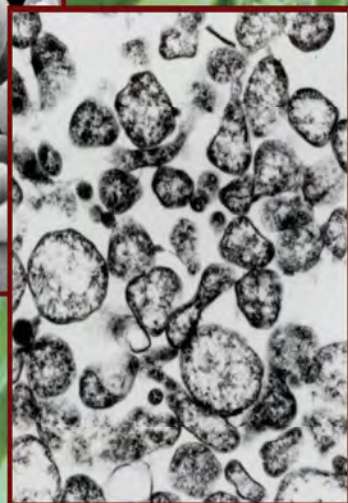
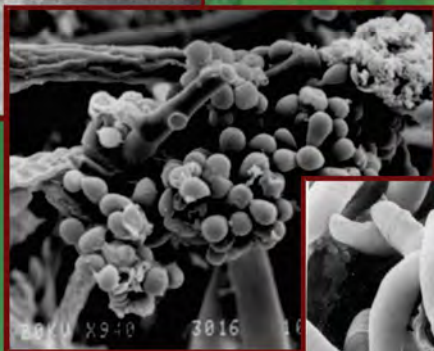


# Guía de experimentos de fitopatología



**Kusunoki, M. , Beltrán, C. ,  
Zuluaga, M. V. , Cotes, A. M.**

Este libro fue elaborado, producido, editado y publicado con el apoyo de la Agencia de Cooperación Internacional del Japón JICA, por lo que se prohíbe su venta. Su distribución será gratuita y la realizará la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), en medio impreso ó digital.

© Los Derechos de Autor son compartidos entre CORPOICA y la Oficina de JICA en Colombia.

Queda prohibida la producción parcial o total de esta publicación por cualquier medio o procedimiento, sin contar con la autorización previa, expresa y por escrito de CORPOICA.

# Guía de experimentos de fitopatología

Manabu KUSUNOKI, Ph.D  
Voluntario Sénior de JICA, Fitopatólogo

Camilo BELTRÁN-ACOSTA, B.Sc  
Investigador Laboratorio de Control Biológico, Centro de  
Biotecnología y Bioindustria, Corpoica, Biólogo

María Victoria ZULUAGA-MOGOLLÓN, B.Sc  
Coordinadora de Transferencia de Tecnología del Centro de  
Biotecnología y Bioindustria, Corpoica, Ingeniera Agrónoma

Alba Marina COTES-PRADO, Ph.D  
Investigadora y Directora del Centro de Biotecnología y  
Bioindustria, Corpoica, Fitopatóloga

Marzo de 2012

## **Prefacio**

La detección rápida y precisa de enfermedades, identificando sus agentes causales, es el punto de partida para llevar a cabo un control efectivo de éstas. Sin embargo, es importante contar con métodos que sean sencillos, económicos y adaptables a diferentes condiciones de trabajo.

El propósito de esta guía es el de servir de apoyo tanto a Fitopatólogos experimentados, como a investigadores y estudiantes que se están formando en Fitopatología. La mayoría de procedimientos básicos incluidos en este libro son un resumen de un curso desarrollado en la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA) como parte de las actividades a cargo del Dr. Manabu Kusunoki, en su calidad de voluntario sénior de la Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA), quien durante su estadía en el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de CORPOICA contó con el apoyo del investigador Camilo Beltrán, como asistente, tanto en la preparación del mencionado curso, como en el desarrollo de las actividades de investigación a su cargo.

El presente texto, sólo pretende hacer una contribución preliminar sobre aspectos básicos del trabajo fitopatológico, por lo cual, los autores invitan a los usuarios de esta guía a profundizar en los temas aquí abordados y a explorar nuevas técnicas aplicables al tema.

Los autores expresan su gratitud a JICA, a CORPOICA y a todas las personas que contribuyeron al logro de esta guía.

# Índice

I. Métodos comunes para experimentos .....	6
1. Esterilización .....	6
1). Autoclave .....	7
2). Esterilización en seco .....	8
3). Esterilización por filtración .....	8
2. Pesaje de reactivos .....	9
3. Uso del potenciómetro .....	10
1). Calibración del equipo .....	10
2). Ajuste del pH de soluciones .....	11
4. Preparación de caldos y medios de cultivo .....	11
1). Preparación de tapones de algodón .....	11
2). Preparación de cultivos en caja de Petri y en tubos de ensayo .....	12
5. Uso del microscopio óptico .....	13
1). Procedimientos de uso .....	14
II. Métodos para experimentos con hongos .....	15
1. Observación .....	15
2. Preparación de cultivos para hongos .....	16
1). Preparación de PDA (Papa-Dextrosa-Agar) .....	16
3. Aislamiento de hongos .....	18
1). Aislamiento a partir de tejido vegetal .....	18
2). Aislamiento de esporas de hongos .....	19
4. Inoculación de una planta con hongos .....	20
1). Inoculación con esporas de hongos .....	20
2). Inoculación con micelio de hongo .....	21
5. Preparación de muestras para observar bajo Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) .....	22
6. Identificación de hongos .....	23
Bibliografía relacionada con identificación de hongos .....	25

III. Métodos para experimentos con bacterias.....	26
1. Observación de bacterias .....	26
1). Tinción simple.....	26
2). Tinción de Gram.....	27
3). Tinción de Flagelos.....	28
2. Ensayos fisiológicos .....	28
1). Ensayo para determinar la oxidación o fermentación de azúcares.....	28
2). La reacción oxidasa de Kovac.....	29
3). Reducción de nitrato.....	29
4). Asimilación de hidratos de carbono.....	30
3. Aislamiento de bacterias a partir de material vegetal.....	30
4. Inoculación de bacterias en plantas.....	31
Bibliografía relacionada con otros métodos para identificación de bacterias patógenas de plantas.....	32
IV. Métodos para experimentos con virus.....	33
1. Síntomas de virus.....	33
2. Observación de virus .....	34
1). Método de tinción negativa (DN).....	34
2). Método de corte ultrafino .....	35
a. Fijación por inmersión en resina de epoxi.....	35
b. Método para cortar secciones ultra finas.....	39
c. Tinción para uso en microscopía electrónica (TEM).....	39
3. Inoculación de material vegetal con virus.....	40
4. Purificación de virus a partir de hojas infectadas.....	42
5. Preparación de anticuerpos policlonales.....	43
6. Experimentos con reacción de suero.....	44
Bibliografía y páginas relacionadas para identificación de virus de plantas.....	45

V. Métodos básicos moleculares para fitopatología.....	46
1. Métodos comunes para análisis molecular.....	46
1). Preparación de geles de agarosa para electroforesis.....	46
2). Preparación de soluciones de reactivos comunes.....	46
3). Electroforesis.....	51
2. Extracción de ADN con Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB) (para muestras difíciles de extraer el ADN).....	55
1). Método de extracción.....	55
2). Páginas de revisión importantes.....	56
3. Extracción de ARN a partir de virus (Método del Ácido Guanidin-Fenol-Cloroformo - AGPC).....	58
4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	60
1). PCR.....	60
2). Preparación de la solución para PCR.....	61
3). Cebadores o "Primers".....	61
Bibliografía.....	62
Glosario.....	63

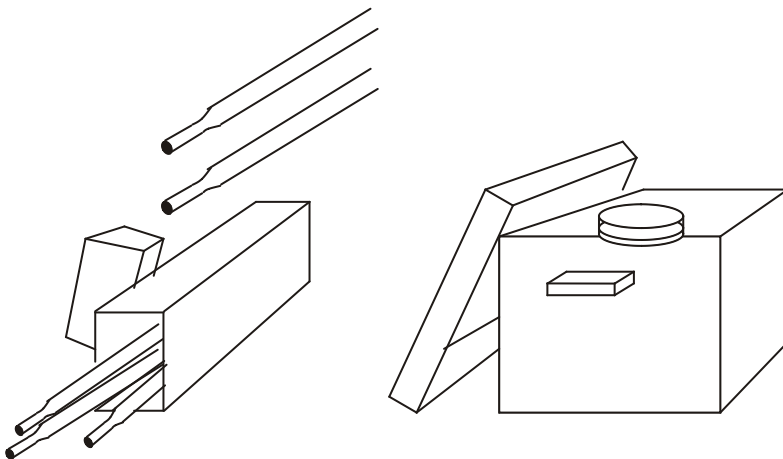
# I . Métodos comunes para experimentos

## 1. Esterilización

Antes de esterilizar materiales de laboratorio, estos deben disponerse en cajas especiales o estar cubiertos con papel de aluminio (Figura 1). La figura 2 muestra las cajas y las formas para esterilizar diferentes materiales. Generalmente, los Erlenmeyer no necesitan de cinta sobre el papel de aluminio cuando estos están cubiertos con doble papel de aluminio.



**Figura 1.** Material de vidrio cubierto con papel de aluminio



**Figura 2.** Cajas para esterilización

## 1). Autoclave

La mayoría de materiales se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 20 minutos (Figuras 3 y 4). Sin embargo, algunos como suelo, sustratos o aserrín de madera necesitan más de 30 minutos. El autoclave debe limpiarse periódicamente y con mayor frecuencia cuando se esterilizan diferentes tipos de sustrato.



**Figura 3.** Autoclave horizontal



**Figura 4.** Autoclave vertical

## 2). Esterilización en seco

La esterilización en seco se realiza generalmente a 180 °C durante 60 min. (Figura 5). No se debe abrir la puerta del equipo durante el proceso de esterilización, debido al riesgo que se genera por la eventual exposición de compuestos combustibles a alta temperatura. Los materiales de vidrio o metal para su uso en experimentos con ARN deben ser esterilizados preferiblemente por este método.



**Figura 5.** Equipo de esterilización en seco

## 3). Esterilización por filtración

Este método es usado para líquidos o soluciones que no soportan altas temperaturas. La esterilización de las soluciones incluyen antibióticos o algunos azúcares (por ejemplo: lactosa, xilosa, glucosa). Entre los antibióticos, el cloramfenicol es autoclavable. Hay dos tipos de filtros (Figura 6 y 7), El primero es desechable, para su uso, se emplea una jeringa que se acopla al filtro estéril (Figura 6). En algunos casos para adicionar la solución filtrada a un caldo de cultivo que se encuentra caliente y estéril, el filtrado debe agregarse a una temperatura menor o igual a 55 °C. Otro tipo de montaje para filtrar soluciones es el uso de un portafiltro previamente esterilizado que acople filtros millipore (Figura 7).



**Figura 6.** Jeringa acoplada al filtro



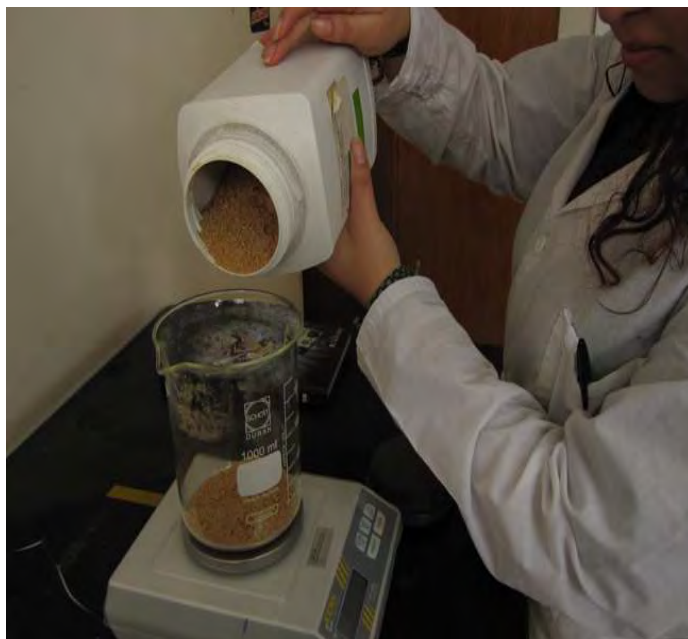
**Figura 7.** Equipo de filtración para esterilizar

## **2. Pesaje de reactivos**

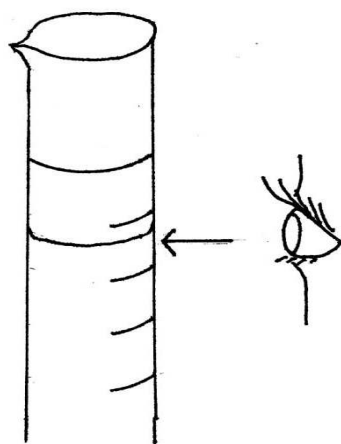
Se debe utilizar una balanza adecuada y confiable. Las balanzas analíticas que pesan cantidades pequeñas de reactivos son muy delicadas, siendo necesaria su ubicación en un sitio fijo, evitando moverla ya que se puede descalibrar o dañar. Para pesar generalmente se usa un papel de celofán para colocar el reactivo y evitar el contacto con el plato de la balanza (Figura 8). Al pesar cantidades importantes de un compuesto en una balanza común, éste puede pesarse directamente, colocándolo en una botella o Erlenmeyer (Figura 9). Cuando el reactivo que se está pesando se pone en exceso, no se debe devolver a su frasco original. Para medir reactivos en presentación líquida, se usan diferentes instrumentos como se muestra en la Figura 10.



**Figura 8.** Uso de papel de celofán para pesaje de reactivos



**Figura 9.** Pesaje de reactivos directamente en Beaker o Erlenmeyer



**Figura 10.** Toma de muestras para medir o para pesar reactivos líquidos

### 3. Uso del potenciómetro

#### 1). Calibración del equipo

Encender el equipo, y en un vaso de precipitado agregar una cantidad de solución tampón pH 7 para que el electrodo del potenciómetro al ser introducido quede sumergido (unos 2 cm). Introducir el electrodo en esta solución, agitando suavemente y calibrar hasta que la lectura se estabilice en pH 7. Una vez

obtenida la lectura, debe lavarse el electrodo con agua destilada y secarse cuidadosamente con una toalla de papel. Posteriormente, en un vaso de precipitado agregar una cantidad de solución tampón pH 4 (si las soluciones que se analizarán son ácidas) o pH 10 (si las soluciones que se analizarán son básicas), y repetir las instrucciones previas. El valor de pH que debe aparecer en la pantalla del equipo debe ser 4 ó 10 según la solución utilizada, de esta forma el equipo quedará calibrado y podrá procederse a medir el pH de la muestra.

## 2). Ajuste del pH de soluciones

La muestra que se analizará debe ser introducida en un vaso de precipitado o Erlenmeyer para facilitar la medida. El electrodo debe sumergirse unos 2cm, haciendo una agitación constante y suave. Al estabilizarse la lectura, anotar el valor y ajustar al pH necesitado: para aumentar el pH se usa hidróxido de sodio NaOH, carbonato de sodio  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  o hidróxido de calcio  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  y para reducirlo, se usa ácido sulfúrico  $\text{H}_2\text{SO}_4$  o ácido clorhídrico HCl. Una vez realizado este procedimiento, el electrodo debe lavarse con agua destilada y secarse como se indicó anteriormente. Al tomar mínimo dos medidas, los valores del pH no deben diferir en más de 0.2 para considerarlos como aceptables.

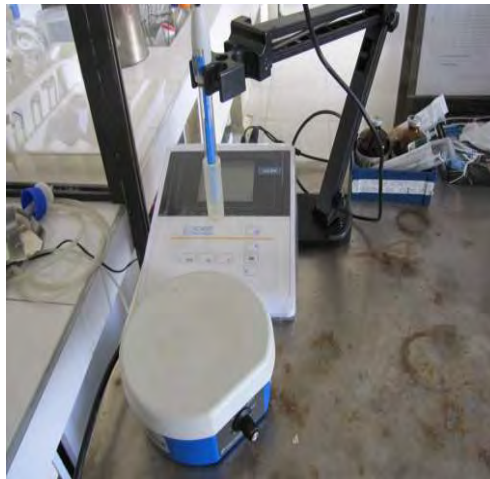


Figura 11. Potenciómetro y agitador magnético

## 4. Preparación de caldos y medios de cultivo

### 1). Preparación de tapones de algodón

Para hacer un tapón de algodón para un tubo de ensayo de 15cm de largo y 15mm de diámetro, se preparan dos tiras de algodón de aproximadamente 4 x 30-40 cm y 7 x 30-40 cm respectivamente (Figura 12). Primero se enrolla la tira de 4cm de ancho a lo largo haciendo un cilindro de forma apretada de más o menos 8mm de diámetro, después el cilindro hecho se coloca en la tira de algodón de 7cm de ancho dejándolo hacia un lado (no al borde, ni centrado) y se enrolla nuevamente a lo largo de forma apretada, teniendo en cuenta de doblar ambos extremos hacia adentro para finalizar el tapón, de esta manera se obtiene un

tapón con cabeza un poco más grande (Figura 13). Antes de usar los tapones en los tubos de ensayo o botellas se pueden esterilizar en seco. Una alternativa más moderna es la utilización de tapones de caucho o de silicona adaptados a los tubos de ensayo o a los Erlenmeyer.



**Figura 12.** Procedimiento para hacer un tapón de algodón



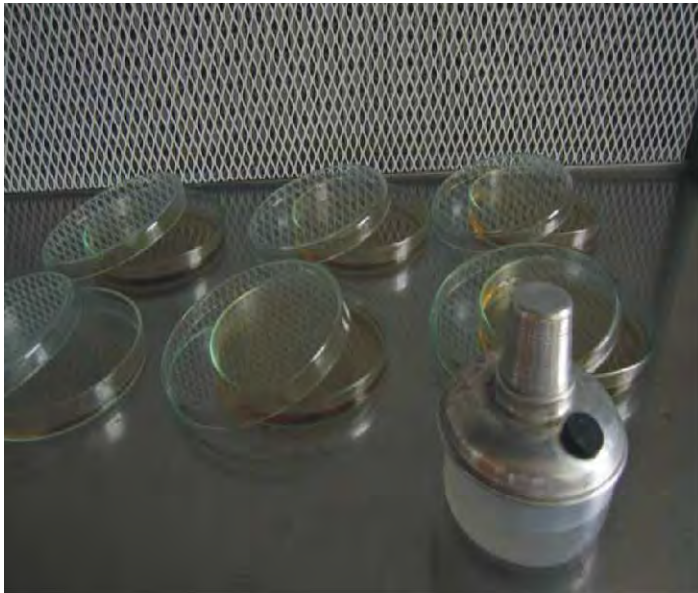
**Figura 13.** Tapón de algodón con forma ideal

## **2). Preparación de cultivos en caja de Petri y en tubos de ensayo**

Los medios de cultivo que incluyan Agar-Agar pueden servirse en los tubos de ensayo antes de autoclavarlos. Para el caso de cajas de Petri el medio de cultivo debe prepararse justo antes de su esterilización. En caso de que el Agar haya sido preparado previamente en un Erlenmeyer y se encuentre en estado sólido, debe disolverse primero en un baño María o en un horno microondas. Nunca debe hacerse este procedimiento directamente con la llama del mechero. Después de disuelto el Agar, mezclar con los otros reactivos del cultivo y esterilizar. Luego, servir en cabina de flujo laminar el medio de cultivo en cajas de Petri previamente esterilizadas y dejarlas parcialmente tapadas (Figura 14). Después de solidificarse el medio y desaparecer la condensación en la tapa de la caja de Petri, ésta debe taparse completamente.

