diciembre de 1981, el que dio la denominación actual al Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación-MAGA, (MAGA, 2016).

Años después a través del Gubernativo número 338-2010 del 19 de noviembre de 2010 surge una estructura del MAGA, que incluye la Dirección de Sanidad Vegetal del Viceministerio de Sanidad Agropecuaria Y Regulaciones-VISAR, (VISAR, 2013).

### **1.2.2. Dirección de Sanidad Vegetal**

La Dirección de Sanidad Vegetal surgió con el fin de prevenir, controlar y erradicar las plagas de importancia cuarentenarias y económicas para el país, con el fin de poder tomar las acciones que son:

- ✓ Identificar las plagas y enfermedades por zonas geográficas, para atender las emergencias fitosanitarias de los cultivos.
- ✓ Disponer de un sistema de control y registro para las medidas de prevención.
- ✓ Promover acciones de organización para la vigilancia de los patógenos que afectan a la producción nacional de los alimentos (VISAR, 2011).

La Dirección de Sanidad Vegetal, estable la estructura de 3 laboratorios con el fin de prestar servicio fitosanitario al país, uno ubicado en el departamento de Petén, otro en el departamento de Quetzaltenango y el otro establecido en el Km 22, carretera al Pacífico,



Bárcenas, Villa Nueva, donde se llevó a cabo el Ejercicio Profesional Supervisado (EPS), con el fin de llegar a la determinación de la función actual en este documento.

### **1.2.3. Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario.**

El laboratorio de Diagnóstico de la Dirección de Sanidad Vegetal, VISAR-MAGA del Km 22, carretera al Pacífico, Bárcenas, Villa Nueva, se destinó brindar asistencia técnica para la vigilancia epidemiológica fitosanitaria a todas las regiones del país, dando servicio a instituciones particulares, privadas y gubernamentales. Estos servicios vigila la inocuidad de alimentos que se consumen en territorio nacional y los que son exportados (MAGA, 2016).

El laboratorio es una entidad de verificar la presencia de plagas y enfermedades en el sector agrícola y forestal. Cumple una función clave para detectar oportunamente plagas y enfermedades cuarentenarias, manteniendo constantemente monitoreo de plagas endémicas y su detección (MAGA, 2016).

El laboratorio cuenta con infraestructura moderna y equipo humano con amplia experiencia en las diferentes disciplinas de la fito-protección (MAGA, 2016).

El Diagnóstico Fitosanitario, es un sistema que debe ser planificado y ejecutado en forma técnica, sistemática de carácter oficial y con el apoyo de todos los sectores involucrados, de forma que genere confiabilidad dentro del país y credibilidad a nivel internacional; favoreciendo la competitividad del país y el comercio internacional (MAGA, 2016).

## **1.3. OBJETIVOS**

### **1.3.1. General**

Determinar las actividades actuales del laboratorio de Diagnóstico de la Dirección de Sanidad Vegetal, del VISAR-MAGA, ubicado en el kilómetro 22, carretera el Pacífico Bárcenas Villa Nueva, con la finalidad de identificar que problemas presenta en el servicio.

### **1.3.2. Específicos**

1. Describir las áreas que se encuentran en el laboratorio de diagnóstico de la dirección de sanidad vegetal, VISAR-MAGA.
2. Describir la metodología que está establecida en el laboratorio para el proceso de análisis de muestras.
3. Identificar los principales problemas que presenta el laboratorio para los servicios de diagnóstico.
4. Conocer el funcionamiento del Laboratorio de Diagnóstico de la Dirección de Sanidad Vegetal, del VISAR-MAGA, mediante un análisis FODA (Fortalezas, Oportunidades, Debilidades y Amenazas).

#### **1.4. METODOLOGÍA**

Para el proceso de diagnóstico, fue importante describir las áreas y personal establecido que forma del Laboratorio de Diagnóstico de la Dirección de Sanidad Vegetal, VISAR-MAGA, así mismo describiendo el proceso de ejecución de muestras que ingresan los usuarios desde recepción hasta entrega de resultados en tiempo establecido de acuerdo análisis requerido por lo que representa un costo único por diagnóstico para el sector agrícola del país.

También se tomó en cuenta fuentes secundarias; como la revisión de documentos, páginas virtuales de la institución, actualización de documentos realizados por especialistas con anterioridad y revisión de manuales establecidos del VISAR.

Se identificaron problemas que se dan día con día en el laboratorio del personal que labora ver Cuadro 1, de los usuarios en el ingreso de muestras, y de equipo e insumos para llevar a cabo los diagnósticos por los espacios reducidos que se estarán presentado en fotos, esto dió la oportunidad de llegar a actualizar un análisis FODA realizado por García, 2015.

## 1.5. RESULTADOS

Descripción general de las áreas y personal que se encuentran en el Laboratorio de Diagnóstico de la Dirección de Sanidad Vegetal, VISAR-MAGA del kilómetro 22, carretera al Pacífico, Bárcenas, Villa Nueva.

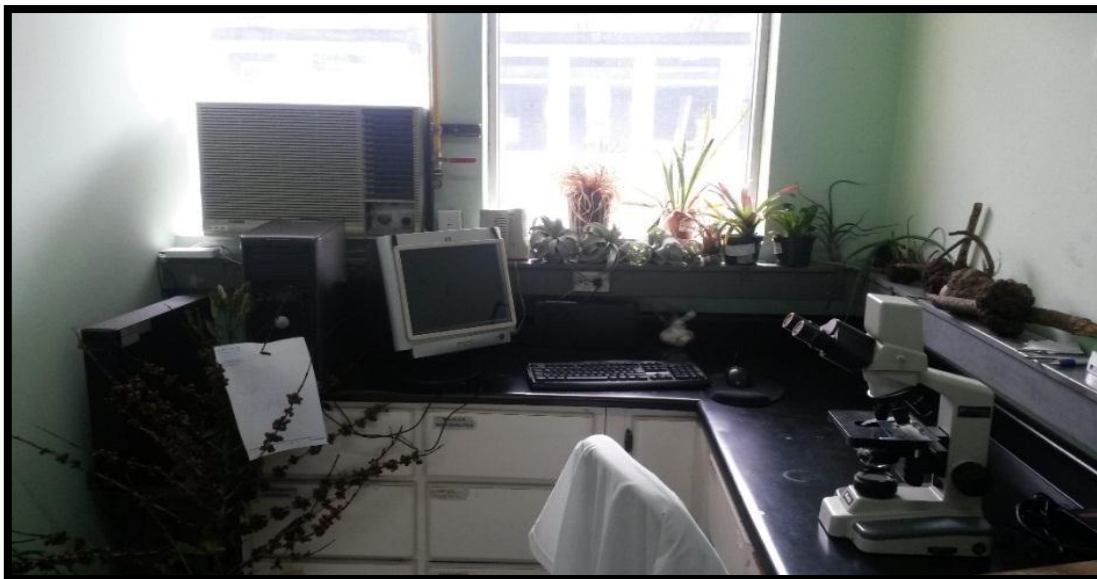
### 1.5.1. El laboratorio realiza las actividades de:

- **Diagnóstico Fitopatológico:** Se diagnostica la presencia de hongos, bacterias y virus como se ve la Figura 1 y Figura 2, con observación de la sintomatología y montaje de la misma para ser observada al estéreo y microscopio.



Fuente: Cuadra, 2016.

Figura 1. Fotografía de la entrada al área de Fitopatología.



Fuente: Cuadra, 2016.

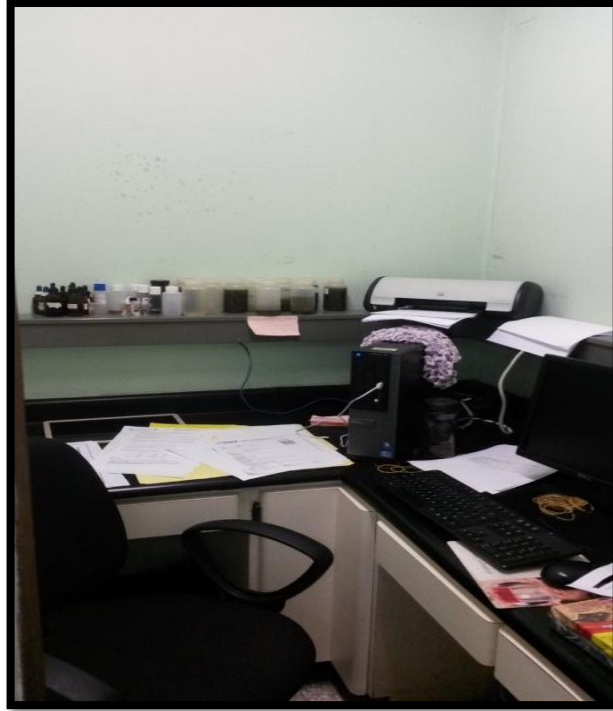
Figura 2. Fotografía del área de Diagnóstico Fitopatológico.

- **Diagnóstico Entomológico:** En la Figura 3 y Figura 4, muestra el área donde se observa en estéreo y microscopio los géneros y especies en presencia de plagas de ácaros, plagas de importancia agrícola y forestal, plagas cuarentenadas, mosca de la fruta.



Fuente: Cuadra, 2016.

Figura 3. Fotografía del área de Acarología y Entomología.



Fuente: Cuadra, 2016.

Figura 4. Fotografía del área de Entomología y Diagnóstico de la mosca de la fruta.

- **Diagnóstico Nematológico:** En la Figura 5 y Figura 6 se muestra el área del cual se observa la presencia de nematodos de quistes y filiformes de las muestras a través de suelo y raíz.



Fuente: Cuadra, 2016.

Figura 5. Fotografía de la cámara Miss Chamber en el área general.



Fuente: Cuadra, 2016.

Figura 6. Fotografía del Embudo Bearman en los pasillos del Laboratorio.

- **Diagnóstico Bacteriológico:** En la Figura 7 se muestra el área donde se realiza análisis a través de plaquetas con agar, para ver la presencia del patógeno y en la figura 8 se muestra el área de diagnóstico molecular PCR convencional para confirmar la presencia del patógeno específico de las bacterias y virus.



Fuente: Cuadra, 2016.

Figura 7. Fotografía del área de Bacteriología



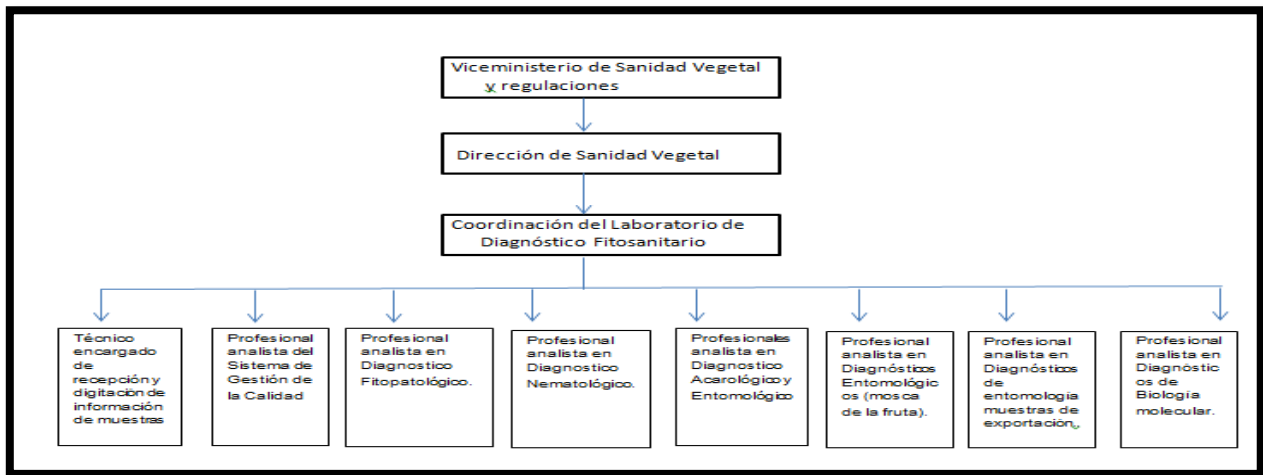
Fuente: Cuadra, 2016.

Figura 8. Fotografía del área de Diagnóstico Molecular.

### 1.5.2. Recurso humano

El recurso humano está constituido por el personal del laboratorio. Actualmente se encuentra bajo la coordinación del Lic. Mcs. Andrés Ávalos Figueroa, estando distribuido por función del área en que se desempeña de la siguiente forma que lo indica la Figura 9 y Cuadro 1.





Fuente: Hernández , 2014.

Figura 9. Organigrama del Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario

Cuadro 1. Estructura del personal del Departamento de Sanidad Vegetal

PUESTO	NOMBRE DEL PERSONAL
<b>Gestión de Calidad</b>	Ing. Teresa Hernández
<b>Diagnóstico Fitopatológico</b>	Ing. Nelson García
<b>Diagnostico Nematológico</b>	Ing. Mcs. Luís Blanco.
<b>Diagnostico Bacteriológico</b>	Ing. Nelson García Técnico analista, Johana Morales
<b>Entomológico</b>	Ing. Rubén Estrada Ing. Guillermo Hernández Ing. Amílcar Toledo Ing. Bernardo Mendoza
<b>Biología Molecular</b>	Técnico analista, Mirna Díaz EPS Erick Ramírez EPS Yeimy Cuadra

Fuente: Cuadra, 2016.

### **1.5.3. Ejecución de muestras**

#### **1.5.3.A. Recepción de muestras**

La recepción consigna los datos de las muestras tales como empresas particulares, privadas y gubernamentales colocando el nombre del usuario, dirección, teléfono, correo electrónico etc. Además de ello en la boleta de ingreso el solicitante debe de llenar una serie de datos sobre la información en el manejo del cultivo, y presencia que ha tenido en plagas y enfermedades. Aparte integrar la boleta de pago en la boleta de ingreso. La recepción está a cargo del técnico de laboratorio, secretaria, o personal de cada área (MAGA, 2011).

#### **1.5.3.B. Registro de muestras**

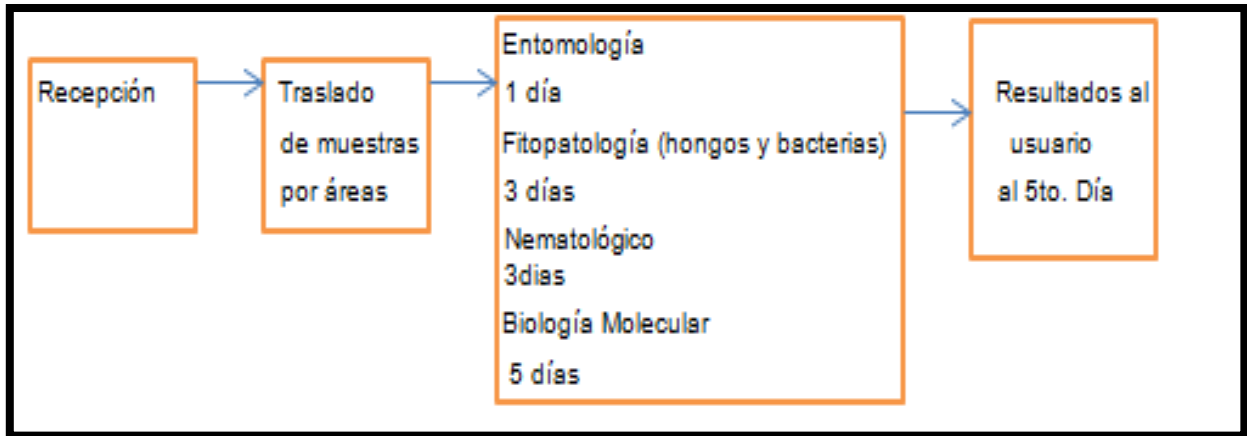
Las muestras deberán de ingresarse al programa Excel donde se llevan los registros según sus correlativos de la misma, este deberá de llevar los siguientes datos: Fecha de ingreso, procedencia, tipo de análisis solicitado, código, solicitante, cultivo y alguna observación si es necesaria. Cabe mencionar una base de datos en forma digital (MAGA, 2011).

#### **1.5.3.C. Procesamiento de muestras**

El proceso de análisis de las muestras pasa a cargo de los responsables de las áreas mencionadas, dándole a ello el manejo correspondiente de acuerdo al tipo de análisis requerido (MAGA, 2011).

### 1.5.3.D. Tiempo requerido para el diagnóstico

En la Figura 10 se visualiza el procedimiento, desde que la muestra entra a recepción hasta parte analítica, se establece un periodo aproximado de 5 días, dependiendo el tipo de diagnóstico que solicita el usuario. Como el caso de diagnóstico molecular se basa en extracción de ADN, amplificación, etc., esto estima un periodo de 5 días. En el caso de la determinación de hongos un aproximado de 3 días, contando desde la siembra de la muestra en plaquetas con PDA y así mismo para el crecimiento de bacterias en Agar nutritivos de las semillas (MAGA, 2011).



Fuente: Cuadra, 2016.

Figura 10. Esquema de distribución de muestras.

### 1.5.3.E. Entrega de resultados

Los resultados son ingresados en una hoja membretada y sellada, en donde los encargados del laboratorio de la parte analítica, emiten su firma, para la validación del resultado emitido (MAGA, 2011).

### **1.5.3.F. Muestras procesadas**

El Laboratorio de Diagnóstico de la Dirección de Sanidad Vegetal, VISAR-MAGA del kilómetro 22, carretera al Pacífico, Bárcenas, Villa Nueva va generando 17,000 muestras en lo que va del mes de diciembre, en donde se solicitan en algunos casos hasta 3 tipos de análisis, por muestra, lo cual son requeridos por empresas particulares, privadas y gubernamentales (MAGA, 2011).

### **1.5.3.G. Costos**

El usuario realiza un depósito de US\$ 9.37 para cada análisis sugerido, equivalente al tipo de cambio del Banco de Guatemala, este ingreso es depositado en el Banco de Desarrollo Rural (BANRURAL), el nombre de la cuenta monetaria es Unidad de Normas y Regulaciones-MAGA y con el número de cuenta 30013-0405-17 el servicio es efectuado a empresas agrícolas, forestales, agricultores individuales, asociaciones de productores y gremiales, cooperativas agrícolas organismos internacionales, todo bajo un mismo costo (MAGA, 2011).

#### **1.5.4. Problemas identificados**

1. Demora en la contratación y pago del personal.
2. Infraestructura con espacio muy reducido en cada área.
3. Poca disponibilidad de referencia de claves dicotómicas.
4. Falta de personal en el área de Fitopatología.
5. Falta de personal en el área de atención del cliente.
6. Falta de capacitación al personal.
7. Manuales de procedimientos para diagnósticos desactualizados.
8. Falta de personal en el área de Biología Molecular.
9. Algunos usuarios no cumplen con el protocolo de ingreso, no dan información de análisis que requieren.
10. En la visualización de las fotos por cada área se cuenta con espacios muy reducidos y desordenados.

## 1.6. ANÁLISIS FODA

Cuadro 3. Análisis FODA para el Laboratorio de Diagnóstico de la Dirección de Sanidad Vegetal, VISAR-MAGA.

<p><b>FORTALEZAS:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Horario de atención</li> <li>• No hay burocracia</li> <li>• Calidad</li> <li>• El precio de todos los diagnósticos son iguales.</li> <li>• Buen servicio</li> <li>• Reconocido a Nivel Nacional.</li> <li>• Centro de Referencia para otros laboratorios gubernamentales e instituciones.</li> <li>• Infraestructura básica.</li> <li>• Equipo y material de laboratorio adecuado.</li> <li>• Personal calificado.</li> <li>• Personal capacitado</li> </ul>	<p><b>OPORTUNIDADES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Puede crecer en servicios y volumen de trabajo.</li> <li>• Puede formar alianzas con otras instituciones similares para generar proyectos estatales con instituciones particulares, privadas y gubernamentales.</li> <li>• Divulgación por medio de Internet, por panfletos, artículos, Colegio de Ingenieros Agrónomos etc.</li> <li>• Expandirse más a nivel nacional e Internacional</li> <li>• Ampliar su campo de acción en forma integrada con área de Bacteriología virología para (PCR).</li> </ul>
<p><b>DEBILIDADES:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Falta de equipo para detección de enfermedades provocadas por virus.</li> <li>• El MAGA no puede cambiar personal por que paraliza otras actividades que ya se han emprendido en años anteriores. (cambio de gobiernos).</li> <li>• Poca divulgación sobre sus actividades como capacitaciones a especialistas.</li> <li>• Cuenta con poca información acerca de manuales de procedimientos y otras documentaciones necesarias para la certificación.</li> <li>• Poco personal.</li> </ul>	<p><b>AMENAZAS:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Otras instituciones prestan servicios similares con mejor atención al usuario.</li> <li>• No ir a la vanguardia de tecnología y técnicas de diagnóstico como los diagnósticos computarizados que ahora son por imágenes.</li> <li>• Cambios en las actividades del personal de apoyo, cambios de personal.</li> <li>• Fenómenos políticos</li> <li>• Existen atrasos en la entrega de resultados.</li> <li>• La escasez de suministros, atrasa la entrega de resultados.</li> </ul>

Fuente: Cuadra, 2016.

## 1.7. CONCLUSIONES

1. El Laboratorio de Diagnóstico de la Dirección de Sanidad Vegetal, VISAR-MAGA, cuenta con el área Entomológico, Fitopatológico, Nematológico y Biología Molecular encargadas de llevar a cabo los análisis de plagas y enfermedades para tener el control y registro para las medidas de prevención tanto de las entidades gubernativas, como particulares y privadas.
2. Se describió la metodología del proceso de análisis de muestras, desde que son ingresadas a recepción hasta la entrega de resultados dando el tiempo establecido de 5 días según el análisis requerido.
3. Se identificó los principales problemas que presenta el laboratorio, los cuales, se menciona la demora de contratación y pago del personal, infraestructura con espacios reducidos para cada área, falta de personal para el diagnóstico del Área de Fitopatología y el incumplimiento de protocolos de ingreso de las muestras, también se muestra en las fotos de cada área el espacio reducido para trabajar los análisis.
4. Se llevó a cabo un análisis FODA (Fortalezas, Oportunidades, Debilidades y Amenazas) del Laboratorio de Diagnóstico de la Dirección de Sanidad Vegetal, del VISAR-MAGA tomando en cuenta la información existentes de documentos que han realizado los epesistas.

## 1.8. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda a la autoridad administrativa encargado del Laboratorio de Diagnóstico de la Dirección de Sanidad Vegetal, VISAR-MAGA, que tome en cuenta el cuidado, atención de la contratación y pago del personal, para que ellos mismo puedan brindar un mejor servicio a las instituciones que requieren diagnósticos.
  2. Que los encargados del laboratorio brinde capacitación constante al personal y actualicen los manuales de diagnósticos, esto ayudara que la institución de resultados confiables a los requeridos.
  3. Se recomienda que se establezcan espacios amplios para la realización de análisis de muestras de cada área.
- Se recomienda que colaboren en dar instrucciones a los usuarios de cómo llenar el protocolo de ingreso, haciéndolo de una forma rápida y sencilla.



## 1.9. BIBLIOGRAFÍA

1. Cuadra Solares, YK. 2016. Diagnóstico sobre la función actual del Laboratorio de Diagnóstico de la Dirección de Sanidad Vegetal, VISAR-MAGA del kilómetro 22, carretera al Pacífico, Bárcenas, Villa Nueva. EPSA Diagnóstico. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 20 p.
2. García, N. 2015. Distribución y presencia del complejo de nemátodos de quiste en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) en la aldea Concepción, Palencia, Guatemala y servicios realizados en el laboratorio de diagnóstico fitosanitario MAGA, Bárcena Villa Nueva, Guatemala. Informe graduación Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. p. 1, 25.
3. MAGA (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, Guatemala). 2016. Historia del MAGA (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación) (en línea). Guatemala. Consultado 14 oct. 2016. Disponible en Historia del MAGA <http://web.maga.gob.gt/historia/>
4. Silvestre Hernández, YG. 2014. Situación actual del Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario de la Dirección de Sanidad Vegetal, del VISAR, MAGA. EPSA Diagnóstico. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 26 p.
5. VISAR (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, Viceministerio de Sanidad Agropecuaria y Regulaciones, Guatemala). 2011. Manual de organización y funciones: nueva estructura (en línea). Guatemala. Consultado 14 nov. 2016. Disponible en [http://web.maga.gob.gt/wp-content/uploads/pdf/uip/enero13/6/manual\\_visar.pdf](http://web.maga.gob.gt/wp-content/uploads/pdf/uip/enero13/6/manual_visar.pdf)
6. VISAR (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, Viceministerio de Sanidad Agropecuaria y Regulaciones, Guatemala). 2016a. Procedimiento de recepción de muestras e ingreso de información a la base de datos. Guatemala. 22 p.
7. VISAR (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, Viceministerio de Sanidad Agropecuaria y Regulaciones, Guatemala). 2016b. Organigrama del laboratorio de diagnóstico fitosanitario. Guatemala. 2 p.

## CAPÍTULO II

**“DETECCIÓN MOLECULAR MEDIANTE PCR CONVENCIONAL DE TRES ESPECIES DEL NEMATODO *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. enterolobii* EN EL CULTIVO ORNAMENTAL DEL GÉNERO *Epipremnum*, EN EL LABORATORIO VISAR-MAGA, KILÓMETRO 22 CARRETERA AL PACÍFICO, VILLA NUEVA, GUATEMALA, C.A.”**

**"MOLECULAR DETECTION THROUGH CONVENTIONAL PCR OF THREE NEMATODE SPECIES *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. enterolobii* IN THE ORNAMENTAL CULTIVATION OF THE GENE *Epipremnum*, IN THE VISAR-MAGA LABORATORY, KILOMETER 22 ROAD TO THE PACIFIC, VILLA NUEVA, GUATEMALA, C.A."**

## 2.1. PRESENTACIÓN

El nematodo del género *Meloidogyne* es uno de los principales patógenos que afectan al cultivo *Epipremnum*. Las plantas infectadas por los nematodos *Meloidogyne*, muestran un desarrollo aberrante en el sistema radicular, caracterizando la formación de agallas. La presencia del nematodo *Meloidogyne*, produce efectos negativos al sector agrícola, al aumentar los costos para su control.

El presente estudio, fué realizado con el objetivo de identificar al nematodo *Meloidogyne incognita*, *javanica* y *enterolobii*. Para la presencia de las especies de los nematodos, fue necesario realizar el análisis morfológico y análisis del método molecular basado en reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en ingles). El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Diagnóstico de la Dirección de Sanidad Vegetal VISAR-MAGA kilómetro 22, carretera al Pacífico, Bárcenas, Villa Nueva.

Para la correcta identificación de nematodos en el análisis morfológico, se utilizó la metodología propuesta por Hartman y Sasser, 1985. Este análisis se basa en la medición y forma del patrón perineal del nematodo *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. enterolobii*, hace medición de distancias de la vulva al ano y medición de la longitud en la vulva en hembras adultas. Los nematodos del género *Meloidogyne*, se encuentran hospedadas en las raíces del cultivo *Epipremnum*.

El análisis molecular se realizó mediante la técnica de PCR, para ellos se utilizó la metodología propuesta por Hu, M. X. y colaboradores en el año 2011. El objetivo de análisis es aumentar los niveles de precisión en el diagnóstico en menor tiempo. El PCR sirve para amplificar un fragmento del ácido desoxirribonucleico (ADN), que ayuda generar millones de copias a través de una sola molécula.

La identificación de dieciocho muestras utilizando el análisis morfológico permitió identificar dieciséis de *Meloidogyne incognita* dos muestras correspondieron a la especie *Meloidogyne javanica*. Dichas muestras seguidamente fueron analizadas mediante la técnica de PCR, habiendo congruencia en los resultados obtenidos en la identificación de las especies tanto morfológica como molecularmente.

## 2.2 Marco teórico

### 2.2.1. Marco conceptual

#### 2.2.1.1. Cultivo ornamental *Epipremnum*

*Epipremnum* es una planta trepadora, bianual que crece en zonas tropicales y subtropicales; uno de sus nombres comunes es "Potos", pertenece a la familia *Araceae*. Su procedencia es de las islas Salomón, nativa del sudeste asiático (Malasia, Indonesia) y Nueva Guinea. Es una planta eficaz contra la contaminación ambiental en interiores, eliminando formaldehído, xileno y benceno. A menudo, se utiliza como elemento decorativo en centros comerciales, oficinas e instalaciones públicas, (Christman, 2014).

#### 2.2.2.2. Clasificación taxonómica

La planta "potos" del género (*Epipremnum*), según (Linden & André) G. S. Bunting, 1964) está clasificada, de acuerdo a lo mostrado en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Clasificación taxonómica de la planta *Epipremnum*

Reino:	Plantae
Sub-reino:	Tracheobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Subclase:	Arecidae
Orden:	Arales
Familia:	<i>Araceae</i>
Género:	<i>Epipremnum</i>
Especie:	<i>Epipremnum pinnatum</i> (L.) Engl. (USDA, 1999)
Sinónimos:	<i>Epipremnum aureum</i> , <i>Pothos aureus</i> , <i>Scindapsus aureus</i> , <i>Rhaphidophora pinnata</i> ,

### **2.2.2.A. Características del cultivo *Epipremnum*.**

La planta vegetal "*Epipremnum*", está conformada con hojas, acorazonadas, pinnadas, de 10 cm a 15 cm de longitud, de color verde brillante y marcas amarillas. El tallo puede alcanzar 2 m de alto y 4 cm de diámetro, las flores surgen en una espata de más de 23 cm de largo. La planta trepa mediante raíces aéreas que se enganchan a las ramas de los árboles. La planta *Epipremnum*, crece de forma continua y no florecen en la etapa juvenil, (Christman, 2014).

### **2.2.2.B. Ecología del cultivo *Epipremnum***

La planta *Epipremnum* es cultivada en clima libre de heladas, la temperatura no debe bajar de los 20 °C – 18 °C durante el día y 12 °C a la noche. Prefieren sustratos ricos en materia orgánica. La planta favorece en una exposición luminosa, pero sin que estén expuestas directas al sol, para evitar la decoloración del follaje. La planta en épocas lluviosas tiene menor necesidad de agua, que en épocas secas y es fácil de cultivar, ((Linden & André) G.S.Bunting, 1964).

### **2.2.2.C. Cuidados de la planta *Epipremnum***

*Epipremnum* es una planta que no tolera el exceso de humedad. En cuanto al riego, se debe realizar en épocas lluviosas cada 10 días y en épocas secas cada 5 días, para evitar que las hojas se tornen a una coloración marrón. Se recomienda regar el follaje con un nebulizador añadiéndole fertilizante líquido al agua durante el período de máximo

crecimiento, en los meses cálidos. Si las hojas de potos se recubren de polvo y suciedad, pasar un paño húmedo, sólo agua, sin añadir productos químicos, (Christman, 2014).

#### **2.2.2.D. Propagación**

Para la multiplicación de la planta "*Epipremnum*" se debe realizar mediante esquejes. Para ellos se corta de la planta madre un tallo con nudo y varias hojas. Es necesario que se utilice un recipiente con sustrato permeable preparado con mantillo, arena y tuba, (Linden & André) G.S.Bunting, 1964).

#### **2.2.3. Plagas y enfermedades**

La planta "*Epipremnum*", presenta ataques de cochinillas, ácaros aéreos y nematodos, que le causan deformaciones en las hojas y raíces. Las enfermedades de la planta, son causadas por hongos y oomycetos, como las podredumbres de tallos y raíces que son; *Sclerotinia* sp., *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora* sp., *Pythium* spp., *Sclerotium rolfsii* entre otras. También es atacada por bacterias presentando manchas foliares provocadas por *Pseudomonas cichorii*, *Dickeya chrysanthemi*, ((Linden & André) G.S.Bunting, 1964) Dickey 2005).

#### **2.2.4. Exportación de plantas ornamentales en Guatemala**

Los productores y empresas exportadoras que integran el sector de follajes y flores cultivan más de 500 especies y 2000 variedades. Gracias a esta actividad agrícola de exportación, se generan más de sesenta mil empleos directos y alrededor de veinte mil empleos indirectos, del cual alrededor del 80 % son mujeres en el área rural, (AGEXPORT, 2016).

Para llevar a cabo la exportación de plantas ornamentales en Guatemala, es necesario tener el conocimiento de los trámites de documentos para realizar el proceso del traslado de los cultivos a los países extranjeros. Los cultivos tienen que pasar el proceso de revisión sanitaria para obtener la licencia de exportación del banco de Guatemala. Es necesario obtener la liquidación de la póliza aduanal y el certificado de inspección y tratamientos, este demuestra que las plantas están libres de plagas y enfermedades. También se debe incluir en los trámites la factura del exportador y patente de comercio (Quiñonez, 2002).

