
DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Área de Desarrollo y Validación de Protocolos

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA Y RNA, A PARTIR DE SEMILLAS Y HOJAS

Autorizó:

M.C. Abel López Buenfil

Director del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Revisó:

M.C. José Gustavo Torres Martínez

Jefe de Departamento de Roedores, Aves y Malezas

M.C. José Manuel Cambrón Crisantos

Coordinador del Área de Desarrollo y Validación de Protocolos

Elaboró:

M.C. José Luis Cruz Jaramillo

Técnico de laboratorio del Área de Desarrollo y
Validación de protocolos

Dr. Francisco Arturo Ramírez Ortega

Profesor del IPN

Diseño y edición:

Ing. José Alejandro Cotoc Roldán

Versión: 0.1

Abril, 2017

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Área de Desarrollo y Validación de Protocolos

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|----|
| TABLA DE CONTENIDO..... | I |
| ÍNDICE DE FIGURAS | II |
| ÍNDICE DE CUADROS..... | II |
| JUSTIFICACIÓN | 1 |
| ÁCIDOS NUCLEICOS..... | 2 |
| IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS | 3 |
| IMPORTANCIA DE LA EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS | 4 |
| FLUJO DE TRABAJO | 4 |
| RECOMENDACIONES DE ENVÍO Y ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA | 5 |
| Envío de la muestra | 5 |
| Almacenamiento de la muestra | 5 |
| ACONDICIONAMIENTO Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA | 6 |
| PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS | 7 |
| EVALUACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS | 9 |
| Cuantificación, calidad e integridad de los ácidos nucleicos | 9 |
| Amplificación de la región 16S rRNA..... | 10 |
| DESTRUCCIÓN DE LA MUESTRA..... | 13 |
| RECOMENDACIONES DE TRABAJO | 13 |
| LITERATURA CITADA | 14 |

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Área de Desarrollo y Validación de Protocolos

| | |
|---|----|
| ANEXOS | 15 |
| ANEXO 1. INFORMACIÓN DE LAS SUSTANCIAS EMPLEADAS..... | 15 |
| ANEXO 2. RELACIÓN DE SOLUCIONES | 17 |
| ANEXO 3. ESPECTRO DE ABSORCIÓN CLÁSICO DE DNA Y RNA EN NANODROP. | 20 |
| ANEXO 4. SOLICITUD DE DIAGNÓSTICO FITOSANITARIO | 21 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura. 1. Bases nitrogenadas que constituyen los ácidos nucleicos. Modificado de Lodish, <i>et al.</i> (2000). | 3 |
| Figura. 2. Gel de agarosa al 0.8% en TAE 1X para determinar la integridad del DNA en muestras de café. MPM=1Kb invitrogene ® | 10 |
| Figura. 3. Gel de agarosa 1% mostrando la amplificación de 300 pb de la región 16S rRNA. M= Muestra, (-) = Control negativo, (+) = Control positivo y MPM= 1 Kb DNA Ladder Invitrogen ®. | 12 |
| Figura. 4. Curva obtenida en el espectrofotómetro (nanodrop) para medir la concentración de DNA | 20 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro. 1. Secuencias de los primer's 16S1/16S2 | 10 |
| Cuadro. 2. Concentraciones de reactivos para la PCR para de 16S1 /16S2..... | 11 |
| Cuadro. 3. Condiciones de amplificación para 16S1 /16S2 | 11 |

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Área de Desarrollo y Validación de Protocolos