Para llenar los tubos de ensayo con medio de cultivo recién autoclavado, éstos deben esterilizarse previamente, el medio se distribuye con un dispensador (Figura 15),

reemplazando el procedimiento en un baño María. El dispensador debe limpiarse con agua caliente después de su uso



**Figura 14.** Preparación de medios de cultivo en cabina de flujo laminar



**Figura 15.** Dispensador de medio de cultivo líquido

## **5. Uso de microscopio óptico**

El microscopio óptico consta de tres sistemas. a) Sistema mecánico: todas las partes que sirven de soporte al microscopio: el brazo, el pie o soporte, el carro o la platina y el revolver; b) Sistema de iluminación: las fuentes de luz o foco, diafragma, y el condensador; c) Sistema óptico: los oculares y los objetivos.

## 1). Procedimiento para su uso

Se prende el microscopio y se enciende la lámpara. Posteriormente, se coloca la lámina porta-objetos con la muestra que se va a observar, abriendo las pinzas metálicas y sujetándola con cuidado. Se acomodan los oculares de tal forma que se puedan observar las imágenes en un solo campo. Se debe mover el carro del microscopio óptico para centrar la imagen con los objetivos. Para dar inicio al análisis de la muestra, poner el objetivo de menor aumento 5x en posición de uso (se puede iniciar la observación en 10x cuando la muestra es de bacterias) y se sube la platina (si el microscopio se guardó de forma correcta, la platina debe estar abajo). Nunca se debe empezar a observar con el objetivo 40x o 100x. Es necesario mover el revolver a la derecha o a la izquierda, para que quede en la posición correcta.

Para enfocar se debe acercar a la muestra el lente del objetivo, empleando el tornillo macrométrico (se hace mirando directamente y no a través del ocular, ya que si no se tiene cuidado se puede incrustar el objetivo en la lámina, lo cual puede rayar el lente y romper la lámina porta-objetos que contiene la muestra). Luego de realizado este acercamiento, se mira a través de los oculares y con el macrométrico se separa o se acerca según sea el caso. Esto debe hacerse de forma lenta, cuando se localice y se enfoque la imagen que se desea analizar, se puede utilizar el micrométrico para mejorar la calidad y el enfoque de la imagen.

Cuando la imagen está enfocada se puede cambiar el aumento del objetivo. Al pasar a un objetivo mayor se puede perder la calidad de la imagen, siendo necesario un pequeño ajuste del micrométrico para volver a enfocar la imagen. Si ésta se perdió por completo, es preferible volver a enfocar con el objetivo de menor aumento y repetir los procedimientos descritos anteriormente. Al usar un objetivo de mayor aumento, dado que se ubica a menor distancia de la muestra, se debe tener cuidado para que el lente no roce la lámina que contiene la muestra.

Para usar el objetivo de inmersión 100x se debe bajar un poco el carro y girar el revólver hacia el objetivo de 100x dejándolo a medio camino entre éste y el de 40x. Observar el punto de luz donde se va a enfocar y poner una gota de aceite de inmersión sobre éste, girar suavemente el revólver hasta la posición del objetivo de inmersión. Al subir el carro lentamente hasta que el lente toque la gota de aceite, se debe mirar el objetivo, y enfocar con el micrométrico. Para enfocar otro campo se debe bajar el carro y repetir los pasos mencionados anteriormente.

Cuando se termine de usar el objetivo de 100x, se baja el carro y se coloca el objetivo de menor aumento girando el revólver. Se retira la lámina observada y se limpia el aceite de inmersión del objetivo empleando papel especial de limpieza óptica o algodón impregnado en alcohol al 70%.

Se debe tener cuidado al usar el objetivo 40x, ya que se mancharía con aceite de inmersión si se observa una preparación previamente enfocada con el objetivo de inmersión.



**Figura 16.** Microscopio óptico

Después de utilizar el microscopio óptico se deberá apagar la lámpara y luego el microscopio. Se quita la lámina con la muestra y se baja la platina. Se mueve el carro para que quede en la posición correcta. Se limpian los oculares y los objetivos con algodón humedecido con solución de alcohol al 70%. Si es necesario mover o transportar el microscopio se toma del brazo con la mano derecha, con la mano izquierda se apoya con la base del mismo, así como también se debe apoyar al cuerpo.

## II . Métodos para experimentos con hongos

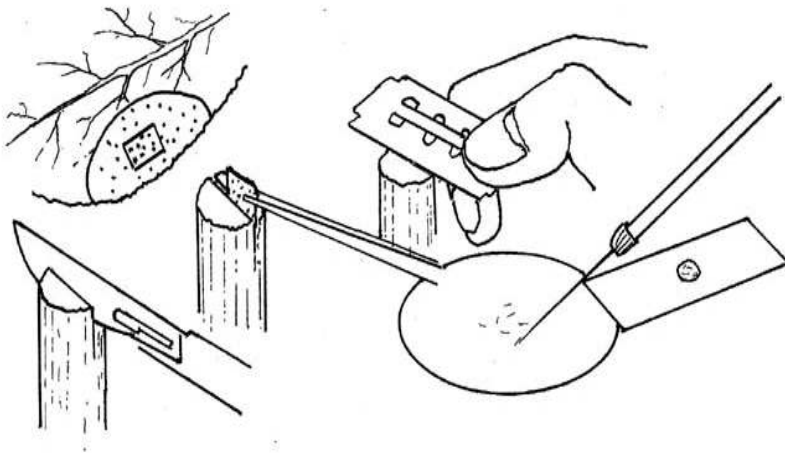
### 1. Observación

Antes de realizar una observación de hongos bajo microscopio, es importante buscar partes de la planta como hojas, tallos u otra parte con síntomas claros, como pequeños puntos negros o estructuras donde se presenta micelio (Figura 17). Hacer pequeños cortes de 5x5 mm donde se presenten los pequeños puntos. Insertar el corte en el medio de un corcho o en un fragmento de médula de saúco. Realizar cortes con bisturí o cuchilla a lo largo de las fibras del material (Figura 18). Escoger los cortes más delgados con una aguja de disección o pincel fino y trasladar a una lámina con una gota de azul de lactofenol (ácido láctico: fenol: glicerina: agua 25%, v/v).

**Nota: Al cubrir la preparación con una laminilla se debe verificar que no queden burbujas de aire. Para la observación de Basidiomicetos, se usa 0.3% de KOH en cambio de lactofenol.**



**Figura 17.** Hoja con síntomas de enfermedad



**Figura 18.** Proceso de disección a mano alzada

Primero hacer un corte a la médula del saúco o a un corcho a lo largo con una cuchilla y luego insertar el espécimen enfermo entre el corte del saúco. Posteriormente, se hace un corte horizontal muy delgado con una hoja de maquinilla de afeitar. Se escogen los cortes más delgados con una aguja de disección o con pincel fino y se colocan en una lámina para observar la muestra en el microscopio.

## **2. Preparación de cultivos para hongos**

### **1). Preparación de PDA (Papa-Dextrosa-Agar)**

Se puede usar PDA comercial que se prepara según la etiqueta. En caso de preparar directamente con papa, para preparar un litro de medio de cultivo, se pesan 200 gramos de papa limpia sin cáscara, después se corta la papa en cubos de más o menos 1cm y se adicionan a un litro de agua en un Erlenmeyer o vaso de precipitado. Calentar el envase por una hora al Baño de María. Después de enfriar, se filtra el líquido usando un paño o tela de algodón y se ajusta a un litro en un Erlenmeyer. Al líquido se le adicionan 20 g de

Agar-Agar, 15 g de dextrosa y se disuelven todos los ingredientes al Baño de María. Para hacer el cultivo en tubos de ensayo, adicionar el medio con dispensador (Fig. 15). Otros medios de cultivo usados para el aislamiento y crecimiento de hongos se describen en las Tablas 1 a 4.

## Preparación de diferentes medios de cultivo para el crecimiento de hongos

### Tabla 1. Medio Agar Harina de maíz (Corn meal)

**Ingredientes:**

Harina de maíz	30g
Agar	20g
Agua corriente	1L

**Procedimiento:**

Pesar 30 g de harina de maíz y adicionar a 500 mL de agua en un Erlenmeyer y calentar una hora al Baño de María. Filtrar el líquido mediante una tela de algodón y adicionar 20 g de agar. Disolver el agar completamente al Baño de María. Ajustar el volumen a un litro. Autoclavar a 121°C por 20 min.

### Tabla 2. Medio Agar extracto de malta

**Ingredientes:**

Extracto de malta	20g
Agar	20g
Agua corriente	1L

**Procedimiento:**

Pesar 20 g de agar y disolverlo completamente en 500 ml de agua al Baño de María. Adicionar 20 g de extracto de Malta y ajustar el volumen a un litro. Autoclavar a 121 °C por 20 min.

### Tabla 3. Medio Agar extracto de malta (Formulación Blakeslee`s)

**Ingredientes:**

Extracto de malta	20g
Agar	20g
Glucosa	20g
Agua corriente	1L

**Procedimiento:**

Pesar 20 g de agar y disolverlo completamente en 500 mL de agua al Baño de María. Adicionar 20 g de extracto de Malta y 20 g de glucosa. Ajustar el volumen a un litro. Autoclavar a 121 °C por 20 min.

### Tabla 4. Agar V8 (Formulación 2)

**Ingredientes:**

V8 jugo de vegetales	400mL
Carbonato de calcio	4.5g
Agar	20g
Agua destilada	800mL

**Procedimiento:**

Mezclar 400 mL de V8, 200 mL de agua y 4.5 g de CaCO<sub>3</sub>. Tomar 200 mL del sobrenadante y después centrifugar a 5,000 rpm durante 10 minutos, añadir 700 mL de agua y ajustar a pH 6.0 con NaOH 10 %. Añadir 20 g de agar, ajustar a un litro y autoclavar a 121 °C por 20 min.

### 3. Aislamiento de hongos

#### 1). Aislamiento a partir de tejido vegetal

Realizar cortes de 5x5 mm de tejido vegetal en los bordes del síntoma. Esterilizar los cortes con etanol al 70% por 30 segundos, posteriormente con hipoclorito de sodio al 1% por 5 minutos. Enjuagar 2 veces con agua destilada estéril. Absorber el agua de la superficie con papel toalla estéril. Poner los cortes sobre PDA en caja de Petri (Figura 19). Incubar las cajas en una incubadora a 25 °C. Observar el crecimiento bajo microscopio, cortar una punta de hifa de hongo y trasladarla a un tubo con PDA. Para el aislamiento a partir de material vegetal como por ejemplo de peciolo, tallo, etc. se debe tener en cuenta un tiempo de esterilización más largo con hipoclorito que puede llegar hasta 20 minutos o más. En este caso, se deben hacer enjuagues sucesivos en agua estéril (Figura 20). Siguiendo los procedimientos indicados, se pueden aislar los patógenos de forma efectiva a partir de material enfermo.

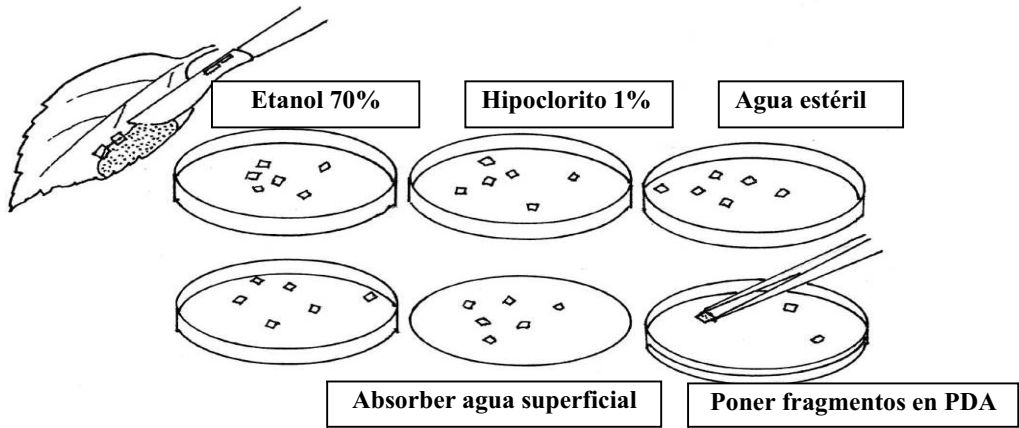


Figura 19. Proceso común para aislar hongos a partir de tejido vegetal (hojas)

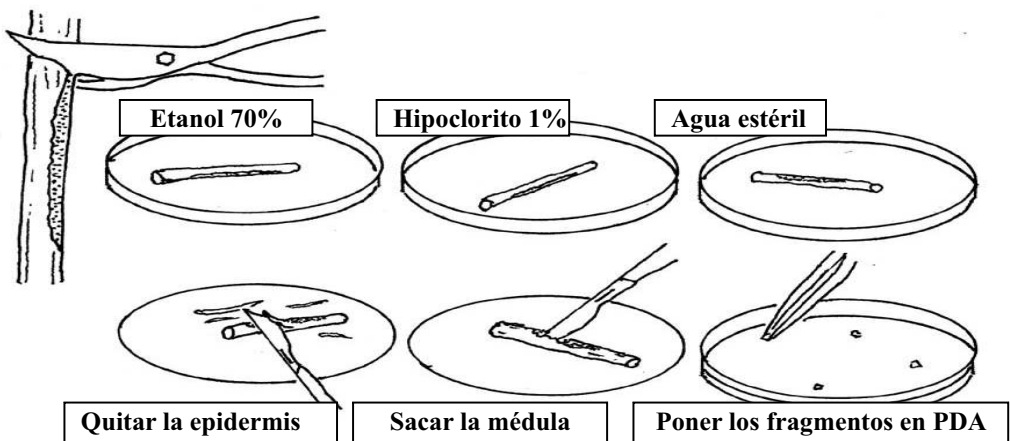


Figura 20. Proceso de aislamiento de hongos a partir de tejido vegetal (tallos)

## 2). Aislamiento de esporas de hongos

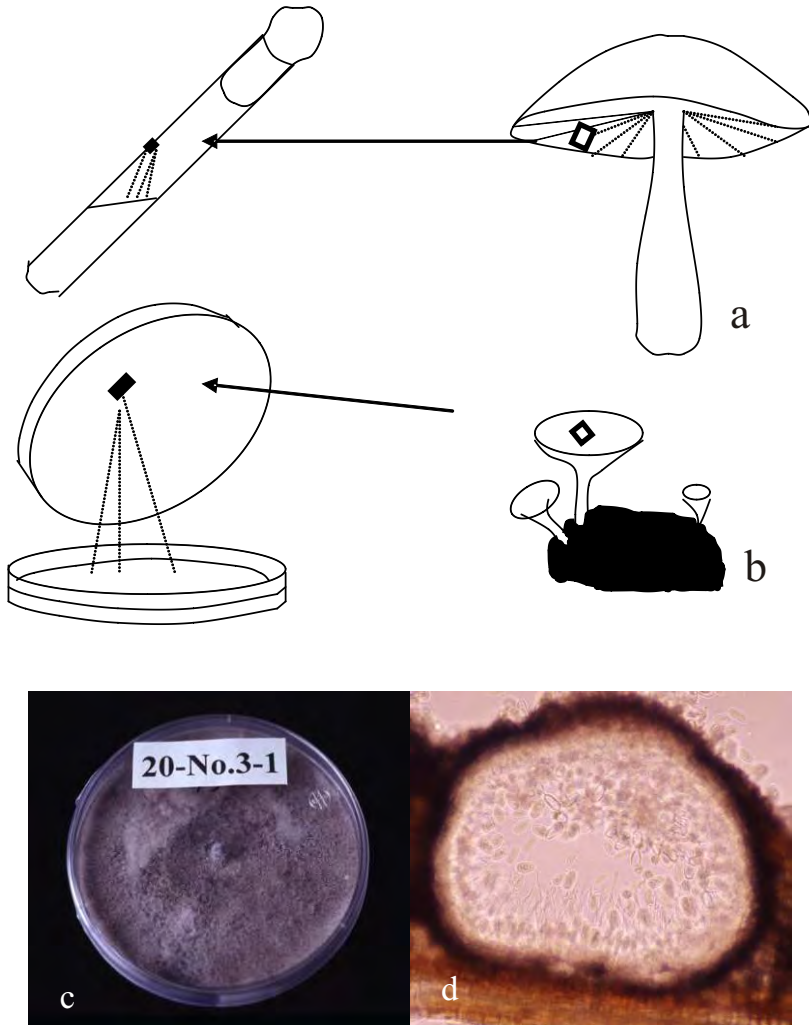
Si se cuenta con un micromanipulador, se puede hacer el aislamiento de esporas directamente con este equipo, de lo contrario se puede usar un asa modificada para la manipulación de éstas (Figura 21). Picar el órgano de la planta incluyendo las esporas del hongo con un bisturí o cuchilla sobre una lámina estéril. Agregar 1 ó 2 gotas de agua estéril y 1 gota de solución de Sulfato de Cobre al 0.01% ( $\text{CuSO}_4$ ) sobre la muestra. Trasladar la suspensión de esporas con un asa bacteriológica en Agar-Agua (2%) en caja de Petri incluido dextrosa (1%) haciendo líneas sobre el medio. Incubar a 25 °C por una noche. Trasladar las esporas germinadas con el asa especial de forma inclinada (Figura 21) observando bajo microscopio. En el microscopio instalar lentes de objetivo de 5x enfrente a uno de 10x para facilitar la observación de esporas en la caja Petri (Figura 22). En el caso de Basidiomicetos y de Ascomicetos se pueden hacer aislamientos directamente del basidiocarpo (Figura 23 a) o del ascocarpo (Figura 23 b).