#### **2.2.5. Nematodos**

Los nematodos son organismos pluricelulares, normalmente microscópicos, con forma de gusano, pero distinto taxonómicamente de los gusanos verdaderos. La mayoría de las miles de especies de nematodos, viven libremente en aguas dulces o saladas y también en el suelo. Los nematodos tienden alimentarse de microorganismos, plantas y animales microscópicos. Se conocen varios cientos de especies, que se alimentan de cultivos, causando una variedad de enfermedades en todo el mundo, (Agrios, 2005).

Las pérdidas mundiales anuales por los nematodos, son causados en cultivos que sustentan la vida. Estos cultivos afectados por los nematodos, involucran a todos los



cereales, legumbres, banano, yuca, coco, papa, remolacha y caña de azúcar. Estos nematodos estiman un 11 % de pérdidas; y para la mayoría de los demás cultivos de importancia económica que son las hortalizas, frutas y cultivos de campo no comestibles son alrededor del 14 % de pérdidas. Para un aproximado en pérdidas de cultivos afectados por nematodos se estima de \$ 80 mil millones anuales, (Agrios 2005).

### Clasificación taxonómica de nematodos según Agrios 2005

Los nematodos, según Agrios 2005, está clasificado taxonómicamente, de acuerdo a lo mostrado en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Clasificación taxonómica de nematodos.

Phylum:	Nematoda
Orden:	<i>Tylenchida</i>
Suborden:	<i>Tylenchina</i>
Super-familia:	<i>Tylenchoidea</i>
Familia:	<i>Heteroderidae</i>
Sub-familia:	<i>Meloidogyninae</i>
Nombre científico:	<i>Meloidogyne</i>
Especies:	<i>Meloidogyne incognita</i> <i>Meloidogyne javanica</i> <i>Meloidogyne enterolobii</i>
Nombre común	Nematodo agallador.

Fuente: Agrios, 2005.

### **2.2.6. *Meloidogyne spp.***

*Meloidogyne*, es un nematodo que habita en las raíces de varias especies vegetales incluyendo las de importancia agrícola. *Meloidogyne* es inductor de agallas que afectan al desarrollo de los cultivos, provocando como síntoma decoloración y raquitismo en la planta. Estos nematodos se encuentran en casi todas las regiones templadas y cálidas del mundo (Agrios, 2005).

### **2.2.7. Morfología**

Los nematodos del genero *Meloidogyne*, tienen presente los estiletes que insisten en una punta cónica, el estilete cuenta con una abertura que conducen al lumen esofágico adherido a los nódulos. Cerca de la parte posterior de los nódulos, el lumen cuenta con una ramificación corta llamada orificio de la glándula dorsal (OGD). El lumen esofágico tiene la función de conducirse hacia una válvula situada en el bulbo esofágico medio, (R. L. Bernard 1970).

El bulbo medio del esófago cuenta con tres glándulas, una dorsal y dos sub-ventrales. Al ser trasladado el alimento al intestino, los músculos son adheridos a la válvula que la dilatan y contraen a modo que funcione como una bomba, (R. L. Bernard. 1970).

### **2.2.8. Ciclo de vida**

El ciclo de vida de los nematodos para las especies de *Meloidogyne*, comienza con un huevo que se desarrolla horas después de la ovoposición. Este huevo es depositado por una hembra que está completa o parcialmente incrustada en una raíz del hospedero. El huevo casi siempre se encuentra en estado unicelular, (Sasser y Taylor, 1983).

Los nematodos *Meloidogyne* hembras, tienen la capacidad de depositar más de 1000 huevos en masa o sacos. Estos huevos pueden ser más grandes que el cuerpo de la del nematodo hembra. El primer estadio del huevo, no es difícil verlo separado de la cutícula, el segundo estadio larval, la cabeza va sobresaliendo y puede dejar inmediatamente la masa de huevos. Las larvas van en busca de una raíz donde pueda alimentarse y se traslada directamente a la punta radicular, (Sasser y Taylor, 1983).

### **2.2.9. Especificidad hospedera para las especies de *Meloidogyne* spp.**

Cada especie del nematodo *Meloidogyne*, cuenta con plantas y cultivares altamente susceptibles, moderadamente susceptibles, ligeramente susceptibles e inmunes. Los hospederos de estos nematodos son susceptibles de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. enterolobii*, son numerosos y pertenecen a muchas familias de plantas, (Golden, 1976).

Otras especies del nematodo *Meloidogyne* están ampliamente distribuidas, tienen hospederos que pertenecen solo a unas cuantas familias de plantas. Muchos de los hospederos de *M. naasi* y *M. graminis*, son de plantas gramíneas, (Golden, 1976).

En América del Sur y América Central está presente el nematodo *Meloidogyne exigua*, esta es una peste muy grave del cafeto, *Coffea arábica*. Se han registrado muy pocos hospederos adicionales. Para la mayoría de especies de *Meloidogyne*, es poco lo que se sabe de hospederos y plantas resistentes, (Golden, 1976).

### **2.2.10. Distribución mundial de especies de nematodos**

Los nematodos del género *Meloidogyne* se encuentra distribuido entre 30 ° de Latitud Sur y 45 ° de Latitud Norte. Muchas áreas en estas latitudes registran temperaturas superiores de 10 °C durante todo el año. Los nematodos *Meloidogyne*, están adaptadas a una existencia de climas templados a climas cálidos. Las especies que están en clima templado son: *M. javanica*, *M. incógnita*, *M. arenaria*, (Sasser, 1977).

Estos nematodos tienen un amplio rango de hospedantes, especialmente plantas dicotiledóneas, que a menudo se encuentran en las áreas donde se cultivan Musáceas, (Waele y Davide, 1998).

La especie *M. hapla* es la más común, por habitar en climas fríos, con temperatura cerca de 0 °C y temperatura de 15 °C en meses cálidos. La información actual indica que *M. hapla* está adaptada para una existencia prolongada en el norte de los Estados Unidos y en el Sur de Canadá, en el Norte de Europa y en el Norte de Asia, (Wong, et al. 1973).

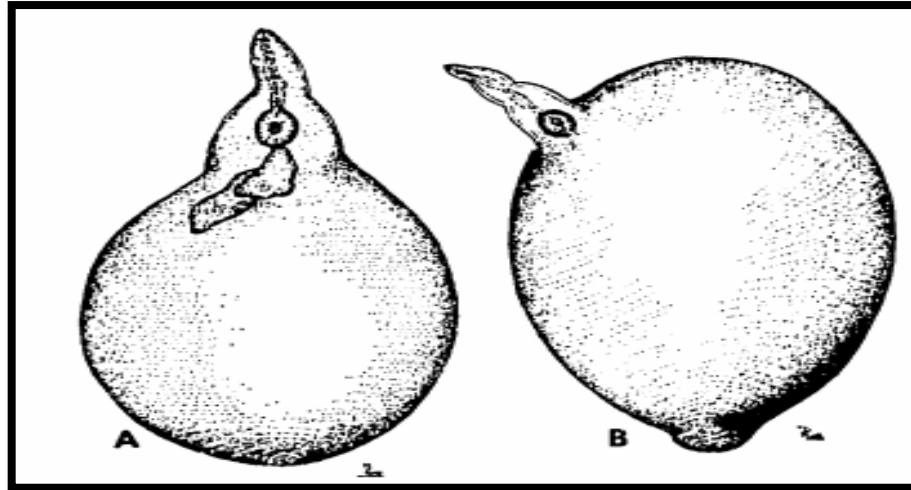
### **2.2.11. Síntomas del nematodo *Meloidogyne sp***

Los síntomas, más comunes para el género *Meloidogyne sp.*, se observan en las raíces, debido a la formación de agallas, que se da por la estimulación de células en los tejidos para ampliarlas y dividir las, ocasionando daños en la planta, (Dickerson, et al. 2000).

La parte aérea de las estructuras foliares, las plantas infestadas presentan tallos raquíuticos, cloróticos y mal desarrollados. El sistema radicular produce protuberancias y deformaciones por los ataques de los nematodos hembras y sufren de estrés hídrico, (Escuer, et al. 1996).

#### **2.2.11.A. Formas de la hembra**

En la Figura 11, se muestra la estructura de nematodos hembras en *Meloidogyne sp.*, la posición del nematodo de la letra A: se observa la forma del cuerpo piriforme y su eje central coincide con una línea recta desde el ano hasta el estilete, y en la posición de la letra B: se observa el nematodo de forma ovalada con una protuberancia posterior y el cuello está en un ángulo con el eje del cuerpo. El Angulo varía desde alrededor de 150°, (Esser, Perry y Taylor, 1976).



Fuente: Esser, Perry y Taylor, 1976.

Figura 11. Formas de cuerpo de hembras en *Meloidogyne* sp., A: cuerpo piriforme, B: cuerpo ovalado.

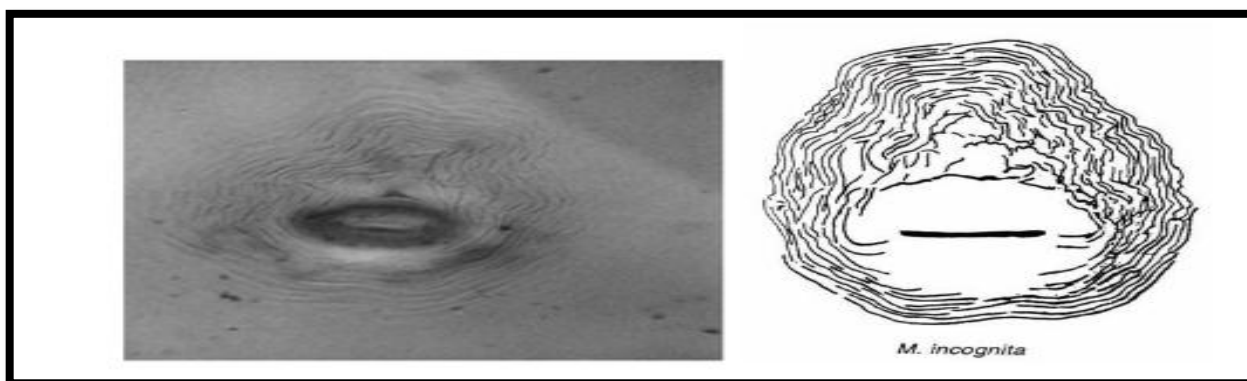
#### A. Tipos de agallas según su especie

- Nudos o agallas como en melón (*Cucumis melo*), afectado por *Meloidogyne incognita*, (Southards, C. J. and M.F. Priest. 1973).
- Hiperplasia de raíces como en tomate, afectado por *Meloidogyne javanica*, (Bird, 1962).
- Deformación de raíces, agallas del *Meloidogyne enterolobii*, atacando tomate (*Solanum lycopersicum*), (Triantaphyllou 1966).

## 2.2.12. Diferencias para las características de los diseños en patrones perineales (mm)

### 2.2.12.A. *Meloidogyne incognita*

Se presenta la descripción morfológica y mediciones del patrón perineal de acuerdo a la Figura 12, realizado por (Jepson 1987); el nematodo hembra de la especie *Meloidogyne incognita*, tiene forma de pera, no posterior terminal. Su estilete es de 15 mm - 16 mm de largo, basal, perillas redondeadas. Su patrón perineal tiene forma ovalada a redondeada, típicamente con arco alto, cuadrado, dorsal, estrías generalmente onduladas, campo lateral ausente o débilmente demarcado por estrías bifurcadas, longitud de la vulva 25,8  $\mu\text{m} \pm 0,7 \mu\text{m}$ ; distancia de la vulva al ano 17,9  $\mu\text{m} \pm 0,3 \mu\text{m}$ .



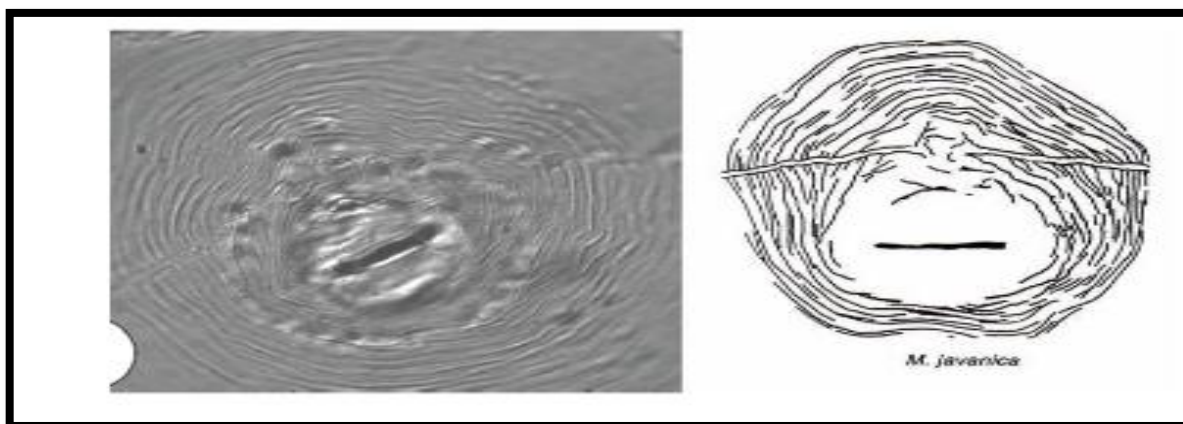
Fuente: Jepson, 1987.

Figura 12. Diseño de patrón perineal en hembra adulta del nematodo *Meloidogyne incognita*.

Según el descriptor (Jepson, 1987), para la identificación de patrón perineal de la especie del nematodo *Meloidogyne incognita*, se puede observar la formación de estrillas onduladas, la posición del arco alto dorsal, la longitud de la vulva y la distancia que existe de la vulva al ano.

### 2.2.12.B. *Meloidogyne javanica*

Se presenta la descripción morfológica y mediciones del patrón perineal de acuerdo a la Figura 13, realizado por (Orton, 1972), el nematodo hembra de la especie *Meloidogyne javanica*, tiene forma de pera, no posterior terminal. Su estilete es de 14  $\mu\text{m}$  - 18  $\mu\text{m}$  de largo, perillas basales ovoides. Su patrón perineal redondeado, bajo arco dorsal; estrías lisas, la cola espira a menudo distinto, campo lateral distinto, claramente demarcado de las estrías por líneas más o menos paralelas, longitud de la vulva 23,8  $\mu\text{m} \pm 0,2 \mu\text{m}$ ; distancia de la vulva al ano 16,7  $\mu\text{m} \pm 0,2 \mu\text{m}$ .



Fuente: Orton, 1972.

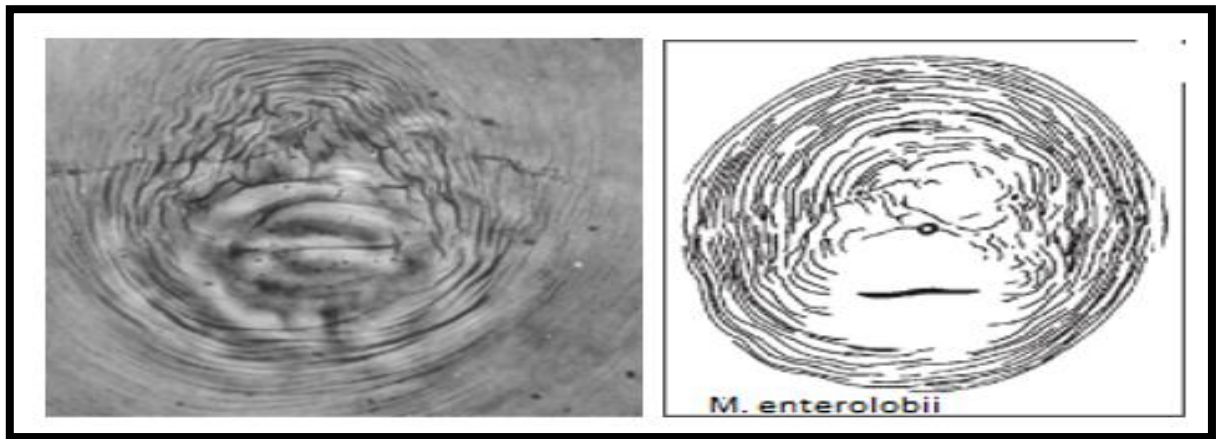
Figura 13. Diseño de patrón perineal hembra adulta del nematodo *Meloidogyne javanica*.

Según el descriptor (Orton, 1972), para la identificación de patrón perineal de la especie del nematodo *Meloidogyne javanica*, se puede observar la formación de estrías lisas, la posición del bajo arco dorsal, la longitud de la vulva y la distancia que existe de la vulva al ano.



### 2.2.12.C. *Meloidogyne enterolobii*

Se presenta la descripción morfológica y mediciones del patrón perineal de acuerdo a la Figura 14, realizado por (Hunt et al., 2009.), el nematodo hembra de la especie *Meloidogyne enterolobii*, tiene forma de pera, no posterior protuberancia. Estilete 14  $\mu\text{m}$  - 17  $\mu\text{m}$  de largo, perillas basales reniforme, endentado. Patrón perineal redonda a ovoide, arco dorsal redondeado; estrías bien ampliamente espaciadas; campo lateral ausente o con una sola línea, ocurren en la unión de arcos dorsales y ventrales; longitud de la vulva 25.3  $\mu\text{m}$  - 32.4  $\mu\text{m}$ , distancia de la vulva al ano 19.7  $\mu\text{m}$  - 26.6  $\mu\text{m}$ .



Fuente: Hunt et al., 2009.

Figura 14. Diseño de patrón perineal en hembra adulta del nematodo *Meloidogyne enterolobii*.

Según el descriptor (Hunt et al., 2009), para la identificación de patrón perineal de la especie del nematodo *Meloidogyne enterolobii*, se puede observar la formación de estrillas espaciadas, la unión del arcos dorsales y ventrales, la longitud de la vulva y la distancia que existe de la vulva al ano.

### **2.2.13. Métodos de identificación en especies de nematodos *Meloidogyne spp.***

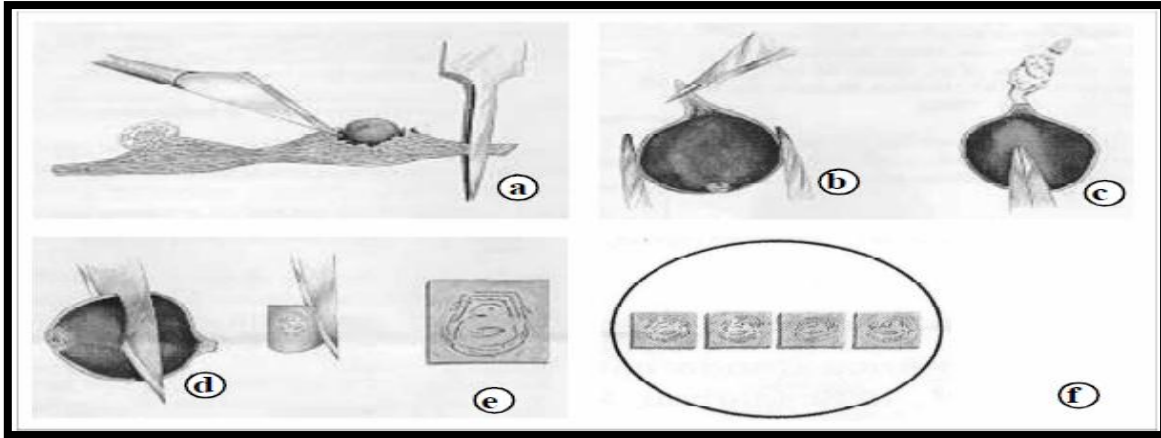
#### **a) Identificación morfológica para patrones para control en nematodos del género *Meloidogyne sp.***

La identificación clásica de especies se basa en caracteres morfológicos y morfométricos. El procedimiento más frecuente para su identificación es el estudio del patrón perineal en la región posterior del cuerpo de los especímenes hembras. Esta región comprende el área de la vulva al ano (el perineo), líneas laterales, y estriaciones cuticulares circundantes, (Hunt et al., 2009).

Chitwood en 1949, fue el primero en indicar que los patrones perineales de poblaciones puras de *M. incognita* y *M. javanica* sufrían variaciones morfológicas bajo la influencia de factores como el hospedante.

El tamaño de los nematodos fitoparásitos, hace necesario el empleo de un microscopio óptico compuesto para su observación y medición; así como para la realización de esquemas y fotografías de los especímenes y sus estructuras esto ayuda a evidenciar las diferencias morfológicas entre poblaciones o razas de diferentes especies, (Rodríguez, 2000).

En la Figura 15, se muestra el procedimiento de los siguientes pasos que se realizaron para la extracción de nematodos y montaje de patrones perineales según Hartman y Sasser, 1985.



Fuente: Hartman y Sasser, 1985.

Figura 15. Esquema de pasos para realizar la extracción de nematodos y montaje de patrones perineales.

Según (Hartman y Sasser, 1985), para llevar a cabo los pasos de la Figura 15 en la extracción de nematodos y montajes de patrones perineales, es importante tomar en cuenta, como detectar la presencia del nematodo formador de agallas en las raíces de las plantas vegetales. Estos nematodos son extraídos desde la raíz, haciendo un corte longitudinal de la misma con la ayuda de un bisturí. Luego se pincha la cabeza del nematodo con una aguja de disección y por último se hace un corte en la ubicación de la vulva y ano.

Para el montaje se toma el corte donde está ubicada la vulva y ano, luego se agrega una gota de lactofenol a un portaobjeto y se monta el corte, después se coloca un cubreobjetos y se sella para ser observado en el microscopio.

## **b) Análisis molecular de ácidos nucleicos**

Los avances de biología molecular en los últimos años, a través del empleo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Es la técnica más importante y revolucionaria, que permite amplificar un fragmento del ácido desoxirribonucleico (ADN), permitiendo generar millones de copias a través de una sola molécula en menor tiempo, (Louws et al., 1999).

La técnica de PCR tiene como objetivo de incrementar los niveles de precisión en el diagnóstico por procedimientos experimentales que se pueden llevar a cabo en un laboratorio, basado en muestras de origen animal o vegetal, (Espinosa, 2007).

Los iniciadores o cebadores tienen como función la identificación del sitio de origen de la replicación, el desenrollamiento de la doble hélice, la estabilización de la estructura desenrollada, la generación de cadenas iniciadoras complementarias con un extremo 3' (tres prima) libre, que sirve de iniciador para que el ADN polimerasa comience su actividad catalizadora, el avance de la bifurcación es replicadora por desenrollamiento, los pasos finales del ensamblaje se dan de dos cadenas complementarias, da la oportunidad de identificar sitios de terminación y el súper enrollamiento de las dos nuevas moléculas de ADN, (Bohinski, 1991).

Sin embargo, la enzima más importante en la replicación, es la polimerasa del ADN, dependiente de ADN comúnmente conocida como ADN polimerasa, porque es la encargada de incorporar nucleótidos durante la síntesis de las nuevas cadenas de ADN, (Bohinski, 1991).

Generalmente, la PCR inicia con la desnaturalización o separación de la doble hélice de ADN mediante el calentamiento de la muestra a una temperatura entre 94 °C y 96 °C para romper los puentes de hidrógeno que las unían, de esta manera cada cadena queda como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria de ADN. Una vez separadas las cadenas del ADN, se alinean los iniciadores a sitios específicos complementarios de

las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar, para que esto suceda se baja la temperatura entre 40 °C y 60 °C lo que permite la unión (alineamiento) de los iniciadores, (Espinosa, 2007).

Finalmente, se sintetiza una nueva cadena en sentido 5 ' a 3 ' para lo cual se incrementa la temperatura, por lo general a 72 °C, porque es la temperatura óptima a la cual la ADN polimerasa se une a los iniciadores y comienza la replicación. Estas tres etapas: 1) desnaturalización, 2) alineamiento y 3) extensión del ADN, se repiten sucesivamente, en cada nuevo ciclo se amplifica simultáneamente la región de interés de las dos cadenas complementarias, (Espinosa, 2007).

### **c) Empleo de biología molecular en la identificación de especies de *Meloidogyne* spp.**

El método para la identificación de *Meloidogyne* spp., se basó en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) convencional, donde se logró amplificar con éxito el ADN mitocondrial de especímenes que fueron macerados con agua desmineralizada y extraído el ADN con NaOH 10Mm y TRIS-HCL a 1 molar, según Stanton, J. M., McNicol, C. G., and Steele, V. 1998, para luego ser añadidos a la reacción de PCR según Hu, M. X., Zhuo, K., and Liao, J. L. 2011 ellos recomiendan los iniciadores para amplificar la región ITS del gen mitocondrial que codifica para citocromo oxidasa y el gen rRNA MF y los específicos para identificar *M. incognita*, *M. javanica*, *M. enterolobii* .

Cabe señalar que los métodos moleculares ayuda a resolver el diagnóstico tradicional de la clasificación morfológica de los organismos (Dorris et al., 1999), que tiene como objetivo usar las regiones ADNmt (ADN mitocondrial) (Powers y Harris, 1993; Stanton et al., 1997), con los perfiles de la región ITS (Espaciador Transcrito Interno).

La amplificación multiplex con iniciadores específicos SCAR (secuencias caracterizadas de la región amplificada), (Zijlstra, 2000); consiste conservar un genoma que está presente en todas las especies, lo cual ayudara a contener resultados de fragmentos de ADN, por la visualización de los tamaños de pares de bases en la gel agarosa concentrada al 2 % según (Hu, M. X., Zhou, K., and Liao, J. L., 2011), esta será visualización a través de electroforesis.

## 2.3. MARCO REFERENCIAL

### 2.3.1. Geografía

Bárcenas, es una comunidad que pertenece al municipio de Villa Nueva, departamento de Guatemala. Está asentada en el Suroeste del Valle de la Virgen, a una distancia de 19 km del centro de la ciudad capital, ahí está ubicado el laboratorio que está destinado para la realizar diagnósticos de plagas y enfermedades en el sector agrícola y forestal, (López, 2014).

El Municipio de Villa Nueva tiene una extensión territorial de 553 km<sup>2</sup> de área total, y se encuentra dentro de la cuenca del lago de Amatitlán, (López, 2014).

En la Figura 16, se muestra una imagen satelital donde está ubicado el Laboratorio de Dirección de Sanidad Vegetal VISAR-MAGA del kilómetro 22, carretera al Pacífico, Bárcenas Villa Nueva Guatemala, C.A.



Fuente: Google Earth, 2016.

Figura 16. Imagen satelital donde se observa la delimitante del Laboratorio VISAR-MAGA, kilómetro 22, carretera al Pacífico, Bárcenas, Villa Nueva Guatemala, C.A.

La Figura16, presenta la imagen satelital del Laboratorio VISAR-MAGA, este Laboratorio es encargado de realizar diagnósticos fitosanitarios en muestras de planta vegetales y suelos. Este Laboratorio brindó la oportunidad de realizar la investigación de Detección Molecular para las 3 especies de nematodos *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. enterolobii* en el Ejercicio Profesional Supervisado (EPS) de la estudiante Yeimy Karina Cuadra Solares en el período de febrero a noviembre del año 2016.

### **2.3.2. Condición climática del municipio de Villa Nueva**

Villa Nueva es un territorio caracterizado por el clima templado, seco agradable, por la variación de temperatura; las diferencias entre radiación solar y la radiación terrestre y los cambios de altura que presenta sobre el nivel del mar, los cuales varían de 1,250 m a 1,500 m. Con respecto a la información esto marca que el parque central de la población está en 1,330.24 m s.n.m., (López, 2014).

Su temperatura promedio es de 21 °C., producto de la época de verano que se presenta durante los meses de marzo a mayo, con 28 °C máximo. La época fría que se presenta durante los meses de noviembre a enero con 13 °C mínimo, con una oscilación absoluta de 15 °C, (López, 2014).

### **2.3.3. Suelos**

Los suelos del área corresponden a la región de la meseta central y como casi todos los suelos de los valles del altiplano guatemalteco, son de origen volcánico, es decir, el valle de Guatemala se encuentra parcialmente relleno de cenizas y arenas volcánicas que forman el piso de topografía uniforme apropiado para desarrollos urbanos, (López, 2014).



## 2.4. HIPÓTESIS

Los nematodos fitoparásitos del genero *Meloidogyne spp.*, está presente en la planta ornamental del género *Epipremnum* conocido como “Potos”.

## 2.5. OBJETIVOS

### 2.5.1. Objetivo general

Establecer un protocolo para la detección de nemátodos *Meloidogyne Incognita*, *M. javanica* y *M. enterolobii*, usando un descriptor morfológico y marcadores moleculares en el Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario de la Dirección de Sanidad Vegetal VISAR-MAGA del kilómetro 22, carretera al Pacífico, Bárcenas, Villa Nueva.

### 2.5.2. Objetivos específicos

1. Diagnosticar morfológicamente muestras de nematodos de *Meloidogyne spp* a través de sus patrones perineales.
2. Emplear la técnica de PCR para identificación de las especies *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. enterolobii*.

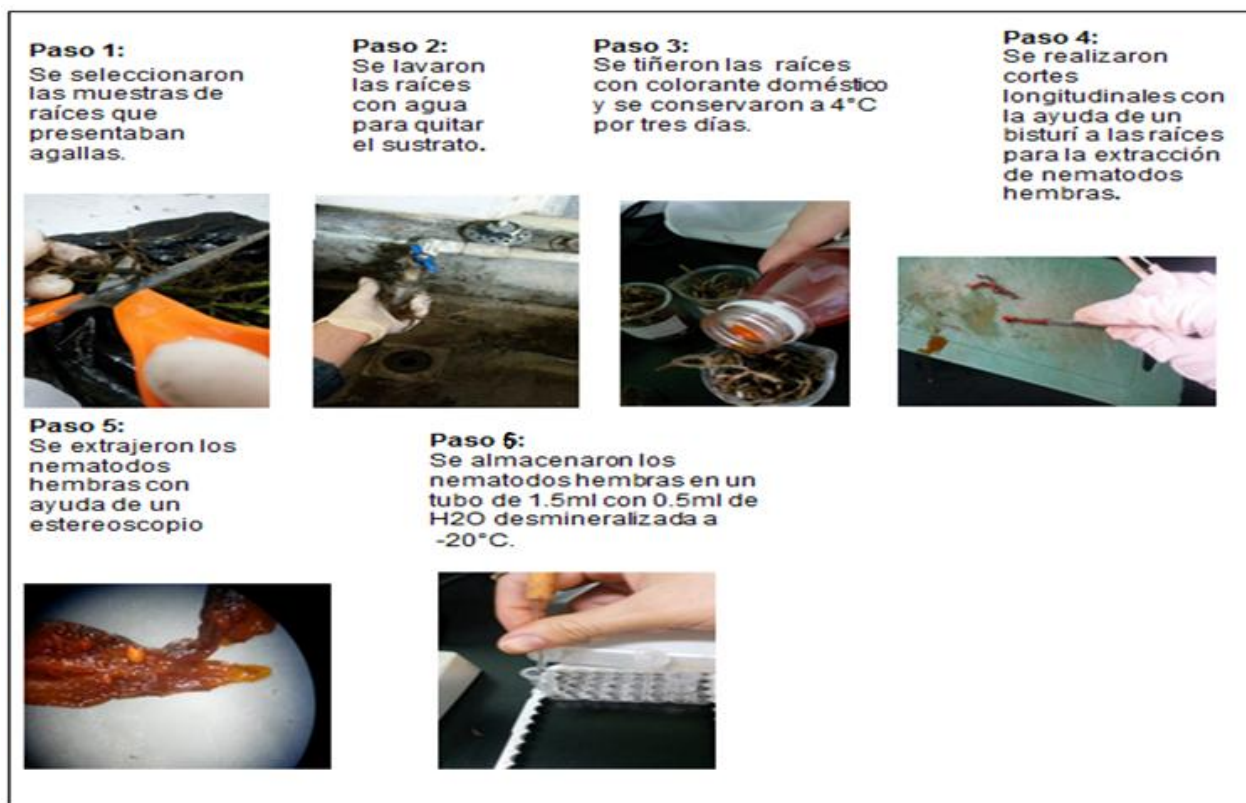
## 2.6. METODOLOGÍA

La investigación consistió, en extraer los individuos de las tres especies de nematodos *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *enterolobii*. Seguidamente se realizó una caracterización morfológica lo cual se realizaron medidas de patrón perineal y posteriormente se realizó la extracción y amplificación del ADN.

A continuación se describe el procedimiento para la extracción de nematodo en las raíces.