JUSTIFICACIÓN

Existen múltiples protocolos para la detección de patógenos de interés cuarentenario y económico. Entre éstas técnicas podemos mencionar las bioquímicas, serológicas y las de biología molecular. A pesar de que las pruebas bioquímicas y serológicas han sido utilizadas durante décadas y de que aún son una poderosa herramienta para un diagnóstico, están comenzando a “ser una segunda opción”, en el caso de las pruebas bioquímicas debido al tiempo que tardan y que en algunos casos no hay medios que permitan el cultivo de los patógenos, por otro lado las pruebas serológicas fácilmente pueden presentar contaminación cruzada, además de que requieren anticuerpos monoclonales específicos para cada patógeno, cuyo procedimiento de obtención es tardado y costoso. Debido a la emergente ola de nuevos patógenos, los laboratorios a nivel mundial que se dedican a la producción de estos anticuerpos no han podido cubrir la demanda de kits requerida por parte de los laboratorios de diagnóstico e investigación que utilizan estos productos. Por otro lado, las técnicas de biología molecular han estado introduciéndose cada vez más en todos los campos de diagnóstico e investigación a nivel mundial porque, a diferencia de las pruebas bioquímicas y serológicas, la elaboración de pruebas moleculares no requiere mucho tiempo para adaptarse a cada caso particular que surge, además de que el tiempo de síntesis de oligonucleótidos específicos para cada diagnóstico es mucho menor que el que se requiere para obtener anticuerpos monoclonales específicos.

La detección oportuna de organismos fitopatógenos de cultivos de interés económico permite tomar medidas para prevenir la propagación de plagas, promover su erradicación y evitar de esta forma pérdidas económicas. Los patógenos de plantas pueden estar presentes en diferentes partes de la planta y de acuerdo al organismo, puede utilizar múltiples vías y vectores para colonizar las plantas. Dentro de las vías de infección encontramos la transmisión mecánica, por injerto, cuscuta, polen y la transmisión por semilla. En el caso de las semillas, la mayoría de las veces no es posible identificar a simple vista los síntomas de enfermedades o ataque de patógenos debido a que carecen casi por completo de actividad metabólica. Por lo tanto, es necesario inducir la germinación para evidenciar la presencia del patógeno y poder realizar el diagnóstico, ya sea serológica o molecularmente, con lo cual se alarga el tiempo de emisión del resultado, pudiendo incrementar los costos a los interesados finales.

Con la intención de no germinar las semillas y disminuir el tiempo de emisión de los dictámenes de muestras de semillas u otros tejidos vegetales, se sugiere utilizar alguna de las técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) o alguna de sus variantes, para realizar el diagnóstico. Pero para la correcta

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Área de Desarrollo y Validación de Protocolos

implementación de estas técnicas es necesario obtener el material genético de la muestra (DNA y/o RNA) libre de almidones y polifenoles que pueden inhibir la reacción de PCR o sus variantes. El presente protocolo está diseñado para obtener DNA y RNA de buena calidad a partir de semillas, sin embargo, también es útil para obtenerlos a partir de hojas, raíces, frutos e incluso vectores, donde el protocolo clásico de CTAB o los Kits comerciales no funcionan como se espera.

ÁCIDOS NUCLEICOS

Fue Johann Friedrich Miescher quien descubrió y aisló por primera vez a los ácidos nucleicos en 1869, dándoles el nombre de nucleína (Dahm, 2005). Más tarde, se comprobó que las células procariotas, que carecen de núcleo, también contenían ácidos nucleicos (Caspersson y Schultz, 1939).

Estructura de los ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos son grandes polímeros formados por la repetición de monómeros denominados nucleótidos. Cada nucleótido consta de tres partes: un azúcar de cinco carbonos o pentosa (Desoxirribosa para el DNA o Ribosa para el RNA), uno o más grupos fosfato y una base nitrogenada.

Las **bases nitrogenadas** son compuestos orgánicos cíclicos que incluyen dos o más átomos de nitrógeno. Biológicamente existen seis bases nitrogenadas principales que se clasifican en tres grupos: bases **isoaloxazínicas** (derivadas de la estructura de la isoaloxazina), bases **purícas** o purinas (derivadas de la estructura de la purina y bases **pirimidínicas** (derivadas de la estructura de la pirimidina). En el caso de los ácidos nucleicos son 5 las bases nitrogenadas involucradas, la **Adenina (A)** y la **Guanina** son purícas; la **Timina (T)**, **Citosina (C)** y el **Uracilo (U)** son pirimidínicas (Fig. 1). Las bases adenina, guanina y citosina se encuentran tanto en DNA como RNA, la timina solo se encuentra en el DNA en cambio el uracilo solo se encuentra en el RNA.