**Figura 21.** Asa modificada para el aislamiento de esporas



**Figura 22.** Microscopio acondicionado con un objetivo de 5x enfrente a uno de 10x



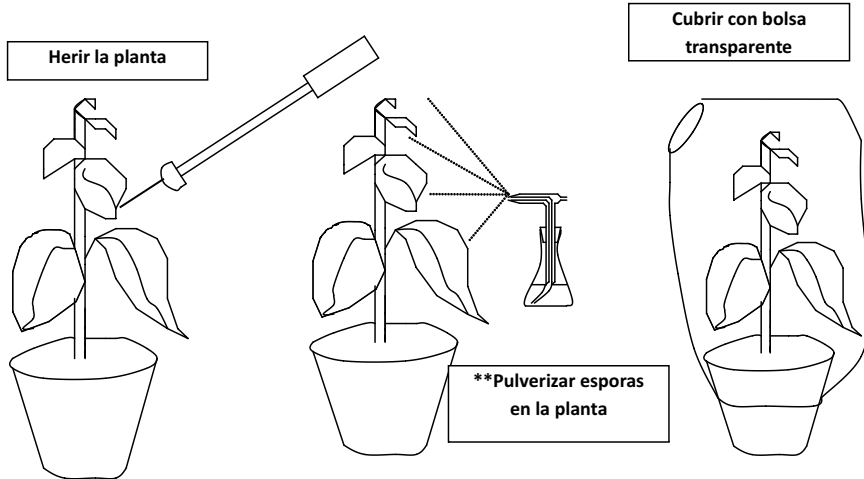
**Figura 23.** Aislamiento de esporas a partir de: a. Un basidiocarp. b. Un ascocarp. c. Cultivo puro de un hongo d. Esporas producidas en picnidio

#### 4. Inoculación de una planta con hongos

##### 1). Inoculación con esporas de hongos

Cuando sea posible obtener las esporas de un hongo de un cultivo puro, éstas se pueden usar para la inoculación, para lo que se adiciona una solución de dextrosa al 1% a una caja de Petri que contiene el hongo cultivado. Filtrar la solución por medio de gasa estéril para eliminar las hifas del hongo. Medir la concentración de esporas con una cámara de recuento de Neubauer. Preparar la suspensión de concentración entre 5,000-10,000/mL de esporas. Aplicar sobre el tejido blanco la suspensión valiéndose de un pulverizador o atomizador pequeño (Figura 24). Cuando se haga la inoculación por primera vez, es recomendable hacer heridas en la zona de la planta que se va a inocular usando un grupo de agujas.

Después de la inoculación, trasladar las plantas a una incubadora que pueda mantener humedad del 100% y una temperatura idónea. Si no hay incubadora, poner un algodón humedecido con agua y cubrir la planta con una bolsa de plástico transparente (Figura 24). Mantener las plantas en la incubadora o cubiertas por bolsas por uno o dos días, después de este tiempo sacar las plantas de la incubadora o de la bolsa de vinilo y observar la expresión de los síntomas.



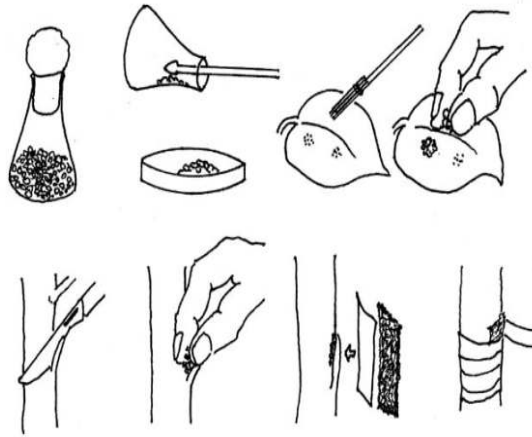
**Figura 24.** Proceso de inoculación con una suspensión de esporas de un patógeno  
**\*\*Pulverizar la suspensión de esporas y cubrir la planta con una bolsa de plástico transparente después de realizada la inoculación**

Poner una solución de dextrosa al 1% en el cultivo puro del patógeno y agitar para separar las esporas. Después de filtrar la suspensión por medio de gasa estéril, se ajusta la concentración de esporas y se aplica mediante pulverización en la zona de la planta en la que se hicieron las heridas. Después de aplicar el inóculo la planta debe mantenerse con alta humedad.

## 2). Inoculación con micelio de hongo

Cuando sea difícil obtener esporas de un hongo, la inoculación puede hacerse con el micelio producido en medio de cultivo. Para esta inoculación, se puede realizar un cultivo en medio de salvado de arroz con salvado de trigo (salvado de arroz : salvado de trigo: agua (1:1:1)) o en cuchuco de cebada con salvado de trigo (cuchuco de cebada : salvado de trigo : agua (1: 1: 1.5)). Estos medios de cultivo deben autoclavarse por 30 minutos, luego inocularse. Para hongos de lento crecimiento, se debe mezclar el cultivo una o dos veces. Después de obtener buen crecimiento del hongo, sacar el micelio de hongo crecido en el sustrato desde el Erlenmeyer a una caja de Petri estéril. Después de hacer las cortaduras a las plantas en el tallo o en las hojas con cuchilla o heridas con un grupo de agujas, se debe

pegar la mezcla de micelio crecido en el cultivo, al corte realizado en la planta y cubrir la mezcla con plástico o parafilm. Mantener la planta uno o dos días en condición de humedad alta como se observa en la figura 24, antes de realizar las observaciones (Figura 25).

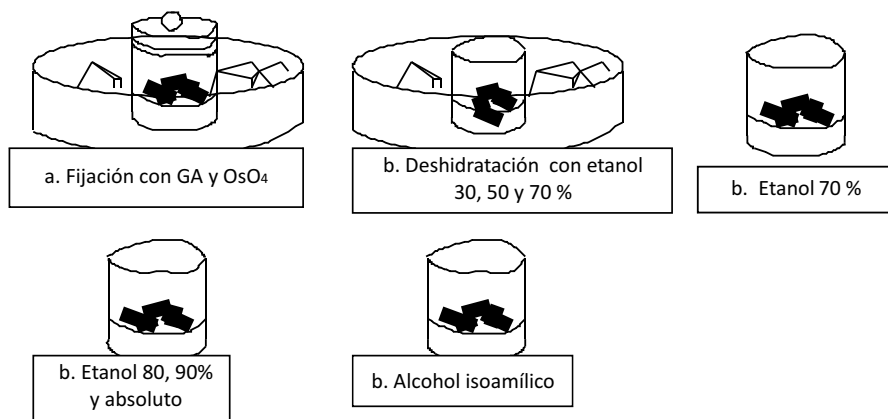


**Figura 25.** Inoculación con micelio de hongo producido en cultivo

## 5. Preparación de muestras para observar bajo Microscopio Electrónico de Barrido (SEM)

Cortar un fragmento de hoja u otra parte vegetal que tenga esporas del patógeno del tamaño del porta-muestra que se utilizará para el SEM. Colocar las muestras en una botella pequeña con tapa de vidrio ajustable y poner una solución de glutaraldehído al 5% (GA 5% en solución tampón de fosfato al 0.1% y pH 7.0 con sacarosa 0.2M). Esta preparación se puede conservar varios meses en el refrigerador a 5 °C. Usar la solución de tetróxido de osmio al 1% para post-fijación. El procedimiento para la preparación de la solución de tetróxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) aparece en la p.37 (capítulo observación en Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM)). Hacer post-fijación en un baño de hielo. Después de aclarar con la solución reguladora, agregar 1 ó 2 ml de solución de tetróxido de osmio y el mismo volumen de solución de Dalton en la botella y fijar por una hora. Después de la post-fijación, hacer deshidratación de la muestra con una serie de alcohol (30, 50, 70, 80, 90%, alcohol absoluto y alcohol isoamílico) cada 20 minutos excepto para el alcohol al 70% para el cual se recomienda utilizar una bomba de vacío, lo que permite realizar descompresión lenta para regular la presión interna y facilitar la deshidratación obteniendo de esta forma un buen resultado. Es necesario dejar la muestra durante una hora para su deshidratación con alcohol al 70%. Este proceso y el que se mencionará a continuación se realizan a temperatura ambiente. Para este proceso es mejor manejar una botella que facilite la medición y el pesaje. Después del tratamiento con alcohol isoamílico (Figura 26) se hace deshidratación crítica en caja de malla en el dispositivo de descompresión. Para desplazar el alcohol isopropílico de la muestra, se insufla dióxido de carbono líquido, el cual por el intercambio de gases desplaza a éste. Posteriormente, el dióxido de carbono se somete a

elevada temperatura hasta alcanzar la temperatura crítica (punto de ebullición), momento en el que se cierra el paso de CO<sub>2</sub> y se efectúa lentamente la apertura de la válvula de salida, permitiendo la regulación de la presión interna, el escape de gas y la descompresión lenta. Un día después, la muestra estará lista manteniendo la forma natural de los materiales.



**Figura 26.** Preparación de muestras para observar bajo Microscopio Electrónico de Barrido (SEM)

- a. Fijación de la muestra (solución de glutaraldehído y de tetróxido de osmio)
- b. Deshidratación.

Una vez obtenida la muestra deshidratada, ésta se pega al porta-muestra con pegamento de plata para posteriormente cubrir con gas de oro.

El uso de este equipo debe hacerse según la guía. Dado que la solución de tetróxido de osmio es muy tóxica, se debe tener cuidado de no tocarla con la mano directamente.

#### 4. Identificación de hongos

Los hongos pueden ser tomados para su identificación de la muestra vegetal (Figura 27), o de un cultivo haciendo una impronta con cinta pegante. En otros casos, éstos deben ser cultivados en cajas de Petri para hacer láminas o en microcultivos con agar agua o medios traslúcidos que permitan su análisis en el microscopio óptico. Muchos aislamientos pueden ser identificados utilizando los caracteres fenotípicos como la morfología macro y microscópica (Figura 28). Lo anterior facilita la observación y análisis de las estructuras microscópicas como el tipo, tamaño, forma y disposición de las esporas y el tamaño y el color de las hifas. También es importante tener en cuenta si las hifas tienen paredes transversales (septos). En el caso de observación de improntas logradas con cinta, ésta se pone sobre la muestra con el lado adherente hacia abajo, en la superficie de una colonia del hongo y luego se coloca en una lámina porta-objetos sobre una gota de azul de lactofenol y se cubre con una laminilla cubre-objetos. La preparación se examina con los objetivos de 10x y 40x para analizar el tipo de esporas y su disposición en el conidióforo. Cuando se

trata de una preparación a partir de un cultivo, con una aguja de disección se toma una porción de las colonias crecidas en medio de cultivo, se transfiere a una lámina que contiene una gota de azul de lactofenol o de agua, se cubre con una laminilla y se observa en el microscopio. En varias ocasiones es necesario hacer microcultivos para observar la producción de esporas. Para esto, con la ayuda de un bisturí se corta un pequeño cubo de agar estéril o de medio de cultivo translúcido y se coloca sobre una lámina, posteriormente se inocula en los cuatro extremos con el hongo y se cubre con una laminilla estéril. Esta preparación se coloca dentro de una caja de Petri que contiene papel de filtro y una barra de vidrio que permite que la lámina esté separada del papel (Figura 29). De tal forma que no haya contacto de la lámina con el papel cuando a éste se le adicione agua a saturación para mantener la humedad. Esta preparación se incuba durante cuatro a diez días. Cuando las esporas sean evidentes, el cubreobjeto se retira y se coloca sobre una lámina que contiene una gota de azul de lactofenol o de agua.

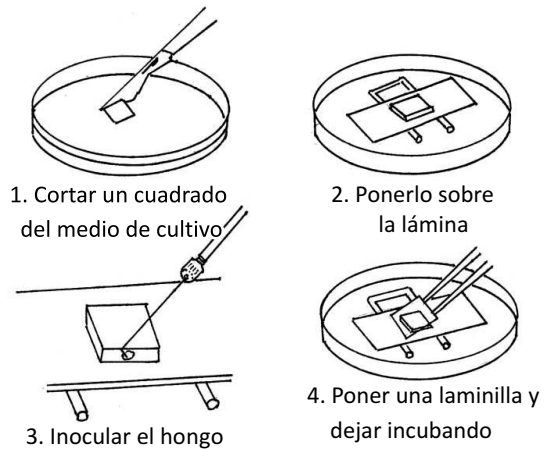
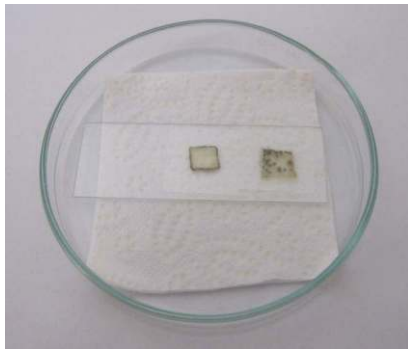
Recientemente han cobrado auge los métodos para la identificación molecular. En ambos casos los aislamientos se pueden identificar a nivel de género y de especie. Cuando se realiza identificación de hongos por métodos tradicionales, se deben seguir claves taxonómicas según el caso.



**Figura 27.** Material vegetal enfermo por *Botrytis cinerea*



**Figura 28.** Cultivo de *Botrytis cinerea* en caja de Petri



**Figura 29.** Microcultivo en lámina de crecimiento en cámara húmeda

### **Bibliografía relacionada con identificación de hongos**

Barnet, H. L., Hunter, B. B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4<sup>th</sup>. Ed. APS Press St. Paul, Minnesota. Pp. 218.

Carmichael, J. W., Bryce Kendrick W., Connors, I. L. and Sigler, L. 1980. Genera of Hyphomycetes. The University of Alberta Press, Edmonton, Alberta, Canada. Pp. 386.

Domsch, K. H., Gams, W. and Anderson, T.-H. 1980. Compendium of soil fungi. Academic Press, London. Vol. I, 859 p. and II. Pp. 405.

Hanlin, R.T. 1990. Illustrated genera of Ascomycetes. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. Pp. 263.

Kirk, P. M., Cannon, P. F. Minter, D. W., Stalpers. J. A.(ed.) 2008. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi,. 10th edn. CAB International, Wallingford, Oxon, UK. Pp. 771.

Petrak, F. 1969. Index of fungi: a supplement to Petrak's lists, 1920-1939. Ed. Commonwealth Mycological Institute (Great Britain). Pp. 236.

Saccardo, P.A. 1884. Sylloge Fungorum III. Padova, Italia. Pp. 860.

Samson, R. A., Hoekstra, E. S. and Frisvad, J. C. 2004. Introduction to food and airborne fungi. Sixth Edition. CBS, Utrecht. Pp. 389.

Sutton, B. C. 1980. The Coelomycetes. CMI. Kew, Surrey England. Pp. 696.

Von Arx, J. A. 1974. The genera of fungi sporulating in pure culture. J. Cramer. Leutershausen Germany. Pp 315.

Páginas importantes: <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>  
<http://www.speciesfungorum.org/GSD/GSDquery.asp>

### III. Métodos para experimentos con bacterias

#### 1. Observación de bacterias

El tamaño de las bacterias es muy pequeño por eso la observación de su morfología es difícil bajo el microscopio de luz. Sin embargo, cuando se observan muestras de cortes enfermos, en el microscopio se pueden ver bacterias agrupadas que emanan de la estructura de la planta. Asimismo, es posible observar su movimiento en una muestra con agua sobre una lámina.

#### 1). Tinción simple

Con un asa bacteriológica tomar una muestra, tocando ligeramente un cultivo de la bacteria crecida previamente durante 24 horas en agar YP o en otro medio de cultivo. Mezclar esta muestra en 1 mL de agua estéril. Diluir bien la suspensión y poner una gota sobre una lámina limpia, extenderla cerca de 1 cm de diámetro y dejar secar a temperatura ambiente. Fijar la muestra sobre una llama suave dos o tres veces, teniendo cuidado de no quemarla y poner sobre la muestra seca unas gotas de solución de Fucsina. Después de 1 ó 2 minutos, lavar la lámina con agua corriente indirecta y adicionar una gota de agua sobre la muestra seca. Cubrirla con la laminilla y absorber el agua sobrante con un papel de filtro (Figura 30). La forma de preparación de la fucsina se describe abajo.

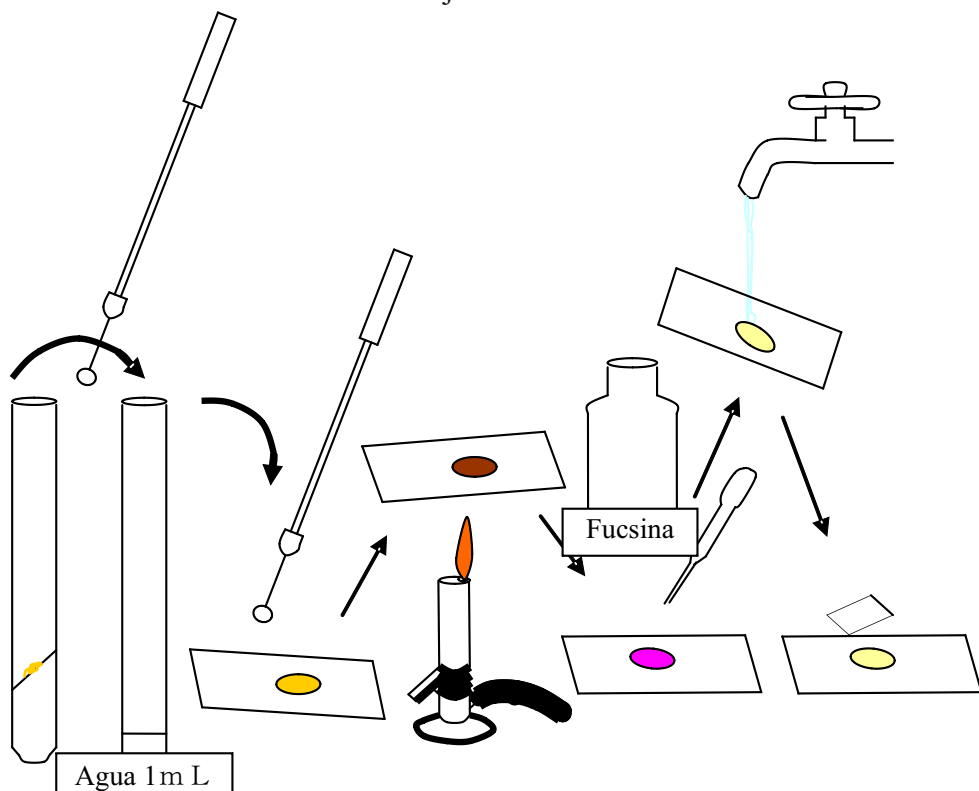


Figura 30. Proceso de tinción simple de bacterias

## Fucsina

Solución A: Disolver 10 g de fucsina básica con 100 mL de etanol al 95%.