### **2.6.1. Pasos para la extracción de nematodos desde la raíz según Hartman y Sasser, 1985.**

En la Figura 17, se presentan los pasos que describe (Hartman y Sasser, 1985), para la extracción de nematodos desde la raíz en el cultivo *Epipremnum*. Estos pasos se realizaron en el laboratorio de diagnóstico de sanidad vegetal VISAR-MAGA para llevar a cabo la investigación de la detección de las 3 especies de nematodo *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. enterolobii*.



Fuente: Cuadra, 2016.

Figura 17. Serie de fotografías del protocolo para extracción de nematodos desde la raíz según Hartman y Sasser, 1985.

En la Figura 17 se muestra el primer paso que se realizó en el laboratorio VISAR-MAGA descrito por (Hartman y Sasser, 1985), haciendo la selección de las raíces con agallas de la planta vegetal y siendo cortadas. En el segundo paso se lavaron las raíces seleccionadas para que se quitara la presencia del suelo y sustratos esto dio una mejor visualización y manipulación de la misma.

Para el tercer paso se tiñeron las raíces introduciéndolas a un beaker de 40 ml, al beaker se le agregó 25 ml de agua desmineralizada y 5 ml de colorante doméstico para realizar el proceso de tinción en la raíz, luego se conservó a una temperatura de 4 °C por tres días. El almacenamiento de 3 días a esa temperatura fue para que el colorante doméstico realizará su función de adherirse a los tejidos de la raíz.

En el cuarto paso se realizaron cortes longitudinales para poder ubicar al nematodo que presenta una coloración blanda en la raíz teñida y fueran extraídos con la ayuda del estereoscopio como lo indica el paso cinco. Luego el paso 6 procede el almacenamiento del nematodo que se conservó a una temperatura de - 20 °C en un tubo de 1.5 ml con 0.5 ml de agua desmineralizada. Esto ayudo a que el nematodo no se degradara.

### 2.6.2. Pasos para la identificación morfológica de nematodos de *Meloidogyne* spp a través de sus patrones perineales según Hartman y Sasser, 1985 .

La Figura 18, se presenta los pasos que describe (Hartman y Sasser, 1985), para la identificación morfológica de las especies de nematodo *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. enterolobii*, a través de patrones perineales.



Fuente: Cuadra, 2016.

Figura 18. Serie de fotografías del protocolo para identificación morfológica de patrones perineales según Hartman y Sasser, 1985.

Estos pasos de la Figura 18 fueron realizados en el Laboratorio después de que se realizó la extracción del nematodo en las raíces de la planta vegetal. Con la descripción (Hartman y Sasser, 1985), el primer paso procedió a sacar el nematodo del tubo de 1.5 ml y fue

colocado en una caja petri con agua de chorro, con la visualización del estereoscopio se cortó el nematodo hembra con un bisturí.

En el segundo paso se enfocó el estereoscopio al corte del patrón ya realizado y se preparó el portaobjeto con una gota de lactofenol colocando el corte, luego se colocó un cubreobjetos y se selló con pintura de uñas. Por último se enfocó con un microscopio y se procedió a realizar la identificación morfológica al nematodo tomando en cuenta la longitud de la vulva, la distancia de la vulva al ano y las formas de las estrillas.

### 2.6.3. Pasos para la extracción de ADN según Stanton, J. M., McNicol, C. G., and Steele, V. 1998.

En la Figura 19, se presentan los pasos que describe (Stanton, J. M., McNicol, C. G., and Steele, V. 1998.), para la extracción de ADN en los nematodos.



Fuente: Cuadra, 2016.

Figura 19. Serie de fotografías del protocolo para extracción de ADN según Stanton, J. M., McNicol, C. G., and Steele, V. 1998.

Los pasos de la Figura 19 fueron realizados, después de que se determinaron morfológicamente las especies presentes en los nematodos. Se procedió a realizar los pasos de (Stanton, J. M., McNicol, C. G., and Steele, V. 1998), para poder extraer el ADN de los nematodos.

El primer paso consistió en descongelar los tubos de 1.5 ml que contenían los nematodos, luego se preparó los insumos para macerar a los nematodos, después se incubó por 10 min a 95 °C y se agregó 5 ml de tris HCl para ser mezclados. En el paso 5 se centrifugó las muestras por 1 min a 11,000 rpm esto ayudó a extraer la mayor cantidad de ADN que los nematodos contienen. Por último se almacenó el ADN para proceder con el último protocolo.

#### **2.6.4. Pasos para la amplificación de ADN de los nematodos según Hu, M. X., Zhuo, K., and Liao, J. L. 2011.**

En la Figura 20, se presentan los pasos que describe (Hu, M. X., Zhuo, K., and Liao, J. L. 2011), para la amplificación del ADN en los nematodos realizados en el laboratorio VISAR-MAGA.



Fuente: Cuadra, 2016.

Figura 20. Serie de fotografías del protocolo para amplificación de ADN en nematodos, según Hu, M. X., Zhuo, K., and Liao, J. L. 2011.

Estos pasos se llevaron a cabo en el laboratorio VISAR-MAGA como lo indica la Figura 20, con el fin de poder amplificar el ADN de los nematodos descrito por Hu, M. X., Zhuo, K., and Liao, J. L. 2011. El primer paso se esterilizó la campana para que los reactivos no fueran contaminados, después se descongelaron los reactivos. En el paso 2 se realizó la mezcla del master mix que incluye los cebadores y los productos sintetizan la cadena de ADN.

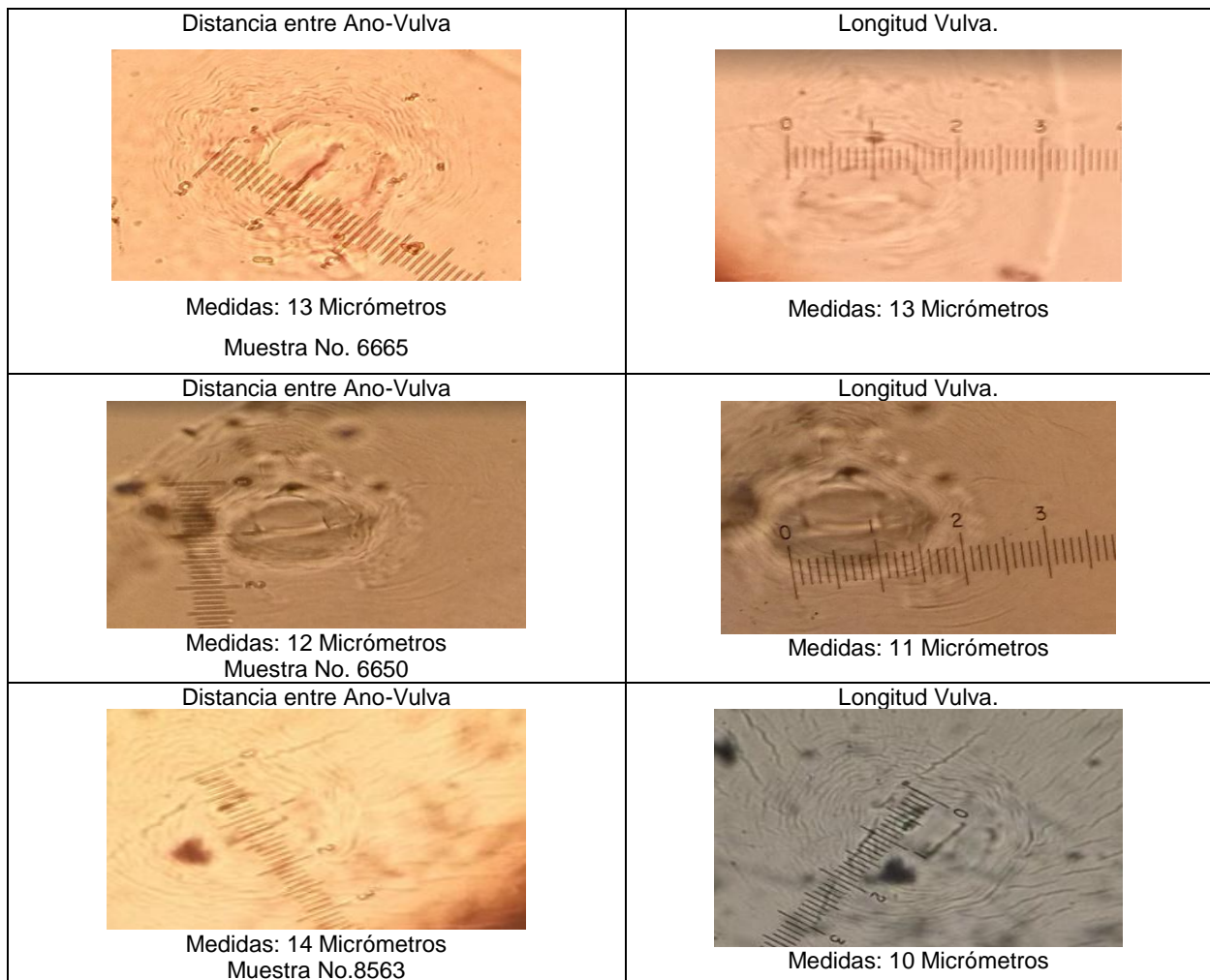
Luego se procedió a realizar el gel agarosa al 2 % haciendo la mezcla con TAE 1 X para sodificarla. Después de ser sodificada se agregó en pequeñas cantidades el ADN amplificado y se corrió en una electroforesis. En el paso 6 se procedió a ser visualizada en la foto-documentación y ver el resultado del tamaño del fragmento para identificar la presencia de tres especies de los nematodos *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. enterolobii*. Por último se reportó al usuario cuales estaban presentes de las tres especies de nematodos de las muestras que fueron procesadas.



## 2.7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

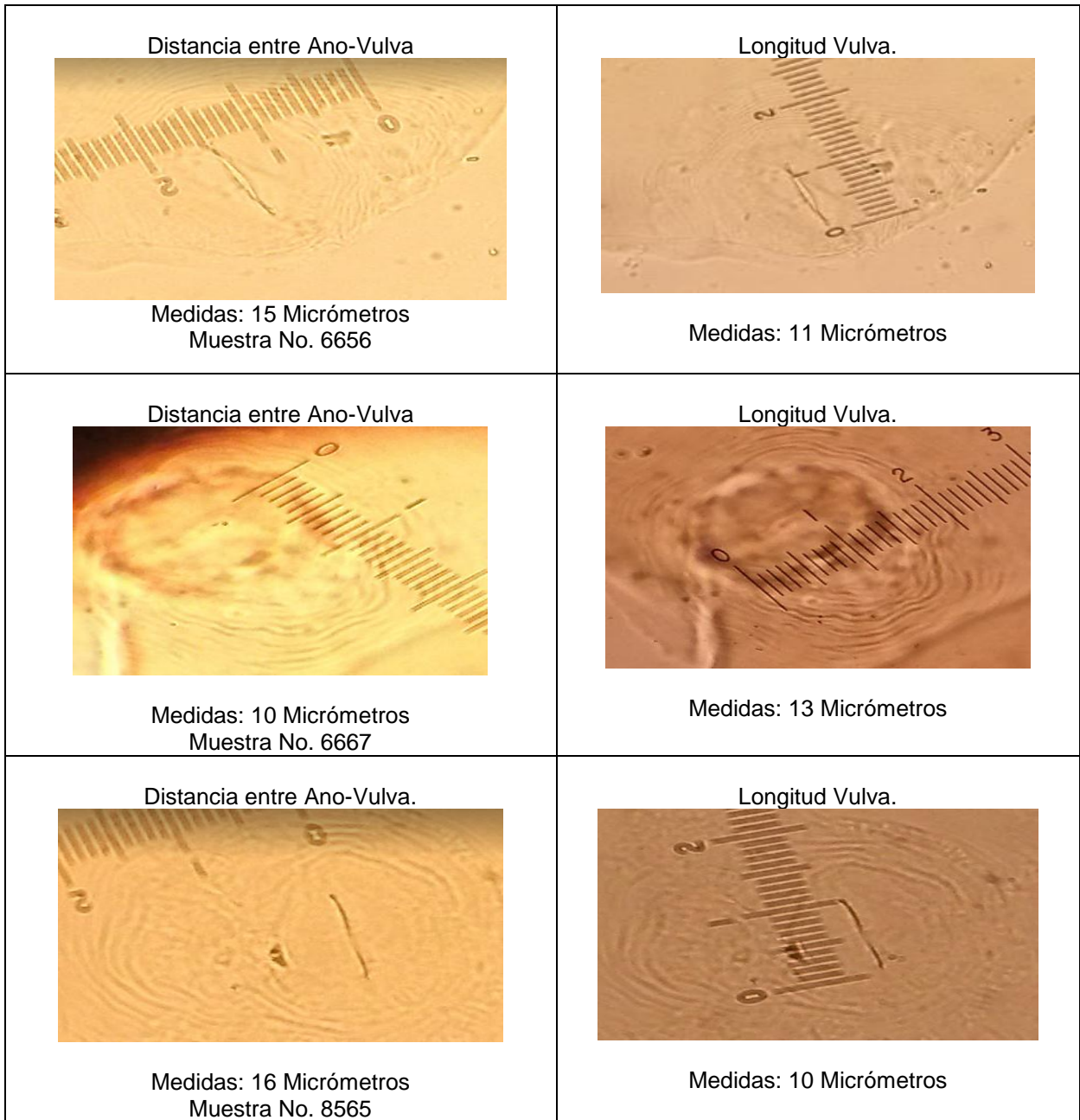
### 2.7.1. Caracterización morfológica de las muestras de nematodos extraídos de muestras de raíces de la planta *epipremnum*

Los resultados obtenidos de la caracterización morfológica de las muestras de nematodos en el presente estudio, basados por la morfología de la vulva y la distancia de la vulva al ano, se presentan en las Figuras 21, 22, 23, 24, 25 y 26.



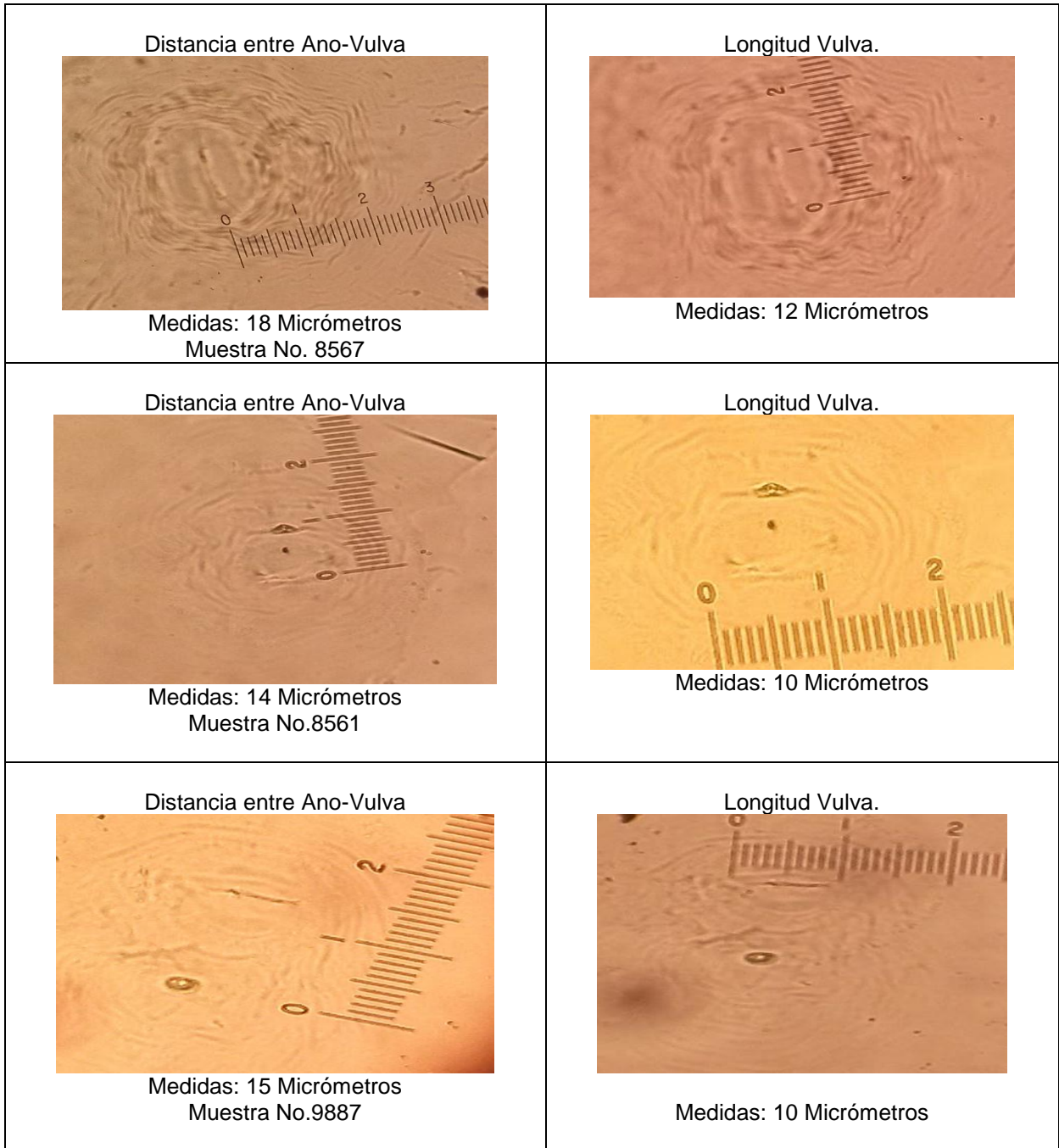
Fuente: Cuadra, 2016.

Figura 21. Serie de fotografías de cortes perineales del nematodo *Meloidogyne* para identificación de sus tres especies.



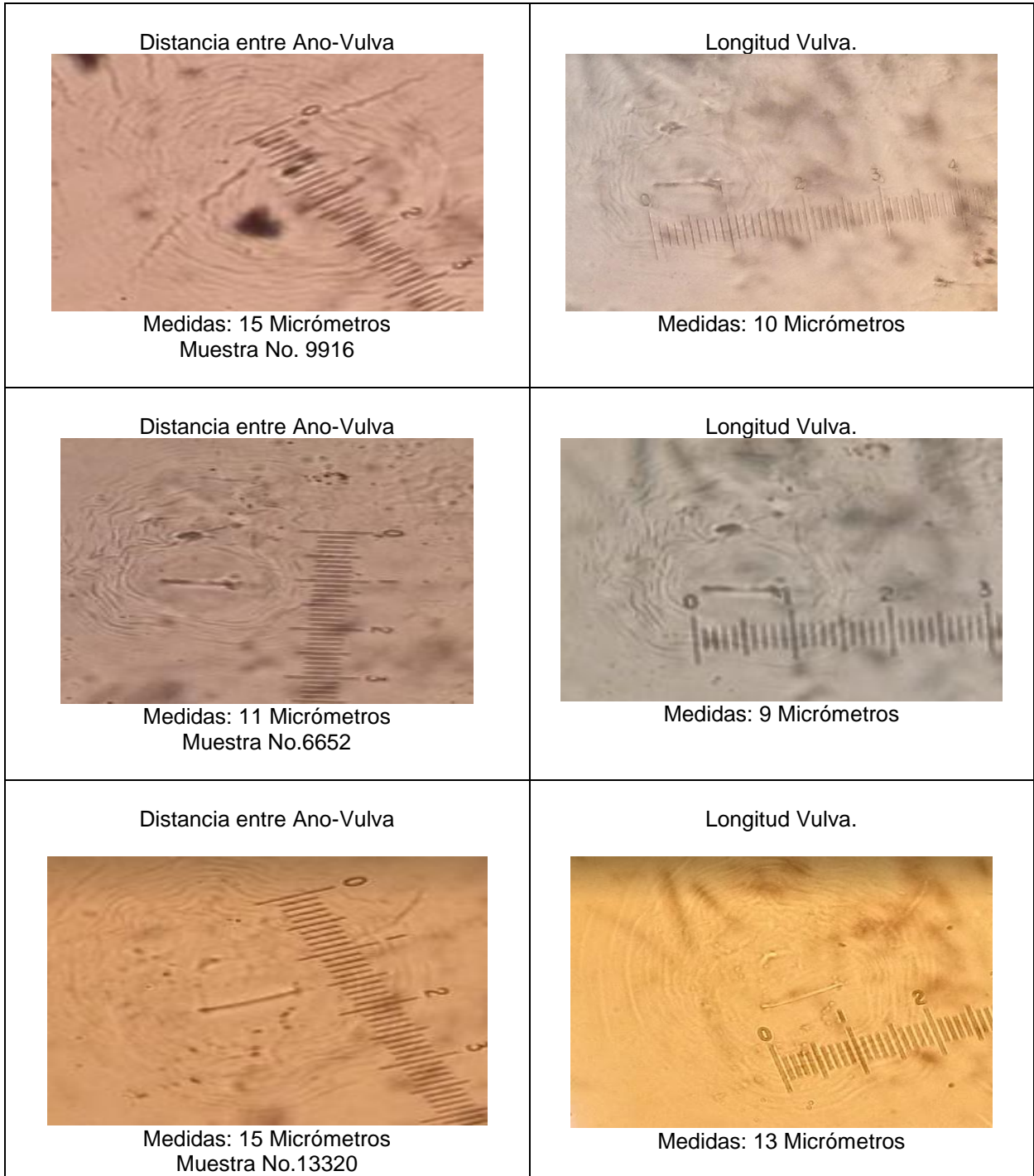
Fuente: Cuadra, 2016.

Figura 22. Serie de fotografías de cortes perineales del nematodo *Meloidogyne* para identificación de sus tres especies.



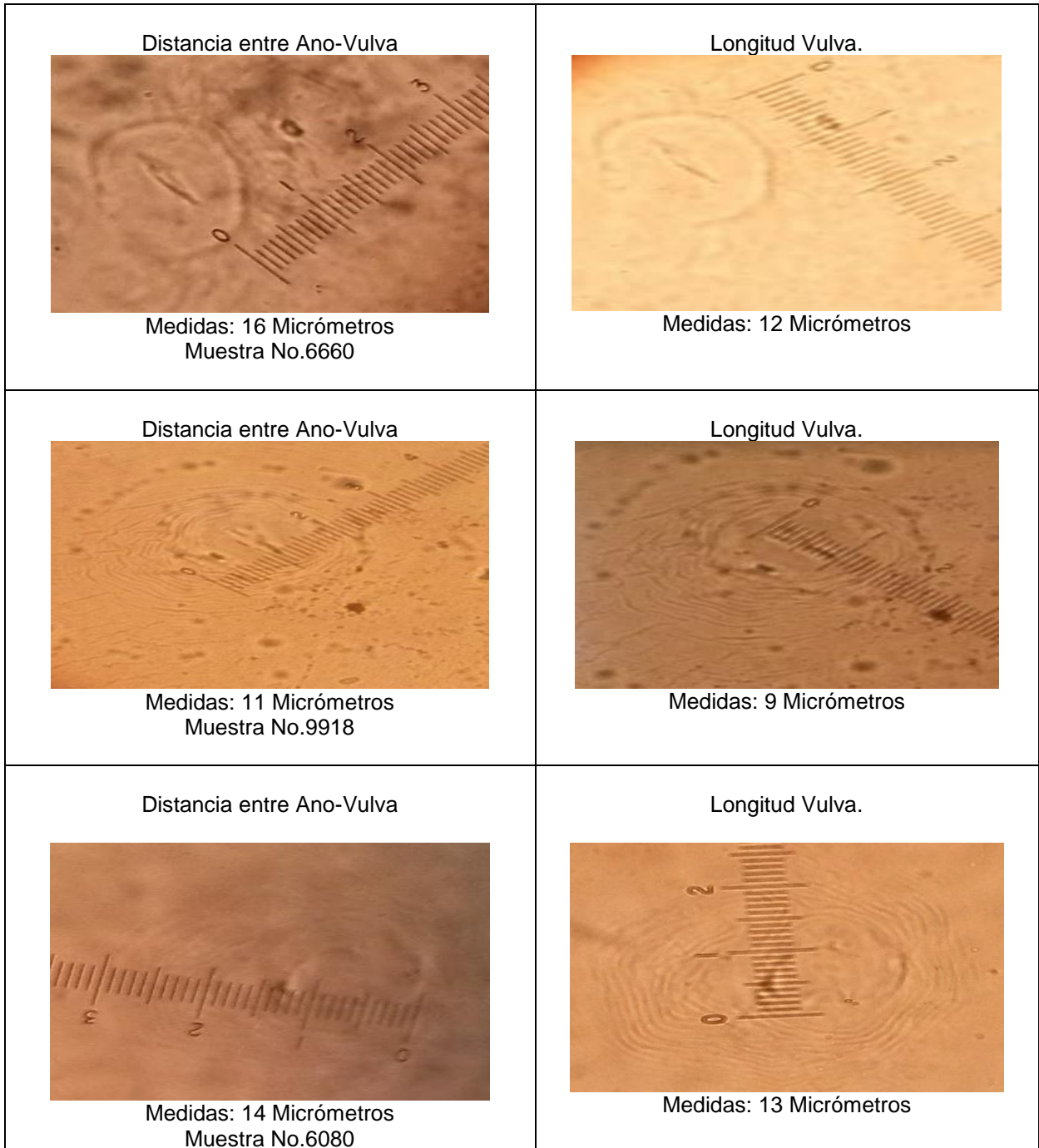
Fuente: Cuadra, 2016.

Figura 23. Serie de fotografías de cortes perineales del nematodo *Meloidogyne* para identificación de sus tres especies.



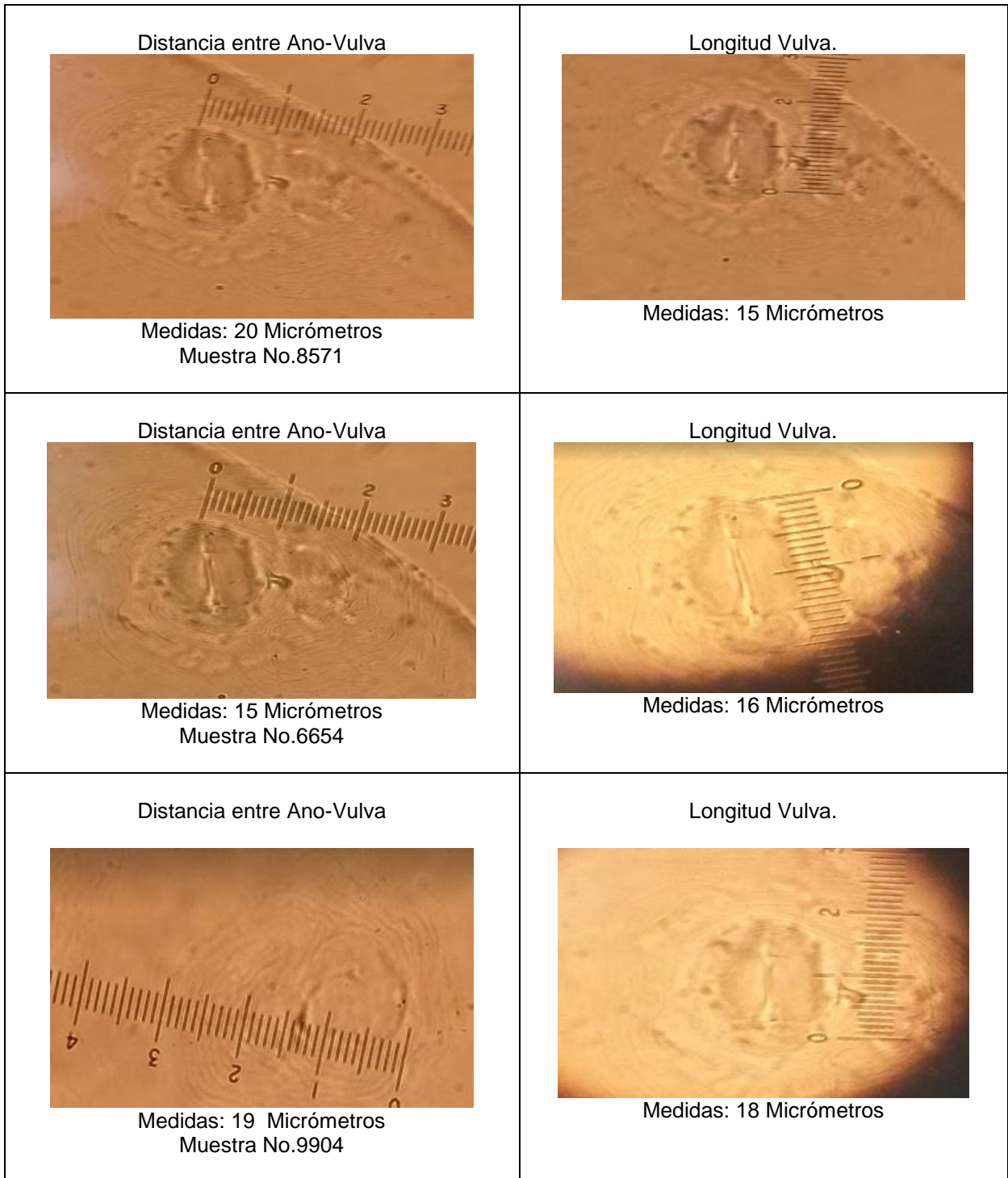
Fuente: Cuadra, 2016.

Figura 24. Serie de fotografías de cortes perineales del nematodo *Meloidogyne* para identificación de sus tres especies.



Fuente: Cuadra, 2016.

Figura 25. Serie de fotografías de cortes perineales del nematodo *Meloidogyne* para identificación de sus tres especies.



Fuente: Cuadra, 2016.

Figura 26. Serie de fotografías de cortes perineales del nematodo *Meloidogyne* para identificación de especies.

El resultado de la Figura 21, para la muestra 6665 presenta un patrón perineal ovalado a redondeado, típicamente con arco alto, cuadrado, dorsal, estrías generalmente onduladas, campo lateral ausente o débilmente demarcado por estrías bifurcadas, la longitud de la vulva es de 13  $\mu\text{m}$  y la distancia de la vulva al ano 13  $\mu\text{m}$ , la muestra 6650 la longitud de la vulva es de 11  $\mu\text{m}$  y la distancia de la vulva al ano 11  $\mu\text{m}$ , estos resultados con características morfológicas indican que son pertenecientes a la especie del nematodo *Meloidogyne incognita*.

La muestra 8563 presenta un patrón perineal redondeado, bajo arco dorsal; estrías lisas, la cola espira a menudo distinto, campo lateral distinto, claramente demarcado de las estrías por líneas más o menos paralelas, su longitud de la vulva 10  $\mu\text{m}$ ; distancia de la vulva al ano 14  $\mu\text{m}$ , las características morfológicas anteriormente obtenidas corresponden a la especie *Meloidogyne javanica*.

Para el resultado de la Figura 22, podemos observar la muestra 6656 presenta un patrón perineal ovalado a redondeado, típicamente con arco alto, cuadrado dorsal, estrías generalmente onduladas, campo lateral ausente o débilmente demarcado por estrías bifurcadas, la longitud de la vulva es de 11  $\mu\text{m}$  y la distancia de la vulva al ano 15  $\mu\text{m}$ . La muestra 6667, la longitud de la vulva es de 13  $\mu\text{m}$  y la distancia de la vulva al ano 10  $\mu\text{m}$ . por último la muestra 8565 presenta una longitud de la vulva de 10  $\mu\text{m}$  y la distancia de la vulva al ano 16  $\mu\text{m}$ , estas características corresponden a la especie *Meloidogyne incognita*.

Para el resultado de la Figura 23, podemos observar la muestra 8567 presenta un patrón perineal ovalado a redondeado, típicamente con arco alto, cuadrado, dorsal, estrías generalmente onduladas, campo lateral ausente o débilmente demarcado por estrías bifurcadas, la longitud de la vulva es de 12  $\mu\text{m}$  y la distancia de la vulva al ano 18  $\mu\text{m}$ . La muestra 8561 vulva es de 10  $\mu\text{m}$  y la distancia de la vulva al ano 16  $\mu\text{m}$ . por último la muestra 9887 la longitud de la vulva es de 10  $\mu\text{m}$  y la distancia de la vulva al ano 15  $\mu\text{m}$ , las características anteriormente obtenidas corresponden a la especie *M. incognita*.

Para el resultado de la Figura 24, se observa la muestra 9916 presenta un patrón perineal redondeado, bajo arco dorsal; estrías lisas, la cola espira a menudo distinto, campo lateral distinto, claramente demarcado de las estrías por líneas más o menos paralelas, longitud de la vulva es de 12  $\mu\text{m}$  y la distancia de la vulva al ano 15  $\mu\text{m}$ , la característica morfológica indica que pertenece a *Meloidogyne javanica*.