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Área de Desarrollo y Validación de Protocolos

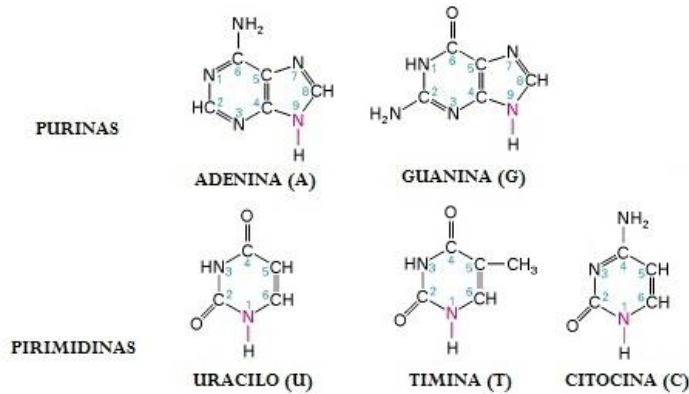


Figura. 1. Bases nitrogenadas que constituyen los ácidos nucleicos. Modificado de Lodish, *et al.* (2000).

Las **pentosas** son monosacáridos (glúcidos simples) formados por una cadena de cinco átomos de carbono que cumplen una función estructural. Como los demás monosacáridos aparecen en su estructura grupos hidroxilo (OH) la fórmula general de las pentosas es $C_5H_{10}O_5$. Las pentosas pueden llevar grupos cetónicos o aldehídos, como las Aldopentosas, que como su nombre lo indica contienen la función aldehído. Una de las más importantes es la ribosa, la cual forma parte de los nucleótidos que forman el RNA. A partir de la ribosa se puede obtener la desoxirribosa, la cual forma parte del DNA.

El **grupo fosfato** es un ion poliatómico de fórmula empírica PO_4^{3-} , está compuesto por un átomo central de fósforo rodeado por cuatro átomos idénticos de oxígeno en disposición tetraédrica. El grupo fosfato es uno de los grupos funcionales más importantes para la vida. Se halla en los nucleótidos, tanto en los que constituyen parte de los ácidos nucleicos (DNA y RNA), como los que intervienen en el transporte de energía química (ATP).

IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Estas moléculas que poseen todos los organismos, dirigen y controlan la síntesis de proteínas, proporcionando la información que determina su especificidad y características biológicas y contienen las instrucciones necesarias para realizar los procesos vitales y son los responsables de todas las funciones básicas de los seres vivos. Podría decirse que lo que un organismo es, o puede llegar a ser, en términos biológicos, aparece “programado” en estas moléculas. O, dicho de otro modo, su función está relacionada con el almacenamiento y la transmisión de la información genética constituyendo la base molecular de la herencia.