Solución B: Disolver 5 g de fenol con agua destilada.

Antes de usar mezclar 10 mL de solución A con 100 mL de solución B.

## 2). Tinción de Gram

En este caso se usa el mismo procedimiento para preparar y fijar la muestra. Poner sobre la muestra unas gotas de solución de Gram y dejar actuar por un minuto (1), lavar con agua (2) y absorber el agua sobrante (3) (Figura 31). Poner unas gotas de solución de lugol y dejar por un minuto (4). Después lavar la lámina con agua indirecta (5) y absorber el agua sobrante (6), poner alcohol continuamente sobre la muestra hasta que deje de fluir el color (máximo un minuto) (7). Después lavar la lámina con agua indirecta y aplicar solución de safranina por 10 segundos (8) (Figura 31). Después limpiar con agua y observar bajo el microscopio. Para este fin se debe usar aceite de inmersión y la observación final se hace usando el objetivo de 100x. Las bacterias Gram positivas aparecen de color morado, mientras que las Gram negativas se ven de color rojo. También se pueden identificar las bacterias Gram negativas de la siguiente manera: Con un asa se toma una muestra de bacterias cultivadas durante 24 horas en agar YP, se mezcla con una gota de KOH al 3% aplicada en la lámina sobre la muestra. Las bacterias Gram negativas se tornan pegajosas.

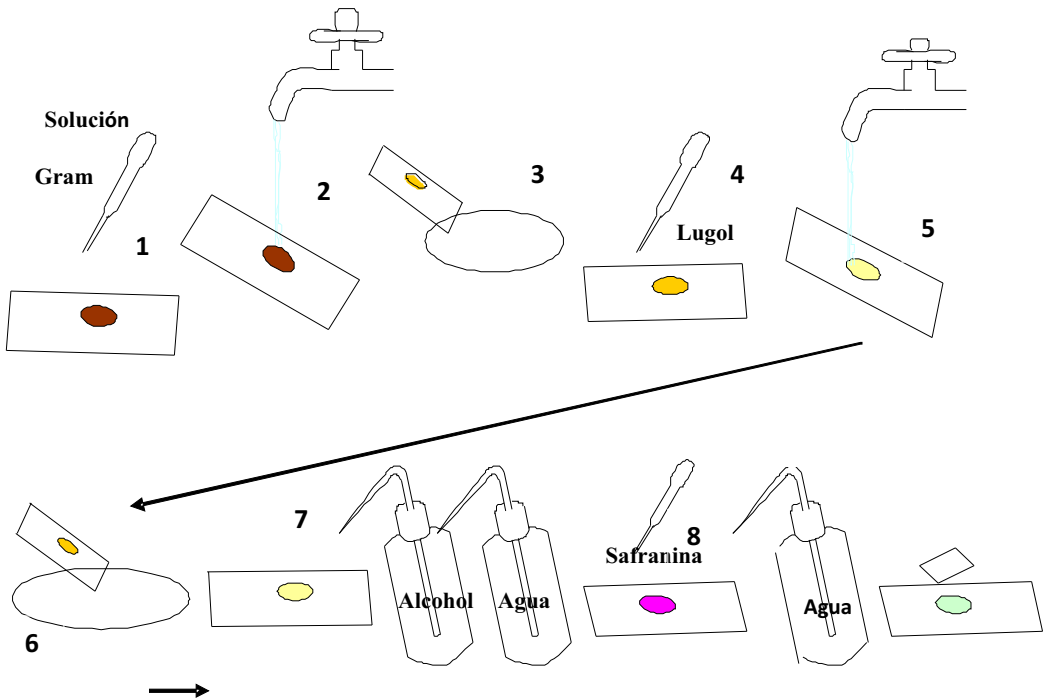


Figura 31. Procedimiento para la tinción de Gram

Después de secar y fijar la muestra como se hizo en la Figura 30, se pone una gota de la solución de Gram, se deja por un minuto, se lava con agua corriente y se absorbe el agua remanente con un papel de filtro. Poner la solución de lugol y dejarla actuar durante un minuto, lavar con agua y agregar alcohol al 95% durante máximo un minuto. Luego, se hace tinción con solución de safranina por 10 segundos, se lava con agua y se pone una laminilla sobre la muestra, se pone una gota de aceite de inmersión y se observa bajo microscopio.

### **Solución colorante de Gram**

Solución de conservación A: Disolver 7g de cristal violeta en 100 mL de etanol al 95%

Solución de conservación B: Disolver 5g de fenol en 100 mL de agua destilada.

Antes de usar, mezclar 10mL de solución A y 100mL de solución B.

### **Solución colorante de lugol**

Se prepara una solución de 10g de yoduro de potasio en 100 mL de agua destilada, más 5 mg de yodo.

### **Solución de safranina**

Se prepara disolviendo 2.5g de safranina en 100 mL de etanol al 95%.

## **3). Tinción de Flagelos**

Con un asa bacteriológica se toma una muestra a partir de un cultivo de 24 horas en agar YP y se mezcla en 5 mL de agua. Sobre una laminilla se pone una gota de la suspensión y se deja secar. Se toma la laminilla con pinzas y se fija 2 ó 3 veces bajo la llama. Poner la solución de tinción de flagelos y calentar de nuevo bajo la llama hasta que desaparezca la turbiedad blanca. Dejar enfriar la laminilla hasta ver de nuevo la turbidez y lavar con un chorro de agua indirecta desde la cara inferior. Después absorber el agua sobrante con papel de filtro, se adiciona la solución de nitrato de plata y se calienta bajo la llama hasta observar vapor. Lavar la lámina con agua de forma indirecta, secar y observar bajo el microscopio. Para observar el montaje, primero enfocar con bajo aumento (5x) y luego observar con 100x usando aceite de inmersión. Si hay Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM), la observación se realiza con una solución de ácido fosfotúngstico al 2% (PTA).

### **Preparación de solución de ácido fosfotúngstico (PTA)**

Disolver 0.2g de PTA en 10 mL de agua destilada. Ajustar el pH de la solución a 7.0 con KOH 1N. Se puede conservar en una botella con tapa y bajo refrigeración. Poner un poco de solución en un envase pequeño para su uso.

### **Solución para tinción de flagelos**

Primero disolver el tartrato ácido de antimonio y potasio al 3% en agua y calentar. Después de enfriar la solución, añadir ácido tartárico al 20% en una proporción de 9 a 10 muy lentamente.

## **Solución de nitrato de plata**

Añadir 0.5 mL de amoníaco al 25-30% y 1mL de NaOH al 4% a 100 mL de nitrato de plata al 5%.

## **2. Ensayos fisiológicos**

### **1). Ensayo para determinar la oxidación o fermentación de azúcares**

Se usan dos tubos con medio de cultivo, uno tapado con parafina antes de ser incubado y el otro sin parafina antes de ser incubado. La bacteria debe cultivarse durante 24 horas en agar YP. Con un asa recta se pincha el cultivo y se inserta hasta el fondo del tubo. Se puede observar cambio en el medio a color amarillo luego de 24 horas a 28 °C al presentarse descomposición fermentativa, como por ejemplo *Erwinia carotovora*. Otras bacterias muestran un color amarillo pálido en el cultivo sin tapón de parafina, indicando oxidación del azúcar. La producción de gas, es indicada por el agrietamiento del medio de cultivo.

### **Preparación de medio de cultivo O.F. (Medio Basal de Hugh y Leifson)**

Disolver 2 g de peptona, 5 g de NaCl, 0.3 g de  $K_2HPO_4$ , 10 g de glucosa, 3 g de Agar-Agar y 10 mL de azul de bromotimol (BTB) al 0.4 % y ajustar a 1000 mL con agua destilada. Dispensar 5 mL de la solución en tubos de ensayo. Ponerle un tapón de parafina líquida a profundidad de 1 cm a la mitad de los tubos con medio de cultivo y autoclavar la totalidad de los tubos.

### **2). La reacción oxidasa de Kovac**

Poner unas gotas del reactivo de Kovac sobre un papel de filtro, sobre éste agregar una muestra de bacterias previamente cultivada durante 24 horas en agar YP al papel de filtro, valiéndose de un asa. Cuando el color del papel cambia a morado oscuro en menos de 10 segundos, significa que la prueba es positiva. Por ejemplo *carotovora* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* son positivas para esta prueba. *Ralstonia solanacearum* es negativa para la reacción.

### **Preparación del reactivo de Kovac (testigo Citocromo-c)**

Disolver tetrametil-p-fenilendiamina a una concentración de 1 %, inmediatamente antes del uso.

NOTA: El reactivo debe tener una coloración amarilla clara ó café clara.

### **3). Reducción de nitrato**

En este ensayo, se examina la capacidad nitrato reductora de una bacteria. Se inocula la bacteria en caldo YP con  $KNO_3$  0.1 % y se incuba por 5 días a 28 °C. Después se añade 1 mL de cada solución A y B al cultivo. Si el cultivo contiene nitrito, éste se torna de color de rojo o rosado. *Erwinia carotovora* y *Ralstonia solanacearum* son ejemplos positivos.

### **Preparación del reactivo de Griess**

Solución A: Disolver 0.8 g de ácido sulfanílico en 100 mL de ácido acético 5 N.

Solución B: Disolver 0.6 g de N,N-dimetil-1-naftilamina a 100 mL de ácido acético 5 N.

### **4). Asimilación de hidratos de carbono**

Si la bacteria usa hidratos de carbono, se puede observar su multiplicación y el cambio de color del cultivo a amarillo. A veces, el medio de cultivo toma la coloración amarilla aunque no haya multiplicación de la bacteria. En este caso, la bacteria inoculada causa directamente la oxidación del hidrato de carbono.

### **Preparación del cultivo de Ayres, Rupp y Johonson.**

Diluir 1 g de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 0.2 g de  $\text{KClO}$ , 0.2 g de  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 mL de solución de azul de bromotimol (0.4 %), 10 g del hidrato de carbono que se vaya a evaluar, 12 g de Agar, ajustar a 1000 mL con agua, ajustar pH 6.8. Dispensar en tubos de ensayo 5 mL del medio de cultivo, autoclavar e inclinar los tubos en pico de flauta para aumentar la superficie utilizable del agar.

Entre los hidratos de carbono tales como la L-ramnosa, L-arabinosa, D-celobiosa, D-trehalosa, D-manitol, salicina y DL-tartrato de sodio y potasio, etc son autoclavables. Pero la xilosa y la lactosa no deben autoclavarse, por eso tienen que esterilizarse con un filtro millipore y añadirse al medio de cultivo de Ayres, Rupp y Johonson previamente autoclavado y ligeramente caliente.

### **3. Aislamiento de bacterias a partir de material vegetal**

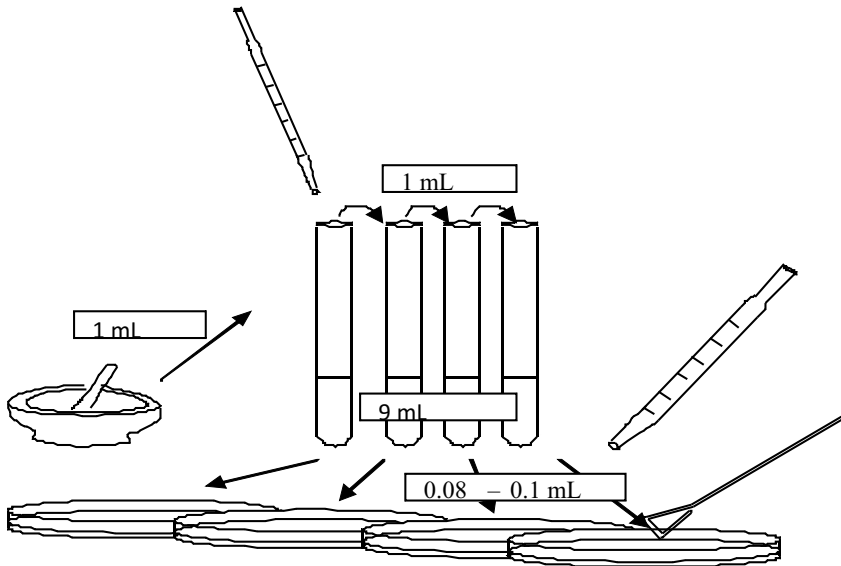
Para el aislamiento de bacterias, se debe lavar con agua la parte de la planta que muestra los síntomas. Esterilizar la superficie con etanol al 70% por unos segundos, luego lavar la superficie con hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto, enjuagar 2 veces consecutivas con agua estéril y triturar la planta en un mortero estéril con agua peptonada también estéril. Hacer diluciones: 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 etc. de la planta macerada (Figura 32). Trasladar 0.1 mL de cada dilución en medio YP. Los medios en cajas de Petri para el aislamiento tienen que secarse antes de uso. Cuando presentan mucha agua de condensación no se pueden obtener colonias independientes. Con un rastrillo extender el inóculo en el medio. Incubar las cajas a 28 °C entre 1 y 4 días hasta que aparezcan colonias diferenciadas. Con un asa redonda, sub-cultivar en tubos de ensayo las colonias que presenten características de color o de forma diferente. En este caso, los medios en tubos deben prepararse inmediatamente antes de su uso. Cuando han sido preparados con anterioridad debe verificarse que estén libres de contaminación y que no presenten agua de condensación.

### Preparación de medio de YP

Disolver 5g de extracto de levadura, 10g de peptona, 5g de NaCl, 15g de agar en 1000 mL de agua destilada y se ajusta el pH a 6.8.

### Agua Peptonada

Disolver 10 g de peptona, 5g de NaCl en 1000 mL de agua destilada y se ajusta el pH a 6.8.



**Figura 32.** Preparación de diluciones para aislamiento de bacterias

Para preparar las diluciones, tomar 1 mL de la suspensión y trasladarla a un tubo de ensayo que contenga 9 mL de agua peptonada. Ésta es la dilución  $10^{-1}$ , de la misma manera hacer diluciones sucesivas para obtener  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  etc. Para la siembra tomar con una micropipeta 0.08-0.1 mL de cada dilución y colocar sobre el medio de cultivo YP en caja de Petri. Si hay mucha agua en la caja de Petri con YP, se debe secar en cabina de flujo laminar. Después extender la dilución con un rastrillo, cerrar las cajas e incubarlas a una temperatura de 28 a 30 °C.

### 4. Inoculación de bacterias en plantas

Para inocular bacterias, el cultivo en YP debe tener entre 24 y 48 horas de crecimiento. Adicionarle a éste 10 mL de agua peptonada a pH 6.8 mezclar y ajustar la concentración de bacterias a  $10^8$  células /mL. Poner una gota de la suspensión encima de la planta y hacer la herida con el grupo de agujas (Figura 33). Incubar a 28 °C la planta inoculada previamente cubierta con una bolsa plástica transparente. Si la bacteria es patógena debe mostrar síntomas iniciales 4 a 10 días después de su inoculación. Siempre debe considerarse un tratamiento control al cual se le debe aplicar agua peptonada sin la bacteria.



**Figura 33.** Grupo de agujas para hacer heridas en plantas

### **Bibliografía relacionada con otros métodos para identificación de bacterias patógenas de plantas**

Balaz, J., Kiryakov, I., Kiryakov, V. and Vasic, M. 1997. Rapid identification of phytopathogenic bacteria originating from vegetables by the Biolog System. *Acta Horticulturae*. (ISHS). 462:491-496.

Holt, J. G., Kring, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams. S. T. (Ed.). 1994. *Bergey's manual of determinative Bacteriology* 9<sup>th</sup>. ed. Williams & Wilkins Maryland USA. Pp. 1417.

Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. (ed.). 2001. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 3rd ed. American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN. Pp. 398.