La muestra 6652 presenta un patrón perineal ovalado a redondeado, típicamente con arco alto, cuadrado, dorsal, estrías generalmente onduladas, campo lateral ausente o débilmente demarcado por estrías bifurcadas, longitud de la vulva es de 9  $\mu\text{m}$  y la distancia de la vulva al ano 11  $\mu\text{m}$  y la muestra 13320 longitud de la vulva es de 13  $\mu\text{m}$  y la distancia de la vulva al ano 15  $\mu\text{m}$ , estas características morfológicas describe a *Meloidogyne incognita*.

Para el resultado de la Figura 25, de la muestra 6660 presenta un patrón perineal ovalado a redondeado, típicamente con arco alto, cuadrado, dorsal, estrías generalmente onduladas, campo lateral ausente o débilmente demarcado por estrías bifurcadas, longitud de la vulva es de 12  $\mu\text{m}$  y la distancia de la vulva al ano 16  $\mu\text{m}$ , la muestra 9918 presenta la longitud de la vulva de 9  $\mu\text{m}$  y la distancia de la vulva al ano 11  $\mu\text{m}$  y por último la muestra 6080 longitud de la vulva es de 13  $\mu\text{m}$  y la distancia de la vulva al ano 14  $\mu\text{m}$  estas características morfológicas descritas anteriormente pertenece al nematodo *Meloidogyne incognita*.

Para el resultado de la Figura 26, de la muestra 8571 presenta un patrón perineal ovalado a redondeado, típicamente con arco alto, cuadrado, dorsal, estrías generalmente onduladas, campo lateral ausente o débilmente demarcado por estrías bifurcadas, longitud de la vulva es de 15  $\mu\text{m}$  y la distancia de la vulva al ano 20  $\mu\text{m}$ , la muestra 6654 longitud de la vulva es de 16  $\mu\text{m}$  y la distancia de la vulva al ano 15  $\mu\text{m}$  y por último la muestra 9904 longitud de la vulva es de 13  $\mu\text{m}$  y la distancia de la vulva al ano 19  $\mu\text{m}$ , estas características morfológicas describen al nematodo *Meloidogyne incognita*.

De acuerdo a las medidas de las 18 muestras se puede ver que las muestras 8563 y 9916 presenta un margen de error de  $\pm 2 \mu\text{m}$  para la especie *javanica*, mientras que el resto de las muestras hay un diferencia hasta de  $\pm 7 \mu\text{m}$  de la especie *incognita*.



## 2.7.2. Detección para el diagnóstico molecular de *Meloidogyne spp.*, descritas por Meng et al. 2004 y Long et al. 2004.

En el Cuadro 5 se muestran las condiciones para amplificar las muestras de ADN en PCR convencional múltiple con los cebadores de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. enterolobii* y sus reactivos.

Cuadro 5. Condiciones de protocolo para la amplificación en PCR múltiple con iniciadores para identificación del género *Meloidogyne* y cebadores para *M. incognita*, *M. javanica* y *M. enterolobii*.

Vol. Final	25µl			
Número de muestras	Ci	Cf	1x (µl)	29x
ddH <sub>2</sub> O	----	----	3	78
10X PCR buffer+15mM MgCl <sub>2</sub>	10X +15mM MgCl <sub>2</sub>	1X+1.5mM MgCl <sub>2</sub>	2.5	72.5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 mM	2.5	72.5
2.5 mM dNTPs	2.5 mM	0.1 mM	4	116
Primer (Multiple+General)	.....	----	6+2	174+58
Taq polimerasa	5U/µl	1 U	1	29
ADN	----	----	4	-----
<b>Total</b>			<b>25µl</b>	<b>Total 600/29= 20.68~ 21 U/µl</b>

Fuente: Cuadra, 2016.

26 muestras

3 blancos

29x

En donde:

Ci es la concentración inicial del reactivo.

Cf es la concentración final del reactivo en la reacción de PCR.

1x (µl) es el volumen del reactivo en microlitros en la reacción de PCR.

1. Se colocaron las muestras en el termociclador, empleando el siguiente programa de ciclado de PCR convencional:

- **PCR para diagnóstico del género *Meloidogyne* y PCR múltiple para las especies *M. incognita*, *M. javanica* y *M. enterolobii*.**

1 Ciclo a 94 °C durante 2 min.

45 Ciclos: 94 °C durante 30 s, 64 °C durante 45 s, 68 °C durante 1 min.

1 Ciclo a 72 °C durante 5 min.

1 Ciclo a 4 °C, permanente.

2. Visualización: se empleó electroforesis en geles de agarosa.

a. Se preparó un gel de agarosa en concentración de 2 % con buffer TAE1 X y gel red en concentración 0.01 X.

b. Se reguló el voltaje a 100 voltios y se dejó transcurrir la electroforesis por 1 hora para geles.

c. Se visualizó el gel en el sistema de foto-documentación.

d. Se tomó la fotografía.

Electroforesis en geles de agarosa

En la Figura 27 se presenta un gel agarosa de las muestras amplificadas de ADN para observar la presencia del nematodo *Meloidogyne general*.

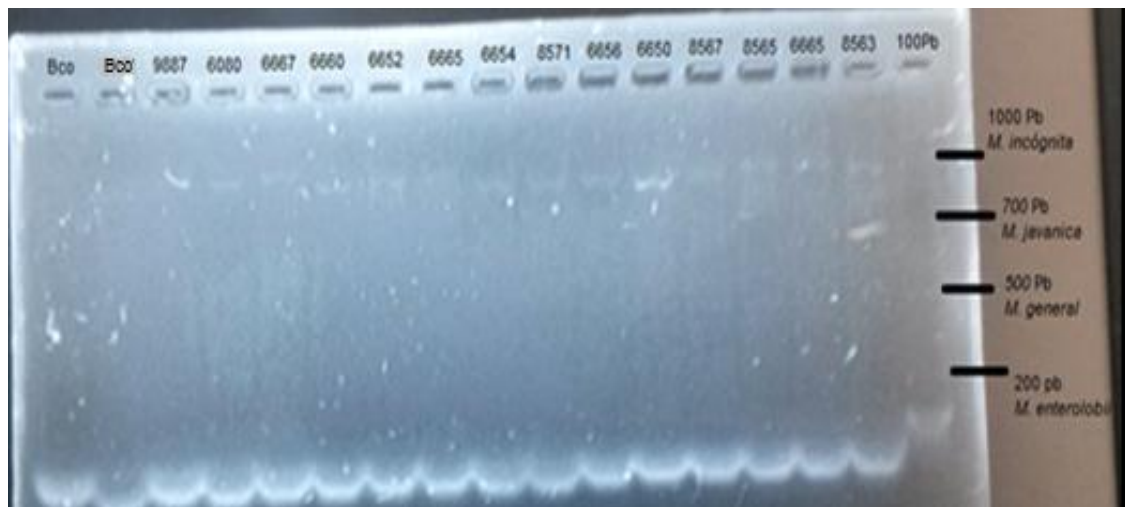


Fuente: Cuadra, 2016.

Figura 27. Fotografía de una gel de agarosa de productos de PCR utilizando ADN extraído de nematodos.

En la Figura 27 se observa en el primer carril de derecha a izquierda, se encuentra la escalera de 50pb, los carriles dos, cuatro, cinco, ocho, nueve, once, doce y trece de derecha a izquierda presentan un fragmento de 500 pb, dando positivo para nematodo de género *Meloidogyne*.

En la Figura 28 se presenta un gel agarosa de PCR múltiple con las muestras amplificadas de ADN, para observar la presencia de 3 especies del nematodo *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. enterolobii*.



Fuente: Cuadra, 2016.

Figura 28. Fotografía de una gel de agarosa de productos de PCR utilizando ADN extraído de nematodos.

En la Figura 28 se observa que el primer carril de derecha a izquierda, se encuentra la escalera de 100pb, el segundo carril de izquierda a derecha con el número de muestra 8563 presenta un fragmento de 700pb dando un resultado en la presencia de *Meloidogyne javanica*. El tercer carril hasta el carril final de derecha a izquierda se encuentran la presencia del nematodo *Meloidogyne incognita* con un fragmento de 1000pb, las muestras enumeradas son 6665, 8665, 8567, 6650, 6656, 8571, 6654, 6665, 6652, 6060, 6667, 6080, 9887 .

En el Cuadro 6 presenta un resumen de los resultados que se obtuvieron del PCR múltiple para las muestras del nematodo *Meloidogyne*.

Cuadro 6. Resumen de resultados obtenidos en PCR de *Meloidogyne múltiple*.

.	M.J.	Mi.	Mi.	Mi.	Mi.	Mi.	Mi.	Mi.	Mi.	Mi.	Mi.	Mi.	Mi.	Mi.		
100pb	8563	6665	8565	8667	6650	6656	8571	6654	6665	6652	6660	6667	6080	9887	Bco	Bco
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		

Fuente: Cuadra, 2016.

Inicialmente se hizo el diagnóstico utilizando el cebador general para el género *Meloidogyne* que presenta la Figura 27. Las muestras que resultaron positivas para el cebador general fueron utilizadas para determinar a cuál de las tres especies de *Meloidogyne* estaba presente, para este caso se utilizó la metodología de PCR múltiple.

La metodología fue utilizada para PCR múltiple, el cual incluye tres pares de cebadores para identificación de las especies *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. enterolobii*, puede ser utilizada con bastante precisión en la identificación de estas especies. Los resultados obtenidos en el diagnóstico molecular se compararon con los resultados del análisis morfológico usando los patrones perineales realizados previamente.

En dicha comparación hubo congruencia en ambos resultados. Podemos observar que la muestra 8563 de la Figura 28, fue identificada como especie *Meloidogyne javanica* tanto en el diagnóstico morfológico como en el diagnóstico molecular. De igual manera podemos comparar las muestras 6665, 8565, 6650, 6656, 8571, 6654, 6665, 6652, 6660, 6667, 6080 y 9887 de la Figura 28 comparado con las muestras morfológicas de patrón

perineal de la Figura 21 ubicadas las muestras 6665, 6650, de la Figura 22, de las muestras 6656, 6667, 8565, figura 23 de la muestra 9887, la Figura 24 de la muestra 6652, Figura 25 de las muestras 6660, 6080 y Figura 26, con las muestras 8571, 6654 todas estas muestras se observan que morfológicamente presenta la especie *Meloidogyne incognita* al igual que en la prueba de PCR.

En el Cuadro 7 presenta un resumen de los resultados que se obtuvieron del PCR múltiple para las muestras del nematodo *Meloidogyne*.

Cuadro 7. Resumen de resultados obtenidos en PCR de *Meloidogyne múltiple*.

Gel No.2			Mi.	M.J.	M.i.	M.i.		M.i.	M.i.	M.i.	M.i.	M.i.	
50pb	8575	9338	6667	9916	9918	6665	Bco	6652	9918	8561	9904	13320	Bco
	-	-	+	+	+	+		+	+	+	+	+	

Fuente: Cuadra, 2016

El resultado de la amplificación de *Meloidogyne múltiple* del Cuadro 7 para la muestra 8575 y 9338 fue negativo. Para la comparación de la muestra 9916 dando una presencia del nematodo de la especie *Meloidogyne javanica*, también lo vemos en la Figura 24 para la identificación morfológica de patrones perineales, ambos coincidieron con el mismo resultado.

Para las muestras 6665, 6667, 9918, 6665, 6652, 9918, 8561, 9904 y 13320 de la prueba de la técnica PCR estas muestras dieron como resultado la presencia de la especie *Meloidogyne incognita* y si observamos las muestras morfológicas de patrones perineales de la figura 21 para la muestra 6665, la Figura 22 para la muestra 6667, Figura 23 de la muestra 8561, Figura 24 de las muestras 6652, 13320, Figura 25 de la muestra 9918 y la Figura 26 de la muestra 9904 señala la presencia de *Meloidogyne incognita* dando el mismo resultado en ambas pruebas.

## 2.8. CONCLUSIONES

1. De las dieciocho muestras de nematodos que se realizaron en análisis morfológico, dieciséis pertenecen a la especie *Meloidogyne incognita* y dos pertenecen a la especie *Meloidogyne javanica*.
2. De las dieciocho muestras para el análisis de nematodos que se analizaron morfológicamente, también fueron analizadas con la técnica PCR, lo cual coinciden en la presencia de dieciséis muestras pertenecen a la especie *Meloidogyne incognita*, y dos muestras pertenecen a la especie *Meloidogyne javanica*.

## 2.9. RECOMENDACIONES

1. El presente trabajo apoya la importancia de un enfoque integrado que combine las características morfológicas con los resultados moleculares para la identificación de las tres especies más comunes de *Meloidogyne spp.* Aunque cualquiera de las dos técnicas pueden ser utilizados para la correcta identificación de las especies de nematodos del género *Meloidogyne*.
2. Si se utiliza la técnica de PCR, es recomendable tomar en cuenta el uso adecuado de reactivos, para evitar problemas de degradación y contaminación de los mismos.

## 2.10. BIBLIOGRAFÍA

1. AGEXPORT (Asociación Gremial de Exportadores, Guatemala). 2016. Plantas ornamentales (en línea). Guatemala. Consultado 17 mar. 2016. Disponible en <http://export.com.gt/sectores/plantas-ornamentales/>
2. Agrios, GN. 1991. Manual de enfermedades de las plantas. México, Limusa. v.1, p. 147; v. 4, p. 677-678.
3. Agrios, GN. 2005. Planta patológica. Florida, US, ELSEVIER. v.5, p. 826-831.
4. Bernard, RL. 1970. Terminology and identity of intraspecific forms of the soybean cy.4t nematode (*Heterodera glycines*). Plant Dis. Repr. 54:544-546.
5. Berry, SD; Fargette, M; Spaul, VW; Morand, S; Cadet, P. 2008. Detection and quantification of rootknot nematode (*Meloidogyne javanica*), lesion nematode (*Pratylenchus zaei*) and adagger nematode (*Xiphinema elongatum*) parasites of sugarcane using real-time PCR. Molecular and Cellular Probes 22:168–176.
6. Bird, AF. 1962. The inducement of giant cells by *Meloidogyne javanica*. Nematologica 8:1-10.
7. Chitwood, DJ; Perry, RN. 2009. Reproduction, physiology and biochemistry. In Perry, R; Moens, M; Starr, J (eds.). Root-knot nematodes. London, UK, CAB International. p. 182-194.
8. Christman, S. 2014. Descripción de *Epipremnum aureum* (en línea). Florida Plant Encyclopedia: Florida. Consultado 17 mar. 2016. Disponible en: <http://floridata.com/Plants/Araceae/Epipremnum%20aureum/1210>
9. Curran, J; Baillie DL; Webster, JM. 1985. Use of restriction fragment length differences in genomic DNA to identify nematode species. Parasitology 90:137-144.
10. Dorris, M; De Ley, P; Blaxter, ML. 1999. Molecular analysis of nematode diversity and the evolution of parasitism. Parasitology Today 15(5):188-193.
11. Eisenback, JD; Hirschmann, H. 1991. Root-knot nematode: *Meloidogyne* spp. and races. In Nickle, WR (eds.). Manual of agricultural nematology. New York, US, Marcel Dekker. p. 191-274.
12. Evans, K; Trudgill, DL; Webster, JM. 1993. Capítulo 1: la extracción, identificación y control de los nemátodos parásitos de las plantas; en planta parásita nemátodos en agricultura templada. Reino Unido, CAB International. 648 p.
13. García, A. 2006. Identificación de especies de nematodos fitopatógenos de los géneros *Globodera* spp. y *Meloidogyne* spp. por medio de dos técnicas moleculares.



- Informe Práctica Especialidad Biología. San José, Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica. 47 p.
14. García, M. 2004. Estudio de la distribución horizontal de los nemátodos fitoparásitos en áreas cultivadas con café de la cabecera municipal de San Vicente Pacaya, Escuintla. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 77 p.
  15. Golden, AM. 1976. Taxonomía de *Meloidogyne-itatus* actual, algunos problemas, y necesidades; provisionings de la conferencia de planificación de investigación sobre nemátodos de nudo-raíz *Meloidogyne* spp. Raleigh, N.C., US, North Carolina State University. p. 13-17.
  16. Harris, TS; Sandall, LJ, Powers TO. 1990. Identification of single *Meloidogyne* juveniles by polymerase chain reaction amplification of Mitochondrial DNA. *Journal of Nematology* 22(4):518-524p.
  17. Hu, MX; Zhuo, K; Liao, JL. 2011. Multiplex PCR for the simultaneous identification and detection of *Meloidogyne incognita*, *M. enterolobii*, and *M. javanica* using DNA extracted directly from individual galls. *Phytopathology* 101:1270-1277.
  18. Hunt, DJ; Handoo, ZA. 2009. Taxonomy, identification and principal species. *In* Perry, R; Moens, M; Starr, J (eds.). *Root-knot nematodes*. London, UK, CAB International. p. 55-88.
  19. Lazo Quiñonez, JG. 2002. Diseño de un plan de exportación de productos no tradiciones a Europa vía área caso específico plantas ornamentales follajes. Tesis Lic. Econ. Guatemala, Universidad Landívar de Guatemala, Facultad de Ciencias Económicas y Empresariales, Mercadotecnista. 15 p.
  20. Linden, JJ; André, EF; Bunting, GS. 1964. *Epipremnum aureum*. *In* USDA; ARS; Programa Nacional de Recursos Genéticos, Guatemala. 2015. Germoplasma recursos red de información - (GRIN). Beltsville, US, Laboratorio Nacional de Recursos de Germoplasma. Consultado 17 mar. 2016. Disponible en <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?461402>
  21. Long, H; Liu, H; Xu, JH. 2006. Development of a PCR diagnostic for the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii*. *Acta Phytopathol. Sin.* 36:109-115.
  22. López Palacios de Sánchez, CY. 2014. Historia del municipio de Villa Nueva. Tesis MA. Docencia Universitaria. Guatemala, USAC, Facultad de Humanidades, Escuela de Postgrado. p. 5-27.
  23. Louws, FJ; Rademake, JLW; De Bruijin, FJ. 1999. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: diversity, detection, disease diagnose. *Annual Review Phytopathology* 37:81-125.

24. Meng, QP; Long, H; Xu, JH. 2004. PCR assays for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. Acta Phytopathol. Sin. 34:204-210.
25. Peterson, DJ; Zijlstra, C; Wishart, J; Blok, V; Vrain, TC. 1997. Specific probes efficiently distinguish root-knot nematode species using signature sequences in the ribosomal intergenic spacer. Fundam. Appl. Nematol. 20:619-626.
26. Powers, TO; Harris, TS. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* spp. Journal of Nematology 25:1-6.
27. Rodríguez, M. 2000. Identificación y caracterización de *Meloidogyne mayaguensis* (Nemata: Meloidogynidae) en el café en Cuba. Tesis PhD. Cuba, Universidad Agraria de la Habana Fructuoso Rodríguez Pérez. 145 p.
28. Sasser, J; Taylor, A. 1983. Biología, identificación y control de los nemátodos de nódulo de la raíz. Carolina del Norte, Estados Unidos, Universidad del Estado de Carolina del Norte. 111 p.
29. Sasser, JN. 1977. Worldwide dissemination and importance of the root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Jour. of Nematology 9:26-29.
30. Stanton, J; Hugall, A; Moritz, C. 1997. Nucleotide polymorphisms and an improved PCR-based mtDNA diagnostic for parthenogenetic root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Fundam. Appl. Nematol. 20:261-268.
31. Stoll, NR. 1964. International code of zoological nomenclature adopted by the XV international congress of zoology. London, International Trust for Zoological Nomenclature. 25 p.
32. Triviño, CG. 1981. Variation in female and juvenile morphology in species of *Meloidogyne* (en línea). Thesis MsG. UK, University of Agriculture and Food. 112 p. Consultado 20 nov 2016. Disponible en <https://books.google.com.gt/books?id=3WszAQAAMAAJ&pg=PA43&lpg=PA43&dq=E+sser+Perry+Taylor&source=bl&ots=5NzS9UhU4v&sig=wJlISMzIukf4vEonQKRu2IbJia0&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi93KOz6MzSAhVE4mMKHcaRAXcQ6AEIIDAB>
33. Whitehead, AG. 1968. Taxonomy of *Meloidogyne* (Nematoda: Heteroderidae) with descriptions of four new species. Trans. Zool. Soc. 31:263-401.
34. Williamson, VM. 1991. Molecular techniques for nematode species identification. In Nickle, WR (ed.). Manual of agricultural nematology. New York, US, Marcel Dekker. p. 107-123.
35. Winstead, NN; Riggs, RD. 1963. Stability of pathogenicity of B biotypes of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato. Plant Dis. Repr. 47:870-871.

36. Wong, TK; Mai, WF. 1973. *Meloidogyne* hapla in organic soil: effect of environment on hatch, movement and root invasion. Jour. Nematology 5:130-138.
37. Wouts, WM. 1973. A revisión of the family Hieteroderidae (Nematoda: Tylenchoidea). Nematológica 18:439-446.
38. Xu, J; Liu, P; Meng, Q; Long, H. 2004. Characterisation of *Meloidogyne* species from China using isozyme phenotypes and amplified mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism. European Journal of Plant Pathology 110:309–315.
39. Zijlstra, C; Uenk, BJ; Van Silfhout, CH. 1997. A reliable, precise method to differentiate species of root-knot nematodes in mixtures on the basis of ITS-RFLPs. Fundam. Appl. Nematol. 20:59-63.

### **CAPÍTULO III**

**Servicios del Laboratorio de Diagnóstico de la Dirección de Sanidad Vegetal,  
VISAR-MAGA del kilómetro 22, carretera al Pacífico, Bárcena, Villa Nueva.**

### 3.1. PRESENTACIÓN

En el Laboratorio VISAR-MAGA se ejecutaron tres servicios de mayor importancia. El primero consistió en el apoyo al Sistema Inventario Computarizado en el Laboratorio de Biología Molecular. Este servicio fue de útil información para tener una alerta de todos los suministros de reactivos y equipo de trabajo, que han sido utilizados. El servicio también brindó la oportunidad que se llevará a cabo las compras de insumos.

El segundo servicio fue, el apoyo en la implementación de la prueba de ELISA en la gestión de calidad. Este servicio es una herramienta poderosa para la detección o diagnóstico de enfermedades en plantas. Su aplicación, permite elaborar estrategias de manejo integrado de enfermedades, mejorando la calidad y sanidad de los cultivos.

El servicio permitió observar la competencia y rentabilidad, es por eso que se realizaron cotizaciones para ver el gasto que genera al realizar la prueba. De acuerdo a la información realizada, se llevó a cabo una estimación de reactivos, suministros, mantenimiento de equipo y mantenimiento del personal que se necesitará para hacer funcionar la prueba ELISA.

Así mismo también se realizaron protocolos escritos especificados bajo los documentos de los equipos, también sobre material e insumos. Se realizó un listado de todos los patógenos que se pueden realizar en el ensayo ELISA y por último una proyección del presupuesto para el inicio de año de las actividades.

El tercer servicio se llevó a cabo con la realización del manual de procedimientos para nematodos *Meloidogyne* para la de detección de las tres. Este manual establece las normas COGUANOR NGR-COPANT- ISO-IEC 17025. Para ser conocido y avalado nacional e internacionalmente.

Estos tres servicios fueron realizados con el fin de apoyar al Laboratorio Fitosanitario VISAR-MAGA. El primer servicio ayudó a tener el control sobre el uso de insumos y reactivos. El segundo servicio de la prueba ELISA, ayudó atender la demanda del sector productivo para la realización de diagnósticos más acertados a menor tiempo, y así adquirir conocimiento sobre los procedimientos.

El tercer servicio en la realización de un manual de procedimientos para la identificación de especies de nemátodos *Meloidogyne*.

## **3.2 SERVICIO 1. SISTEMA DE INVENTARIO COMPUTARIZADO EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR.**

### **3.2.1. OBJETIVOS**

#### **General**

Realizar un inventario computarizado, para llevar a cabo el control de insumos de reactivos y equipo de trabajo para el laboratorio de Diagnóstico de Biología Molecular en PCR convencional.

#### **Específicos**

1. Realizar un sistema de alerta a la hora de llevar a cabo un inventario de todos los insumos de reactivos que se usan, para realizar pruebas de Diagnósticos en Biología Molecular.
2. Detallar la cantidad total del equipo de trabajo para llevar un control de lo que entra y sale en el Laboratorio de Biología Molecular.

### **3.2.2. METODOLOGÍA**

Para la elaboración de un inventario computarizado, se realizará un conteo de todo el material de equipo que estará en uso, como cristalería que forma parte del Laboratorio de Biología Molecular y saber cuál es el funcionamiento de cada uno.

En el mismo inventario de equipo y cristalería, se tomará en cuenta, la cantidad de los insumos de reactivos, dando a conocer los nombres de cada uno y cuál es el funcionamiento que tienen en el laboratorio, así mismo disponer de una computadora que contenga el software excel para ingresar toda la información colectada, esto ayudará a tener más control de entrada y salidas de los insumos.

### **3.2.3. RESULTADOS**

Como resultado del inventario realizado en el Laboratorio de Diagnóstico de Sanidad Vegetal, se realizó un sistema de alerta de lo entra y sale de equipos e insumos. Este servicio tiene una constante actualización por el encargado del Área de Biología Molecular por ser parte del uso de insumos ver Cuadros 8, 9, 10, 11, 12, 13, y 14.



### 3.2.3.A. Inventario de Equipos, Materiales e insumos

#### A. Inventario de Equipo

Cuadro 8. Resultados de la cantidad de aparatos en uso del Laboratorio Biología Molecular.

<b>Cantidad</b>	<b>Aparatos del laboratorio</b>
1	Centrifugadora de 24 entradas para tubos de 1.5ml
1	Centrifugadora de 24 entradas para tubos de 1.5ml
1	Centrifugadora de 18 entradas para tubos de 1.5ml
1	Centrifugadora de 8 entradas para tubos de 0.5ml
1	Aparato para electroforesis
1	Amplificador PCR Multigen optimux Labnet
1	Incubadora de 40 entradas para tubos de 1.5ml
1	Balanza Radwag wlc 0,6/A1/C/2
1	Microondas
1	Aparato Quamtus fluorometer promega
1	Medidor de Ph verde Clean Leau
1	Aparato digicel (digital gel imagen system) con una cámara fotográfica y pantalla para imagen
1	Regleta de energía de 5 entradas color blanco
1	Regleta de energía de 8 entradas marca Ace color negro
1	Cámara autoclave Dengyng Instruments Cu, LTD circulador Oven D045

Fuente: Cuadra, 2016.

## B. Inventario de materiales

Cuadro 9. Resultados de la cantidad de pipetas en uso del Laboratorio Biología Molecular.

Cantidad	Pipetas
1	Pipeta 100/1000 $\mu$ l azul de color celeste
1	Pipeta sl 200 de 20-200 $\mu$ l de color azul
1	Pipeta sl 1000 de 100 a 1000 $\mu$ l de color azul
1	Pipeta 20/200 $\mu$ l de color amarilla
1	Pipeta sl20 xsl de 2-20 $\mu$ l de color azul
1	Pipeta 2/20 $\mu$ l color amarilla en la parte estéril
1	Pipeta de 0.5/10 $\mu$ l color roja en la parte estéril
1	Pipeta de 100 $\mu$ l color gris en la parte estéril
1	Pipeta de 100 $\mu$ l color gris amarilla en la parte estéril
1	Colocador de pipetas color negro
1	Colocador de pipetas color blanco en la parte estéril.

Fuente: Cuadra, 2016.

Cuadro 10. Resultados de la cantidad de puntas del Laboratorio Biología Molecular.

<b>Puntas encajadas de las pipetas</b>	<b>Puntas Eppendorf</b>	<b>Puntas Eppendorf</b>		
<b>Tamaño de puntas</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Fecha de Ingreso</b>	<b>Fecha finalizada</b>	<b>Total puntas</b>
Eppendorf 0.1-2.5 $\mu$	96			
Eppendorf 0.5-10 $\mu$	96	26-ene-16		
Eppendorf 10-100 $\mu$	96	26-ene-16		
Eppendorf 100-1000 $\mu$	96	26-ene-16		
				384
<b>Bolsas selladas</b>				
Eppendorf 1500 $\mu$	500	15-jul-16	Sellada	
Eppendorf 50-1000 $\mu$	500		Sellada	
Eppendorf 50-1000 $\mu$	500		Sellada	
Eppendorf 2-200 $\mu$	500		Sellada	
Eppendorf 2-200 $\mu$	500		Sellada	
Eppendorf 0.1-20 $\mu$	500		Sellada	
Eppendorf 0.1-200 $\mu$	500		Sellada	
Eppendorf 0.5-200 $\mu$	500		Sellada	
Eppendorf 0.5-200 $\mu$	500		Sellada	
				4500
<b>Puntas bolsas selladas</b>	<b>Puntas Labcon</b>	<b>Fecha de ingreso</b>	<b>Fecha finalizada</b>	<b>Total puntas</b>
Labcon100-1250 $\mu$	1000	26-may-16	Sellada	
Labcon1-200 $\mu$	1000	26-may-16	Sellada	
Labcon 10 $\mu$	1000	26-may-16	Sellada	
				3000
<b>Bolsas vacías de puntas Labcon</b>				
Labcon 10 $\mu$	1000	18-mar-16	19-ago-16	
Labcon10 $\mu$	1000	09-feb-16	15-jul-16	
Labcon 1-200 $\mu$	1000	12-ene-16	11-abr-16	

Labcon 10 $\mu$	1000	12-ene-16	29-feb-16	
Labcon 100-1250 $\mu$	1000	01-oct-16	07-mar-16	
Labcon 100-1250 $\mu$	1000	15-may-16		
				vacías 6000
<b>Puntas Brand selladas</b>				
Brand 1000 $\mu$	500		Sellada	
Brand 200 $\mu$ bolsa amarilla	1000		Sellada	
Brand 200 $\mu$ bolsa amarilla	1000		Sellada	
Brand 200 $\mu$ bolsa amarilla	1000		Sellada	
Brand 200 $\mu$ bolsa amarilla	1000		Sellada	
Brand 200 $\mu$ bolsa blanca	1000		Sellada	
Brand 200 $\mu$ bolsa blanca	1000		Sellada	
Brand 200 $\mu$ bolsa blanca	1000		Sellada	
Brand 200 $\mu$ bolsa blanca	1000		Sellada	
Brand 200 $\mu$ bolsa blanca	1000		Sellada	
Brand 200 $\mu$ bolsa blanca	1000		Sellada	
				10500
<b>Puntas Brand bolsas vacías</b>				
Brand 200 $\mu$	1000	02-jun-16	25-jul-16	
Brand 1000 $\mu$	1000	18-mar-16	11-abr-16	
Brand 1000 $\mu$	500	16-jul-16	16-may-16	
Brand 1000 $\mu$	500	16-may-16	24-jun-16	
Brand 1000 $\mu$	500	08-jul-16	15-jul-16	
				3500
<b>Cajas verdes llenas de puntas</b>				
8 Cajas de 1.5 ml	768			
8 Cajas de 20-200 $\mu$	768			
8 Cajas de 0.1 $\mu$	768			
				2304

Fuente: Cuadra, 2016.

Cuadro 11. Resultados de la cantidad de tubos del Laboratorio Biología Molecular.

<b>Tubos Brand</b>				
<b>Tubos Labcon Brand selladas</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Fecha de Ingreso</b>	<b>Fecha final</b>	<b>Total</b>
Labcon T1500-012 (1.5ml)	500	26-may-16		
Labcon T1500-013 (1.5ml)	500	26-may-16		
Labcon T1500-014 (1.5ml)	500	26-may-16		
Labcon T200-004 (0.2ml)	1000	26-may-16		
				2500
<b>Tubos Labcon bolsas vacías</b>				
Labcon T1500-001 (1.5ml)	500		30-jul-16	
Labcon T1500-002 (1.5ml)	500	12-ago-15		
Labcon (1.5ml)	500	16-may-16	06-jun-16	
Labcon (1.5ml)	500	05-feb-16	18-feb-16	
Labcon (0.2ml)	500			
Labcon (0.2ml)	500			
				3000
<b>Tubos Brand bolsas selladas</b>				
Brand T200-003 (0.2ml)	1000	15-jul-16		
Brand (0.2ml)	500	05-abr-16		
Brand T1500-008 (1.5ml)	500	13-nov-16		
Brand T1500-009 (1.5ml)	500	13-nov-16		
Brand T1500-010 (1.5ml)	500	13-nov-16		
Brand T1500-011 (1.5ml)	500	13-nov-16		
				3500
tubos bolsas vacías Eppendorf				
Eppendorf 1.5ml	500	08-jun-16	23-jun-16	
Eppendorf 1.5ml	500	21-mar-16	18-abr-16	
Eppendorf T500-002 0.6ml	500	07-mar-16	07-abr-16	
Eppendorf 0.6ml	500	07-abr-16	27-jul-16	
				2000

Fuente: Cuadra, 2016.