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

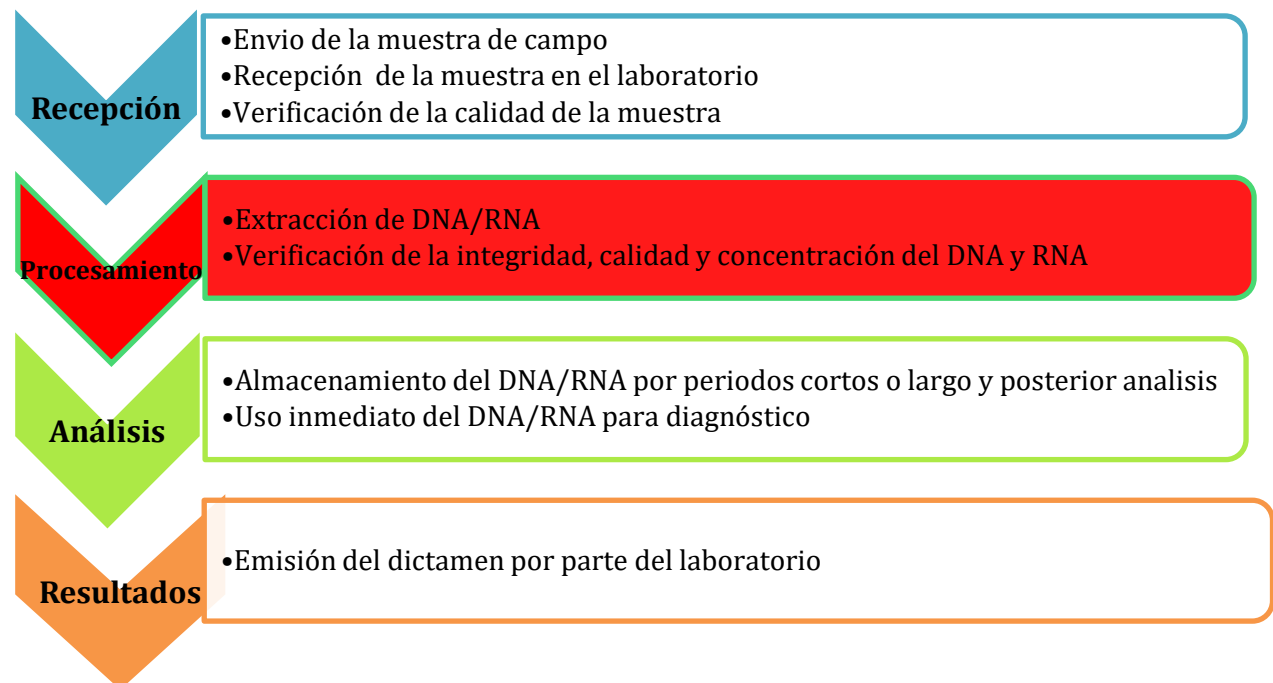
Área de Desarrollo y Validación de Protocolos

IMPORTANCIA DE LA EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

El diagnóstico molecular comienza con la extracción de ácidos nucleicos, la cual consiste en una lisis celular para liberar las moléculas en una fase acuosa que es separada de los restos celulares por centrifugación. Las proteínas son removidas de la fase acuosa con solventes orgánicas (como fenol o cloroformo). El ácido nucleico, que permanece en la fase acuosa, precipita con etanol y posteriormente es purificado y suspendido en el eluyente adecuado. El material genético resultante se podrá utilizar para hacer el diagnóstico mediante la técnica molecular adecuada (PCR, NESTED-PCR, qPCR, RT-PCR, RFLPS, AFLP's, entre otras). Es importante mencionar que las técnicas basadas en el uso de los ácidos nucleicos presentan una mayor sensibilidad respecto a las técnicas serológicas.

FLUJO DE TRABAJO

De un diagnóstico molecular



DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Área de Desarrollo y Validación de Protocolos

RECOMENDACIONES DE ENVIO Y ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA

ENVIO DE LA MUESTRA

Cuando se envían muestras de semillas deben de estar dentro de una bolsa o de un sobre de papel que las aisle de las condiciones ambientales. En el caso de muestras de tejido vegetal o plantas completas, estas se deben envolver en toallas y/o bolsas de papel que absorban el agua de condensación de la humedad generada por la transpiración del material vegetal.

Las muestras deben estar acompañadas de su respectiva solicitud de diagnóstico (Anexo 4) y cada muestra deberá esta rotulada de manera tal que se pueda identificar, utilice tinta indeleble para garantizar que no se borrará la etiqueta durante el transporte o manipulación habitual del embalaje. Se recomienda enviarlas dentro de hieleras con geles refrigerantes con la finalidad de retardar la degradación del tejido.