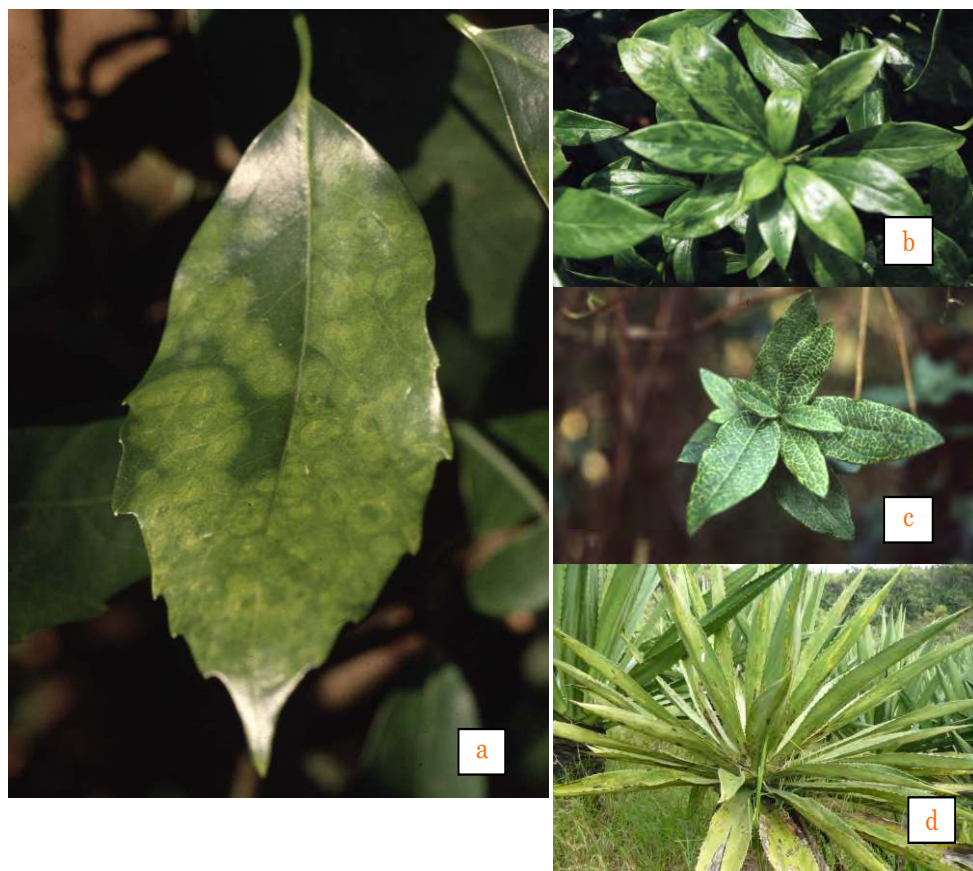
Stackebrandt, E. (Ed.). 2006. *Molecular identification, systematics, and population structure of Prokaryotes*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany. Pp. 320.

Starr, M. P., Stolp, H., Truper, H. G., Balows, A. Schlegel, H. G. (Ed.). 1981. *The Prokaryotes, a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*. Vol. 2. Springer-Verlag, Berlin. Pp. 2440.

## IV. Métodos para experimentos con virus

### 1. Síntomas de enfermedades virales

Los síntomas causados por virus son diferentes de los originados por hongos o bacterias. Los virus muestran mosaicos, manchas en anillo, venas blancas o amarillas, necrosis, etc. (Figura 34). Frecuentemente en etapas iniciales, los síntomas causados por fitoplasmas (de la clase Mollicutes) son parecidos a los síntomas causados por virus. Sin embargo, posteriormente las enfermedades causadas por un fitoplasma muestran síntomas de escoba de bruja o enanismo amarillo.



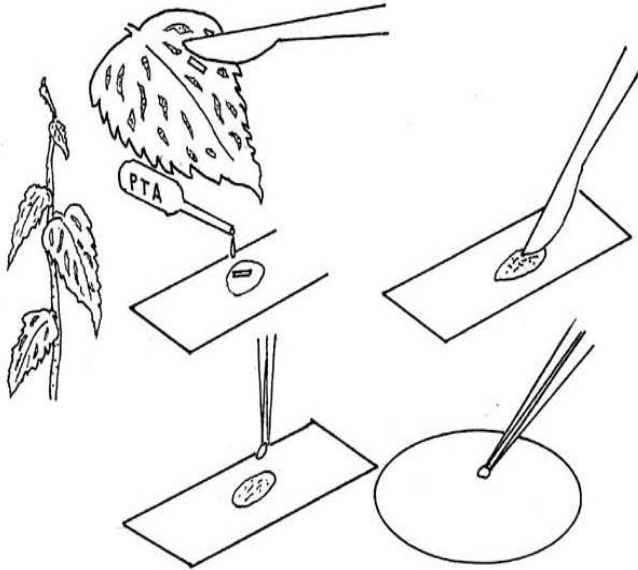
**Figura 34.** Síntomas típicos de enfermedades causadas por virus  
a. Manchas en anillo. b. Mosaico. c. Venas amarillas. d. Necrosis  
(Imagen suministrada por Alex Smith).

### 2. Observación de virus

Para observar virus, se debe usar un Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM). Hay dos métodos principales que se usan para este fin, uno es el de tinción negativa (DN) y otro es el método de corte fino.

### 1). Método de tinción negativa (DN)

A partir de una hoja que muestre síntomas claros, cortar fragmentos de tejido de 2x4 mm aproximadamente, colocarlos sobre una lámina que contenga una gota de ácido fosfotúngstico al 2 % (PTA), y cortar pedazos más pequeños. Ubicar los cortes en una rejilla con membrana de soporte de colodión, retirar con papel de filtro el líquido sobrante (Figura 35) y observar bajo un TEM. Para la observación de virus, se necesita de aumentos de 20,000x – 40,000x. Dado que los virus son frágiles, es necesario un pretratamiento con formalina o glutaraldehído al 1 ó 2 % antes del tratamiento con PTA. Después del tratamiento de formalina o glutaraldehído el tejido debe enjuagarse con agua destilada.

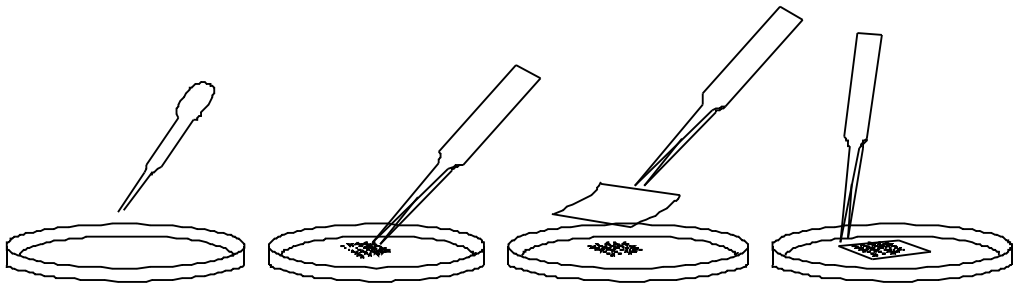


**Figura 35.** Preparación de muestras para observación por tinción negativa (DN)

### Elaboración de una rejilla con membrana de soporte de colodión

Las rejillas que se consiguen comercialmente, deben ser preparadas y limpiadas previamente a su uso, para esto se emplea acetona (100%) y posteriormente ésta es removida utilizando agua destilada en lavadora de ultrasonido.

Para preparar una rejilla de aproximadamente 200 celdas, se pone agua a 2/3 de profundidad en una caja de Petri de 25 cm de diámetro, cuando la superficie del agua esté reposada, se pone una gota de colodión al 2% en el centro de la caja en amyl acético. Después de unos 5 minutos se obtiene en la superficie del agua una membrana de colodión. Poner la rejilla en la superficie de la membrana. Una rejilla puede usarse máximo 2 ó 3 veces. Inmediatamente, poner papel parafilm sobre las rejillas. Desechar la membrana sobrante alrededor del papel parafilm con pinzas y dejar el parafilm restante con las rejillas (Figura 36). Después de sacar de la caja de Petri las rejillas con el parafilm, se somete a un proceso de endurecimiento con vapor de carbono bajo presión.



**Figura 36.** Elaboración de rejillas con membrana de soporte de colodión

## 2). Método de corte ultrafino

### a. Fijación por inmersión en resina de epoxi

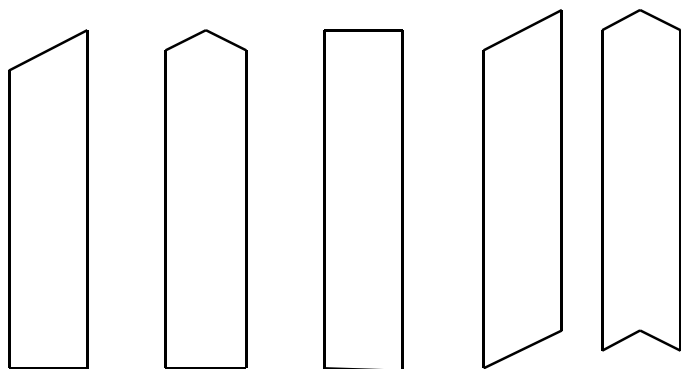
Cortar muestras de plantas en diferentes formas como se observa en la Figura 37 y en tamaños de más o menos 20 x 1-1.5 mm. Poner los fragmentos en agua en caja de Petri y con papel de filtro absorber de la superficie el agua sobrante. Trasladar las muestras en una botella pequeña para su pesaje. Las muestras pueden fijarse de forma simple o doble.

#### Fijación simple

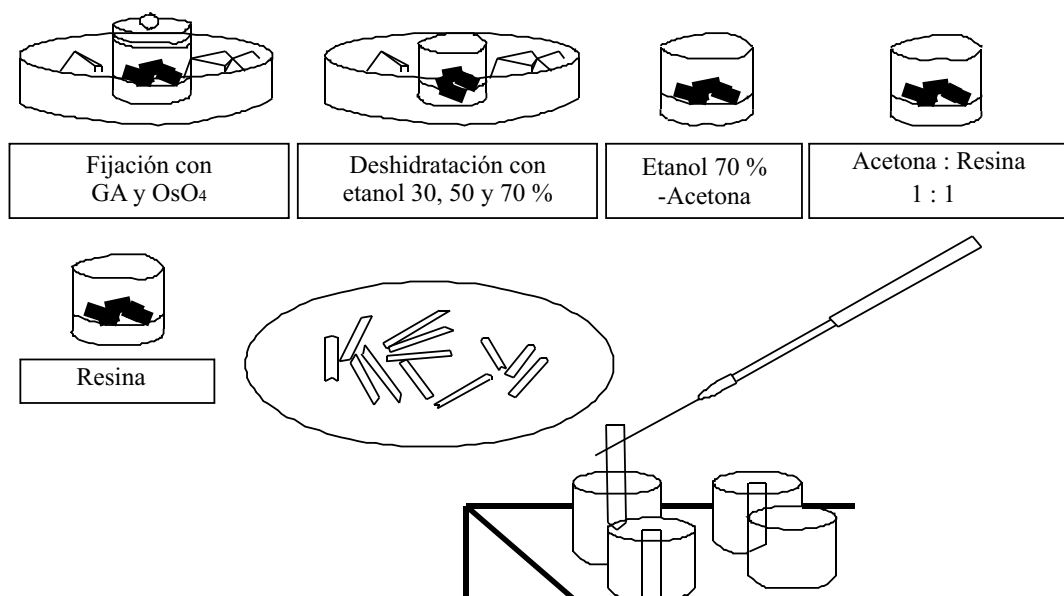
Poner la muestra en 1mL de solución de tetróxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 2% y 1mL de solución de Dalton. Fijar por una hora en baño de hielo y continuar deshidratación con alcohol. El proceso de deshidratación con etanol al 30% hasta el 70% se hace en baño de hielo cada 15 minutos. Para la deshidratación con etanol al 70%, se hace descompresión con bomba de vacío. Después de la deshidratación con etanol al 70%, se continúa la deshidratación con etanol al 80%, 90%, y alcohol absoluto (100%) y acetona absoluta (100%) cada 10 minutos a temperatura ambiente.

#### Fijación doble

Prefijar la muestra con glutaraldehído al 5 % en tampón fosfato 0.1 M con sacarosa 0.2 M por una hora. Después limpiar con solución tampón fosfato, hacer la post-fijación con tetróxido de osmio al 1% por 2 horas. El proceso de deshidratación después de post-fijar la muestra se realiza de la misma forma descrita anteriormente. Posterior al tratamiento con acetona absoluta, poner la mitad de la mezcla de la resina de epoxi y acetona absoluta en un desecador con silica gel durante 2 horas, se retira la mezcla, se agrega la resina de epoxi y se deja una noche en desecador y a temperatura ambiente (Figura 38). Luego de retirar la resina, sobre un papel de filtro las muestras deben separarse según las diferentes formas. Trasladar cada muestra en una cápsula de gelatina y colocar en agujeros de una lámina de silicona. Después adicionar resina de epoxi en la cápsula, llevar las muestras a un desecador con silica gel que debe ubicarse en una incubadora para aumentar la temperatura cada día en la siguiente secuencia: 35, 45 y 60 °C, respectivamente durante tres días. La resina de epoxi tiene que estar seca antes de su uso, para esto puede emplearse una bomba de vacío por más de 30 minutos.



**Figura 37.** Formas para fijar y preparar diferentes muestras de tejido



**Figura 38.** Preparación de muestras para corte ultrafino

La fijación y deshidratación con alcohol al 70 % debe hacerse en baño de hielo. Durante el proceso de deshidratación con alcohol al 70 % se traslada a un vaso con una cámara de descompresión y poner en baja presión atmosférica. Desde el proceso de adicionar la mitad de la mezcla de resina de epoxi y acetona hasta poner en cápsula de gelatina tiene que hacerse en desecador.

### Preparación de solución tetróxido de osmio

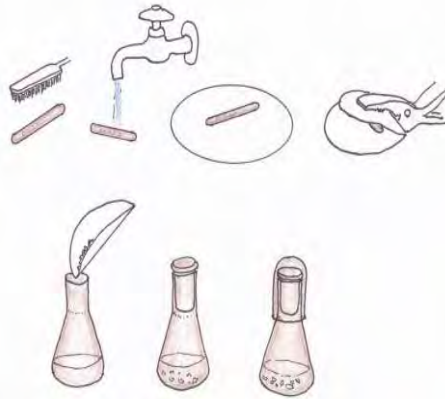
La solución de tetróxido de osmio al 2 ó 4%, puede comprarse comercialmente. Cuando se prepara la solución con cristal de tetróxido de osmio, primero debe limpiarse la superficie de la ampolla, luego poner ésta sobre un papel de filtro y luego de forrar el vidrio con un papel, romperlo con una pinza. Colocar los cristales en una botella de color ambar con doble tapa y adicionar agua destilada hasta ajustar la solución al 2% (Figura 39). Se necesitan al menos 2 días hasta que se disuelva completamente. Dado que el tetróxido de osmio es muy tóxico, éste no debe tocarse con la mano, ni permitir el contacto con los ojos.

### Solución de Dalton

Solución A: Solución de  $K_2Cr_2O_7$  al 5 %, después ajustar a pH 7.2 con 2.5 N de KOH.

Solución B: Solución NaCl al 3.4 %.

Mezclar en proporción 1:1 la solución A y solución B. Poner el líquido en una botella y conservar en nevera.



**Figura 39.** Proceso de preparación de la solución tetróxido de osmio de cristal

### Resina de epoxi

La resina epóxica Epon 812 (Shell Chemical co. USA.) se usa extensivamente para realizar cortes ultrafinos. En la tabla 6 se muestran las proporciones que se utilizan de ésta y de otras resinas (Epon 812, DDSA (anhídrido dodecenil succínico) y MNA (anhídrido nadic metílico), DMP-30 (2, 4, 6 tri (dimetil amino metil) fenol) usadas para el mismo procedimiento (Figura 40). Para medir el volumen de DMP-30, el fenol tiene que calcularse con precisión con la ayuda de una jeringa de inyección. El volumen total se calcula según el número de muestra  $\times 0.7$  (en caso de uso de cápsula de gelatina de número cero) + 5mL + 5mL. Después mezclar los cuatro reactivos, calentar hasta que esta mezcla sea totalmente líquida. Posteriormente, la resina debe secarse más o menos durante dos horas en una cámara de descompresión. En el laboratorio, se puede usar una bomba de vacío (Tabla 5).

En otra preparación se puede mezclar la solución A y B:

Solución A: 62 mL de Epon 812, 100 mL de DDSA

Solución B: 100 mL de Epon 812, 89 mL de MNA

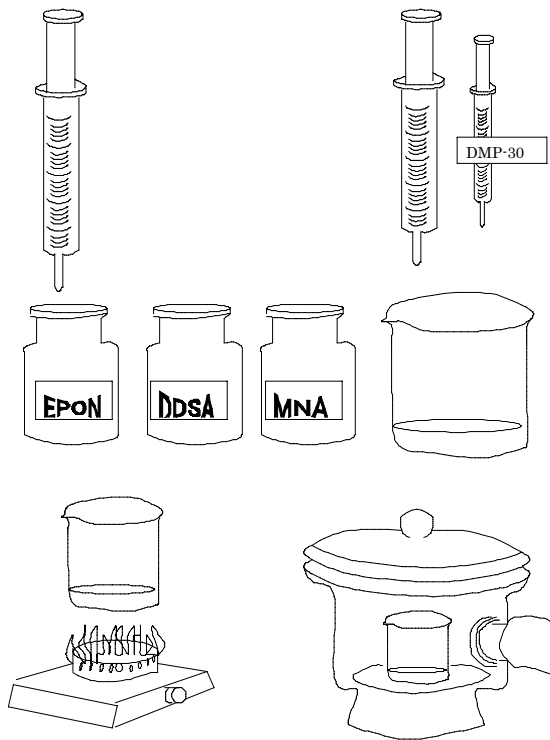
DMP-30: 1.5 - 2.0 %

Proporción A : B = 7 : 3 - 3 : 7

**Tabla 5.** Relación del volumen total de resina de epoxy y de otras resinas

Resina	Mezcla 1 mL	Mezcla 2 mL	Mezcla 3 mL
Epon 812	9.1	18.3	36.7
DDSA	8.7	17.5	35.0
MNA	3.3	6.6	13.3
DMP -30	0.3	0.6	1.25
DMP -30 *	0.33	0.65	1.35
Total	21.4	43	86.25

\*En caso de tener las muestras en silicona

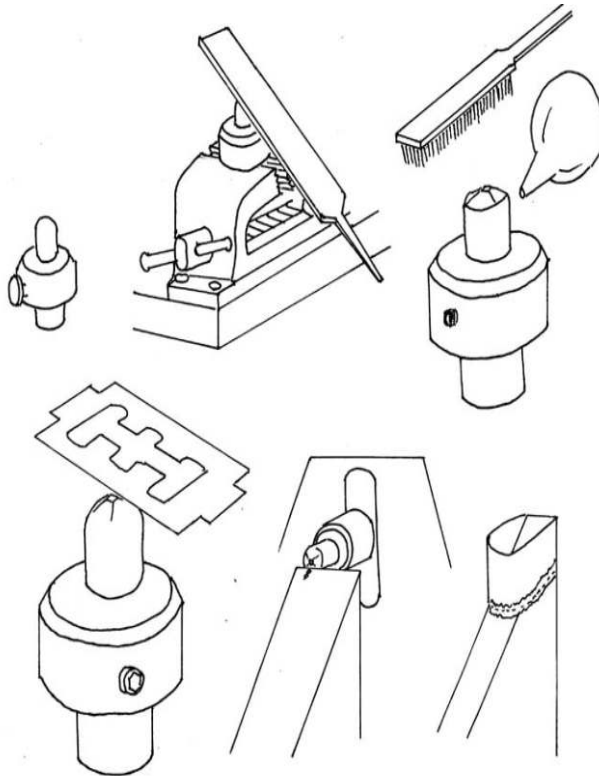


**Figura 40.** Preparación de resina epoxy

Las resinas Epon 812, DDSA y MNA se deben disponer en botellas de boca grande y conservar en refrigeración. Con una jeringa tomar en orden Epon 812, DDSA y MNA. Para medir DMP-30, debe usarse una jeringa pequeña. Limpiar el exterior de la jeringa con toalla de papel cuando se necesite llenar de nuevo con otra resina. La limpieza de la vidriería debe hacerse inicialmente con una toalla de papel y posteriormente se enjuaga con acetona, la limpieza final debe hacerse con un detergente para productos químicos.