Cuadro 12. Resultados de la cantidad de cristalería del Laboratorio Biología Molecular.

<b>Cantidad</b>	<b>Equipo de laboratorio</b>	<b>ML</b>	<b>Usos</b>
1	Beaker	150	en uso con cloro abajo
1	Beaker	150	en uso con agua abajo
1	Beaker	1000	
1	Beaker	600	para descartes de puntas (Dp)
1	Beaker	600	
2	Beaker	250	
1	Beaker	250	para descarte de puntas (Dp)
1	Beaker	80	
1	Beaker	120	
1	Beaker	600	para Dp en el área de amplificación
1	Balón de aforo	100	
1	Balón de aforo	250	
1	Probeta	100	
2	Probeta	250	
1	Probeta	100	
1	Probeta	50	
2	Probeta	500	
1	Erlenmeyer	225	con detergente
1	Erlenmeyer	125	usos múltiples
1	Erlenmeyer con tapón	250	

Fuente: Cuadra, 2016.

### C. Inventario de Insumos

Cuadro 13. Resultados de la cantidad de reactivos sellados y en uso del Laboratorio Biología Molecular.

CANTIDAD	NOMBRE	CÓDIGOS	LOTIFICACIÓN
1	Bote en uso de sílice Gel de 1 kg	k 36859925 703	1.01925.1000 Merck
1	Bote en uso de sílice Gel de 1 kg	k 35182825 548	1.01925.1000 Merck
4	Frascos de agarosa de 250g sellados	k 37124401 725	1.16801.0250 Merck
1	Bote plástico de 500g de Tris (Hydromethyl aminomethane, 99+%, for Biochemistry en uso	cod. 14050500	lot: A0340874 Acros Organics
1	Bote plástico de 1kg de Sodium Hydroxide-Pearl nuevo sellado	cod. S/4845/60	Lot: 1347549 Marca F
1	Bote plástico blanco Tris (Hydroxymethyl) aminomethane de 1kg nuevo sellado		Cod. 1.08382.1000 Acros Organics.
1	Bote gris con tapa azul de Sodium Chloride (NaCl 001) de 1kg en uso	cod. s/3160/60	Lot. 1154988 Marca F
1	Bote gris con tapa azul de Sodium Hydroxide- pearl de 1kg en uso	cod. s/4845/60	Lot.1347549 Marca F
1	Bote EDTA Na2. 2H2O Dnase, Rnase and protease Free puro 99% catalogo No. BED101 en uso (C10H14N2O8Na2) Mw 372.24		Lot: 0341B83 Zymeset
1	Bote plástico CTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide) 99+% (C19H42BrN) Mw 364.45 en uso de 100g	cod. 22716 1000	Lot: 0333490Acros Organics.
1	Bote plástico Tris (Hydroxymethyl) aminomethane Hydrochloride, 99+% extra pure alpha, alpha, (C4H11NO3.HCl) Mw 157.60 en uso	cod. 22803 1000	Lot: A0334731 Acros Organics.
1	Bote plástico agarosa v10-A100 100g sellado	S/N: 10711020	Basic Life
1	Bote plástico NS. Acetato de 250g Proanalysis (CH3I00Na) M=82.03g/mol	k 36523968 712	1.06268.0250 Merck
1	Bote plástico Lauryl Sulfate de 100g en uso	L3771	Lot: 107h00061 SIGMA
1	Bote plástico Litio Cloruro p.a. 250g sellado	Cód. 1.05679.0250	Lot: B847179 635
2	Botes plásticos de sarcosina (N-Lauroylsarcosine Sodium purity min 97% Mw 293.39 ( C15H28NaO3) 1 en uso y el otro sellado	Catalogo BLA101	Lot: 0900702 Zymeset
1	Bote plástico de agarosa -001- molecular Biology Grade 4/1 open de 100g en uso	Cant. No. 75510-019	Lot: 0000173722 invitrogen
1	Caja azul abierta con 54 botes sellados y 6 abiertos de H2O para inyección de 20ml c/u.		Marca sintong
1	Bote de PVP plástico de 100g (Polyvinylpyrrolidone 100% puro solo se uso para prueba y no funciona	k45280102 503	1.07302.0100 Merck
1	Frasco de vidrio de 2.5L Asoamyl Alcohol, alcohol isoamílico (C5H12O), 1L= 0.81kg, M=88.5g/m, UN 1105	K44397979 326	cód. 1.00179.2500 Merck
1	Frasco de vidrio de 2.5L Emsure 2-propanol, (CH3CH(OH)CH3, 1L=0.786kg, M=60.1g/m, UV 1219	K45187334402	Cód. 1.09634.2500 Merck

1	Frasco de vidrio de 2.5L Emsure Ácido acético 100% (CH <sub>3</sub> COOH), 1L= 1.05kg, M=60.05g/m, en uso	K45508463 414	Cód. 1.00063.2500 Merck
1	Frasco de vidrio de 2.5L Emsure Etanol, (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH), 1L=0.790kg, M=46.07g/m en uso	k45362083 409	Cód. 1.00983.2500 Merck
1	Frasco de vidrio de 25g Agarosa en uso	k27376 501	Cód. 1.16801.0025 Merck
1	Frasco café de 1L de 2-Mercaptoethanol for syntesis, (HCHC <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH), 1L=1.12kg, M=78.13g/m, UN2966, en uso, refrigerado	57056540 522	8.057740.100 Merck
1	Frasco café de 100g Albumina fracción V refrigerado en uso	k46342318 543	1.12018.0100 Merck
1	Frasco vidrio con tapa azul	400 ml	Contenido TAE IX
1	Frasco vidrio con tapa azul	400 ml	Contenido TAE 50X
1	Frasco vidrio con tapa azul	400 ml	Contenido Agua desmineralizada
1	Frasco vidrio con tapa azul	400 ml	Contenido Tris-Hd edta 0.5 M
1	Frasco vidrio con tapa azul	400 ml	Contenido Tris HCl 1M PH 7.5
1	Frasco vidrio con tapa azul	200 ml	Contenido TAE IX Geles
2	Frasco vidrio con tapa azul	40 ml	Vacíos
1	Frasco vidrio café	200 ml	Sin uso
1	Frasco vidrio con tapa azul	250 ml	Contenido NaO AC 2.5 M
1	Frasco vidrio con tapa azul	80 ml	Contenido NaCl 4M
1	Frasco vidrio con tapa azul	80 ml	Contenido HCl + DH <sub>2</sub> O
1	Frasco vidrio con tapa azul	40 ml	Sin uso
1	Frasco vidrio con tapa azul	80 ml	Contenido con CTAB 10% NaCl 0.7 M
1	Frasco vidrio con tapa azul	80 ml	Contenido Ácido acético 10 %
1	Frasco vidrio con tapa azul	40 ml	Contenido con H <sub>2</sub> O para inyección
1	Frasco vidrio sin tapadera		Sin uso
1	Frasco vidrio con tapa azul	80 ml	Contenido con Buffer de extracción
1	Frasco vidrio con tapa azul	80 ml	Contenido con Buffer de lavado
1	Frasco vidrio con tapa azul	250 ml	Refrigerado
1	Frasco vidrio con tapa azul	80 ml	Contenido con TE refrigerado
1	Frasco vidrio con tapa azul	80 ml	Contenido con EDTA 0.5 M refrigerado
1	Frasco vidrio con tapa azul	250 ml	Contenido con Cl 24: 1 (Cloroformo) refrigerado
1	Frasco vidrio con tapa azul	250 ml	Contenido con E+OH 70% refrigerado
1	Frasco vidrio con tapa azul	250 ml	Contenido con ISO PROPANOL refrigerado

Fuente: Cuadra, 2016.



### 3.2.3.B. Sistema de alerta del inventario de puntas y tubos.

Cuadro 14. Resultados de la cantidad de puntas y tubos que están sellados y en uso del Aaboratorio Biología Molecular como sistema de alerta.

<b>Medidas de puntas</b>	<b>Cantidad de puntas</b>	<b>Total disponible</b>
Total de puntas empacadas 1500 $\mu$	500	
Total de puntas empacadas 1000 $\mu$	1500	
Total de puntas empacadas 50-1000 $\mu$	1000	
Total de puntas empacadas 100-1250 $\mu$	3000	
cantidad puntas empacadas 1-200 $\mu$	1500	
Total de puntas empacadas 200 $\mu$	10000	
Cantidad puntas empacadas 0.5-200 $\mu$	1000	
Cantidad puntas empacadas 0.1-200 $\mu$	500	
Cantidad puntas empacadas 10-100 $\mu$	96	
Total de puntas empacadas 100-1000 $\mu$	96	
Total de puntas empacadas 10 $\mu$	1000	
Total de puntas empacadas 0.1-2.5 $\mu$	96	
Total de puntas empacadas 0.5-10 $\mu$	96	
Total selladas		20384
Total puntas de bolsas vacías		
Puntas de 200 $\mu$	1000	
Puntas de 1000 $\mu$	2500	
Puntas de 100-1250 $\mu$	1000	
Puntas de 10 $\mu$	3000	
Total puntas usadas		7500
<b>Cantidad de tubos usados</b>	<b>Cantidad de tubos</b>	<b>Total disponible</b>
Total tubos 1.5ml	3500	
Tubos 0.2ml	2500	
		6000
	<b>Cantidad tubos bolsas vacias</b>	
Tubos DE 1.5ml	3000	
tubos de 0.6ml	1000	
tubos 0.2ml	1000	
		5000

Fuente: Cuadra, 2016.

### 3.2.4. EVALUACIÓN

- Se realizó un sistema de alerta de inventario de todos los insumos de reactivos químicos los cuales se hacen uso en el área, para la realización de pruebas de Diagnósticos en Biología Molecular.
- Se detalló la cantidad total del equipo de trabajo los cuales son muy útiles para el proceso de PCR convencional, y se llevó a cabo el control de lo que entró y salió mediante el sistema de alerta por medio del programa excel.

### 3.2.5. BIBLIOGRAFÍAS

1. MAGA (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, Viceministerio de Sanidad Agropecuaria y Regulaciones, Dirección de Sanidad Vegetal, Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario, Guatemala). 2016a. Inventario de materiales, equipo y cristalería del Laboratorio de Biología Molecular. Guatemala. (Hoja Excel).
2. \_\_\_\_\_. 2016b. Sistema de alerta del inventario de puntas y tubos del Laboratorio de Biología Molecular. Guatemala. (Hoja Excel).
3. Silvestre Hernández, YG. 2015. Detección de *Tuta absoluta* Meyrick en muestras ingresadas al Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario de la Dirección de Sanidad Vegetal, diagnóstico y servicios realizados en el VISAR, MAGA. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. p. 18-27.

### **3.3. SERVICIO 2. APOYO A LA IMPLEMENTACIÓN DE LA PRUEBA DE ANÁLISIS ELISA.**

#### **3.3.1. OBJETIVOS**

##### **Objetivo General**

Apoyar en la implementación de la prueba ELISA, de Gestión de Calidad con el fin de entregar muestras más certeras en menor tiempo, en el Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario, de la Dirección de Sanidad Vegetal VISAR-MAGA del kilómetro 22, carretera al Pacífico, Bárcenas, Villa Nueva, Guatemala C.A.

##### **Objetivos Específicos**

1. Generar un listado de patógenos de mayor demanda que pueden detectarse mediante una prueba de ELISA.
2. Realizar cotizaciones con 3 proveedores diferentes, sobre reactivos para la detección de patógenos en prueba ELISA.
3. Proveer información sobre protocolos, en uso de reactivos y lavado de cristalería para el proceso de prueba ELISA.
4. Generar un listado de todos los reactivos a utilizar con cada patógeno específico.
5. Proyectar por año el inicio de actividades que se realizaran en la prueba ELISA.

### **3.3.2. METODOLOGÍA**

Para llevar a cabo el apoyo a la implementación sobre el uso de Detección y Diagnóstico Inmunoenzimáticas como la prueba de ELISA (del inglés: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays), se realizó una búsqueda de información, sobre que patógenos que pueden detectarse y los reactivos que se utilizan mediante la realización del diagnóstico (Sutula, C., Gillet, J., Morrisey, S., and Ramsdell, D. 1986).

También se realizaron, listados de protocolos escritos sobre el proceso de la prueba y varios listados de reactivos, insumos plásticos, cristalería y desechables y por último se harán cotización formales a 3 proveedores sobre los reactivos.

### **3.3.3. RESULTADOS**

Se realizó un listado de diez patógenos que presentan mayor demanda, tres cotizaciones a tres proveedores de los diez patógenos y elaboración de protocolos para el uso de los reactivos, para el Laboratorio de Diagnóstico de Sanidad Vegetal VISAR-MAGA, del cual se pueden realizar pruebas ELISA para tener un resultado más confiable.

### 3.3.3.A. Listado de patógenos de la prueba ELISA

El Cuadro 15 se presenta un listado de patógenos que tienen mayor demanda en el Laboratorio de Diagnóstico de la Dirección de Sanidad Vegetal VISAR-MAGA.

Cuadro 15. Listado de patógenos con mayor demanda en el Laboratorio de Diagnóstico de la Dirección de Sanidad Vegetal.

<b>CANTIDAD</b>	<b>PATOGENOS CON MAYOR DEMANDA</b>
1	Virus del Mosaico del Pepino
2	Alfalfa mosaic virus
3	Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis
4	Virus de papa X
5	Ralstonia solanacearum
6	Virus del mosaico del tabaco
7	Virus de la marchitez del manchado
8	Virus del mosaico del tomate
9	Virus de la mancha necrótica de impatiens
10	Virus de la patata Y

Fuente: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimento - MAGA, 2016.

### 3.3.3.B. Cotizaciones de 3 Proveedores diferentes para la prueba ELISA.

En los Cuadros 16, 17 y 18 muestran la cotización que se realizó, de los reactivos de prueba ELISA para el Laboratorio de Diagnóstico de la Dirección de Sanidad Vegetal VISAR-MAGA.

Cuadro 16. Resultado de la cotización de prueba de ELISA en AGDIA

Cotización para pruebas ELISA en Agdia							
Reactivo	Nombre	Reacciones	Cantidad Kit	Control +	Control -	precio en dolares	precio en quetzales
PepMV	Virus del Mosaico del Pepino	500	1	1	1	\$275.00	Q. 2,068.00
AMV	Alfalfa mosaic virus	500	1	1	1	\$275.00	Q. 2,068.00
Cmm	Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis	500	1	1	1	\$275.00	Q. 2,068.00
PVX	Virus de papa X	500	1	1	1	\$205.00	Q. 1,541.00
Rs	Ralstonia solanacearum	500	1	1	1	\$450.00	Q. 3,384.00
TMV	Virus del mosaico del tabaco	500	1	1	1	\$275.00	Q. 2,068.00
TSWV	Virus de la marchitez del manchado	500	1	1	1	\$275.00	Q. 2,068.00
ToMV	Virus del mosaico del tomate	500	1	1	1	\$205.00	Q. 1,541.00
INSV	Virus de la mancha necrótica de Impatiens	500	1	1	1	\$370.00	Q. 2,782.40
PVY	Virus de la patata Y	500	1	1	1	\$305.00	Q. 2,293.6

Fuente: Cuadra, 2016.

Cuadro 17. Resultado de la cotización de prueba ELISA en SEDIAG.

Cotización para pruebas ELISA en Sediag							
Reactivo	Nombre	Reacciones	Cantidad Kit	Control +	Control -	precio en dolares	precio en quetzales
PepMV	Virus del Mosaico del Pepino	500	1	1	1	\$313.22.	Q. 2,355.41
AMV	Alfalfa mosaic virus	500	1	1	1	\$275.00	Q. 2,068.00
Cmm	Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis	500	1	1	1	\$275.00	Q. 2,068.00
PVX	Virus de papa X	500	1	1	1	\$205.00	Q. 1,541.00
Rs	Ralstonia solanacearum	500	1	1	1	\$450.00	Q. 3,384.00
TMV	Virus del mosaico del tabaco	500	1	1	1	\$275.00	Q. 2,068.00
TSWV	Virus de la marchitez del manchado	500	1	1	1	\$275.00	Q. 2,068.00
ToMV	Virus del mosaico del tomate	500	1	1	1	\$205.00	Q. 1,541.00
INSV	Virus de la mancha necrótica de Impatiens	500	1	1	1	\$370.00	Q. 2,782.40
PVY	Virus de la patata Y	500	1	1	1	\$305.00	Q. 2,293.6

Fuente: Cuadra, 2016.

Cuadro 18. Resultado de la cotización de prueba ELISA en LOEWE.

Cotización para pruebas ELISA en Loewe							
Reactivo	Nombre	Reacciones	Cantidad Kit	Control +	Control -	precio en euros	precio en quetzales
PepMV	Virus del Mosaico del Pepino	500	1	1	1	206.00 EUR	Q. 1,621.22
AMV	Alfalfa mosaic virus	500	1	1	1	202.00 EUR	Q. 1,589.74
Cmm	Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis	500	1	1	1	211.00 EUR	Q. 1,660.87
PVX	Virus de papa X	500	1	1	1	162.00 EUR	Q. 1,274.94
Rs	Ralstonia solanacearum	500	1	1	1	211.00 EUR	Q. 1,660.87
TMV	Virus del mosaico del tabaco	500	1	1	1	202.00 EUR	Q. 1,589.74
TSWV	Virus de la marchitez del manchado	500	1	1	1	206.00 EUR	Q. 1,621.22
ToMV	Virus del mosaico del tomate	500	1	1	1	202.00 EUR	Q. 1,589.74
INSV	Virus de la mancha necrótica de Impatiens	500	1	1	1	202.00 EUR	Q. 1,589.74
PVY	Virus de la patata Y	500	1	1	1	162.00 EUR	Q. 1,274.94

Fuente: Cuadra, 2016.

### 3.3.3.C. Información de protocolo para cada patógeno en uso de reactivos y lavado de cristalería.

#### A. Protocolo ELISA de *Virus del Mosaico en pepino (PepMV)*

##### A. Preparación de materiales

1. Prepara los buffer de cobertura, buffer de extracción *PepMV* y buffer de revelado en base al instructivo procedimiento para elaboración buffer para ELISA.
2. Preparar los controles positivo y negativo de la prueba según el instructivo de procedimiento para dilución de controles para ELISA.
3. Preparar una caja húmeda con un recipiente hermético y con una toalla de papel húmeda para prevenir la evaporación de las muestras durante las incubaciones.



## B. Proceso de análisis

1. Calcular el volumen de buffer de cobertura de cobertura de carbonatos necesario para diluir el anticuerpo de la prueba utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{ml de buffer de cobertura} = \frac{(\text{No. de Pozos} + 1) \times 100}{1000}$$

2. Calcular el volumen adecuado de anticuerpo de captura concentrado a utilizar para mezclar con el buffer de cobertura de carbonatos con la siguiente fórmula según su concentración:

Para concentraciones 1:200:

$$\text{ul de anticuerpo captura} = \text{ml de buffer de cobertura} \times \frac{1}{200} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

Para concentraciones 1:100:

$$\text{ul de anticuerpo captura} = \text{ml de buffer de cobertura} \times \frac{1}{100} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

3. Mezclar al menos durante 5 minutos.

**Nota:** todos los anticuerpos y conjugados de enzimas deben ser preparados en un recipiente hecho de un material tal como polietileno o vidrio que no facilite la adherencia de los anticuerpos. No utilizar poliestireno. Algunos anticuerpos tienen una relación de dilución distinta; leer la etiqueta del envase del anticuerpo antes de utilizarlo.

- 4 Pipetear 100 ul del anticuerpo de captura diluido en cada pozo.
- 5 Incubar la placa en caja húmeda durante 4 horas  $\pm$  15 minutos a temperatura ambiente o durante toda la noche a temperatura de refrigeración (2 ° C a 6 ° C). No almacenar placas cubiertas con el anticuerpo de captura por más de 24 horas.

- a. Lavar la placa 2 veces en base al instructivo de procedimiento de lavado manual de placas.
- b. Pesar 0.1 gramos de partes de la muestra que presenten síntomas, seleccionándolo según el instructivo de procedimiento para selección de muestra.
- c. Macerar el tejido vegetal en 1 ml de buffer *PepMV* para diluir las muestras en una relación de 1:10 (peso en g: volumen de buffer en ml) en tubos para serología.
- d. Dispensar 100 ul de muestra en base al mapa de carga en cada pozo de la muestra.
- e. Dispensar 100 ul de control positivo en los pozos de control positivo.
- f. Dispensar 100 ul de control negativo en los pozos de control negativo.
- g. Dispensar 100 ul de buffer de extracción en los pozos de blanco.
- h. Incubar la placa durante 2 horas  $\pm$  15 minutos a temperatura ambiente o toda la noche en el refrigerador (0 °C a 6 °C).
- i. Preparar enzima conjugada diluyendo con el buffer de conjugado enzimático ECI antes de su uso, calculando el volumen de RUB6 a utilizar con la siguiente formula:

$$\text{ml de ECI} = \frac{(\text{No. de Pozos} + 1) \times 100}{1000}$$

Calcular el volumen de enzima conjugada a utilizar en base a su concentración:

Para concentraciones 1:200:

$$\text{ul de enzima conjugada} = \text{ml de buffer ECI} \times \frac{1}{200} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

Para concentraciones 1:100:

$$\text{ul de enzima conjugada} = \text{ml de buffer ECI} \times \frac{1}{100} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

- j. Después de añadir la enzima conjugada al buffer mezclar al menos durante 5 minutos.
- k. Lavar la placa 7 veces en base al instructivo de procedimiento de lavado manual de placas.
- l. Dispensar 100 ul de enzima conjugada preparada por pozo.
- m. Colocar la placa en el interior de la caja húmeda e incubar durante 2 horas  $\pm$  15 minutos a temperatura ambiente o toda la noche en el refrigerador (0 °C a 6 °C ).
- n. Preparar la solución de PNP en una concentración de 1 mg / ml, por lo menos 15 minutos antes del final de la etapa de incubación anterior, medir 5 ml de buffer PNP 1X a temperatura ambiente por cada 6 columnas utilizadas de la placa.
- o. Agregar las tabletas de PNP en el buffer de PNP 1X. No tocar las tabletas de PNP o exponer la solución PNP a una luz muy intensa. La luz o la contaminación pueden causar el color de fondo en pozos negativos.
- p. Mezclar al menos durante 10 minutos.
- q. Lavar la placa 8 veces en base al instructivo de procedimiento de lavado manual de placas.
- r. Añadir sustrato PNP dispensando 100 ul de sustrato PNP en cada pozo de prueba.
- s. Incubar la placa durante 60 minutos  $\pm$  5 minutos. La placa debe ser protegida de la luz directa o luz intensa.
- t. Evaluar los resultados examinando los pozos mediante un lector de placas a 405 nm según el instructivo de procedimiento para lectura de placas.
- u. Incubar nuevamente la placa protegida de la luz directa o luz intensa durante 60 minutos  $\pm$  5 minutos.
- v. Evaluar nuevamente los resultados examinando los pozos mediante un lector de placas a 405 nm según el instructivo de procedimiento para lectura de placas.

**Nota:** Si hay burbujas de aire presentes en el momento de la lectura puede alterar los resultados, se deben eliminar las burbujas con una punta para pipeta, antes de la lectura.

### C. Proceso de interpretación de resultados

- a. Interpretar los datos obtenidos de las lecturas y compararlos con los observados macroscópicamente, los pozos en los que el color se desarrolla indican resultados positivos.
- b. Los resultados de las pruebas sólo son válidos si los pozos de control positivo dan un resultado positivo y los pozos del blanco son incoloros.

**Nota:** Los resultados pueden ser interpretados después de más de 60 minutos de incubación siempre que los controles negativos permanezcan claros.

Algunos métodos comunes para establecer un umbral incluyen el doble de la media de los controles negativos (sanos) o la media de los controles negativos (sanos) + 3 desviaciones estándar.

$$\text{Ec. 1 } U = 2(\bar{X})$$

$$\text{Ec. 2 } U = \bar{X} + 3\sigma$$

Donde U: Umbral

X= Control negativo

## B. Protocolo ELISA de *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* (Cmm).

### A. Preparación de materiales

1. Prepara los buffer de cobertura, buffer de extracción (Cmm) y buffer de revelado en base al instructivo procedimiento para elaboración buffer para ELISA.
2. Preparar los controles positivo y negativo de la prueba según el instructivo de procedimiento para dilución de controles para ELISA.
3. Preparar una caja húmeda con un recipiente hermético y con una toalla de papel húmeda para prevenir la evaporación de las muestras durante las incubaciones.

## B. Proceso de análisis

1. Calcular el volumen de buffer de cobertura de carbonatos necesario para diluir el anticuerpo de la prueba utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{ml de buffer de cobertura} = \frac{(\text{No. de Pozos} + 1) \times 100}{1000}$$

2. Calcular el volumen adecuado de anticuerpo de captura concentrado a utilizar para mezclar con el buffer de cobertura de carbonatos con la siguiente fórmula según su concentración:

Para concentraciones 1:200:

$$\text{ul de anticuerpo captura} = \text{ml de buffer de cobertura} \times \frac{1}{200} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

Para concentraciones 1:100:

$$\text{ul de anticuerpo captura} = \text{ml de buffer de cobertura} \times \frac{1}{100} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

3. Mezclar al menos durante 5 minutos.

**Nota:** todos los anticuerpos y conjugados de enzimas deben ser preparados en un recipiente hecho de un material tal como polietileno o vidrio que no facilite la adherencia de los anticuerpos. No utilizar poliestireno. Algunos anticuerpos tienen una relación de dilución distinta; leer la etiqueta del envase del anticuerpo antes de utilizarlo.

4. Pipetear 100 ul del anticuerpo de captura diluido en cada pozo.
5. Incubar la placa en caja húmeda durante 4 horas  $\pm$  15 minutos a temperatura ambiente o durante toda la noche a temperatura de refrigeración (2 ° C a 6 ° C). No almacenar placas cubiertas con el anticuerpo de captura por más de 24 horas.
  - a. Lavar la placa 2 veces en base al instructivo de procedimiento de lavado manual de placas.

- b. Pesar 0.1 gramos de partes de la muestra que presenten síntomas, seleccionándolo según el instructivo de procedimiento para selección de muestra.
- c. Macerar el tejido vegetal en 1 ml de buffer (Cmm) para diluir las muestras en una relación de 1:10 (peso en g: volumen de buffer en ml) en tubos para serología.
- d. Dispensar 100 ul de muestra en base al mapa de carga en cada pozo de la muestra.
- e. Dispensar 100 ul de control positivo en los pozos de control positivo.
- f. Dispensar 100 ul de control negativo en los pozos de control negativo.
- g. Dispensar 100 ul de buffer de extracción en los pozos de blanco.
- h. Incubar la placa durante 2 horas  $\pm$  15 minutos a temperatura ambiente o toda la noche en el refrigerador (0 °C a 6 °C).
- i. Preparar enzima conjugada diluyendo con el buffer de conjugado enzimático ECI antes de su uso, calculando el volumen de RUB6 a utilizar con la siguiente formula:

$$\text{ml de ECI} = \frac{(\text{No. de Pozos} + 1) \times 100}{1000}$$

Calcular el volumen de enzima conjugada a utilizar en base a su concentración:

Para concentraciones 1:200:

$$\text{ul de enzima conjugada} = \text{ml de buffer ECI} \times \frac{1}{200} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

Para concentraciones 1:100:

$$\text{ul de enzima conjugada} = \text{ml de buffer ECI} \times \frac{1}{100} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

- j. Después de añadir la enzima conjugada al buffer mezclar al menos durante 5 minutos.
- k. Lavar la placa 7 veces en base al instructivo de procedimiento de lavado manual de placas.

- l. Dispensar 100  $\mu$ l de enzima conjugada preparada por pozo.
- m. Colocar la placa en el interior de la caja húmeda e incubar durante 2 horas  $\pm$  15 minutos a temperatura ambiente o toda la noche en el refrigerador (0  $^{\circ}$ C a 6  $^{\circ}$ C).
- n. Preparar la solución de PNP en una concentración de 1 mg / ml, por lo menos 15 minutos antes del final de la etapa de incubación anterior, medir 5 ml de buffer PNP 1X a temperatura ambiente por cada 6 columnas utilizadas de la placa.
- o. Agregar las tabletas de PNP en el buffer de PNP 1X. No tocar las tabletas de PNP o exponer la solución PNP a una luz muy intensa. La luz o la contaminación pueden causar el color de fondo en pozos negativos.
- p. Mezclar al menos durante 10 minutos.
- q. Lavar la placa 8 veces en base al instructivo de procedimiento de lavado manual de placas.
- r. Añadir sustrato PNP dispensando 100  $\mu$ l de sustrato PNP en cada pozo de prueba.
- s. Incubar la placa durante 60 minutos  $\pm$  5 minutos. La placa debe ser protegida de la luz directa o luz intensa.
- t. Evaluar los resultados examinando los pozos mediante un lector de placas a 405 nm según el instructivo de procedimiento para lectura de placas.
- u. Incubar nuevamente la placa protegida de la luz directa o luz intensa durante 60 minutos  $\pm$  5 minutos.
- v. Evaluar nuevamente los resultados examinando los pozos mediante un lector de placas a 405 nm, según el instructivo de procedimiento para lectura de placas.

**Nota:** Si hay burbujas de aire presentes en el momento de la lectura puede alterar los resultados, se deben eliminar las burbujas con una punta para pipeta, antes de la lectura.

### C. Proceso de interpretación de resultados

- w. Interpretar los datos obtenidos de las lecturas y compararlos con los observados macroscópicamente, los pozos en los que el color se desarrolla indican resultados positivos.
- x. Los resultados de las pruebas sólo son válidos si los pozos de control positivo dan un resultado positivo y los pozos del blanco son incoloros.

**Nota:** Los resultados pueden ser interpretados después de más de 60 minutos de incubación siempre que los controles negativos permanezcan claros.

Algunos métodos comunes para establecer un umbral incluyen el doble de la media de los controles negativos (sanos) o la media de los controles negativos (sanos) + 3 desviaciones estándar.

$$\text{Ec. 1} \quad U = 2(\bar{X})$$

$$\text{Ec. 2} \quad U = \bar{X} + 3\sigma$$

Donde U: Umbral

X= Control negativo

### C. Protocolo ELISA de virus de la papa X (PVX)

#### A. Preparación de materiales

1. Prepara los buffer de cobertura, buffer de extracción (PVX) y buffer de revelado en base al instructivo procedimiento para elaboración buffer para ELISA.
2. Preparar los controles positivo y negativo de la prueba según el instructivo de Procedimiento para dilución de controles para ELISA.
3. Preparar una caja húmeda con un recipiente hermético y con una toalla de papel húmeda para prevenir la evaporación de las muestras durante las incubaciones.



## B. Proceso de análisis

1. Calcular el volumen de buffer de cobertura de carbonatos necesario para diluir el anticuerpo de la prueba utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{ml de buffer de cobertura} = \frac{(\text{No. de Pozos} + 1) \times 100}{1000}$$

2. Calcular el volumen adecuado de anticuerpo de captura concentrado a utilizar para mezclar con el buffer de cobertura de carbonatos con la siguiente fórmula según su concentración:

Para concentraciones 1:200:

$$\text{ul de anticuerpo captura} = \text{ml de buffer de cobertura} \times \frac{1}{200} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

Para concentraciones 1:100:

$$\text{ul de anticuerpo captura} = \text{ml de buffer de cobertura} \times \frac{1}{100} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

3. Mezclar al menos durante 5 minutos.

**Nota:** todos los anticuerpos y conjugados de enzimas deben ser preparados en un recipiente hecho de un material tal como polietileno o vidrio que no facilite la adherencia de los anticuerpos. No utilizar poliestireno. Algunos anticuerpos tienen una relación de dilución distinta; leer la etiqueta del envase del anticuerpo antes de utilizarlo.

4. Pipetear 100 ul del anticuerpo de captura diluido en cada pozo.
5. Incubar la placa en caja húmeda durante 4 horas  $\pm$  15 minutos a temperatura ambiente o durante toda la noche a temperatura de refrigeración (2 ° C a 6 ° C). No almacenar placas cubiertas con el anticuerpo de captura por más de 24 horas.
  - a. Lavar la placa 2 veces en base al instructivo de procedimiento de lavado manual de placas.