Las muestras que se reciben para diagnóstico serán registradas en la bitácora del laboratorio con el número de control que acompaña a la muestra. Posteriormente, se debe verificar que el material (semillas o vegetales) se encuentre en buenas condiciones; debe evitarse recibir muestras deterioradas, en descomposición o colonizadas por organismos saprofitos; si fuera el caso, solicite que se haga un nuevo muestreo.

Las muestras que presentan estado de descomposición ya no poseen RNA y posiblemente tampoco DNA de la semilla o tejido vegetal, por lo cual se descartan para detección de virus. En el caso de bacterias y hongos, si el patógeno a diagnosticar no puede ser el causante de la pudrición de las semillas, también se deben descartar.

ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA

Para conservar la viabilidad de las muestras, se recomienda almacenar las semillas en refrigeración (a 4°C) o en un recipiente herméticamente cerrado y protegidas de la humedad por medio de algún agente desecante como la silica. Los tejidos vegetales se deberán almacenar en refrigeración (a 4°C o -70°C dependiendo del o los patógenos que se pretendan detectar, así como de las técnicas a emplear). Al finalizar el diagnóstico, las muestras deberán ser resguardadas a 4°C o -70°C hasta por un mes, por si es necesaria alguna corroboración o algún otro diagnóstico.

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Área de Desarrollo y Validación de Protocolos

ACONDICIONAMIENTO Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Considerando la fuente de extracción podemos clasificar las distintas muestras a las cuales se les va a extraer el material genético en: 1) Muestras sencillas sin polifenoles ni almidones, 2) muestras con almidones, 3) muestras con polifenoles y almidones. El tejido que se toma para realizar el diagnóstico debe ser representativo de toda la muestra, principalmente de áreas donde se observen síntomas. Dependiendo del tipo de muestra, se recomienda tomar:

- a) Semilla: Cantidad en función del tamaño del ítem y lote.
- b) Hojas: Tomar la nervadura central.
- c) Ramas: Retirar la corteza y tomar a partir de la albura y el duramen.
- d) Raíz: Tomar principalmente raíces jóvenes.

En el caso de muestras asintomáticas es necesario realizar dos repeticiones por muestra. Se recomienda cortar las muestras de tejido vegetal en trozos pequeños (utilizar una navaja estéril por muestra) para facilitar su maceración en el mortero o disruptor.

Para el caso de las semillas, estas deben ser lavadas antes de ser procesadas, porque algunas tienen restos de fungicidas o de alguna otra sustancia química que las protege de la acción de microorganismos. El lavado se realiza remojando semillas durante 5 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 1% con agitación. Posteriormente, pasarlas a un recipiente con agua estéril y dejar en agitación a 40°C por una hora, retirar el exceso de humedad de las mismas y proceder a macerar.

Nota: en los anexos 1-2 se muestra la relación de las sustancias empleadas y su preparación.

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Área de Desarrollo y Validación de Protocolos

PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

A continuación, se describen los protocolos de extracción de DNA y RNA partiendo de 100mg de semilla o tejido vegetal.

Protocolo para la obtención de ADN genómico

Antes de comenzar, se recomienda **precalentar el buffer de lisis** (2% de CTAB, 0.5% de PVP, 20mM EDTA pH 8.0, 100mM Tris base pH 8.0, 2.5M de NaCl) a **65°C**.

1. Colocar la muestra en un mortero que haya sido precongelado previamente a -80°C, agregar nitrógeno líquido y moler hasta obtener un polvo fino.

2. Antes de que descongele la muestra, adicionar sobre ella 10 volúmenes del buffer de lisis previamente precalentado. Homogenizar un par de veces antes de que descongele completamente.

3.- Homogenizar y transferir a un tubo nuevo, incubar a 90°C por 10 minutos, mezclar un par de veces durante el proceso. Adicionar 1/10 de volumen de SDS al 10%, homogenizar e incubar por 5 minutos más. Transcurrido ese tiempo se permite que la muestra se enfríe a temperatura ambiente.

4. Adicionar 0.5 volúmenes de la mezcla previamente enfriada de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1 v/v), homogenizar y centrifugar a 14,000 rpm por 15 minutos a 4°C.

5. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y agregar 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M (pH 5.2), 0.5 volúmenes de fenol-cloroformo (5:1 v/v), homogenizar y centrifugar a 14,000rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.

6. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y adicionar 0.65 volúmenes de la mezcla de Etanol-Metanol-Ácido acético glacial (9:3:1 v/v). Agitar y centrifugar a 13,000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Para mejorar el rendimiento se recomienda antes de centrifugar incubar por una hora a -20°C.

7.- Tirar el sobrenadante. Lavar con 1 mililitro de la mezcla de Etanol-Agua-Metanol-Acetato de sodio 3M, pH 5.2 (30:9:5:1). Agitar y centrifugar a 13,000 rpm por 5 minutos.

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Área de Desarrollo y Validación de Protocolos

Descartar el sobrenadante. Si persisten algunas sales se puede dar un lavado adicional con 1 mililitro de etanol al 70%.

8.- Secar la pastilla y disolver en agua grado biología molecular (de 20 a 100 μ L dependiendo del tamaño de la pastilla formada)

Protocolo para la obtención de RNA total

Mediante la siguiente metodología se obtiene tanto DNA genómico como RNA total. Se recomienda esta metodología para muestras con poca cantidad de agua como semillas, cultivos bacterianos o fúngicos en los que hay presencia de agar, liofilizados y muestras deshidratadas en general. Antes de comenzar se recomienda que el mortero con pistilo haya sido precongelado a -80°C , **la solución de lisis debe estar a temperatura ambiente.**

1.- Colocar la muestra en un mortero que haya sido precongelado previamente a -80°C , agregar nitrógeno líquido y moler hasta obtener un polvo fino. Únicamente cuando el producto a obtener es RNA, se recomienda utilizar 5 μ L de β -mercapto-etanol por cada gramo de muestra, el cual debe ser añadido sobre la muestra una vez que haya sido congelada por el nitrógeno líquido y antes de comenzar a moler. Esto con el fin de que el β -mercapto-etanol actúe sobre las RNAsas conforme son liberadas durante la molienda.

2.- Antes de que la muestra descongele, se adiciona la solución de lisis (2% de CTAB, 0.5% de PVP, 20mM EDTA pH 8.0, 100mM Tris base pH 8.0, 2.5M de NaCl). Se homogeniza un par de veces antes de que la muestra descongele y se pasa a un tubo nuevo. Centrifuga por 2 minutos a 10,000 rpm.

3.- El sobrenadante del paso anterior se pasa a tubo nuevo, se agregan 0.5 volúmenes de fenol: cloroformo 5:1, 0.1 volúmenes de buffer de acetato de sodio 3M pH 5.2 y se homogeniza. Se centrifuga a 13,000 rpm por 10 minutos a 4°C .

4.- Se pasa el sobrenadante a tubo nuevo y se agregan 0.5 volúmenes de la solución fría de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico 25:24:1. Se homogeniza y se centrifuga a temperatura ambiente por 15 minutos.

5. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y adicionar 0.65 volúmenes de la mezcla de Etanol-Metanol-Ácido acético glacial (9:3:1 v/v). Agitar y centrifugar a 13,000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Para mejorar el rendimiento se recomienda antes de centrifugar incubar por una hora a -20°C .

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Área de Desarrollo y Validación de Protocolos

6.- Tirar el sobrenadante. Lavar con 1 mililitro de la mezcla de Etanol-Agua-Metanol-Acetato de sodio 3M, pH 5.2 (30:9:5:1). Agitar y centrifugar a 13,000 rpm por 5 minutos. Descartar el sobrenadante. Si persisten algunas sales se puede dar un lavado adicional con 1 mililitro de etanol al 70%.

7.- Secar la pastilla y disolver en agua grado biología molecular (de 20 a 100 μ L dependiendo del tamaño de la pastilla formada)

Cuando el producto de interés es RNA, se puede agregar 1 μ L de RNaseOUT™ y 1 μ L de ditioneitol (DTT) una vez que se ha eluido en 20 μ L de agua con el fin de prolongar la vida del RNA.