## b. Método para cortar secciones ultra finas

Antes de realizar cortes delgados con el ultra-micrótopo, con una lima y con una hoja de afeitar deben recortarse los excesos de la muestra en resina epoxi (Figura 41). Hay varias consideraciones que se deben tener en cuenta para cortar secciones delgadas, por ejemplo el tamaño de recorte o ribete, el ancho de éste, el ajuste de la distancia entre la muestra y el cortador de vidrio, etc. Para realizar esta actividad es mejor asesorarse de personal técnico que maneje de forma adecuada el ultra-micrótopo.

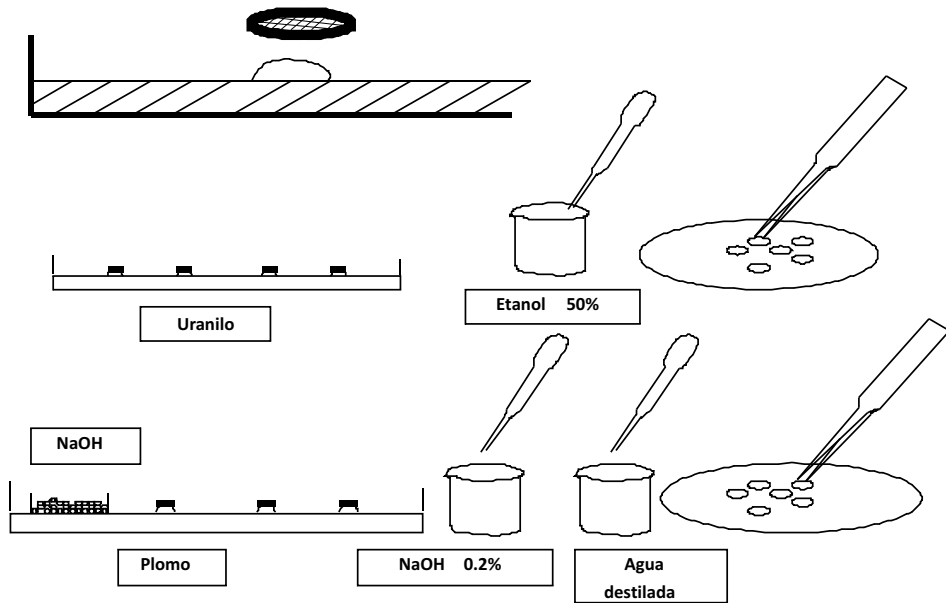


**Figura 41.** Proceso de pre-corte antes de usar el ultra-micrótopo

Embeber la muestra en resina de epoxi y dejar secar. Fijar el montaje al aparato de fijación del ultra-micrótopo. Afilar la base de la muestra con una lima. Después limpiar la muestra con un pincel, limpiar y secar, realizar el recorte en ángulo obtuso con una cuchilla.

## c. Tinción para uso en microscopía electrónica (TEM)

Las muestras se tiñen con acetato de uranilo y citrato sódico de plomo. Colocar sobre la muestra una gota de acetato de uranilo en solución saturada de etanol al 50 % y teñir por 20 minutos. Después enjuagar en etanol al 50 %, secar con papel de filtro. Después, poner sobre la muestra una gota de la solución de citrato sódico de plomo y teñir por 10 minutos. Enjuagar la muestra con una solución de NaOH 0.2 %. Lavar con agua destilada y secar sobre papel filtro. Realizar la observación de la muestra (Figura 42).



**Figura 42.** Proceso de tinción electrónica

Para este procedimiento, las cajas de vidrio utilizadas para calentar cera en odontología son adecuadas, ya que éstas pueden calentarse a 60 °C, temperatura a la cual se diluye la cera, sobre la que se dispensan las gotas de la solución de acetato de uranilo (AU) por medio de pipeta en una malla. Luego del teñido con AU, limpiar la malla con etanol 50 %, NaOH 0.2 % y agua destilada (se puede retirar el agua con un gotero). Luego de la tinción con la solución de citrato sódico de plomo, es efectivo poner NaOH para disminuir la contaminación con plomo carbónico. Una vez terminado el procedimiento lavar con agua corriente para reutilizar la caja con la cera.

### **Preparación de la solución de acetato de uranilo**

Macerar 3g de acetato de uranilo en un mortero con 100 mL de etanol al 50 %. Disponer la solución en una botella y conservar en refrigerador. Para teñir usar la parte superior.

### **Preparación de citrato sódico de plomo**

Agregar a una botella o frasco de vidrio 1.33 g de plomo nitrato, 1.76 g de citrato sódico y 30 mL de agua, tapar y agitar fuertemente por un minuto. Después agitar la botella ocasionalmente durante 30 minutos hasta obtener la solución con turbiedad blanca. Añadir 8 mL de 1N NaOH y ajustar a 50 mL con agua destilada.

### **3. Inoculación de material vegetal con virus**

Varios virus pueden inocularse en plantas sanas con jugo crudo (Figura 43). Para esto se debe macerar en un mortero una hoja con síntomas de virus con solución tampón (por ejemplo tampón fosfato, 0.1 M y pH 7.0)

Tabla 6. Esparcir polvo de carburo de silicio en hojas de plantas sanas, frotar con una bola de algodón humedecida en la solución de jugo crudo y limpiar las hojas con agua. Después de unos días de inoculación, examinar las hojas de las plantas y registrar la sintomatología desarrollada.

### Preparación de tampón fosfato 0.1 M y pH 7.0

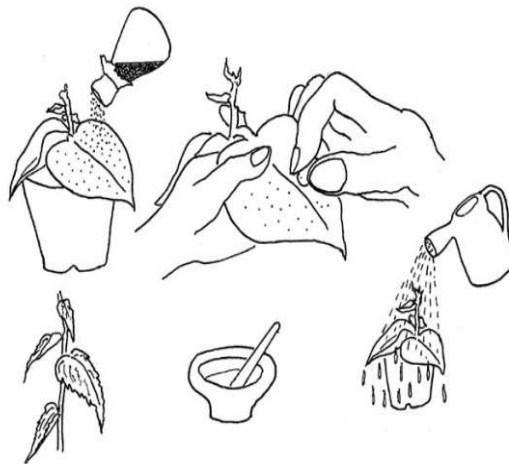
Solución A: Disolver 2.76 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  en 100 mL de agua destilada.

Solución B: Disolver 5.66 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en 100 mL de agua destilada.

Ajustar el pH y mezclar la solución A y B según la Tabla 6. Después de mezclar las soluciones diluir al doble con agua.

**Tabla 6.** Relación pH y proporción A y B

	Solución B	pH	Solución A	Solución B	pH
68 mL	32	6.5	33	67	7.1
57	43	6.7	23	77	7.3
45	55	6.9	19	81	7.4



**Figura 43.** Inoculación con jugo crudo de plantas enfermas

Los virus también pueden inocularse con insectos: Esta transmisión de virus puede realizarse de dos formas. Una permanente y otra temporal.

En esta guía se describe la inoculación de virus con áfidos, para lo cual debe contarse con áfidos alimentados con plantas libres de virus, de esta población deben separarse varios individuos en una caja de Petri con un pincel pequeño y suave. Para capturar los áfidos, primero tocar la parte posterior del cuerpo del insecto con el pincel para que se muevan y poder recogerlos sin dañarlos para trasladarlos a la caja de Petri, en donde deben conservarse por dos horas aproximadamente antes de trasladarlos a plantas enfermas por virus. Después de que los insectos se alimenten de las hojas de plantas enfermas, trasladarlos de nuevo a plantas sanas para que continúen su alimentación en las plantas que se quieren infectar.

#### 4. Purificación de virus a partir de hojas infectadas

Para facilitar el análisis viral, de acuerdo con la forma y características propias de cada virus, la purificación de éste es importante. A manera de ejemplo, a continuación se describe el modelo de purificación de un virus esférico pequeño de cerca de 30 nm de diámetro.

##### Modelo de purificación de virus

Homogeneizar en tampón EDTA 0.01 M + 1% Mercapto-etanol (1:1 p/v) a 4°C

Filtrar con gasa el material de la planta macerado

Descartar el residuo, tomar el jugo crudo filtrado

Centrifugar a 7,700 g por 15 min.

Descartar el precipitado y recuperar el sobrenadante

Adicionar Cloroformo 10 % + Amyl alcohol 10 % por 5 min.

Centrifugar a 7,700 g por 15 min.

Descartar la fase intermedia

Tomar el sobrenadante (fase acuosa)

Calentar a 55 °C por 10 min.

Centrifugar a 12,000 g por 15 min.

Descartar el precipitado y recuperar el sobrenadante

Centrifugar a 75,000 g por 90 min.

Descartar el sobrenadante y recuperar el precipitado

Centrifugar a 12,000 g por 15 min.

Descartar el precipitado y recuperar el sobrenadante

Centrifugar a 75,000 g por 90 min.

Descartar el sobrenadante y recuperar el precipitado

Resuspender en tampón EDTA 0.01 M

Centrifugar con el gradiente de densidad de sacarosa a 60,000 g por 240 min (4h)

(Figura 44)

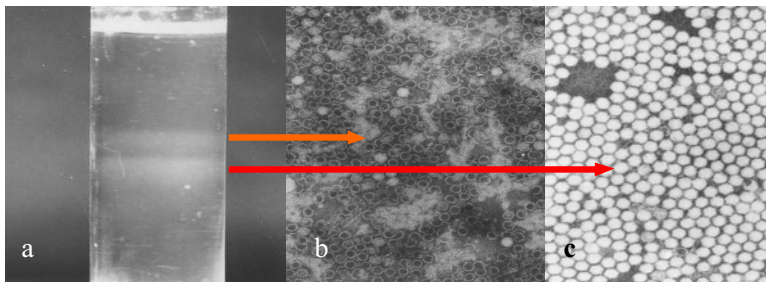
Extraer la zona viral con una jeringa, la cual se reconoce

por formar una banda de color blanco lechoso

Adicionar tampón EDTA 0.01 M

Centrifugar a 75,000 g por 90 min.

Descartar el sobrenadante y recuperar el precipitado



**Figura 44.** Resultado de la centrifugación en un gradiente de densidad de sacarosa

a. Dos bandas producidas en tubo b. Vista microscopica TEM de capside proteica del virus

c. Vista microscopica TEM de nucleocapside del virus

## 5. Preparación de anticuerpos policlonales

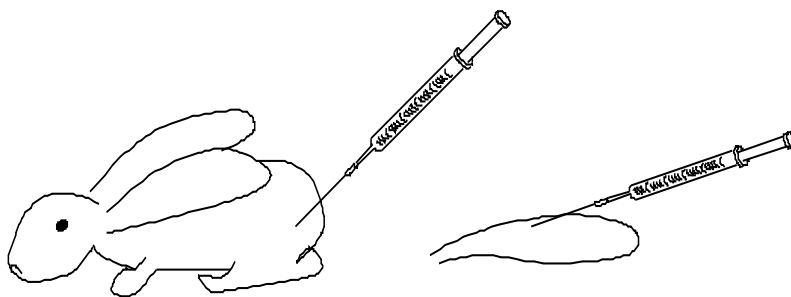
Para la obtención de un anticuerpo policlonal se necesitan más o menos 5 mg de antígeno purificado (por ejemplo virus, bacteria, pared celular de hongo, etc.). Generalmente se usan conejos con un peso entre 2 y 3 kg. Otros materiales usados son instrumento de fijación, jaulas para la cría de conejos, jeringas, aguja de inyección (1/4 - 1/3), suero fisiológico, fórceps para hemostasis, solución adyuvante completo de Freund's, botella para almacenar sangre, pipeta de vidrio, tijeras y bisturí (Figura 45).

Para la obtención del anticuerpo, se realiza la aplicación del antígeno y del adyuvante completo de Freund's en proporción 1:1, siguiendo el esquema de aplicación descrito en la Figura 46. Para efectuar la mezcla de éstos, se emplea una jeringa a la que se adapta una llave con acople doble, tal como se ilustra en la Figura 47. La aplicación inicial de éste, se hace vía intramuscular en el pernil del conejo con la mezcla antígeno-adyuvante, intercalando con aplicaciones intravenosas en las venas de las orejas con antígeno en solución con suero fisiológico, hasta completar entre 5 y 6 inyecciones.

Siete días antes de la inyección final, se obtienen 5 mL de sangre de la vena de la oreja del conejo, para determinar la cantidad de anticuerpos. Cuando se determina un alto título de anticuerpos (mínimo 200), se hace la extracción total de la sangre, día en el que no se le puede dar de comer ni beber al conejo. La sangre obtenida se dispensa en una botella y se somete a un baño de María a 37 °C entre 30 minutos a una hora. Posteriormente, la sangre se refrigera por un día a 4 °C. Al día siguiente con una pipeta se toma sólo la parte superior de la sangre y se pone en una nueva botella, para ser centrifugada a 2500 rpm durante 5 minutos. Después calentar a 56 °C por 30 minutos, posteriormente se adiciona azida de sodio al 0.05%. El suero obtenido se dispone en ampollitas, las cuales deben ser selladas, para mantenerlas en un congelador.



**Figura 45.** Materiales necesarios para obtener anticuerpos  
a. Mesa para disección; b. Forceps; c. Botella para recolección de sangrado



1 <sup>er</sup> día	7 <sup>o</sup> día	14 <sup>o</sup> día	21 <sup>o</sup> día
1 <sup>a</sup> inyección	2 <sup>a</sup> inyección	3 <sup>a</sup> inyección	4 <sup>a</sup> inyección
Aplicación intramuscular	Aplicación intravenosa	Aplicación intramuscular	Aplicación intravenosa

2-3 días después de la última inyección, extraer 5 mL de sangre:

Resultado positivo del conteo de anticuerpos: Extracción total de sangre

Resultado negativo del conteo de anticuerpos: Continuar con inyecciones

**Figura 46.** Esquema de inyecciones para producir anticuerpos en conejos



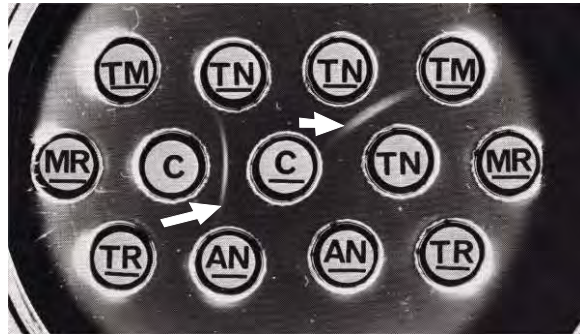
**Figura 47.** Instrumentos para mezclar el adyuvante completo de Freund's con el antígeno  
 a. Llave con acople doble para jeringas; b. Jeringa

## 6. Experimentos con reacción de suero

Generalmente, hay dos maneras de realizar experimentos con el suero que se obtenga, en donde se encuentran los anticuerpos. Uno es el método de aglutinación en lámina, para lo cual deben ponerse 3 gotas del anticuerpo por separado sobre de una lámina. Poner el

antígeno (extracto de la planta enferma). Considerar un testigo (antígeno) y un testigo negativo (extracto de planta sana) para cada gota de anticuerpo. Cuando el anticuerpo presente un buen título (mínimo 1/36 dependiendo del propósito), éste se diluye con suero fisiológico antes de su uso. Cuando se observa aglutinación entre el antígeno y el anticuerpo la reacción se considera positiva.

El otro método que se utiliza es el de Ouchterlony. Se prepara una solución de agar al 1.5 % con azida de sodio 0.1 % y tampón fosfato 0.05 M. Distribuir 5 mL y 15 mL de la solución en tubos de ensayo y autoclavar. Primero poner la solución de 5 mL en caja de Petri de 9 cm de diámetro, después de solidificarse poner cilindros de metal con una distancia entre ellos de 10 mm (en vez de usar cilindros de metal se pueden hacer orificios con un sacabocado). Después poner 15 mL de agar en solución y esperar a que se solidifique. Quitar los cilindros metálicos. Poner muestras de anticuerpo, testigos, antígeno, etc., sin rebosar el borde del orificio. Guardar las cajas de Petri en bolsas o en cajas grandes que contengan algodón mojado para mantener la humedad. Incubar a 28 °C y continuar por 7 días la observación para determinar la reacción entre el antígeno y el anticuerpo por medio de la formación de una banda en el medio de cultivo (Figura 48)



**Figura 48.** Ejemplo del método de Ouchterlony.

C: *Cycas necrotic stunt virus* (CNSV); C: anticuerpo de CNSV, TN: *Tomato black ring virus*; TN: anticuerpo de TN; AN: anticuerpo de *Arabis mosaic virus*; TR anticuerpo de *Tabacco ringspot virus*; MR: anticuerpo de *Malberry ringspot virus*; TM: anticuerpo de *Tomato ringspot virus*. Positivo: la formación de una banda en el medio de cultivo como resultado de la reacción entre antígeno y anticuerpo (ver flecha).