- b. Pesar 0.1 gramos de partes de la muestra que presenten síntomas, seleccionándolo según el instructivo de procedimiento para selección de muestra.
- c. Macerar el tejido vegetal en 1 ml de buffer (PVX) para diluir las muestras en una relación de 1:10 (peso en g: volumen de buffer en ml en tubos para serología).
- d. Dispensar 100 ul de muestra en base al mapa de carga en cada pozo de la muestra.
- e. Dispensar 100 ul de control positivo en los pozos de control positivo.
- f. Dispensar 100 ul de control negativo en los pozos de control negativo.
- g. Dispensar 100 ul de buffer de extracción en los pozos de blanco.
- h. Incubar la placa durante 2 horas  $\pm$  15 minutos a temperatura ambiente o toda la noche en el refrigerador (0 ° C a 6 ° C).
- i. Preparar enzima conjugada diluyendo con el buffer de conjugado enzimático ECI antes de su uso, calculando el volumen de RUB6 a utilizar con la siguiente fórmula:

$$\text{ml de ECI} = \frac{(\text{No. de Pozos} + 1) \times 100}{1000}$$

Calcular el volumen de enzima conjugada a utilizar en base a su concentración:

Para concentraciones 1:200:

$$\text{ul de enzima conjugada} = \text{ml de buffer ECI} \times \frac{1}{200} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

Para concentraciones 1:100:

$$\text{ul de enzima conjugada} = \text{ml de buffer ECI} \times \frac{1}{100} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

- j. Después de añadir la enzima conjugada al buffer mezclar al menos durante 5 minutos.
- k. Lavar la placa 7 veces en base al instructivo de procedimiento de lavado manual de placas.

- l. Dispensar 100  $\mu$ l de enzima conjugada preparada por pozo.
- m. Colocar la placa en el interior de la caja húmeda e incubar durante 2 horas  $\pm$  15 minutos a temperatura ambiente o toda la noche en el refrigerador (0 ° C a 6 ° C).
- n. Preparar la solución de PNP en una concentración de 1 mg / ml, por lo menos 15 minutos antes del final de la etapa de incubación anterior, medir 5 ml de buffer PNP 1X a temperatura ambiente por cada 6 columnas utilizadas de la placa.
- o. Agregar las tabletas de PNP en el buffer de PNP 1X. No tocar las tabletas de PNP o exponer la solución PNP a una luz muy intensa. La luz o la contaminación pueden causar el color de fondo en pozos negativos.
- p. Mezclar al menos durante 10 minutos.
- q. Lavar la placa 8 veces en base al instructivo de procedimiento de lavado manual de placas.
- r. Añadir sustrato PNP dispensando 100  $\mu$ l de sustrato PNP en cada pozo de prueba.
- s. Incubar la placa durante 60 minutos  $\pm$  5 minutos. La placa debe ser protegida de la luz directa o luz intensa.
- t. Evaluar los resultados examinando los pozos mediante un lector de placas a 405 nm según el instructivo de procedimiento para lectura de placas.
- u. Incubar nuevamente la placa protegida de la luz directa o luz intensa durante 60 minutos  $\pm$  5 minutos.
- v. Evaluar nuevamente los resultados examinando los pozos mediante un lector de placas a 405 nm según el instructivo de procedimiento para lectura de placas.

**Nota:** Si hay burbujas de aire presentes en el momento de la lectura puede alterar los resultados, se deben eliminar las burbujas con una punta para pipeta, antes de la lectura.

### C. Proceso de interpretación de resultados

- w. Interpretar los datos obtenidos de las lecturas y compararlos con los observados macroscópicamente, los pozos en los que el color se desarrolla indican resultados positivos.
- x. Los resultados de las pruebas sólo son válidos si los pozos de control positivo dan un resultado positivo y los pozos del blanco son incoloros.

**Nota:** Los resultados pueden ser interpretados después de más de 60 minutos de incubación siempre que los controles negativos permanezcan claros.

Algunos métodos comunes para establecer un umbral incluyen el doble de la media de los controles negativos (sanos) o la media de los controles negativos (sanos) + 3 desviaciones estándar.

$$\text{Ec. 1 } U = 2(\bar{X})$$

$$\text{Ec. 2 } U = \bar{X} + 3\sigma$$

Donde U: Umbral

X= Control negativo

### D. Protocolo ELISA de *Ralstonia solanacearum* (Rs)

#### A. Preparación de materiales

1. Prepara los buffer de cobertura, buffer de extracción (Rs) y buffer de revelado en base al instructivo procedimiento para elaboración buffer para ELISA.
2. Preparar los controles positivo y negativo de la prueba según el instructivo de procedimiento para dilución de controles para ELISA.
3. Preparar una caja húmeda con un recipiente hermético y con una toalla de papel húmeda para prevenir la evaporación de las muestras durante las incubaciones.

## B. Proceso de análisis

1. Calcular el volumen de buffer de cobertura de carbonatos necesario para diluir el anticuerpo de la prueba utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{ml de buffer de cobertura} = \frac{(\text{No. de Pozos} + 1) \times 100}{1000}$$

2. Calcular el volumen adecuado de anticuerpo de captura concentrado a utilizar para mezclar con el buffer de cobertura de carbonatos con la siguiente fórmula según su concentración:

Para concentraciones 1:200:

$$\text{ul de anticuerpo captura} = \text{ml de buffer de cobertura} \times \frac{1}{200} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

Para concentraciones 1:100:

$$\text{ul de anticuerpo captura} = \text{ml de buffer de cobertura} \times \frac{1}{100} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

3. Mezclar al menos durante 5 minutos.

**Nota:** todos los anticuerpos y conjugados de enzimas deben ser preparados en un recipiente hecho de un material tal como polietileno o vidrio que no facilite la adherencia de los anticuerpos. No utilizar poliestireno. Algunos anticuerpos tienen una relación de dilución distinta; leer la etiqueta del envase del anticuerpo antes de utilizarlo.

4. Pipetear 100 ul del anticuerpo de captura diluido en cada pozo.
5. Incubar la placa en caja húmeda durante 4 horas  $\pm$  15 minutos a temperatura ambiente o durante toda la noche a temperatura de refrigeración (2 ° C a 6 ° C). No almacenar placas cubiertas con el anticuerpo de captura por más de 24 horas.
  - a. Lavar la placa 2 veces en base al instructivo de procedimiento de lavado manual de placas.

- b. Pesar 0.1 gramos de partes de la muestra que presenten síntomas, seleccionándolo según el instructivo de procedimiento para selección de muestra.
- c. Macerar el tejido vegetal en 1 ml de buffer (Rs) para diluir las muestras en una relación de 1:10 (peso en g: volumen de buffer en ml en tubos para serología).
- d. Dispensar 100 ul de muestra en base al mapa de carga en cada pozo de la muestra.
- e. Dispensar 100 ul de control positivo en los pozos de control positivo.
- f. Dispensar 100 ul de control negativo en los pozos de control negativo.
- g. Dispensar 100 ul de buffer de extracción en los pozos de blanco.
- h. Incubar la placa durante 2 horas  $\pm$  15 minutos a temperatura ambiente o toda la noche en el refrigerador (0 a 6 ° C).
- i. Preparar enzima conjugada diluyendo con el buffer de conjugado enzimático ECI antes de su uso, calculando el volumen de RUB6 a utilizar con la siguiente fórmula:

$$\text{ml de ECI} = \frac{(\text{No. de Pozos} + 1) \times 100}{1000}$$

Calcular el volumen de enzima conjugada a utilizar en base a su concentración:

Para concentraciones 1:200:

$$\text{ul de enzima conjugada} = \text{ml de buffer ECI} \times \frac{1}{200} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

Para concentraciones 1:100:

$$\text{ul de enzima conjugada} = \text{ml de buffer ECI} \times \frac{1}{100} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

- j. Después de añadir la enzima conjugada al buffer mezclar al menos durante 5 minutos.
- k. Lavar la placa 7 veces en base al instructivo de procedimiento de lavado manual de placas.
- l. Dispensar 100 ul de enzima conjugada preparada por pozo.
- m. Colocar la placa en el interior de la caja húmeda e incubar durante 2 horas  $\pm$  15 minutos a temperatura ambiente o toda la noche en el refrigerador (0 ° C a 6 ° C).
- n. Preparar la solución de PNP en una concentración de 1 mg / ml, por lo menos 15 minutos antes del final de la etapa de incubación anterior, medir 5 ml de buffer PNP 1X a temperatura ambiente por cada 6 columnas utilizadas de la placa.
- o. Agregar las tabletas de PNP en el buffer de PNP 1X. No tocar las tabletas de PNP o exponer la solución PNP a una luz muy intensa. La luz o la contaminación pueden causar el color de fondo en pozos negativos.
- p. Mezclar al menos durante 10 minutos.
- q. Lavar la placa 8 veces en base al instructivo de procedimiento de lavado manual de placas.
- r. Añadir sustrato PNP dispensando 100 ul de sustrato PNP en cada pozo de prueba.
- s. Incubar la placa durante 60 minutos  $\pm$  5 minutos. La placa debe ser protegida de la luz directa o luz intensa.
- t. Evaluar los resultados examinando los pozos mediante un lector de placas a 405 nm según el instructivo de procedimiento para lectura de placas.
- u. Incubar nuevamente la placa protegida de la luz directa o luz intensa durante 60 minutos  $\pm$  5 minutos.
- v. Evaluar nuevamente los resultados examinando los pozos mediante un lector de placas a 405 nm según el instructivo de procedimiento para lectura de placas.

**Nota:** Si hay burbujas de aire presentes en el momento de la lectura puede alterar los resultados, se deben eliminar las burbujas con una punta para pipeta, antes de la lectura.

### C. Proceso de interpretación de resultados

- w. Interpretar los datos obtenidos de las lecturas y compararlos con los observados macroscópicamente, los pozos en los que el color se desarrolla indican resultados positivos.
- x. Los resultados de las pruebas sólo son válidos si los pozos de control positivo dan un resultado positivo y los pozos del blanco son incoloros.

**Nota:** Los resultados pueden ser interpretados después de más de 60 minutos de incubación siempre que los controles negativos permanezcan claros.

Algunos métodos comunes para establecer un umbral incluyen el doble de la media de los controles negativos (sanos) o la media de los controles negativos (sanos) + 3 desviaciones estándar.

$$\text{Ec. 1 } U = 2(\bar{X})$$

$$\text{Ec. 2 } U = \bar{X} + 3\sigma$$

Donde U: Umbral

X= Control negativo

### E. Protocolo ELISA *virus del mosaico del tabaco (TMV)*

#### A. Preparación de materiales

1. Prepara los buffer de cobertura, buffer de extracción (TMV) y buffer de revelado en base al instructivo procedimiento para elaboración buffer para ELISA.
2. Preparar los controles positivo y negativo de la prueba según el instructivo de procedimiento para dilución de controles para ELISA.
3. Preparar una caja húmeda con un recipiente hermético y con una toalla de papel húmeda para prevenir la evaporación de las muestras durante las incubaciones.

#### B. Proceso de análisis



1. Calcular el volumen de buffer de cobertura de cobertura de carbonatos necesario para diluir el anticuerpo de la prueba utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{ml de buffer de cobertura} = \frac{(\text{No. de Pozos} + 1) \times 100}{1000}$$

2. Calcular el volumen adecuado de anticuerpo de captura concentrado a utilizar para mezclar con el buffer de cobertura de carbonatos con la siguiente fórmula según su concentración:

Para concentraciones 1:200:

$$\text{ul de anticuerpo captura} = \text{ml de buffer de cobertura} \times \frac{1}{200} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

Para concentraciones 1:100:

$$\text{ul de anticuerpo captura} = \text{ml de buffer de cobertura} \times \frac{1}{100} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

3. Mezclar al menos durante 5 minutos.

**Nota:** todos los anticuerpos y conjugados de enzimas deben ser preparados en un recipiente hecho de un material tal como polietileno o vidrio que no facilite la adherencia de los anticuerpos. No utilizar poliestireno. Algunos anticuerpos tienen una relación de dilución distinta; leer la etiqueta del envase del anticuerpo antes de utilizarlo.

4. Pipetear 100 ul del anticuerpo de captura diluido en cada pozo.
5. Incubar la placa en caja húmeda durante 4 horas  $\pm$  15 minutos a temperatura ambiente o durante toda la noche a temperatura de refrigeración (2 ° C a 6 ° C). No almacenar placas cubiertas con el anticuerpo de captura por más de 24 horas.
  - a. Lavar la placa 2 veces en base al instructivo de procedimiento de lavado manual de placas.

- b. Pesar 0.1 gramos de partes de la muestra que presenten síntomas, seleccionándolo según el instructivo de procedimiento para selección de muestra.
- c. Macerar el tejido vegetal en 1 ml de buffer (TMV) para diluir las muestras en una relación de 1:10 (peso en g: volumen de buffer en ml en tubos para serología).
- d. Dispensar 100 ul de muestra en base al mapa de carga en cada pozo de la muestra.
- e. Dispensar 100 ul de control positivo en los pozos de control positivo.
- f. Dispensar 100 ul de control negativo en los pozos de control negativo.
- g. Dispensar 100 ul de buffer de extracción en los pozos de blanco.
- h. Incubar la placa durante 2 horas  $\pm$  15 minutos a temperatura ambiente o toda la noche en el refrigerador (0 ° C a 6 ° C).
- i. Preparar enzima conjugada diluyendo con el buffer de conjugado enzimático ECI antes de su uso, calculando el volumen de RUB6 a utilizar con la siguiente fórmula:

$$\text{ml de ECI} = \frac{(\text{No. de Pozos} + 1) \times 100}{1000}$$

Calcular el volumen de enzima conjugada a utilizar en base a su concentración:

Para concentraciones 1:200:

$$\text{ul de enzima conjugada} = \text{ml de buffer ECI} \times \frac{1}{200} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

Para concentraciones 1:100:

$$\text{ul de enzima conjugada} = \text{ml de buffer ECI} \times \frac{1}{100} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

- j. Después de añadir la enzima conjugada al buffer mezclar al menos durante 5 minutos.

- k. Lavar la placa 7 veces en base al instructivo de procedimiento de lavado manual de placas.
- l. Dispensar 100  $\mu$ l de enzima conjugada preparada por pozo.
- m. Colocar la placa en el interior de la caja húmeda e incubar durante 2 horas  $\pm$  15 minutos a temperatura ambiente o toda la noche en el refrigerador (0 ° C a 6 ° C).
- n. Preparar la solución de PNP en una concentración de 1 mg / ml, por lo menos 15 minutos antes del final de la etapa de incubación anterior, medir 5 ml de buffer PNP 1X a temperatura ambiente por cada 6 columnas utilizadas de la placa.
- o. Agregar las tabletas de PNP en el buffer de PNP 1X. No tocar las tabletas de PNP o exponer la solución PNP a una luz muy intensa. La luz o la contaminación pueden causar el color de fondo en pozos negativos.
- p. Mezclar al menos durante 10 minutos.
- q. Lavar la placa 8 veces en base al instructivo de procedimiento de lavado manual de placas.
- r. Añadir sustrato PNP dispensando 100  $\mu$ l de sustrato PNP en cada pozo de prueba.
- s. Incubar la placa durante 60 minutos  $\pm$  5 minutos. La placa debe ser protegida de la luz directa o luz intensa.
- t. Evaluar los resultados examinando los pozos mediante un lector de placas a 405 nm según el instructivo de procedimiento para lectura de placas.
- u. Incubar nuevamente la placa protegida de la luz directa o luz intensa durante 60 minutos  $\pm$  5 minutos.
- v. Evaluar nuevamente los resultados examinando los pozos mediante un lector de placas a 405 nm según el instructivo de procedimiento para lectura de placas.

**Nota:** Si hay burbujas de aire presentes en el momento de la lectura puede alterar los resultados, se deben eliminar las burbujas con una punta para pipeta, antes de la lectura.

### C. Proceso de interpretación de resultados

- w. Interpretar los datos obtenidos de las lecturas y compararlos con los observados macroscópicamente, los pozos en los que el color se desarrolla indican resultados positivos.
- x. Los resultados de las pruebas sólo son válidos si los pozos de control positivo dan un resultado positivo y los pozos del blanco son incoloros.

**Nota:** Los resultados pueden ser interpretados después de más de 60 minutos de incubación siempre que los controles negativos permanezcan claros.

Algunos métodos comunes para establecer un umbral incluyen el doble de la media de los controles negativos (sanos) o la media de los controles negativos (sanos) + 3 desviaciones estándar.

$$\text{Ec. 1 } U = 2(\bar{X})$$

$$\text{Ec. 2 } U = \bar{X} + 3\sigma$$

Donde U: Umbral

X= Control negativo

### F. Protocolo ELISA *virus del bronceado del tomate (TSWV)*

#### A. Preparación de materiales

1. Prepara los buffer de cobertura, buffer de extracción (TSWV) y buffer de revelado en base al instructivo procedimiento para elaboración buffer para ELISA.
2. Preparar los controles positivo y negativo de la prueba según el instructivo de procedimiento para dilución de controles para ELISA.
3. Preparar una caja húmeda con un recipiente hermético y con una toalla de papel húmeda para prevenir la evaporación de las muestras durante las incubaciones.

## B. Proceso de análisis

1. Calcular el volumen de buffer de cobertura de carbonatos necesario para diluir el anticuerpo de la prueba utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{ml de buffer de cobertura} = \frac{(\text{No. de Pozos} + 1) \times 100}{1000}$$

2. Calcular el volumen adecuado de anticuerpo de captura concentrado a utilizar para mezclar con el buffer de cobertura de carbonatos con la siguiente fórmula según su concentración:

Para concentraciones 1:200:

$$\text{ul de anticuerpo captura} = \text{ml de buffer de cobertura} \times \frac{1}{200} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

Para concentraciones 1:100:

$$\text{ul de anticuerpo captura} = \text{ml de buffer de cobertura} \times \frac{1}{100} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

3. Mezclar al menos durante 5 minutos.

**Nota:** todos los anticuerpos y conjugados de enzimas deben ser preparados en un recipiente hecho de un material tal como polietileno o vidrio que no facilite la adherencia de los anticuerpos. No utilizar poliestireno. Algunos anticuerpos tienen una relación de dilución distinta; leer la etiqueta del envase del anticuerpo antes de utilizarlo.

4. Pipetear 100 ul del anticuerpo de captura diluido en cada pozo.
5. Incubar la placa en caja húmeda durante 4 horas  $\pm$  15 minutos a temperatura ambiente o durante toda la noche a temperatura de refrigeración (2 ° C a 6 ° C). No almacenar placas cubiertas con el anticuerpo de captura por más de 24 horas.
  - a. Lavar la placa 2 veces en base al instructivo de procedimiento de lavado manual de placas.

- b. Pesar 0.1 gramos de partes de la muestra que presenten síntomas, seleccionándolo según el instructivo de procedimiento para selección de muestra.
- c. Macerar el tejido vegetal en 1 ml de buffer (TSWV) para diluir las muestras en una relación de 1:10 (peso en g: volumen de buffer en ml en tubos para serología).
- d. Dispensar 100 ul de muestra en base al mapa de carga en cada pozo de la muestra.
- e. Dispensar 100 ul de control positivo en los pozos de control positivo.
- f. Dispensar 100 ul de control negativo en los pozos de control negativo.
- g. Dispensar 100 ul de buffer de extracción en los pozos de blanco.
- h. Incubar la placa durante 2 horas  $\pm$  15 minutos a temperatura ambiente o toda la noche en el refrigerador (0 ° C a 6 ° C).
- i. Preparar enzima conjugada diluyendo con el buffer de conjugado enzimático ECI antes de su uso, calculando el volumen de RUB6 a utilizar con la siguiente formula:

$$\text{ml de ECI} = \frac{(\text{No. de Pozos} + 1) \times 100}{1000}$$

Calcular el volumen de enzima conjugada a utilizar en base a su concentración:

Para concentraciones 1:200:

$$\text{ul de enzima conjugada} = \text{ml de buffer ECI} \times \frac{1}{200} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

Para concentraciones 1:100:

$$\text{ul de enzima conjugada} = \text{ml de buffer ECI} \times \frac{1}{100} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

- j. Después de añadir la enzima conjugada al buffer mezclar al menos durante 5 minutos.
- k. Lavar la placa 7 veces en base al instructivo de procedimiento de lavado manual de placas.
- l. Dispensar 100 ul de enzima conjugada preparada por pozo.
- m. Colocar la placa en el interior de la caja húmeda e incubar durante 2 horas  $\pm$  15 minutos a temperatura ambiente o toda la noche en el refrigerador (0 ° C a 6 ° C).
- n. Preparar la solución de PNP en una concentración de 1 mg / ml, por lo menos 15 minutos antes del final de la etapa de incubación anterior, medir 5 ml de buffer PNP 1X a temperatura ambiente por cada 6 columnas utilizadas de la placa.
- o. Agregar las tabletas de PNP en el buffer de PNP 1X. No tocar las tabletas de PNP o exponer la solución PNP a una luz muy intensa. La luz o la contaminación pueden causar el color de fondo en pozos negativos.
- p. Mezclar al menos durante 10 minutos.
- q. Lavar la placa 8 veces en base al instructivo de procedimiento de lavado manual de placas.
- r. Añadir sustrato PNP dispensando 100 ul de sustrato PNP en cada pozo de prueba.
- s. Incubar la placa durante 60 minutos  $\pm$  5 minutos. La placa debe ser protegida de la luz directa o luz intensa.
- t. Evaluar los resultados examinando los pozos mediante un lector de placas a 405 nm según el instructivo de Procedimiento para Lectura de Placas.
- u. Incubar nuevamente la placa protegida de la luz directa o luz intensa durante 60 minutos  $\pm$  5 minutos.
- v. Evaluar nuevamente los resultados examinando los pozos mediante un lector de placas a 405 nm según el instructivo de procedimiento para lectura de placas.

**Nota:** Si hay burbujas de aire presentes en el momento de la lectura puede alterar los resultados, se deben eliminar las burbujas con una punta para pipeta, antes de la lectura.

### C. Proceso de interpretación de resultados

- w. Interpretar los datos obtenidos de las lecturas y compararlos con los observados macroscópicamente, los pozos en los que el color se desarrolla indican resultados positivos.
- x. Los resultados de las pruebas sólo son válidos si los pozos de control positivo dan un resultado positivo y los pozos del blanco son incoloros.

**Nota:** Los resultados pueden ser interpretados después de más de 60 minutos de incubación siempre que los controles negativos permanezcan claros.

Algunos métodos comunes para establecer un umbral incluyen el doble de la media de los controles negativos (sanos) o la media de los controles negativos (sanos) + 3 desviaciones estándar.

$$\text{Ec. 1 } U = 2(\bar{X})$$

$$\text{Ec. 2 } U = \bar{X} + 3\sigma$$

Donde U: Umbral

X= Control negativo

### G. Protocolo ELISA *virus de la mancha necrótica de Impatiens* (INSV)

#### A. Preparación de materiales

1. Prepara los buffer de cobertura, buffer de extracción (INSV) y buffer de revelado en base al instructivo procedimiento para elaboración buffer para ELISA.
2. Preparar los controles positivo y negativo de la prueba según el instructivo de Procedimiento para Dilución de Controles para ELISA.
3. Preparar una caja húmeda con un recipiente hermético y con una toalla de papel húmeda para prevenir la evaporación de las muestras durante las incubaciones.



## B. Proceso de análisis

1. Calcular el volumen de buffer de cobertura de carbonatos necesario para diluir el anticuerpo de la prueba utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{ml de buffer de cobertura} = \frac{(\text{No. de Pozos} + 1) \times 100}{1000}$$

2. Calcular el volumen adecuado de anticuerpo de captura concentrado a utilizar para mezclar con el buffer de cobertura de carbonatos con la siguiente fórmula según su concentración:

Para concentraciones 1:200:

$$\text{ul de anticuerpo captura} = \text{ml de buffer de cobertura} \times \frac{1}{200} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

Para concentraciones 1:100:

$$\text{ul de anticuerpo captura} = \text{ml de buffer de cobertura} \times \frac{1}{100} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

3. Mezclar al menos durante 5 minutos.

**Nota:** todos los anticuerpos y conjugados de enzimas deben ser preparados en un recipiente hecho de un material tal como polietileno o vidrio que no facilite la adherencia de los anticuerpos. No utilizar poliestireno. Algunos anticuerpos tienen una relación de dilución distinta; leer la etiqueta del envase del anticuerpo antes de utilizarlo.

4. Pipetear 100 ul del anticuerpo de captura diluido en cada pozo.
5. Incubar la placa en caja húmeda durante 4 horas  $\pm$  15 minutos a temperatura ambiente o durante toda la noche a temperatura de refrigeración (2 ° C a 6 ° C). No almacenar placas cubiertas con el anticuerpo de captura por más de 24 horas.
  - a. Lavar la placa 2 veces en base al instructivo de procedimiento de lavado manual de placas.

- b. Pesar 0.1 gramos de partes de la muestra que presenten síntomas, seleccionándolo según el instructivo de procedimiento para selección de muestra.
- c. Macerar el tejido vegetal en 1 ml de buffer (INSV) para diluir las muestras en una relación de 1:10 (peso en g: volumen de buffer en ml en tubos para serología).
- d. Dispensar 100 ul de muestra en base al mapa de carga en cada pozo de la muestra.
- e. Dispensar 100 ul de control positivo en los pozos de control positivo.
- f. Dispensar 100 ul de control negativo en los pozos de control negativo.
- g. Dispensar 100 ul de buffer de extracción en los pozos de blanco.
- h. Incubar la placa durante 2 horas  $\pm$  15 minutos a temperatura ambiente o toda la noche en el refrigerador (0 ° C a 6 ° C).
- i. Preparar enzima conjugada diluyendo con el buffer de conjugado enzimático ECI antes de su uso, calculando el volumen de RUB6 a utilizar con la siguiente fórmula:

$$\text{ml de ECI} = \frac{(\text{No. de Pozos} + 1) \times 100}{1000}$$

Calcular el volumen de enzima conjugada a utilizar en base a su concentración:

Para concentraciones 1:200:

$$\text{ul de enzima conjugada} = \text{ml de buffer ECI} \times \frac{1}{200} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

Para concentraciones 1:100:

$$\text{ul de enzima conjugada} = \text{ml de buffer ECI} \times \frac{1}{100} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

- j. Después de añadir la enzima conjugada al buffer mezclar al menos durante 5 minutos.

- k. Lavar la placa 7 veces en base al instructivo de procedimiento de lavado manual de placas.
- l. Dispensar 100  $\mu$ l de enzima conjugada preparada por pozo.
- m. Colocar la placa en el interior de la caja húmeda e incubar durante 2 horas  $\pm$  15 minutos a temperatura ambiente o toda la noche en el refrigerador (0 ° C a 6 ° C).
- n. Preparar la solución de PNP en una concentración de 1 mg / ml, por lo menos 15 minutos antes del final de la etapa de incubación anterior, medir 5 ml de buffer PNP 1X a temperatura ambiente por cada 6 columnas utilizadas de la placa.
- o. Agregar las tabletas de PNP en el buffer de PNP 1X. No tocar las tabletas de PNP o exponer la solución PNP a una luz muy intensa. La luz o la contaminación pueden causar el color de fondo en pozos negativos.
- p. Mezclar al menos durante 10 minutos.
- q. Lavar la placa 8 veces en base al instructivo de procedimiento de lavado manual de placas.
- r. Añadir sustrato PNP dispensando 100  $\mu$ l de sustrato PNP en cada pozo de prueba.
- s. Incubar la placa durante 60 minutos  $\pm$  5 minutos. La placa debe ser protegida de la luz directa o luz intensa.
- t. Evaluar los resultados examinando los pozos mediante un lector de placas a 405 nm según el instructivo de procedimiento para lectura de placas.
- u. Incubar nuevamente la placa protegida de la luz directa o luz intensa durante 60 minutos  $\pm$  5 minutos.
- v. Evaluar nuevamente los resultados examinando los pozos mediante un lector de placas a 405 nm según el instructivo de procedimiento para lectura de placas.

**Nota:** Si hay burbujas de aire presentes en el momento de la lectura puede alterar los resultados, se deben eliminar las burbujas con una punta para pipeta, antes de la lectura.

### C. Proceso de interpretación de resultados

- w. Interpretar los datos obtenidos de las lecturas y compararlos con los observados macroscópicamente, los pozos en los que el color se desarrolla indican resultados positivos.
- x. Los resultados de las pruebas sólo son válidos si los pozos de control positivo dan un resultado positivo y los pozos del blanco son incoloros.

**Nota:** Los resultados pueden ser interpretados después de más de 60 minutos de incubación siempre que los controles negativos permanezcan claros.

Algunos métodos comunes para establecer un umbral incluyen el doble de la media de los controles negativos (sanos) o la media de los controles negativos (sanos) + 3 desviaciones estándar.

Ec. 1  $U = 2(\bar{X})$

Ec. 2  $U = \bar{X} + 3\sigma$

Donde U: Umbral

X= Control negativo

### H. Protocolo ELISA *virus de la patata Y (PVY)*

#### A. Preparación de materiales

1. Prepara los buffer de cobertura, buffer de extracción (PVY) y buffer de revelado en base al instructivo procedimiento para elaboración buffer para ELISA.
2. Preparar los controles positivo y negativo de la prueba según el instructivo de procedimiento para dilución de controles para ELISA.
3. Preparar una caja húmeda con un recipiente hermético y con una toalla de papel húmeda para prevenir la evaporación de las muestras durante las incubaciones.

## B. Proceso de análisis

1. Calcular el volumen de buffer de cobertura de carbonatos necesario para diluir el anticuerpo de la prueba utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{ml de buffer de cobertura} = \frac{(\text{No. de Pozos} + 1) \times 100}{1000}$$

2. Calcular el volumen adecuado de anticuerpo de captura concentrado a utilizar para mezclar con el buffer de cobertura de carbonatos con la siguiente fórmula según su concentración:

Para concentraciones 1:200:

$$\text{ul de anticuerpo captura} = \text{ml de buffer de cobertura} \times \frac{1}{200} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

Para concentraciones 1:100:

$$\text{ul de anticuerpo captura} = \text{ml de buffer de cobertura} \times \frac{1}{100} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

3. Mezclar al menos durante 5 minutos.

**Nota:** todos los anticuerpos y conjugados de enzimas deben ser preparados en un recipiente hecho de un material tal como polietileno o vidrio que no facilite la adherencia de los anticuerpos. No utilizar poliestireno. Algunos anticuerpos tienen una relación de dilución distinta; leer la etiqueta del envase del anticuerpo antes de utilizarlo.

4. Pipetear 100 ul del anticuerpo de captura diluido en cada pozo.
5. Incubar la placa en caja húmeda durante 4 horas  $\pm$  15 minutos a temperatura ambiente o durante toda la noche a temperatura de refrigeración (2 ° C a 6 ° C). No almacenar placas cubiertas con el anticuerpo de captura por más de 24 horas.
  - a. Lavar la placa 2 veces en base al instructivo de procedimiento de lavado manual de placas.

- b. Pesar 0.1 gramos de partes de la muestra que presenten síntomas, seleccionándolo según el instructivo de procedimiento para selección de muestra.
- c. Macerar el tejido vegetal en 1 ml de buffer (PVY) para diluir las muestras en una relación de 1:10 (peso en g: volumen de buffer en ml en tubos para serología).
- d. Dispensar 100 ul de muestra en base al mapa de carga en cada pozo de la muestra.
- e. Dispensar 100 ul de control positivo en los pozos de control positivo.
- f. Dispensar 100 ul de control negativo en los pozos de control negativo.
- g. Dispensar 100 ul de buffer de extracción en los pozos de blanco.
- h. Incubar la placa durante 2 horas  $\pm$  15 minutos a temperatura ambiente o toda la noche en el refrigerador (0 ° C a 6 ° C).
- i. Preparar enzima conjugada diluyendo con el buffer de conjugado enzimático ECI antes de su uso, calculando el volumen de RUB6 a utilizar con la siguiente fórmula:

$$\text{ml de ECI} = \frac{(\text{No. de Pozos} + 1) \times 100}{1000}$$

Calcular el volumen de enzima conjugada a utilizar en base a su concentración:

Para concentraciones 1:200:

$$\text{ul de enzima conjugada} = \text{ml de buffer ECI} \times \frac{1}{200} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

Para concentraciones 1:100:

$$\text{ul de enzima conjugada} = \text{ml de buffer ECI} \times \frac{1}{100} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

- j. Después de añadir la enzima conjugada al buffer mezclar al menos durante 5 minutos.
- k. Lavar la placa 7 veces en base al instructivo de procedimiento de lavado manual de placas.
- l. Dispensar 100 ul de enzima conjugada preparada por pozo.
- m.
- n. Colocar la placa en el interior de la caja húmeda e incubar durante 2 horas  $\pm$  15 minutos a temperatura ambiente o toda la noche en el refrigerador (0 ° C a 6 ° C).
- o. Preparar la solución de PNP en una concentración de 1 mg / ml, por lo menos 15 minutos antes del final de la etapa de incubación anterior, medir 5 ml de buffer PNP 1X a temperatura ambiente por cada 6 columnas utilizadas de la placa.
- p. Agregar las tabletas de PNP en el buffer de PNP 1X. No tocar las tabletas de PNP o exponer la solución PNP a una luz muy intensa. La luz o la contaminación pueden causar el color de fondo en pozos negativos.
- q. Mezclar al menos durante 10 minutos.
- r. Lavar la placa 8 veces en base al instructivo de procedimiento de lavado manual de placas.
- s. Añadir sustrato PNP dispensando 100 ul de sustrato PNP en cada pozo de prueba.
- t. Incubar la placa durante 60 minutos  $\pm$  5 minutos. La placa debe ser protegida de la luz directa o luz intensa.
- u. Evaluar los resultados examinando los pozos mediante un lector de placas a 405 nm según el instructivo de Procedimiento para Lectura de Placas.
- v. Incubar nuevamente la placa protegida de la luz directa o luz intensa durante 60 minutos  $\pm$  5 minutos.
- w. Evaluar nuevamente los resultados examinando los pozos mediante un lector de placas a 405 nm según el instructivo de procedimiento para lectura de placas.