Cuando el producto es DNA, se agrega 1 μ L de RNasa por cada 100 μ L de volumen final de elución y se incuba a 37°C durante una hora antes de realizar la PCR.

La concentración final suele ser de 100 ng/ μ L a 500 ng/ μ L de DNA y RNA. Se recomienda almacenar el DNA o el RNA a -80°C. Bajo estas condiciones el material genético suele conservarse íntegro hasta por 5 años.

EVALUACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

CUANTIFICACIÓN, CALIDAD E INTEGRIDAD DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

La cuantificación del DNA total extraído se realiza mediante espectrometría, aceptando la calidad del DNA cuando las relaciones A260/A280 estén dentro del rango 1.7 - 2.0 (Ver anexo 3).

La verificación de la ausencia de inhibidores en el DNA puede observarse en un gel de agarosa al 0.8% en TAE 1X para determinar la integridad del DNA en muestras. MPM=1Kb invitrogene®. Homogenizar las muestras de la siguiente manera antes de cargarlas en el gel de agarosa: sobre una tira de parafilm coloque 5 μ L del DNA extraído y agregue 1 μ L de buffer de carga.

El voltaje aplicado es una constante de 80V por 60 min. Posteriormente, observar la imagen del gel en un transiluminador de luz ultra violeta (UV). En caso de una buena extracción, se debe obtener una banda íntegra de DNA genómico por encima de los 12,000 pb en todas las muestras (Fig. 5).

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Área de Desarrollo y Validación de Protocolos

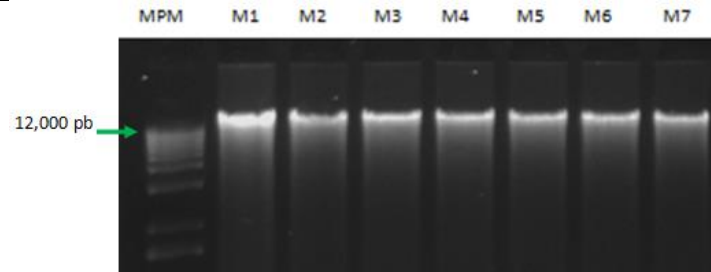


Figura. 2. Gel de agarosa al 0.8% en TAE 1X para determinar la integridad del DNA en muestras de café. MPM=1Kb invitrogene ®

Amplificación por PCR (control endógeno)

Una forma de confirmar la ausencia de inhibidores es mediante la amplificación de un gen endógeno como el 16S, 18S, actina, COX, COI. Esto permite comprobar que los resultados obtenidos son confiables.

AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN 16S rRNA

Mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificar la región ribosomal 16S utilizando los primer´s 16S1/16S2 de Trejo (2002) (Cuadro 1).

Cuadro. 1. Secuencias de los primer´s 16S1/16S2.

| Denominación del primer | Secuencia (5' - 3') | Tamaño del amplicón (pb) |
|-------------------------|----------------------|--------------------------|
| 16S1 | TGAGAATGGATAAGAGGCTC | 300 |
| 16S2 | TGTTGTTCCCCTCCCAAGGG | |

Las mezclas para la reacción de PCR se realizan a un volumen final de 25µL, en un gabinete de PCR, utilizando los reactivos del Cuadro 2. Una vez hecha la mezcla maestra, homogenizar los componentes, succionando y expulsando la mezcla con la micropipeta de 3 a 5 veces. En tubos de PCR de 0.2mL agregar 23µL del máster mix y adicionar 2µL de DNA de la muestra a analizar. Colocar los tubos en el termociclador y programar las condiciones de amplificación (Cuadro 3).