### **Bibliografía y páginas relacionadas para identificación de virus de plantas**

Descriptions of Plant Viruses < <http://www.dpvweb.net/dpv/index.php> >

Plant Viruses ONLINE (VIDE) < <http://image.fs.uidaho.edu/vide/refs.htm> >

ICTVdB-The Universal Virus Database, version 4

< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/> >

Virus Index 2005 < <http://www.danforthcenter.org/iltab/> >

Fauquet, C. M. et al. 2005. *Virus Taxonomy, Eighth report of the International Committee on Taxonomy of viruses*. Elsevier Academic Press. San Diego USA. Pp. 1259.

## V. Métodos moleculares básicos para fitopatología.

### 1. Métodos comunes para experimentos moleculares

Cuando se hacen preparaciones para análisis molecular deben usarse materiales desechables o de vidrio (por ejemplo, puntas de pipetas, tubos Eppendorf, etc.), para cuya manipulación deben usarse guantes desechables, ya que estos materiales no pueden tocarse con la mano directamente.

#### 1). Preparación de gel de agarosa para electroforesis

Pesar la agarosa según el tamaño de ADN. Para tamaños de 50 a 1000 pares de bases (pb) debe usarse entre 3 y 4 %, para ADN de más de 1000 pb debe usarse 1 %, en solución TAE (Tris-acetato EDTA). Cuando se preparan 100 mL de gel al 1 %, poner 1g de agarosa, 10 mL de TAE x10 y 90 mL de agua en un Erlenmeyer y calentar en microondas hasta disolver la agarosa. Después, poner el Erlenmeyer a temperatura ambiente y dejar enfriar hasta 55-60 °C. Luego servir el gel de agarosa en la lámina de vidrio, evitando la formación de burbujas. Inmediatamente instalar el peine de las muestras y dejar solidificar la agarosa (más o menos por una hora). Para el análisis de fragmentos más pequeños de ADN, se debe usar gel de poliacrilamida.

#### 2). Preparación de soluciones de reactivos comunes

Tabla7. 1M Tris-HCl (MW121.14)

Reactivo	Grado	Densidad final	Uso tipo 1	Uso tipo 2
Tris	Calidad superior	1 M	30.3 g	121.1 g
Milli - Q agua	Sin autoclavar	-	200 mL	800 mL
Milli - Q agua para el ajuste final	Sin Autoclavar	-	ajustar	ajustar
Total			250 mL	1 L
	HCl 35%	pH 8.0	ca. 10 mL	ca. 42 mL
		pH 7.6	ca. 15 mL	ca. 60 mL
		pH 7.4	ca. 17 mL	ca. 70 mL

- 1) Primero poner agua en una botella, añadir el tris y agitar
- 2) Añadir HCl a la solución y medir el pH
- 3) Enfriar a temperatura ambiente, después ajustar de nuevo el pH con HCl
- 4) Añadir agua hasta completar el volumen final
- 5) Autoclavar

**Tabla 8. TE (10mM Tris -HCl pH 8.0, 1mM EDTA )**

Reactivo	Uso tipo 1
1M Tris-HCl (pH 8.0 )	10 mL
0.5 M EDTA (pH 8.0)	2 mL
Milli-Q agua	988 mL
Total	1000 mL

**Tabla 9. 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0 para preparación de fenol)**

Reactivo	Grado	Densidad final	Uso tipo 1	Uso tipo 2
Tris	Calidad superior	0.5 M	15.1 g	60.57 g
Milli- Q agua	Sin autoclavar	-	200 mL	800 mL
Milli- Q agua para el ajuste final	Sin autoclavar	-	ajustar	ajustar
Total			250 mL	1 L
		HCl 35%	ca. 5 mL	ca. 20 mL

**Tabla 10. 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0 para preparación de fenol )**

Reactivo	Grado	Densidad final	Uso tipo 1	Uso tipo 2
Tris	Calidad superior	0.1 M	3.0 g	12.1 g
Milli- Q agua	Sin autoclavar	-	200 mL	800 mL
Milli- Q agua para el ajuste final	Sin autoclavar	-	ajustar	ajustar
Total			250 mL	1 L
		HCl 35%	ca. 1 mL	ca. 4 mL

**Tabla 11. 0.5 MEDTA (Ácido Etilendiaminotetraacético 2Na 2H<sub>2</sub>O:pH 8.0)**

Reactivo	Grado	Densidad final	Uso tipo 1	Uso tipo 2
EDTA	Calidad superior	0.5M	46.5 g	186.1 g
Milli-Q agua	Sin autoclavar	-	200 mL	800 mL
Milli-Q agua para el ajuste final	Sin autoclavar	-	Ajustar	Ajustar
Total			250 mL	1 L
NaOH (para ajustar pH, gramos) calidad superior			ca. 5 g	ca. 20 g
NaOH 5N (ajustar pH)			Ajustar	Ajustar
Añadir y disolver EDTA poco a poco en una botella con agua y agitar				
Añadir gramos de NaOH a solución EDTA (disolver EDTA)				
Ajustar pH con NaOH 5N				
Añadir agua hasta completar el volumen final				
Autoclavar				

**Tabla 12. 5 M NaCl (Cloruro de sodio, PM=58.44)**

Reactivo	Grado	Densidad final	Uso tipo 1	Uso tipo 2
NaCl	Calidad superior	5 M	14.6 g	292.2 g
Milli-Q agua	Sin autoclavar	-	40 mL	800 mL
Milli- Q agua para el ajuste final	Sin Autoclavar	-	Ajustar	Ajustar
Total			50 mL	1 L
Añadir y disolver NaCl poco a poco en un vaso de precipitado con agua y agitar				
Añadir agua hasta completar el volumen final				
Autoclavar				

**Tabla 13. Cloroformo Isoamil alcohol (24:1, para ADN)**

Reactivo	Grado	Uso tipo 1
Cloroformo		288 mL
Isoamil alcohol		12 mL

**Tabla 14. 3 M Acetato sódico (pH 5.2, pH 7.0), (NaOAc3H2O, PM=136.08)**

Reactivo	Grado	Densidad final	Uso tipo 1	Uso tipo 2
NaOAc3H2O	Calidad superior	3 M	20.5 g	408.1 g
Milli-Q agua		-	40 mL	800 mL
Milli-Q agua para el ajuste final		-	Ajustar	Ajustar
Total			50 mL	1 L
Ácido acético glacial calidad superior pH 7.0			64 uL	1280 uL
pH 5.2			5.7 mL	114 mL

Añadir y disolver NaOAc poco a poco en un vaso de precipitado con agua y agitar

Añadir ácido acético glacial y ajustar pH

Añadir agua hasta completar el volumen final

Autoclavar

**Tabla 15. SDS al 10 % (Dodecil sulfato de Sodio o Lauril sulfato de Sodio)**

Reactivo	Grado	Densidad final	Uso tipo 1	Uso tipo 2
SDS	Calidad superior	10%	10 g	50 g
Milli-Q agua	Sin autoclavar	-	90 mL	450 mL
Milli-Q agua para el ajuste final	Sin autoclavar	-	Ajustar	Ajustar
Total			100mL	500 mL

HCl (ajustar pH)

Añadir agua en un vaso de precipitado

Añadir SDS y disolver con agitador sin generar burbujas

Ajustar pH con HCl a pH 7.2

Añadir agua hasta volumen final

Conservar en temperatura ambiente

**Tabla 16. Cloroformo Isoamil alcohol (49:1, para ARN)**

Reactivo	Uso tipo 1	Uso tipo 2
Cloroformo	49 mL	500 mL
Isoamil alcohol	1 mL	10.2 mL

**Tabla 17. Preparación de fenol neutro (para extracción de ADN)**

Reactivo	Grado	Densidad final	Uso tipo 1
Fenol en cristales	Extracción de ADN		ca. 40 g
8-hidroxiloquinolina		0.1%	0.04 g
2-mercaptoetanol		0.2%	90 $\mu$ L
0.5 M EDTA (pH8)		1 mM	90 $\mu$ L
0.5 M tris-HCl (pH8)			60 mL o más
0.1 M tris-HCl (pH8)			60 mL o más

1. Añadir 40 g de fenol en un tubo de centrifuga que tenga tapa
2. Medir 0.03 g 8 -hidroxiloquinolina y tapar el tubo
3. Añadir 0.5 M Tris -HCl hasta cerca de llenado
4. Tapar el tubo y calentar para disolver en baño María a 65°C
5. Agitar fuertemente entre 5 y 10 minutos.
6. Centrifugar a 2.000 rpm por 5 min.
7. Eliminar el líquido sobrenadante con aspirador o pipeta
8. Añadir 0.5 M Tris -HCl repetir 5-7 veces el proceso, agitando fuertemente por 15 minutos
9. Repetir los pasos 5 a 7, hasta que el pH indique 7.8 o más
10. Añadir 10 mL de 0.1 M Tris-HCl, 80  $\mu$ L de 2-mercaptoetanol y 80  $\mu$ L EDTA 0.5 M (pH 8)
11. Envolver los tubos en papel aluminio y conservar en refrigerador a 4°C o congelado a -20°C

### **Sedimentación de ácidos nucleicos con alcohol etílico**

Definir el volumen de la solución

Añadir 3M de acetato sódico a 1/10 de la solución

Añadir alcohol etílico al 100% a 2.5 del volumen de la solución

Mezclar bien y conservar 10 minutos a temperatura ambiente

Centrifugar a 12.000 g por 10 minutos en 4°C o temperatura ambiente

Guardar el precipitado y descartar el sobrenadante

Añadir 1 ml de alcohol etílico al 70 % y mezclar suavemente

Centrifugar a 12.000 g por 2 minutos en 4°C o temperatura ambiente

Descartar el sobrenadante

### **Sedimentación de ácidos nucleicos con alcohol isopropílico**

Definir el volumen de la solución

Añadir 3M acetato sódico a 1/10 de la solución

Añadir alcohol isopropílico al 100% en igual volumen de la solución

Mezclar bien y conservar 10 minutos a temperatura ambiente

Centrifugar a 12.000 g por 10 minutos a 4°C o a temperatura ambiente

Guardar el precipitado y descartar el sobrenadante

Añadir 1 mL de alcohol etílico al 70 % y mezclar suavemente

Centrifugar a 12.000 g por 2 minutos a 4°C o a temperatura ambiente

Descartar el sobrenadante

### **3). Electroforesis**

La electroforesis es una técnica usada para la separación de macromoléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico. La separación habitualmente puede realizarse sobre la superficie de una matriz porosa o sobre un gel de agarosa o de poliacrilamida. Los ácidos nucleicos disponen de carga eléctrica negativa, que los dirigirá al polo positivo (cátodo). Al poner la mezcla de moléculas y aplicar un campo eléctrico, éstas se moverán por la malla del gel, por lo que las moléculas de menor masa se moverán rápidamente y las más grandes quedarán cerca del lugar de inicio del gel en donde hay carga negativa.

Para caracterizar las moléculas se determina la velocidad a la que éstas se mueven en un campo eléctrico. Esto permite determinar la masa molecular en el caso de proteínas o cambios de aminoácidos para separar cuantitativamente distintas moléculas; en el caso de ácidos nucleicos se determina su tamaño medido en pares de bases (pb).

En un papel Parafilm pequeño se puede realizar la mezcla de las muestras. Poner la mezcla de la muestra con una micropipeta en las calles o espacios hechos en el gel con el peine, previamente se debe adicionar la solución tampón TAE (Tris-acetato EDTA), la cual debe quedar más o menos 5 mm por encima del gel. Conectar los terminales + y – a los respectivos puntos de la muestra y prender el equipo. Cuando las moléculas se hayan desplazado hacia la mitad del gel y presenten buena tinción, apagar el equipo, después sacar el gel y poner en solución de bromuro de etidio para que las moléculas sean más visibles. Al finalizar la electroforesis las moléculas más pequeñas han llegado al ánodo donde cada calle mostrará distintas bandas correspondientes a cada componente de la mezcla. Además se emplean otros métodos para visualizar la separación de la mezcla en el gel. Si el reactivo es fluorescente bajo luz UV, se puede visualizar bajo dicha luz.

**Nota:** Las temperaturas altas producidas en el sistema afectan la técnica de electroforesis. Por lo tanto, es necesario controlar la temperatura para que ésta no desnaturalice la muestra.

**Tabla 18. TAE (Tris-acetato EDTA)**

Reactivo	Grado	Densidad final	Uso tipo 1	Uso tipo 2
Tris	Calidad superior	0.04M	1.21 g	4.84 g
Ácido acético glacial	Calidad superior	0.04M	286 uL	1,142 uL
0.5M EDTA (pH 8.0)	Sin autoclavar	0.001 M	0.5 mL	3 mL
Agua destilada	Sin autoclavar		200 ml	900 mL
Agua destilada para el ajuste final	Sin autoclavar		ajustar	Ajustar
Total			250 mL	1 L

**Tabla 19. 10X TAE**

Reactivo	Grado	Densidad final	Uso tipo 1	Uso tipo 2
Tris	Calidad superior	0.4 M	12.1 g	48.4 g
Ácido acético glacial	Calidad superior	0.4 M	2.9 mL	11.4 mL
0.5M EDTA (pH 8.0)	Sin autoclavar	0.01 M	5 mL	20 mL
Agua destilada	Sin autoclavar	-	200 mL	900 mL
Agua destilada para el ajuste final	Sin autoclavar	-	Ajustar	Ajustar
Total			250 mL	1 L

**Tabla 20. 50X TAE**

Reactivo	Grado	Densidad final	Uso tipo 1	Uso tipo 2
Tris	Calidad superior	2 M	60.5 g	242 g
Ácido acético glacial	Calidad superior	2 M	14.3 ml	57.1 mL
0.5M EDTA (pH 8.0)	Sin autoclavar	0.05 M	25 mL	100 mL
Agua destilada	Sin autoclavar	-	150 mL	700 mL
Agua destilada para el ajuste final	Sin autoclavar	-	Ajustar	Ajustar
Total			250 mL	1 L

**Tabla 21. TBE (Tris-borato EDTA)**

Reactivo	Grado	Densidad final	Uso tipo 1	Uso tipo 2
Tris	Calidad superior	0.089 M	2.7 g	10.8 g
Ácido bórico	Calidad superior	0.089 M	1.38 g	5.5 g
0.5M EDTA (pH 8.0)	Sin autoclavar	0.002 M	1 mL	4 mL
Agua destilada	Sin autoclavar	-	200 mL	900 mL
Agua destilada para el ajuste final	Sin autoclavar	-	Ajustar	Ajustar
Total			250 mL	1 L

**Tabla 22. 5X TBE**

Reactivo	Grado	Densidad final	Uso tipo 1	Uso tipo 2
Tris	Calidad superior	0.445 M	13.5 g	54 g
Ácido bórico	Calidad superior	0.445 M	6.9 g	27.5 g
0.5M EDTA (pH 8.0)	Sin autoclavar	0.01 M	5 mL	20 mL
Agua destilada	Sin autoclavar	-	200 mL	900 mL
Agua destilada para el ajuste final	Sin autoclavar	-	Ajustar	Ajustar
Total	Sin autoclavar	-	250 mL	1 L

**Tabla 23. 10X TBE**

Reactivo	Grado	Densidad final	Uso tipo 1
Tris	calidad superior	0.89 M	108 g
Ácido bórico	calidad superior	0.89 M	55 g
0.5M EDTA (pH 8.0)			40 ml
Agua destilada para el ajuste final			1 L

**Tabla 24. Colorante azul**

Azul de bromofenol (BPB)

Xilencianol FF (XC)

**Tipo 1**

Reactivo	Grado	Densidad final	Uso tipo 1	Uso tipo 2
1% BPB		0.25%	2.5 mL	12.5 mL
1% XC		0,25%	2.5 mL	12.5 mL
500mM EDTA		1mM	0.02 mL	0.1 mL
Sacarosa	Calidad superior	40%	4 g	20 g
Milli-Q agua	Estéril	-	Ajustar	Ajustar
Total			10 mL	50 mL

**Tipo 2**

Reactivo	Grado	Densidad final	Uso tipo 1	Uso tipo 2
1% BPB	-	0.25%	2.5 mL	12.5 mL
1% XC	-	0.25%	2.5 mL	12.5 mL
500mM EDTA	-	1mM	0.02 mL	0.1 mL
Ficor	400	15%	1.5 g	7.5 g
Milli-Q agua	Estéril	-	Ajustar	Ajustar
Total			10 mL	50 mL

**Tipo 3**

Reactivo	Grado	Densidad final	Uso tipo 1	Uso tipo 2
1% BPB	-	0.25%	2.5 mL	12.5 mL
1% XC	-	0.25%	2.5 mL	12.5 mL
500mM EDTA	-	1mM	0.02 mL	0.1 mL
Glicerina	calidad superior	30%	3 mL	15 mL
Milli-Q agua	Estéril	-	Ajustar	Ajustar
Total			10 mL	50 mL

## **Tabla 25. Bromuro de etidio (BrEt) 10mg/mL**

\*Peligro (manejar con guantes de nitrilo)

Reactivo	Grado	Densidad final	Uso tipo 1	Uso tipo 2
BrEt	Calidad superior	10mg/mL	1 g	5 g
Milli-Q agua	Estéril		100 mL	500 mL

Añadir agua y BrEt en una botella y disolver en un agitador por una hora

Después conservar a temperatura ambiente

## **2. Extracción de ADN con Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB) (para muestras de ADN de difícil extracción)**

Este método es usado para detectar patógenos de plantas, por ejemplo fitoplasmas, hongos, bacterias, etc. El ADN extraído es usado como molde de amplificación de PCR.

### **1). Método de extracción**

Pesar 50 g del tejido de la planta por evaluar

Licuar con una licuadora o batidora y macerar en mortero con nitrógeno líquido

Añadir 150 mL de solución de extracción reguladora (Tabla 26)

Incubar a 55°C durante 30 minutos (agitar suave y esporádicamente)

Añadir 150 mL de Cloroformo:Isoamil alcohol (Tabla 27)

Mezclar suavemente durante 5 minutos

Centrifugar a 4.000 rpm durante 30 minutos a temperatura de 30 °C

Recuperar el sobrenadante

Añadir 1/10 cantidad de solución CTAB (Tabla 28)

Añadir igual cantidad de Cloroformo:Isoamil alcohol (Tabla 27) al total de la solución

Mezclar suavemente durante 5 minutos

Centrifugar a 4.000 rpm durante 30 minutos a temperatura de 30 °C

Recuperar el sobrenadante

Añadir 1/10 cantidad de solución CTAB y igual cantidad de la solución reguladora para la sedimentación (Tabla 29)

Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos

Centrifugar a 7.000 rpm durante 20 minutos a temperatura de 4 °C

Recuperar el precipitado

Añadir 100µL de solución 1M NaCl-TE (Tabla 30)

Incubar a refrigerador por una noche

Añadir 100µL de alcohol isopropílico al 100%

Centrifugar a 9.000 rpm durante 10 minutos

Recuperar el precipitado

Añadir alcohol etílico al 70 %

## 2). Páginas importantes:

Buscar “NCBI”, “BLAST”, “DDBJ (Japón)”.