**Nota:** Si hay burbujas de aire presentes en el momento de la lectura puede alterar los resultados, se deben eliminar las burbujas con una punta para pipeta, antes de la lectura.

### C. Proceso de interpretación de resultados

- x. Interpretar los datos obtenidos de las lecturas y compararlos con los observados macroscópicamente, los pozos en los que el color se desarrolla indican resultados positivos.
- y. Los resultados de las pruebas sólo son válidos si los pozos de control positivo dan un resultado positivo y los pozos del blanco son incoloros.

**Nota:** Los resultados pueden ser interpretados después de más de 60 minutos de incubación siempre que los controles negativos permanezcan claros.

Algunos métodos comunes para establecer un umbral incluyen el doble de la media de los controles negativos (sanos) o la media de los controles negativos (sanos) + 3 desviaciones estándar.

$$\text{Ec. 1} \quad U = 2(\bar{X})$$

$$\text{Ec. 2} \quad U = \bar{X} + 3\sigma$$

Donde U: Umbral

X= Control negativo

## I. Protocolo ELISA *Virus del mosaico de la alfalfa (AMV)*

### DESCRIPCION DEL PROCEDIMIENTO

#### A. Preparación de materiales

1. Realizar el mapa de carga de los pozos en duplicado por muestra en la hoja excel disponible en el acceso público de LPV.



2. Preparar los buffer de cobertura, buffer de extracción AMV y buffer de revelado en base al instructivo Procedimiento para elaboración buffer para ELISA.
3. Preparar los controles positivo y negativo de la prueba según el instructivo de Procedimiento para dilución de controles para ELISA.
4. Preparar una caja húmeda con un recipiente hermético y con una toalla de papel húmeda para prevenir la evaporación de las muestras durante las incubaciones.

## B. Proceso de análisis

1. Calcular el volumen de buffer de cobertura de cobertura de carbonatos necesario para diluir el anticuerpo de la prueba utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{ml de buffer} = \frac{(\text{No. de Pozos} + 1) \times 100}{1000}$$

2. Calcular el volumen adecuado de anticuerpo de captura concentrado a utilizar para mezclar con el buffer de cobertura de carbonatos con la siguiente fórmula según su concentración:

Para concentraciones 1:200:

$$\text{ul de anticuerpo} = \text{ml de buffer} \times \frac{1}{200} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

Para concentraciones 1:100:

$$\text{ul de anticuerpo} = \text{ml de buffer} \times \frac{1}{100} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

3. Mezclar al menos durante 5 minutos.

**Nota:** todos los anticuerpos y conjugados de enzimas deben ser preparados en un recipiente hecho de un material tal como polietileno o vidrio que no facilite la adherencia de los anticuerpos. No utilizar poliestireno. Algunos anticuerpos tienen una relación de dilución distinta; leer la etiqueta del envase del anticuerpo antes de utilizarlo.

- a. Pipetear 100 ul del anticuerpo de captura diluido en cada pozo.
- b. Incubar la placa en caja húmeda durante 4 horas  $\pm$  15 minutos a temperatura ambiente o durante toda la noche a temperatura de refrigeración (2 ° C a 6 ° C). No almacenar placas cubiertas con el anticuerpo de captura por más de 24 horas.
- c. Lavar la placa 2 veces en base al instructivo de procedimiento de lavado manual de placas.
- d. Pesar 0.1 gramos de partes de la muestra que presenten síntomas, seleccionándolo según el instructivo de procedimiento para selección de muestra.
- e. Macerar el tejido vegetal en 1 ml de buffer GEB3 para diluir las muestras en una relación de 1:10 (peso en g: volumen de buffer en ml) en tubos para serología.
- f. Dispensar 100 ul de muestra en base al mapa de carga en cada pozo de la muestra.
- g. Dispensar 100 ul de control positivo en los pozos de control positivo.
- h. Dispensar 100 ul de control negativo en los pozos de control negativo.
- i. Dispensar 100 ul de buffer de extracción en los pozos de blanco.
- j. Incubar la placa durante 2 horas  $\pm$  15 minutos a temperatura ambiente o toda la noche en el refrigerador (0 ° C a 6 ° C).
- k. Preparar enzima conjugada diluyendo con el buffer de conjugado enzimático RUB6 antes de su uso, calculando el volumen de RUB6 a utilizar con la siguiente formula:

$$\text{ml de RUB6} = \frac{(\text{No. de Pozos} + 1) \times 100}{1000}$$

Calcular el volumen de enzima conjugada a utilizar en base a su concentración:

Para concentraciones 1:200:

$$\text{ul de anticuerpo} = \text{ml de buffer} \times \frac{1}{200} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

Para concentraciones 1:100:

$$\text{ul de anticuerpo} = \text{ml de buffer} \times \frac{1}{100} \times \frac{1000 \text{ ul}}{1 \text{ ml}}$$

- l. Después de añadir la enzima conjugada al buffer mezclar al menos durante 5 minutos.
- m. Lavar la placa 7 veces en base al instructivo de procedimiento de lavado manual de placas.
- n. Dispensar 100 ul de enzima conjugada preparada por pozo.
- o. Colocar la placa en el interior de la caja húmeda e incubar durante 2 horas  $\pm$  15 minutos a temperatura ambiente o toda la noche en el refrigerador (0 ° C a 6 ° C).
- p. Preparar la solución de PNP en una concentración de 1 mg / ml, por lo menos 15 minutos antes del final de la etapa de incubación anterior, medir 5 ml de buffer PNP 1X a temperatura ambiente por cada 6 columnas utilizadas de la placa.
- q. Agregar las tabletas de PNP en el buffer de PNP 1X. No tocar las tabletas de PNP o exponer la solución PNP a una luz muy intensa. La luz o la contaminación pueden causar el color de fondo en pozos negativos.
- r. Mezclar al menos durante 10 minutos.
- s. Lavar la placa 8 veces en base al instructivo de procedimiento de lavado manual de placas.
- t. Añadir sustrato PNP dispensando 100 ul de sustrato PNP en cada pozo de prueba.
- u. Incubar la placa durante 60 minutos  $\pm$  5 minutos. La placa debe ser protegida de la luz directa o luz intensa.
- v. Evaluar los resultados examinando los pozos mediante un lector de placas a 405 nm según el instructivo de procedimiento para lectura de placas.
- w. Incubar nuevamente la placa protegida de la luz directa o luz intensa durante 60 minutos  $\pm$  5 minutos.

- x. Evaluar nuevamente los resultados examinando los pozos mediante un lector de placas a 405 nm según el instructivo de procedimiento para lectura de placas.

**Nota:** Si hay burbujas de aire presentes en el momento de la lectura puede alterar los resultados, se deben eliminar las burbujas con una punta para pipeta, antes de la lectura.

### C. Proceso de interpretación de resultados

1. Interpretar los datos obtenidos de las lecturas y compararlos con los observados macroscópicamente, los pozos en los que el color se desarrolla indican resultados positivos.
2. Los resultados de las pruebas sólo son válidos si los pozos de control positivo dan un resultado positivo y los pozos del blanco son incoloros.

**Nota:** Los resultados pueden ser interpretados después de más de 60 minutos de incubación siempre que los controles negativos permanezcan claros.

Algunos métodos comunes para establecer un umbral incluyen el doble de la media de los controles negativos (sanos) o la media de los controles negativos (sanos) + 3 desviaciones estándar.

$$\text{Ec. 1} \quad U = 2(\bar{X})$$

$$\text{Ec. 2} \quad U = \bar{X} + 3\sigma$$

Donde U: Umbral

X= Control negativo

#### 3.3.3.D. Preparación del control

Los controles están listos para usar o liofilizados y tienen que ser rehidratados bajo Las condiciones mencionadas en la etiqueta de control. En este último caso, mezcle el control rehidratado en el vial agitando suavemente.

Guarde el control a + 4 ° C en la recepción. Si es necesario (dependiendo de la condición): una vez rehidratado, los controles deben almacenarse a + 4 ° C y se utiliza en un plazo de 24 horas. Para almacenamiento a largo plazo, la muestra rehidratada se puede dividir en alícuotas (por ejemplo, 200 µL si va a utilizar el control en dos pocillos) y se almacena a -20 ° C, sin embargo la eficiencia no es garantizada, la actividad antigénica puede disminuir gradualmente a través del tiempo.

### **3.3.3.E. Recomendaciones del control**

Recomendamos encarecidamente el uso sistemático de métodos positivos y negativos de los controles durante el ensayo para asegurarse de que la prueba ELISA en su Procedimiento se ha realizado correctamente. El volumen de control preparado debe ser el mismo volumen que La muestra (es decir, 100 µl / pocillo). Sólo se recomiendan controles positivos para las pruebas ELISA

### **3.3.3.F. Protocolo de lavado de Cristalería ELISA**

#### **MATERIALES.**

- Placas de poli-estireno de 96 pocillos separables en tiras. Cuando las tiras no estén en uso guardarlas en la bolsa y mantenerlas en refrigeración.
- Puntas de micro-pipetas desinfectarlas en cámara clave antes de usarlas, cuando ya estén usadas juntarlas en una bolsa para desecharlas al eco-termo.

### 3.3.3.G. Listado de todos los reactivos a utilizar con cada patógeno específico.

Cuadro 19. Listado de reactivos con su patógeno específico.

No.	Patógenos	Reactivos Buffer y de Control Positivo y Negativo
1	Virus del Mosaico del Pepino	(CMV), (CMV-LPC), (CMV-LNC).
2	Alfalfa mosaic virus	(AMV), (AMV-LPC), (AMV-LNC).
3	Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis	(Cmm), (Cmm-LPC), (Cmm-LNC).
4	Virus de papa X	(PVX), (PVX-LPC), (PVX-LNC).
5	Ralstonia solanacearum	(Rs- SRA), (Rs-LPC), (Rs-LNC).
6	Virus del mosaico del tabaco	(TMV), (TM-LPC), (TM-LNC).
-7	Virus de la marchitez del manchado	(TSWV). (TSWV-LPC), (TSWV-LNC).
8	Virus del mosaico del tomate	(Tom SRA), (Tom-LPC), (Tom-LNC).
9	Virus de la mancha necrótica de Impatiens	(INSV). (INSV-LPC), (INSV-LNC).
10	Virus de la patata Y	(PVY - n), (PVYN-LPC), (PVYN-LNC).

Fuente: AGDIA, 2016.

### 3.3.3.H. Proyecciones por año el inicio de actividades que se realizarán en la prueba ELISA.

El Cuadro 20 muestra la proyección de gastos al inicio de año para realizar la prueba ELISA con reactivos de AGDIA para 10 patógenos.

Cuadro 20. Proyección de pruebas para un año de cotización AGDIA.

Precio de Buffer 500 Pruebas	Precio por prueba \$9.37 = Q. 70.46 para 25 pruebas/mes	Para un año	Descuento del analista Q. 7,500/mes
Q. 2,068.00	Q. 1761.5	Q. 21,138.00	Q. 21,138.00-Q. 7,500.00= Q. 13,638.00
Q. 2,068.00	Q. 1761.5	Q. 21,138.00	Q. 21,138.00-Q. 7,500.00= Q. 13,638.00
Q. 2,068.00	Q. 1761.5	Q. 21,138.00	Q. 21,138.00-Q. 7,500.00= Q. 13,638.00
Q. 1,541.00	Q. 1761.5	Q. 21,138.00	Q. 21,138.00-Q. 7,500.00= Q. 13,638.00
Q. 3,384.00	Q. 1761.5	Q. 21,138.00	Q. 21,138.00-Q. 7,500.00= Q. 13,638.00
Q. 2,068.00	Q. 1761.5	Q. 21,138.00	Q. 21,138.00-Q. 7,500.00= Q. 13,638.00
Q. 2,068.00	Q. 1761.5	Q. 21,138.00	Q. 21,138.00-Q. 7,500.00= Q. 13,638.00
Q. 1,541.00	Q. 1761.5	Q. 21,138.00	Q. 21,138.00-Q. 7,500.00= Q. 13,638.00
Q. 2,782.40	Q. 1761.5	Q. 21,138.00	Q. 21,138.00-Q. 7,500.00= Q. 13,638.00
Q. 2293.6	Q. 1761.5	Q. 21,138.00	Q. 21,138.00-Q. 7,500.00= Q. 13,638.00
	<b>Total un año para 10 patógenos</b>	<b>Q. 253,656.00</b>	<b>Q. 253,656.00-Q. 90,000.00= Q. 163,656.00</b>

Fuente: cuadro, 2016.

### 3.3.4. EVALUACIÓN

1. Se generó un listado de diez patógenos para el área de fitopatología. Este listado se elaboró con el fin de poderse detectar con la prueba de análisis ELISA, por su mayor demanda que hay en el Laboratorio de Diagnóstico de la Dirección de Sanidad Vegetal VISAR-MAGA. Esta prueba ayudará que, el analista pueda generar resultados con mayor precisión y a menor tiempo.
2. Se realizó tres cotizaciones a tres diferentes proveedores, los cuales son AGDIA, SEDIAG Y LOEWE, brindando información sobre reactivos como buffer de los patógenos, controles positivos y controles negativos dando un costo total en dólares como en euros, estos pasados a la conversión de quetzales de acuerdo al cambio del Banco de Guatemala, se generó la información con el fin de tomar la decisión si se implementa la prueba de análisis ELISA.
3. Se generó información sobre protocolos, describiendo el procedimiento y la preparación de materiales, así como el proceso de análisis y resultados para cada patógeno, también un protocolo sobre el uso y lavado de cristalería, para el proceso de la prueba de análisis ELISA.
4. Se elaboró un listado de los reactivos que se usan en la prueba de análisis ELISA, los cuales son los buffer, controles positivos y negativos que son útiles para cada patógeno en específico del proveedor AGDIA.
5. Se proyectó información sobre los gastos que genera la prueba de análisis ELISA en cada inicio de actividades que se presenta al año, tomando en cuenta el costo del técnico analista.

### 3.3.5. BIBLIOGRAFÍA

1. AGDIA, US. 2016. Cotizaciones de pruebas Elisa en diez patógenos (en línea). USA. Consultado 14 oct. 2016. Disponible en <https://orders.agdia.com/reagent-set-aa-alkphos-bra-41900>
2. \_\_\_\_\_. 2016. Protocolos Elisa de AGDIA (en línea). USA. Consultado 10 dic. 2016. Disponible en: <https://orders.agdia.com/pathogen-tests/elisa>
3. BANGUAT (Banco de Guatemala, Guatemala). 2017. Tipo de cambio en EUROS en el Banco de Guatemala 2017 (en línea). Consultado 2 ene. 2017. Disponible en <https://themoneyconverter.com/ES/EUR/GTQ.aspx>
4. \_\_\_\_\_. 2017. Tipo de cambio en dólares en el Banco de Guatemala 2017 (en línea). Guatemala. Consultado 2 ene. 2017. Disponible en <http://www.banguat.gob.gt/cambio/>
5. Cuadra Solares, YK. 2016. Listado de patógenos de mayor demanda en el Laboratorio VISAR-MAGA. Guatemala, MAGA, VISAR. 4 p.
6. LOEWE, US. 2016. Cotizaciones de pruebas Elisa en diez patógenos (en línea). USA. Consultado 14 oct. 2016. Disponible en: <https://www.loewe-info.com/categories/elisa-sets-kits-and-controls/plant-viruses.html>
7. SEDIAG, España. 2016. Cotizaciones de pruebas Elisa en diez patógenos (en línea). España. Consultado 14 oct. 2016. Disponible en <http://www.sediag.com/accueil/contacts.php>



### 3.4. SERVICIO 3. PROTOCOLO SOBRE EL PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DEL NEMATODO HEMBRA MELOIDOGYNE INCOGNITA, M. JAVANICA Y M. ENTEROLOBII EN MUESTRAS DE RAÍZ

#### 3.4.1. OBJETIVOS

##### General

Realizar un protocolo que permita detectar la presencia del nematodo hembra; *Meloidogyne incógnita*, *M. javanica* y *M. enterolobii*, mediante la técnica de PCR de punto final (PCR convencional).

##### Específicos

1. Describir el procedimiento para la extracción de los nematodos hembras desde la raíz del cultivo.
2. Describir el procedimiento para la extracción de ADN del nematodo hembra.
3. Calcular las concentraciones de los reactivos que se usan para la amplificación de ADN de los nematodos.
4. Realizar las recetas para la amplificación del ADN de los nematodos *Meloidogyne general*, *M. incógnita*, *M. Javanica*, *M. enterolobii* y *Multiplex*.

### 3.4.2. METODOLOGÍA

Para la elaboración del protocolo sobre el procedimiento para la detección del nematodo hembra *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. enterolobii* en muestras de raíz, se realizará búsquedas de información en la web, primero sobre la extracción de cada individuo que está en la raíz, luego el procedimiento para extracción de ADN.

También se hará cálculos sobre las concentraciones de los reactivos que se usan para la amplificación, así poder realizar la receta para cada especie del nematodo, para que de último la prueba se lleve a visualización de gel en la foto-documentación, esto ayudara a comprobar si los primeros seleccionados son aptos para las pruebas en el Laboratorio de Biología Molecular.

### **3.4.3. RESULTADOS**

#### **3.4.3.A. Extracción del nematodo hembra.**

1. Tomar fotografía de la muestra con su correspondiente identificación.
2. Cortar las raíces de los cultivos que presentan agallas aproximadamente 30 g.
3. Lavar las raíces e introducir a un beaker de 40 ml agregando 25 ml de agua y 10 ml de colorante para alimento.
4. Dejar las raíces en el beaker por tres días, a una temperatura de 4°C.
5. Cortar en una tabla plástica las raíces de forma longitudinal con ayuda de un bisturí.
6. Visualizar el nemátodo hembra con la ayuda del estereoscopio.
7. Extraer los nemátodos con agujas de disección e introducir a un tubo de 1.5 ml con 0.5 ml de agua desmineralizada y almacenar a 4 °C.

### 3.4.3.B. Extracción del ADN (Stanton, J. M., McNicol, C. G., and Steele, V. 1998)

1. Macerar los nemátodos hembras en un mortero con 45 ml de buffer extracción de ADN NaOH a (10 Mm). (ver Cuadro 21).
2. Transferir la muestra a un tubo de 1.5 ml
3. Incubar a 95 °C por 10 minutos
4. Agregar 5 ml de solución TRIS-HCL 1molar PH 8 (ver Cuadro 22) y agitar.
5. Centrifugar a 11,000 rpm por 1 minuto.
6. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5ml aproximadamente 150 ml.

### 3.4.4. Concentraciones de Reactivos

Cuadro 21. Resumen del cálculos para el reactivo del Buffer de extracción en ADN: NaOH a (10 Mm).

No.	Componente	Peso Molar	Concentración final en la solución	Cantidad
1	NaOH	40 g	0.1 molar	0.5 g
	Ajustar a pH 8.0 y aforar con agua ddH2O a:			250 ml

Fuente: Cuadra, 2016.

Reactivos necesarios:

Solución 1 molar NaOH (Hidróxido de Sodio)

Cuadro 22. Resumen del cálculo para el reactivo Tris-HCL pH 8.

No.	Componente	Peso Molar	Concentración final en la solución	Cantidad
1	Tris-base	121.6 g	1 molar	3.03 g
2	HCl	36.46094 g	1 molar	0.9115 ml
2	Aforar con agua ddH2O a:			25 ml

Fuente: Cuadra, 2016.

Solución 1 molar Tris-HCL pH 8.0)

Reactivos necesarios:

Solución 1molar Tris-HCL pH 8.0)

Cuadro 23. Resumen del cálculo para el reactivo de TAE 1 X para la mezcla del gel agarosa.

No.	Componente	Concentración Inicial	Concentración final en la solución	Cantidad	Cantidad
1	TAE	50 X	1 X	10 ml	5 ml
2	ddH <sub>2</sub> O	---	---	490 ml	245 l
3	Total de la solución			500 ml	250 ml

Fuente: Cuadra, 2016.

TAE 1 X:

Reactivos necesarios:

Solución TAE 50 X

Cuadro 24. Resumen del cálculo para el reactivo TAE 50 X para la concentración del TAE 1 X.

No.	Componente	Peso Molar	Concentración final en la solución	Cantidad	Cantidad
1	Tris-base	121.14 g	2 molar	60.57 g	121.14 g
2	EDTA	372.24 g	0.05 molar	4.65 g	9.3 g
3	Acido Acético glacial	60.05 g	1M	14.27 ml	28.54 ml
3	Aforar con agua ddH <sub>2</sub> O a:			250 ml	500 ml

Fuente: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación- MAGA, 2016.

TAE 50 X:

Reactivos necesarios:

Tris-base (C<sub>4</sub> H<sub>11</sub> N O<sub>3</sub>)

EDTA (C<sub>10</sub> H<sub>14</sub> N<sub>2</sub> O<sub>8</sub> Na<sub>2</sub>)

Ácido acético glacial (CH<sub>3</sub> COOH).

Cuadro 25. Resumen del cálculo para la cantidad de reactivo en la mezcla de gel-red a una concentración de 10,000 X.

No.	Componente	Concentración inicial	Concentración final en la solución	Cantidad
1	Gel red	10,000 X	50 X	5 $\mu$ l
2	Agua ddH <sub>2</sub> O	---	---	95 $\mu$ l
3	Total de solución			100 $\mu$ l

Fuente: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación- MAGA, 2016.

Solución 50 X red gel:

Reactivos necesarios

Red gel a concentración 10,000 X

Preparación del gel-red:

Se utiliza a una concentración de 0.17 X en geles de 30 ml (agregando 1  $\mu$ l de gel red 50 X y 0.25 X para geles de 20 ml (agregando 1  $\mu$ l de red gel 50 X).

**3.4.5. Amplificación a partir del ADN de los nemátodos *Meloidogyne general*, *M. incógnita*, *M. Javanica*, *M. enterolobii* y múltiple, mezclando los componentes de la reacción.**

Se realizaron cálculos de concentraciones para los nematodos *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. enterolobii* y múltiple y cálculos del master mix que presentan los Cuadros 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 y 37.

Cuadro 26. Concentraciones del master mix utilizando buffer sin MgCl<sub>2</sub> para *Meloidogyne general*.

Vol. Final	25 µl			12.5 µl		
Número de Muestras	Ci	Cf	1x (µl)	Ci	Cf	1x (µl)
ddH <sub>2</sub> O	----	----	15.75	----	----	7.875
10X PCR buffer	10X	1X	2.5	10X	1X	1.25
25 mM MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 Mm	1.5	25 mM	2 mM	0.75
2.5 mM dNTPs	2.5 mM	0.1 Mm	2	2.5 mM	0.1 mM	1
Primer (MF+R)	----	----	1	----	----	0.5
Taq polimerasa	5U/µl	0.05 U	0.25	5U/µl	0.05 U	0.125
ADN dilución 2:6	----	----	2	----	----	1
<b>Total</b>	<b>25 µl</b>			<b>12.5 µl</b>		

Fuente: - Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación - MAGA, 2016.

En donde:

Ci es la concentración inicial del reactivo.

Cf es la concentración final del reactivo en la reacción de PCR.

1x(µl) es el volumen del reactivo en microlitros en la reacción de PCR.

Cuadro 27. Concentraciones del master mix utilizando buffer con MgCl<sub>2</sub>. para *Meloidogyne general*

Vol. Final	25 µl			12.5 µl		
	Ci	Cf	1x (µl)	Ci	Cf	1x (µl)
ddH <sub>2</sub> O	----	----	12	----	----	6
10X PCR buffer+ 15mM MgCl <sub>2</sub>	10X+ 15mM MgCl <sub>2</sub>	1X+1.5mM MgCl <sub>2</sub>	5	10X+ 15mM MgCl <sub>2</sub>	1X+1.5mM MgCl <sub>2</sub>	2.5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	25 mM	0.5 Mm	0	25 mM	0.5 Mm	0
2.5 mM dNTPs	2.5 mM	0.1 mM	4	2.5 mM	0.1 mM	2
Primer (MF+R)	----	----	1	----	----	0.5
Taq polimerasa	5U/µl	0.05 U	1	5U/µl	0.05 U	0.5
ADN dilución 1:4	----	----	2	----	----	1
<b>Total</b>			<b>25 µl</b>	<b>Total</b>		<b>12.5 µl</b>

Fuente: - Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación - MAGA,2016.

Cuadro 28. Concentraciones del master mix utilizando buffer sin MgCl<sub>2</sub> para *Meloidogyne incognita*.

Vol. Final	25 µl			12.5 µl		
	Ci	Cf	1x (µl)	Ci	Cf	1x (µl)
ddH <sub>2</sub> O	----	----	10.75	----	----	5.375
10X PCR buffer	10X	1X	2.5	10X	1X	1.25
25 mM MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 mM	1.5	25 mM	2 mM	0.75
2.5 mM dNTPs	2.5 mM	0.1 mM	2	2.5 mM	0.1 mM	1
Primer (MiF+MiR)	----	----	2	----	----	1
Taq polimerasa	5U/µl	0.05 U	0.25	5U/µl	0.05 U	0.125
ADN dilución 2:6	----	----	6	----	----	3
<b>Total</b>			<b>25 µl</b>	<b>Total</b>		<b>12.5 µl</b>

Fuente: - Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación - MAGA,2016.



Cuadro 29. Concentraciones del master mix utilizando buffer sin MgCl<sub>2</sub> para *Meloidogyne javanica*.

Vol. Final	25 µl			12.5 µl		
	Ci	Cf	1x (µl)	Ci	Cf	1x (µl)
ddH <sub>2</sub> O	----	----	10.75	----	----	5.375
10X PCR buffer	10X	1X	2.5	10X	1X	1.25
25 mM MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 mM	1.5	25 mM	2 mM	0.75
2.5 mM dNTPs	2.5 mM	0.1 mM	2	2.5 mM	0.1 mM	1
Primer (Fjav+Rjav)	----	----	2	----	----	1
Taq polimerasa	5U/µl	0.05 U	0.25	5U/µl	0.05 U	0.125
ADN dilución 2:6	----	----	6	----	----	3
<b>Total</b>			<b>25 µl</b>	<b>Total</b>		<b>12.5 µl</b>

Fuente: - Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación - MAGA,2016.

Cuadro 4. Concentraciones del master mix utilizando buffer sin MgCl<sub>2</sub> para *Meloidogyne enterolobii*.

Vol. Final	25 µl			12.5 µl		
	Ci	Cf	1x (µl)	Ci	Cf	1x (µl)
ddH <sub>2</sub> O	----	----	10.75	----	----	5.375
10X PCR buffer	10X	1X	2.5	10X	1X	1.25
25 mM MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 mM	1.5	25 mM	2 mM	0.75
2.5 mM dNTPs	2.5 mM	0.1 mM	2	2.5 mM	0.1 mM	1
Primer (Me-F+Me-R)	----	----	2	----	----	1
Taq polimerasa	5U/µl	0.05 U	0.25	5U/µl	0.05 U	0.125
ADN dilución 2:6	----	----	6	----	----	3
<b>Total</b>			<b>25 µl</b>	<b>Total</b>		<b>12.5 µl</b>

Fuente: - Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación - MAGA,2016.

Cuadro 31. Concentraciones del master mix utilizando buffer con MgCl<sub>2</sub> para *Meloidogyne múltiple* (*Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. enterolobii* + *M. general*).

Vol. Final	25 µl			12.5 µl		
	Ci	Cf	1x (µl)	Ci	Cf	1x (µl)
ddH <sub>2</sub> O	----	----	3.5	----	----	1.75
10X PCR buffer+ 15mM MgCl <sub>2</sub>	10X	1X	2.5	10X	1X	1.25
25 mM MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 mM	2	25 mM	2 mM	1
2.5 mM dNTPs	2.5 mM	0.1 mM	4	2.5 mM	0.1 mM	2
Primer (multiplex+ general)	----	----	6+2	----	----	3+1
Taq polimerasa	5U/µl	0.05 U	1	5U/µl	0.05 U	0.5
ADN dilución 2:6	----	----	4	----	----	2
<b>Total</b>			<b>25 µl</b>	<b>Total</b>		<b>12.5 µl</b>

Fuente: - Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación - MAGA,2016.

Cuadro 32. Tabla con cálculos para el master mix con buffer sin MgCl<sub>2</sub> para *Meloidogyne general* de 12.5 µl.

Número de Muestras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ddH <sub>2</sub> O	7.875	15.75	23.625	31.5	39.375	47.25	55.125	63	70.875	78.75
10X PCR buffer	1.25	2.5	3.75	5	6.25	7.5	8.75	10	11.25	12.5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	0.75	1.5	2.25	3	3.75	4.5	5.25	6	6.75	7.5
2.5 mM dNTPs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Primer (MF+R)	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
Taq polimerasa	0.125	0.25	0.375	0.5	0.625	0.75	0.875	1	1.125	1.25
Vol. total de Mix	11.5	23	34.5	46	57.5	69	80.5	92	103.5	115
Vol. de Mix/reacción	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5
ADN dilución 1:4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Número de Muestras	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ddH <sub>2</sub> O	86.625	94.5	102.375	110.25	118.125	126	133.875	141.75	149.625	157.5
10X PCR buffer	13.75	15	16.25	17.5	18.75	20	21.25	22.5	23.75	25
25 mM MgCl <sub>2</sub>	8.25	9	9.75	10.5	11.25	12	12.75	13.5	14.25	15
2.5 mM dNTPs	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Primer (MF+R)	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	9	9.5	10
Taq polimerasa	1.375	1.5	1.625	1.75	1.875	2	2.125	2.25	2.375	2.5
Vol. total de Mix	126.5	138	149.5	161	172.5	184	195.5	207	218.5	230
Vol. de Mix/reacción	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5
ADN dilución 1:4		1	1	1	1	1	1	1	1	1

Fuente: - Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación - MAGA,2016.

Cuadro 33. Tabla con cálculos para el master mix con buffer con MgCl<sub>2</sub> para *Meloidogyne general* de 12.5 µl.

Número de Muestras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ddH <sub>2</sub> O	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60
10X PCR buffer+ 15mM MgCl <sub>2</sub>	2.5	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20	22.5	25
25 mM MgCl <sub>2</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.5 mM dNTPs	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Primer (MF+R)	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
Taq polimerasa	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
Vol. total de Mix	11.5	23	34.5	46	57.5	69	80.5	92	103.5	625
Vol. de Mix/reacción	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5
ADN dilución 1:4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Número de Muestras	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ddH <sub>2</sub> O	66	72	78	84	90	96	102	108	114	120
10X PCR buffer+ 15mM MgCl <sub>2</sub>	27.5	30	32.5	35	37.5	40	42.5	45	47.5	50
25 mM MgCl <sub>2</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.5 mM dNTPs	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
Primer (MF+R)	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	9	9.5	10
Taq polimerasa	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	9	9.5	10
Vol. total de Mix	126.5	138	149.5	161	172.5	184	195.5	207	218.5	230
Vol. de Mix/reacción	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5
ADN dilución 1:4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Fuente: - Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación - MAGA,2016.

Nota: Incluir controles positivo, negativo y blanco.

Cuadro 5. Tabla con cálculos para el master mix con buffer sin MgCl<sub>2</sub> para *Meloidogyne incognita* de 12.5 µl.