Incluir en la base de datos GIB (virus), GIB (bacterias), GTOP (proteína) etc.

Ver: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>

**Tabla 26. Solución reguladora de extracción**

Reactivo	Densidad final	Uso tipo 1
Bromuro cetil Trimetil Amonio (CTAB)	1%	1g
NaCl	0.7 M	4.9
Na -EDTA (pH 8.0)	10mM	2 mL
1M Tris -HCl (pH 8.0)	50mM	5 mL
Agua estéril		Completar a 97 mL
Añadir mercaptoetanol inmediatamente antes de uso		3 mL

**Tabla 27. Cloroformo isoamil alcohol (para extracción de ADN)**

Reactivo	Uso tipo 1
Cloroformo	228 mL
Isoamil alcohol	12 mL

**Tabla 28. Solución CTAB (CTAB 10% (p/v):0.7 M NaCl)**

Reactivo	Densidad final	Uso tipo 1
CTAB	10%	2g
NaCl	0.7 M	0.82
Agua estéril		Añadir a 20 mL en total

**Tabla 29. Solución reguladora para precipitados**

Reactivo	Densidad final	Uso tipo 1
CTAB	1%	1.5g
1M Tris-HCL (pH 8.0)	50mM	7.5 mL
0.5M EDTA	10 mM	3 mL
Agua esteril		Añadir a 150 mL en total

**Tabla 30. 1M NaCl-TE (1M NaCl :10mM Tris-HCl pH 8.0 : 1mM EDTA )**

Reactivo	Uso tipo 1
5M NaCl	20mL
1MTris-Hcl (pH 8.0 )	1 mL
0.5 M EDTA ( pH 8.0)	0.2 mL
Mili-Q agua	Ajustar solución
total	100mL

### **3. Extracción de ARN a partir de virus (Método Ácido Guanidinium tiocianato-fenol-cloroformo)**

1. Añadir 3 mL de solución de tiocianato de guanidinio (GTC) (Tabla 31) a 0.3 g de tejido infectado y macerar rápidamente.
2. Añadir 0.3 mL de 2M acetato sódico (Tabla 32), 3mL de fenol saturado con agua (Tabla 33) y 0.6 mL de cloroformo.  
Agitar vigorosamente y después poner sobre hielo.
3. Centrifugar a 10.000 g a 4°C durante 20 minutos.  
Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo.  
Añadir 3mL de alcohol isopropílico.
4. Centrifugar a 10.000 g a 4°C durante 20 minutos  
Después eliminar el sobrenadante.
5. Añadir 0.4 ml de GTC solución al precipitado de RNA.  
Para diluir el precipitado agregar 0.4 mL de alcohol isopropílico.
6. Centrifugar a 10,000 g, a 4°C durante 10 minutos, después retirar el sobrenadante.
7. Añadir 1 mL de alcohol etílico al 75%, después centrifugar a 10.000 g, a 4°C durante 5 minutos.  
(Se puede obtener un precipitado más puro si se repite 2 ó 3 veces el procedimiento con alcohol etílico al 75 %)
8. Secar el precipitado un poco y después añadir agua tratada con DEPC (Tabla 34) o TE (Tabla 35) (Cuando no se pueda diluir tratar el precipitado a 65°C por 30 minutos)
9. Medir la densidad óptica (DO a 260nm,  $10D=40 \text{ mg/mL}$ )  
Por ejemplo: 50 veces la dilución indica 0.25 en DO 260,  $0.25 \cdot 0.04 \cdot 50 = 0.5 \text{ mg/mL}$

El ARN se puede conservar en alcohol etílico al 75 % a -20 °C, o como solución a -80 °C.

## Preparación de las soluciones

**Tabla 31. Solución de Tiocianato de guanidinio (GTC)**

4M GTC
25 mM Citrato de sodio (pH 7)
0.5 % Sarcocyl
0.2 M Mercaptoetanol (puro: es 14.3 M)

**Tabla 32. Aceto sódico 2M (pH 4.0, para extracción de ARN)**

Reactivo	Grado	Densidad final	Uso tipo 1	Uso tipo 2
NaOAc-3H <sub>2</sub> O	Calidad superior	2 M	13.6 g	272.2 g
Milli-Q agua	Libre de ARNasas -		15 mL	300 mL
Milli-Q agua para la solución final	Libre de ARNasas -		Ajustar	Ajustar
TOTAL			50 mL	1 L
Ácido acético glacial	Calidad superior		ca. 28 mL	ca. 560 mL

**Tabla 33. Agua saturada Fenol (para ARN). Ver Tabla 18 para extracción de ADN**

1. Pesar 30 g de cristales de Fenol en tubo de centrifugación de polipropileno
2. Pesar 0.03 g de 8-hidroxiquinolina en la tapa del tubo de centrifugación
3. Añadir agua mili-Q (aprox. 20 mL).
4. Tapar cuidadosamente el tubo sin derramar la 8-hidroxiloquinolina
5. Disolver el fenol y la 8-hidroxiloquinolina a 65°C en baño de María
6. Ajustar y cerrar la tapa, después agitar fuertemente
- 7 Añadir agua mili-Q hasta completar volumen

**Tabla 34. Agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC)**

---

Añadir 1ml de 0.1% de dietil pirocarbonato (DEPC) a agua milli-Q

Tapar y agitar vigorosamente.

Incubar en baño María a 37°C durante 2 horas (agitar esporádicamente)

Luego aflojar la tapa un poco y autoclavar a 121°C durante 20 minutos

Autoclavar una segunda vez

Enfriar a temperatura ambiente antes de usar

---

**Tabla 35. TE (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA )**

Reactivo	Uso tipo 1
1MTris-HCl (pH 8.0 )	10 mL
0.5 M EDTA (pH 8.0)	2 mL
Agua milli-Q	988 mL
Total	1000 mL

---

#### **4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

##### **1). PCR**

La PCR es una técnica que permite obtener muchas copias de ADN provenientes de muestras pequeñas, amplificando un fragmento de ADN, lo que conlleva a la identificación de patógenos, de genes de plantas, de individuos etc.. Las técnicas de PCR pueden hacerse para ADN o para ARN(RT-PCR). En el caso de ARN, una hebra es retrotranscrita en ADN complementario (ADNc) usando una enzima llamada transcriptasa inversa y el resultado, se amplifica en una PCR general. El proceso de PCR se hace en tres pasos que se llevan a cabo en el termociclador o equipo de PCR. Estos son el proceso de desnaturalización, el de anillamiento y el de elongación. El termociclador puede controlar la temperatura y el tiempo necesario para cada proceso. Generalmente, se usa una temperatura de 95° C para desnaturalizar, 60° C para el anillamiento (la temperatura de fusión  $T_m$  puede ser  $\pm 5$  °C más alta) y 72 °C para la elongación. El manejo del equipo de PCR se hace según el manual del mismo (Figura 49).

## 2). Preparación de la solución para PCR

La solución para la PCR se puede preparar según indicaciones del kit para PCR. Pero tiene que disponerse de los primers o cebadores y del extracto de ADN o ARN.

**Generalmente la solución para la PCR incluye los siguientes componentes.**

Extracto de ADN	menos de 1 $\mu$ g
10X Gene Taq Universal Buffer	5 $\mu$ L
dNTP Mixture (2.5 mmol L)	4 $\mu$ L
Primer forward (20 pmol $\mu$ L)	1 $\mu$ L
Primer reverse (20 pmol $\mu$ L)	1 $\mu$ L
Gene Taq o Gene Taq NT (5 unidades $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L
Mg <sup>2+</sup> (0.5-2.5mmol/L más alta concentración de dNTP)	
dd H <sub>2</sub> O	Por encima de 50 $\mu$ L

## 3). Cebadores o "Primers"

Los cebadores son pequeñas partes de ADN que se anillan a secuencias específicas, en este caso se usan un par de cebadores que se unen a los extremos opuestos del gen del ADN, uno en cada hebra del ADN. Una vez que los cebadores se anillan al ADN, las polimerasas extienden el ADN desde el extremo 5' hasta el 3' final. Los cebadores se seleccionan cuando se forman las dos nuevas copias y entre ellos se superponen en la región de interés.

Los pares de cebadores se pueden diseñar mediante el software "Primer-3" que se encuentra en la página: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>. Los cebadores ideales tienen que satisfacer las siguientes características. Ambos cebadores tienen que estar contruidos de 18 a 28 nucleótidos, que incluyan las concentraciones de Guanina y Citosina en proporción de 50-60 % y para que se desacoplen en un valor de T<sub>m</sub> (temperatura de separación) entre 55-80 °C. Para los cebadores de virus, bacterias y hongos se usa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) que es un conjunto de herramientas informáticas o base de datos que comparan secuencias de ADN o proteínas utilizando los datos que se encuentran disponibles en bases de datos de dominio público. Están diseñadas para encontrar coincidencias de porciones pequeñas de ADN o proteínas entre un conjunto de secuencias mayores. BLAST está disponible en internet y su dirección es:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/...> Igualmente existe una base de datos de DDBJ (Japón) con cebadores de virus, bacterias y hongos y se usan los siguientes enlaces: GIB (virus), GIB (bacterias), GTOP (proteínas) etc.



**Figura 49.** Equipo para PCR

## Bibliografía

- 中山広樹、西方敬人. 1995. バイオ実験イラストレイテッド1 分子生物学実験の基礎. 秀潤社 (東京). Pp. 171.
- 佐藤昭二、後藤正夫、土居養二 (編). 1983. 植物病理実験法. 講談社サイエンティフィク (東京). Pp. 230 .
- 渡辺格 (監)、杉浦昌弘 (編). 1989. クローニングとシークエンス. 農村文化社 (東京). Pp. 315.

Agrios, G. N. 2004. Plant Pathology 5ed. Elsevier Academic Press. Pp. 922.

Narayanasamy, P. 2001. Plant Pathogen Detection and Disease Diagnosis 2ed. Marcel Dekker Inc. New York Pp. 518.

# Glosario

## A

aceite de inmersión	14,27,28
acetato de uranilo	39,40
acetato sódico	49-51,58,59
acetona	34-36-38
ácido acético glacial	19,52,59
ácido bórico	53
ácido etilendiaminotetraacético 2Na 2H <sub>2</sub> O	48
ácido fosfotúngstico	28,34
ácido sulfanílico	30
ADN	46,48,55,60,61
ADNc	60
adyuvante completo	43,44
áfido	41
agar V8	17
agar-agar	12,17
agar-agua	19
agarosa	46,51
agitador magnético	11
aglutinación en lámina	44
agua peptonada	30,31
aislamiento	17-20,23
aislamiento de bacteria	30,31
ajustar al pH	11
alcohol etílico	50,51,55,58
alcohol isoamílico	22,23
alcohol isopropílico	22,51,55,58
amplificación	55
amyl acético	34
amyl alcohol	42
anhídrido dodecenil succínico	37
anhídrido nadic metílico	37
antibiótico	8
anticuerpo	43,45

arabinosa	30
ARN	8,49,58,61
ascocarpo	19,20
AU	40
autoclave	7
autoclave horizontal	7
autoclave vertical	7
azida de sodio	43,45
azul de bromofenol	54

## B

bacteria	14, 26, 27, 29-33, 43, 55, 56, 61
balanza	9
baño de María	12, 13, 16, 17, 43, 50, 59, 60
basidiocarpo	19,20
Basidiomiceto	15, 19
BLAST	56,61
bomba de vacío	22,35,37
<i>Botrytis cinerea</i>	24
BPB	54
bromotimol	29,30
bromuro de cetiltrimetilamonio	55-56
bromuro de etidio	51,55
BTB	29

## C

cabina de flujo laminar	12, 13, 31
caja de malla	22
caja de Petri	12, 18-21, 23, 24, 30, 31, 34, 35, 41, 45
calibración	10
cápsula de gelatina	35,37
cebador	61
celobiosa	30
centrifugación del gradiente de densidad	42
centrifugar	17, 42, 50, 51, 55, 58
citocromo-c	29

citrato sódico de plomo	39,40
<i>Clavibacter michiganensis</i>	29
cloramfenicol	8
cloroformo	42, 48, 49, 57, 58
cloroformo isoamil alcohol	48,49,55,57
cloroformo isoamil alcohol (para ARN)	49
colodión	34,35
colorante azul	54
corn meal	17
corte ultrafino	35-37
CTAB	55-57
cultivo	8, 11-13, 16, 17, 20-26, 28-31, 45

## D

DDBJ	56,61
DDSA	37,38
DEPC	58,60
descomposición	29
deshidratación	22,23,35,36
dextrosa	16,17,19-21
dietil pirocarbonato	60
dilución	31,58
disección	15,16,24,43
dispensador	12,13,17
DMP-30	37,38
DN	33,34
dodecil sulfato de sodio	49

## E

EDTA	42, 46-48, 50-54, 56, 57, 60
electroforesis	46,51
ensayos fisiológicos	29
Epon 812	37,38
<i>Erwinia carotovora</i>	29
espora	19-24
esterilización	6, 8, 12, 18
esterilización en seco	
esterilización por filtro	
extracción de ADN	50, 55, 57, 59

esterilización por filtro	8
etanol	18,28,30,35,36
extracción de ADN	55
<b>F</b>	
fenol en cristal	50
fenol neutro (para extracción de ADN )	50
fenol saturado con agua	58
fermentación	29
ficor	54
fijación	22,23,35,36
fijación doble	35
fijación simple	35
fitoplasma	33,55
formalina	34
fucsina	26,27
<b>G</b>	
GA	22, 23, 36
GIB (bacterias)	56, 61
GIB (virus)	56, 61
glicerina	16, 54
glucosa	8, 17, 29
glutaraldehido	22, 23, 34, 35
Gram	27, 28
GTC	58,59
GTOP (proteínas )	56, 61
<b>H-I</b>	
8-hidroxiloquinolina	50,59
hipoclorito	18,30
hongo	15-25, 33, 43, 55, 61
identificación de bacteria	32
identificación de hongo	23-25
identificación de virus	45
inoculación con jugo	40,41
inoculación de bacteria	31
inoculación de hongo	20-22
inoculación de virus	40

inyección	37,43,44
<b>J-L</b>	
jeringa	8, 37, 38, 42-44
lactofenol	15, 23, 24
lactosa	8,30
lámina	14-16, 19, 23-28, 34, 35, 44, 46
lámina de silicona	35
laminilla	15, 23-26, 28
lauril sulfato de sodio	49
<b>M</b>	
manchas en anillo	33
manitol	30
medio agar extracto de malta	17
medio agar harina de maíz	17
medio de cultivo	12, 13, 16, 21, 24-26, 29-31, 45
medio de salvado	21
membrana de colodión	34,35
mercapto-etanol	42, 50, 56, 61
micelio	15,21,22
microcultivo	23,25
micromanipulador	19
microonda	12, 46
microscopio electrónico de barrido	22,23
microscopio electrónico de transmisión	22,28,33,34
microscopio óptico	13-17, 19, 23
milli-Q agua	46-49, 54, 55, 59, 60
MNA	37,38
Mollicutes	33
mosaico	33
<b>N</b>	
N,N-dimetil-1-naftilamina	30
NaCl	29, 31, 37, 48, 56-58
NaCl-TE	55, 57
NCBI	45, 56, 61

necrosis	33
nitrate de plata	28,29
nucleocapside	42

## O-P

O.F.	29
OsO4	23, 35, 36
Ouchterlony	45
oxidación	29, 30
oxidasa de Kovac	29
papel de celofán	9
parafilm	22, 34, 51
PCR	55, 60-62
PDA	16,18
pesaje de reactivo	9, 10
poliacrilamida	51
policlonal	46, 51
potenciómetro	10,11
Primer	61
Primer-3	56, 61
PTA	28,34
pulverizar	21
purificación de virus	42

## R

<i>Ralstonia solanacearum</i>	29
ramnosa	30
reacción de suero	44
reactivo de Griess	30
reducción de nitrato	29
rejilla	34,35
resina de epoxi	35-37,39
RT-PCR	60

## S

sacarosa	22, 35, 42, 54
----------	----------------

safranina	27, 28
salicina	30
salvado de trigo	21
saúco	15, 16
SDS	49
Sedimentación	50, 51, 55
SEM	22,23
serie de alcohol	22
silicona	12, 35, 38
síntoma	15, 16, 19, 21, 30, 31, 33, 34, 40
solución de Dalton	22, 35, 37
solución de Gram	27,28
solución de lugol	27,28
suero fisiológico	43, 45

## T

TAE	46,51-52
tampón de fosfato	35, 40, 41, 45
tampón EDTA	42
tapón de algodón	11, 12
tartrato ácido de antimonio y potasio	28
tartrato de sodio y potasio	30
TBE	53
TE	47, 55, 57, 58, 60
TEM	22,28,33,34,39,42
tetróxido de osmio	22, 23, 35, 37
tinción de flagelos	28
tinción de Gram	27
tinción electrónica	40
tinción negativa	33,34
tinción simple	26
tiocianato de guanidinio	58,59
trehalosa	30
tris	46, 47, 50, 52, 53
tris-acetato EDTA	46,51,52
tris-borato EDTA	53

tris-HCl	46, 47, 50, 56, 57, 60
tubo de ensayo	11, 12, 17, 29-31, 45
ultra -micrótomo	39

### U-Y

UV	51
venas blanca o amarilla	33
virus	33, 34, 40-43, 45, 56, 58, 61
XC	54
Xilencianol FF	54
xilosa	8,30
yoduro de potasio	28
YP	26,31



Japan International  
Cooperation Agency



Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria



ISBN: 978-958-99436-1-8



9 789589 943618