Número de Muestras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ddH <sub>2</sub> O	5.375	10.75	16.125	21.5	26.875	32.25	37.625	43	48.375	53.75
10X PCR buffer	1.25	2.5	3.75	5	6.25	7.5	8.75	10	11.25	12.5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	0.75	1.5	2.25	3	3.75	4.5	5.25	6	6.75	7.5
2.5 mM dNTPs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Primer (MiF+MiR)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Taq polimerasa	0.125	0.25	0.375	0.5	0.625	0.75	0.875	1	1.125	1.25
Vol. total de Mix	9.5	18.6	28.5	38	47.5	57	66.5	76	85.5	95
Vol. de Mix/reacción	9.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5
ADN dilución 1:4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Número de Muestras	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ddH <sub>2</sub> O	59.125	64.5	69.875	75.25	80.625	86	91.375	96.75	102.125	107.5
10X PCR buffer	13.75	15	16.25	17.5	18.75	20	21.25	22.5	23.75	25
25 mM MgCl <sub>2</sub>	8.25	9	9.75	10.5	11.25	12	12.75	13.5	14.25	15
2.5 mM dNTPs	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Primer (MiF+MiR)	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Taq polimerasa	1.375	1.5	1.625	1.75	1.875	2	2.125	2.25	2.375	2.5
Vol. total de Mix	104.5	114	123.5	133	142.5	152	161.5	171	180.5	190
Vol. de Mix/reacción	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5
ADN dilución 1:4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Fuente: - Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación - MAGA,2016.

Nota: Incluir controles positivo, negativo y blanco.

Cuadro 35. Tabla con cálculos para el master mix con buffer sin MgCl<sub>2</sub> para *Meloidogyne javanica* de 12.5 µl.

Número de Muestras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ddH <sub>2</sub> O	5.375	10.75	16.125	21.5	26.875	32.25	37.625	43	48.375	53.75
10X PCR buffer	1.25	2.5	3.75	5	6.25	7.5	8.75	10	11.25	12.5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	0.75	1.5	2.25	3	3.75	4.5	5.25	6	6.75	7.5
2.5 mM dNTPs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Primer (Fjav+Rjav)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Taq polimerasa	0.125	0.25	0.375	0.5	0.625	0.75	0.875	1	1.125	1.25
Vol. total de Mix	9.5	18.6	28.5	38	47.5	57	66.5	76	85.5	95
Vol. de Mix/reacción	9.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5
ADN dilución 1:4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Número de Muestras	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ddH <sub>2</sub> O	59.125	64.5	69.875	75.25	80.625	86	91.375	96.75	102.125	107.5
10X PCR buffer	13.75	15	16.25	17.5	18.75	20	21.25	22.5	23.75	25
25 mM MgCl <sub>2</sub>	8.25	9	9.75	10.5	11.25	12	12.75	13.5	14.25	15
2.5 mM dNTPs	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Primer (Fjav+Rjav)	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Taq polimerasa	1.375	1.5	1.625	1.75	1.875	2	2.125	2.25	2.375	2.5
Vol. total de Mix	104.5	114	123.5	133	142.5	152	161.5	171	180.5	190
Vol. de Mix/reacción	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5
ADN dilución 1:4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Fuente: - Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación - MAGA,2016.

Nota: Incluir controles positivo, negativo y blanco.

Cuadro 36. Tabla con cálculos para el master mix con buffer sin MgCl<sub>2</sub> para *Meloidogyne enterolobii* de 12.5 µl.

Número de Muestras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ddH <sub>2</sub> O	5.375	10.75	16.125	21.5	26.875	32.25	37.625	43	48.375	53.75
10X PCR buffer	1.25	2.5	3.75	5	6.25	7.5	8.75	10	11.25	12.5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	0.75	1.5	2.25	3	3.75	4.5	5.25	6	6.75	7.5
2.5 mM dNTPs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Primer(Me-F+Me-R)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Taq polimerasa	0.125	0.25	0.375	0.5	0.625	0.75	0.875	1	1.125	1.25
Vol. total de Mix	9.5	18.6	28.5	38	47.5	57	66.5	76	85.5	95
Vol. de Mix/reacción	9.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5
ADN dilución 1:4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Número de Muestras	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ddH <sub>2</sub> O	59.125	64.5	69.875	75.25	80.625	86	91.375	96.75	102.125	107.5
10X PCR buffer	13.75	15	16.25	17.5	18.75	20	21.25	22.5	23.75	25
25 mM MgCl <sub>2</sub>	8.25	9	9.75	10.5	11.25	12	12.75	13.5	14.25	15
2.5 mM dNTPs	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Primer(Me-F+Me-R)	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Taq polimerasa	1.375	1.5	1.625	1.75	1.875	2	2.125	2.25	2.375	2.5
Vol. total de Mix	104.5	114	123.5	133	142.5	152	161.5	171	180.5	190
Vol. de Mix/reacción	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5
ADN dilución 1:4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Fuente: - Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación - MAGA,2016.

Nota: Incluir controles positivo, negativo y blanco.

Cuadro 37. Cálculos para el master mix con buffer con MgCl<sub>2</sub> para *Meloidogyne multiplex* de 12.5 µl

Número de Muestras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ddH <sub>2</sub> O	1.75	3.5	5.25	7	8.75	10.5	12.25	14	15.75	17.5
10X PCR buffer+ 15mM MgCl <sub>2</sub>	1.25	2.5	3.75	5	6.25	7.5	8.75	10	11.25	12.5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2.5 mM dNTPs	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Primer(multiplex+gen )	3+1	6+2	9+3	16+4	15+5	18+6	21+7	24+8	27+9	30+1 0
Taq polimerasa	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
Vol. total de Mix	10.5	21	31.5	46	52.5	63	73.75	84	94.5	105
Vol. de Mix/reacción	10.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5
ADN dilución 1:4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Número de Muestras	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ddH <sub>2</sub> O	19.25	21	22.75	24.5	26.25	28	29.75	31.5	33.25	35
10X PCR buffer+ 15mM MgCl <sub>2</sub>	13.75	15	16.25	17.5	18.75	20	21.25	22.5	23.75	25
25 mM MgCl <sub>2</sub>	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
2.5 mM dNTPs	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
Primer(multiplex+gen )	33+11	36+1 2	39+13	42+14	45+15	48+1 6	51+17	54+18	57+19	60+2 0
Taq polimerasa	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	9	9.5	10
Vol. total de Mix	115.5	126	136.5	147	157.5	168	178.5	189	199.5	210
Vol. de Mix/reacción	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5
ADN dilución 1:4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Fuente: - Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación - MAGA,2016.

Nota: Incluir controles positivo, negativo y blanco.



Colocar las muestras en el termociclador, empleando el siguiente programa de ciclado de PCR convencional:

- ***Meloidogyne general***

1 Ciclo a 94 °C durante 2 min.

35 Ciclos: 94°C durante 30 s, 66 °C durante 1 s, 68°C durante 1 min.

1 Ciclo a 72 °C durante 5 min.

1 Ciclo a 4 °C, permanente.

- ***Meloidogyne incognita***

1 Ciclo a 94 °C durante 3 min.

35 Ciclos: 94°C durante 30 s, 60 °C durante 1 s, 72°C durante 1 min.

1 Ciclo a 72 °C durante 7 min.

1 Ciclo a 4 °C, permanente.

- ***Meloidogyne javanica***

1 Ciclo a 94°C durante 5 min.

35 Ciclos: 94°C durante 30 s, 64 °C durante 45 s, 70°C durante 1 min.

1 Ciclo a 70 °C durante 8 min.

1 Ciclo a 4 °C, permanente.

- ***Meloidogyne enterolobii***

1 Ciclo a 94 °C durante 2 min.

35 Ciclos: 94°C durante 30 s, 72 °C durante 30 s, 72°C durante 30 s.

1 Ciclo a 72 °C durante 5 min.

1 Ciclo a 4 °C, permanente.

- ***Meloidogyne múltiple***

1 Ciclo a 94 °C durante 2 min.

45 Ciclos: 94°C durante 30 s, 64 °C durante 45 s, 68°C durante 1 min.

1 Ciclo a 72 °C durante 5 min.

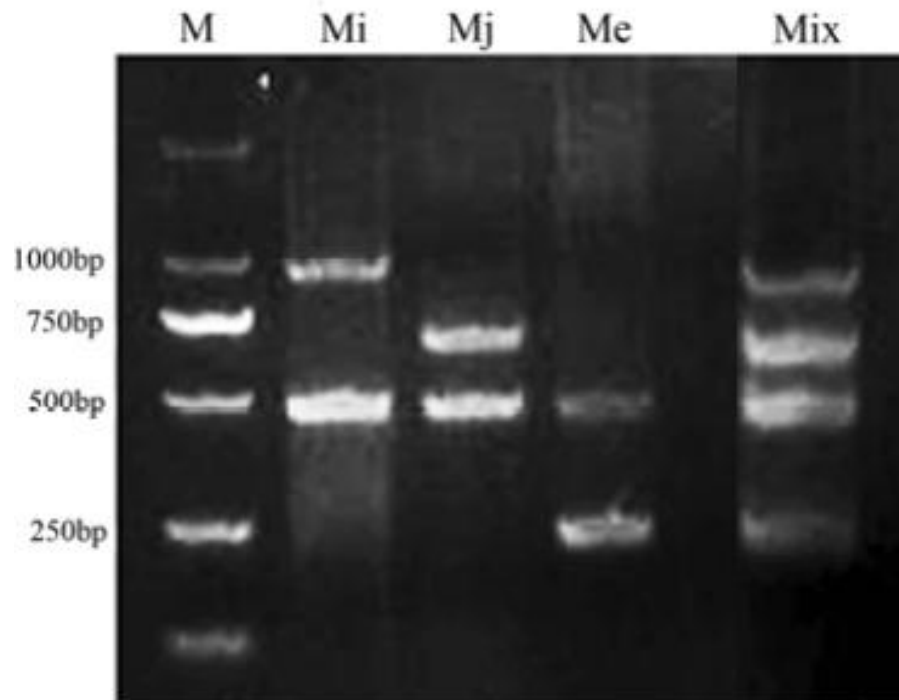
1 Ciclo a 4 °C, permanente.

### 3. Visualización

Emplear electroforesis en geles de agarosa

- Preparar un gel de agarosa en concentración de 2 % con buffer TAE1X (Ver Cuadro 25) y Gel Red en concentración 0.01X (Ver Cuadro 23).
- Regular el voltaje a la posición Half y dejar transcurrir la electroforesis por 1 hora para geles.
- Visualización de gel en el sistema de foto-documentación.
- Tomar la fotografía.

- Interpretación



Fuente:Hu, M. X., Zhuo, K., and Liao, J. L. 2011.

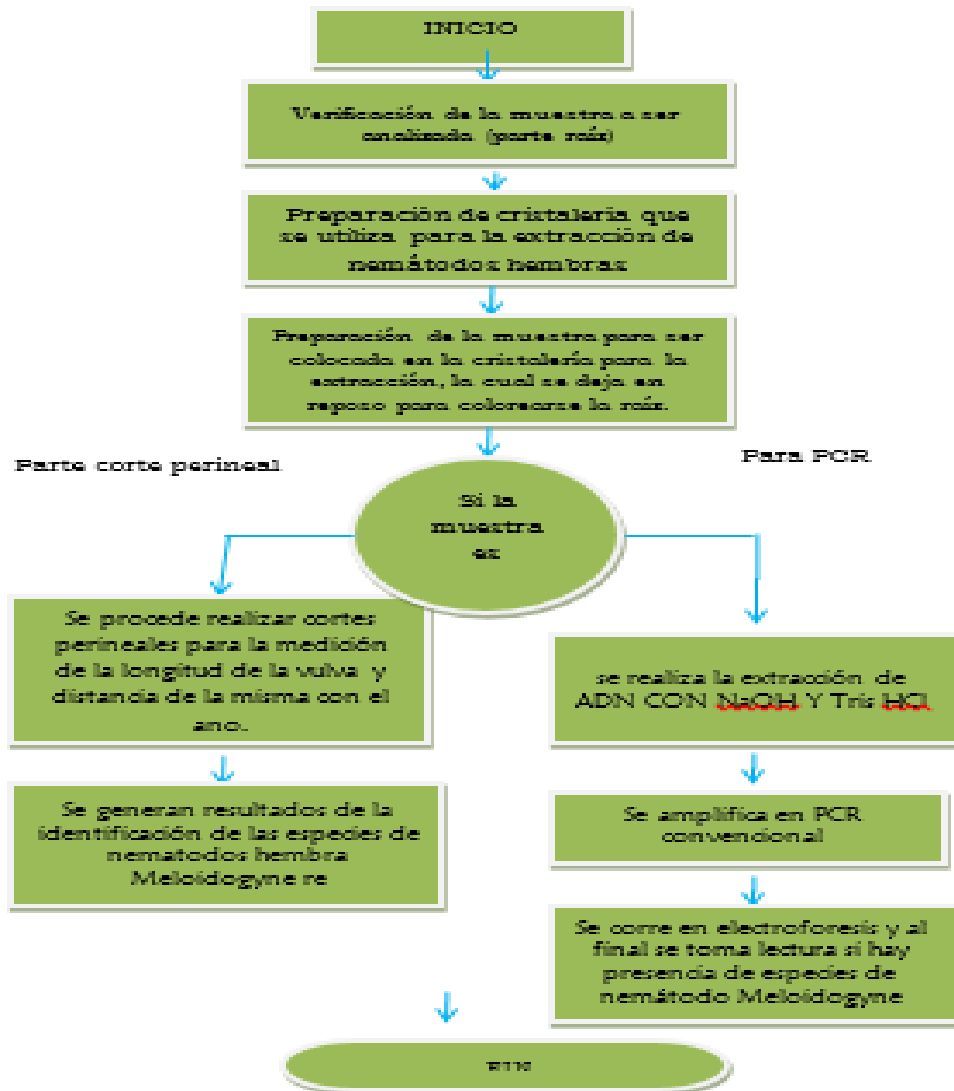
Figura 29. Fotografía de gel de agarosa.

En la figura 29 muestra los fragmentos de 500 pb M: resultado *Meloidogyne* general, fragmento de 1000 pb Mi: resultado *Meloidogyne incognita*, fragmento de 750 pb Mj: resultado *Meloidogyne javanica*, fragmento de 250 pb Me: resultado *Meloidogyne enterolobii*, y mix: resultado múltiple, todas las especies + general.

### 3.4.6. BIBLIOGRAFÍA

1. Long, H; Liu, H; Xu, JH. 2006. Development of a PCR diagnostic for the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii*. Acta Phytopathol. Sin. 36:109-115.
2. Meng, QP; Long, H; Xu, JH. 2004. PCR assays for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. Acta Phytopathol. Sin. 34:204- 210.
3. Stanton, J; Hugall, A; Moritz, C. 1997. Nucleotide polymorphisms and an improved PCR-based mtDNA diagnostic for parthenogenetic root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Fundam. Appl. Nematol. 20:261-268.
4. Stanton, JM; McNicol, CG; Steele, V. 1998. Non-manual lysis of second-stage *Meloidogyne* juveniles for identification of pure and mixed samples based on the polymerase chain reaction. Australas. Plant Pathol. 27:112-115.
5. Xu, J; Liu, P; Meng, Q; Long, H. 2004. Characterisation of *Meloidogyne* species from China using isozyme phenotypes and amplified mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism. European Journal of Plant Pathology 110:309–315.
6. Zijlstra, C; Uenk, BJ; Van Silfhout, CH. 1997. A reliable, precise method to differentiate species of root-knot nematodes in mixtures on the basis of ITS-RFLPs. Fundam. Appl. Nematol. 20:59-63.

## a. ANEXOS



Fuente: Cuadra, 2016.

Figura 30A. Flujograma del procedimiento extracción de nematodos formadores de agallas.

**Iniciadores evaluados para la identificación de *Meloidogyne general*, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. enterolobii*, en poblaciones provenientes de Taiwan.**

Cuadro 38A. Resumen para información de iniciadores con fragmento amplificado

Especie	Nombre	Secuencia de iniciadores (5'-3')	Fuente	Fragmento amplificado
Meloidogyne spp	MF	GGGATGTTTGAGGCAGATTG	Liu, et al. 2005.	500 pb
Meloidogyne spp	MR	AACCGCTTCGGACTCCACCAG	Liu, et al. 2005.	
M. incognita-specific	MiF	GTGAGGATTCAGCTCCCCAG	Meng et al., 2004, Hu et al. 2011	1000 pb
M. incognita-specific	MiR	ACGAGGAA CATACTTCTCCGTCC	Meng et al., 2004, Hu et al. 2011	
M. javanica-specific	Fjav	GGTGC GCGATTGAACTGAGC	Zijlstra et al., 2000	700 pb
M. javanica-specific	Rjav	CAG GCCCTTCAGTGGAACATAC	Zijlstra et al., 2000	
M. enterolobii specific	MeF	AACTTTTG TGAAAGTGCCGCTG	Long, et al. 2006.	200 pb
M. enterolobii specific	MeR	TCAGTTCAGGCAGG ATCAACC	Long, et al. 2006.	

Fuente: M. X. Hu, K. Zhuo, and J. L. Liao 2011.

Cuadro 39A. Resumen de preparación para la concentración del iniciador de la especie *Meloidogyne general*.

PRIMER			
<b>MF</b>			
volumen de primer por reacción de PCR	1	ul	
volumen de reacción de PCR	25	ul	
concentración final de primer	0.2	uM	
concentración de trabajo del primer	5	uM	
Para agregar	5	ul de STOCK a	95 de agua UP y obtener 100 <sup>u</sup> ul de solución de trabajo:
la concentración del STOCK debe ser	100	uM	
el FABRICANTE me vendió	23	nmol de primer	<b>MF</b>
el primer	<b>MF</b>	debe reconstituirse en	<b>0.230</b> ml de agua UP.
			230 <sup>u</sup> uL
Con lo que pueden correrse alrededor de	<b>4140</b>	PCR's	
Con un error de pipeteo del	10%		

Fuente: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación- MAGA, 2016.

Cuadro 40A. Resumen de preparación para la concentración del iniciador de la especie *Meloidogyne general* reverso.

PRIMER	
MR	
volumen de primer por reacción de PCR	1 $\mu$ l
volumen de reacción de PCR	25 $\mu$ l
concentración final de primer	0.2 $\mu$ M
concentración de trabajo del primer	5 $\mu$ M
Para agregar	5 $\mu$ l de STOCK a 95 de agua UP y obtener 100 $\mu$ l de solución de trabajo:
la concentración del STOCK debe ser	100 $\mu$ M
el FABRICANTE me vendió	24 nmol de primer MR
el primer MR	debe reconstituirse en 0.240 ml de agua UP.
	240 $\mu$ L
Con lo que pueden correrse alrededor de	
<b>4320</b>	PCR's
Con un error de pipeteo del	10%

Fuente: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación- MAGA, 2016.

Cuadro 41A. Resumen de preparación para la concentración del iniciador de la especie *Meloidogyne incognita*.

PRIMER	
Mi-F	
volumen de primer por reacción de PCR	1 $\mu$ l
volumen de reacción de PCR	25 $\mu$ l
concentración final de primer	0.16 $\mu$ M
concentración de trabajo del primer	4 $\mu$ M
Para agregar	5 $\mu$ l de STOCK a 95 de agua UP y obtener 100 $\mu$ l de solución de trabajo:
la concentración del STOCK debe ser	80 $\mu$ M
el FABRICANTE me vendió	24 nmol de primer Mi-F
el primer Mi-F	debe reconstituirse en 0.300 ml de agua UP.
	300 $\mu$ L
Con lo que pueden correrse alrededor de	
<b>5400</b>	PCR's
Con un error de pipeteo del	10%

Fuente: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación- MAGA, 2016.

Cuadro 42A. Resumen de preparación para la concentración del iniciador de la especie *Meloidogyne incognita* reverso.

PRIMER	
Mi-R	
volumen de primer por reacción de PCR	1 ul
volumen de reacción de PCR	25 ul
concentración final de primer	0.16 uM
concentración de trabajo del primer	4 uM
Para agregar	5 ul de STOCK a 95 de agua UP y obtener 100 ul de solución de trabajo:
la concentración del STOCK debe ser	80 uM
el FABRICANTE me vendió	25 nmol de primer Mi-R
el primer Mi-R	debe reconstituirse en 0.313 ml de agua UP.
	313 uL
Con lo que pueden correrse alrededor de	
<b>5625</b>	PCR's
Con un error de pipeteo del	10%

Fuente: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación- MAGA, 2016.

Cuadro 43A. Resumen de preparación para la concentración del iniciador de la especie *Meloidogyne javanica*.

PRIMER	
Fjav	
volumen de primer por reacción de PCR	1 ul
volumen de reacción de PCR	25 ul
concentración final de primer	0.16 uM
concentración de trabajo del primer	4 uM
Para agregar	5 ul de STOCK a 95 de agua UP y obtener 100 ul de solución de trabajo:
la concentración del STOCK debe ser	80 uM
el FABRICANTE me vendió	25 nmol de primer Fjav
el primer Fjav	debe reconstituirse en 0.313 ml de agua UP.
	313 uL
Con lo que pueden correrse alrededor de	
<b>5625</b>	PCR's
Con un error de pipeteo del	10%

Fuente: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación- MAGA, 2016.

Cuadro 44A. Resumen de preparación para la concentración del iniciador de la especie *Meloidogyne javanica* reverso.

PRIMER	
<b>Rjav</b>	
volumen de primer por reacción de PCR	1 ul
volumen de reacción de PCR	25 ul
concentración final de primer	0.16 uM
concentración de trabajo del primer	4 uM
Para agregar	5 ul de STOCK a 95 de agua UP y obtener 100 ul de solución de trabajo:
la concentración del STOCK debe ser	80 uM
el FABRICANTE me vendió	25 nmol de primer <b>Rjav</b>
el primer <b>Rjav</b>	debe reconstituirse en 0.313 ml de agua UP.
	313 uL
Con lo que pueden correrse alrededor de	
<b>5625</b>	PCR's
Con un error de pipeteo del	10%

Fuente: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación- MAGA 2016.

Cuadro 45A. Resumen de preparación para la concentración del iniciador de la especie *Meloidogyne enterolobii*.

PRIMER	
<b>Me-F</b>	
volumen de primer por reacción de PCR	1 ul
volumen de reacción de PCR	25 ul
concentración final de primer	0.12 uM
concentración de trabajo del primer	3 uM
Para agregar	5 ul de STOCK a 95 de agua UP y obtener 100 ul de solución de trabajo:
la concentración del STOCK debe ser	60 uM
el FABRICANTE me vendió	24 nmol de primer <b>Me-F</b>
el primer <b>Me-F</b>	debe reconstituirse en 0.400 ml de agua UP.
	400 uL
Con lo que pueden correrse alrededor de	
<b>7200</b>	PCR's
Con un error de pipeteo del	10%

Fuente: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación- MAGA, 2016.



Cuadro 46A. Resumen de preparación para la concentración del iniciador de la especie *Meloidogyne enterolobii* reverso.

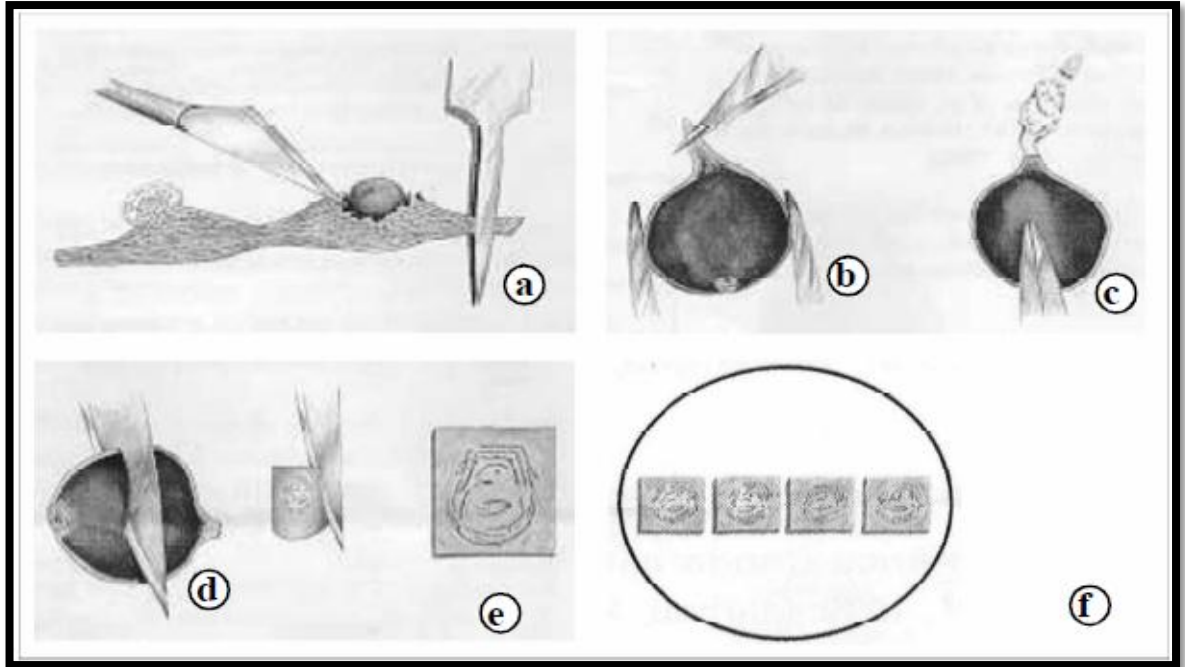
PRIMER	
<b>Me-R</b>	
volumen de primer por reacción de PCR	1 ul
volumen de reacción de PCR	25 ul
concentración final de primer	0.12 uM
concentración de trabajo del primer	3 uM
Para agregar	5 ul de STOCK a 95 de agua UP y obtener 100 ul de solución de trabajo:
la concentración del STOCK debe ser	60 uM
el FABRICANTE me vendió	23 nmol de primer <b>Me-R</b>
el primer <b>Me-R</b>	debe reconstituirse en 0.383 ml de agua UP.
	383 uL
Con lo que pueden correrse alrededor de	
<b>6900</b>	PCR's
Con un error de pipeteo del	10%

Fuente: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación- MAGA, 2016.

Cuadro 47A. Listado de 18 muestras que dieron positivas para el análisis morfológico y detección molecular de *Meloidogyne sp.*

	Muestra	Cultivo	Finca	Saran	Usuario	Fecha de ingreso
1	6080	Pothos golden	Buenos Aires	Saran EA L-2	I-01-3432	13/05/2016
2	6650	Pothos perla	La Conquista	saran 2-1	I-01-3457	25/05/2016
3	6652	Pothos marblee	La Conquista	Saran 2-2	I-01-3458	25/05/2016
4	6654	Pothos golden	La Conquista	Saran 2-3	I-01-3459	25/05/2016
5	6656	Pothos golden	La Conquista	Saran 2-4	I-01-3460	25/05/2016
6	6660	Pothos golden	La Conquista	Saran 2-6	I-01-3462	25/05/2016
7	6665	Pothos golden	Villa Sol	Saran 1-1	I-01-3465	25/05/2016
8	6667	Pothos golden	Villa Sol	Saran 1-2	I-01-3466	25/05/2016
9	8561	Pothos golden	La Linea 7	Saran 1	I-01-3507	27/06/2016
10	8563	Pothos marblee	La Linea 7	Saran 1	I-01-3508	27/06/2016
11	8565	Pothos marblee	Santa Clara	Saran 1-1	I-01-3509	27/06/2016
12	8571	Pothos marblee	Santa Clara	Saran 1-4	I-01-3512	27/06/2016
13	8575	Pothos marblee	Santa Clara	Saran 2-2	I-01-3514	27/06/2016
14	9338	Pothos marblee	Queletzu	Saran 2	I-01-3543	13/07/2016
15	9887	Pothos golden	Queletzu		I-01-3455	21/07/2016
16	9904	Pothos golden	La Conquista	saran 2-4	I-01-3565	21/07/2016
17	9916	Pothos Silver satin	Buenos Aires	Macarena 4	I-01-3571	21/07/2016
18	9918	Pothos marblee	Buenos Aires	Macarena 4	I-01-3572	21/07/2016
19	13320	Pothos golden	La Conquista	Techado #2	I-01-2107	23/09/2016

Fuente Cuadra, 2016.



Fuente: Hartman y Sasser, 1985.

Figura 31A. Pasos como realizar corte y montaje de patrón perineal en nematodos hembras.

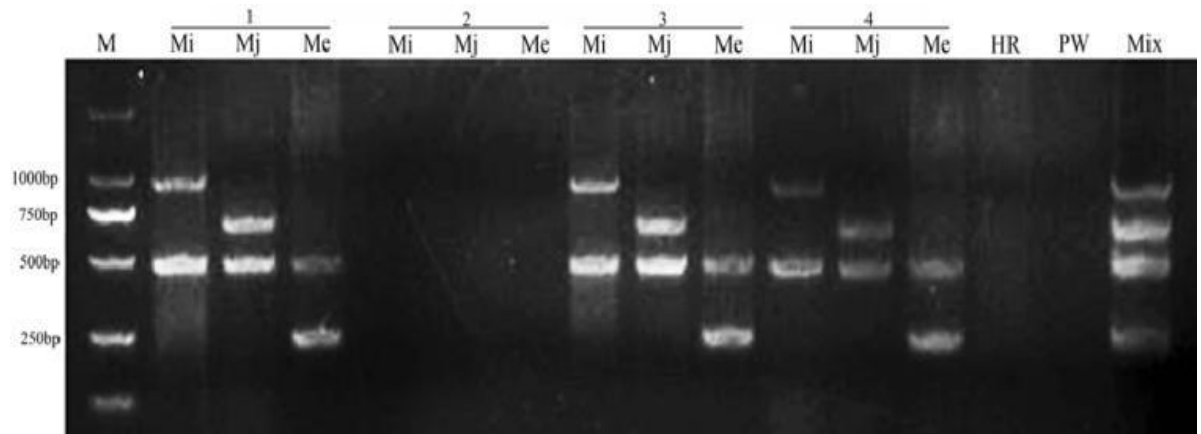
- **Protocolo para extracción de ADN** (Stanton, J. M., McNicol, C. G., and Steele, V. 1998)

#### Pasos

1. Extraer de 3 a 5 nemátodos ♀ en forma de pera, directo desde la raíz de la planta vegetal y colocarlos con 0.5 ml de ddH<sub>2</sub>O en un tubo de 1.5 ml.
2. Macerar la muestra en un mortero con 45 µL de NaOH a (10 Mm).
3. Transferir la muestra a un tubo de 1.5 ml.
4. Incubar a 95 °C por 10 minutos.
5. Agregar 5 µL de TRIS-HCL a (1molar) y mezclar.
6. Centrifugar a 11,000 rpm por 1 minuto.
7. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5ml aproximadamente 150 µL.

Una dilución del ADN se mezclará con los componentes de la reacción y en condiciones de termociclado sugeridos por (Meng et al. 2004 y Long et al. 2004). Los primers a emplear son *Meloidogyne general*: primer específico (MF 5' - GGGGATGTTTGAGGCAGATTTG- 3'), (MR5' - AACCGCTTCGGACTTCCACCAG-3'), *M. incognita*, primer específico: (Mi-F 5' - GTGAGGATTCAGCTCCCCAG-3'), (Mi-R 5' - ACGAGGAA CATACTTCTCCGTCC- 3'), *M. javanica*, primer específico: (Fjav 5' - GGTGCGCGATTGAACTGAGC- 3'), (Rjav 5' -CAG GCCCTTCAGTGGAAGTATAC- 3'), *M. enterolobii* primer específico (MeF 5' -AACTTTTGTGAAAGTGCCGCTG- 3'), (Me-R 5' -TCAGTTCAGGCAGG ATCAACC- 3').

El resultado se visualizará mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % concentraciones descritas por Hu et al. 2011 teñida con gel-red, esperando obtener un fragmento de alrededor de 999 pares de bases cuando haya presencia *Meloidogyne general*, *M. incognita*, *M. javanica* y *M. enterolobii*.



Fuente: Hu, M. X., Zhuo, K., and Liao, J. L. 2011.

Figura 32A. Fotografía de una gel de agarosa de productos de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple.

En la figura 32A, se muestran los fragmentos del métodos de extracción de ADN (1 a 4). M: marcador de ADN DS2000; *Mi*: *Meloidogyne incognita*; *Mj*: *M. javanica*; *Me*: *M. enterolobii*; HR: control negativo del ADN de la raíz sin nematodos; PW: control negativo sin plantilla de ADN; Mezcla: control positivo con una mezcla de ADN a *granel* de *M. incognita*, *M. javanica* y *M. enterolobii*.