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Área de Desarrollo y Validación de Protocolos

Cuadro. 2. Concentraciones de reactivos para la PCR para de 16S1 /16S2

| Reactivo | Concentración inicial | Volumen 1X | Concentración final |
|---------------------|-----------------------|------------|---------------------|
| Agua grado PCR | | 17 µL | |
| Buffer | 10X | 2.5 µL | 1 X |
| MgCl ₂ | 50 mM | 0.75 µL | 1.5 mM |
| dNTP's | 10 mM | 0.5 µL | 200 µM |
| 16S1 | 10 pmoles/µL | 1 µL | 0.4 pmoles/µL |
| 16S2 | 10 pmoles/µL | 1 µL | 0.4 pmoles/µL |
| DNA Taq Pol | 5 U/ µL | 0.25 µL | 1.25 U |
| DNA (30 -100 ng/µL) | | 2 µL | |
| Volumen final | | 25 µL | |

Cuadro. 3. Condiciones de amplificación para 16S1 /16S2

| Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|-------------|--------|-----------|
| 94°C | 90 seg | 1 |
| 94°C | 40 seg | |
| 55°C | 40 seg | 35 ciclos |
| 72°C | 40 seg | |
| 72°C | 40 seg | 1 |
| 4°C | ∞ | ----- |

Nota: El término “Volumen 1X” que se presenta en el cuadro 3 se emplea para indicar la cantidad de reactivo requerida para analizar una sola muestra. Se debe multiplicar el volumen de cada reactivo por el total de muestras más un control positivo, un control negativo y una muestra por el error de pipeteo.

Verificar la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, teñido con bromuro de etidio o GelRed® (10mg/mL), cargue las muestras de la siguiente manera: sobre una tira de parafilm coloque 10 µL del producto de PCR y agregue 2µL de buffer de carga, homogenizar bien antes de colocar la mezcla en el gel sumergido en buffer TAE 1X. El voltaje aplicado es una constante de 90V durante 60 min, por tratarse de fragmentos más pequeños. Posteriormente, observar la imagen en un transiluminador de luz ultra violeta (UV) (Fig. 6).

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Área de Desarrollo y Validación de Protocolos

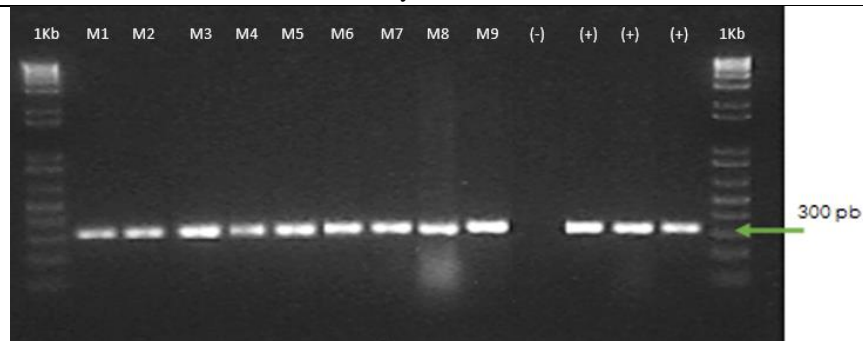


Figura. 3. Gel de agarosa 1% mostrando la amplificación de 300 pb de la región 16S rRNA. M= Muestra, (-) = Control negativo, (+) = Control positivo y MPM= 1 Kb DNA Ladder Invitrogen ®.

Nota: Tenga cuidado en el orden en que carga las muestras para su posterior identificación.

Una vez confirmada la ausencia de inhibidores y una buena calidad e integridad de los ácidos nucleicos, estos están listos para utilizar la técnica molecular que elija, o almacenar a -80°C por tiempo indeterminado.

Puntos a considerar:

Si los ácidos nucleicos extraídos presentan inhibidores, mala calidad o concentraciones muy bajas, se recomienda volver a extraer.

En caso de tener concentraciones muy altas se sugiere realizar una dilución hasta obtener la concentración deseada.

No se garantiza una buena extracción de ácidos nucleicos si esta se realiza a partir de tejidos o semillas no aptas para este procedimiento (deterioradas).

Compuestos que pueden afectar la PCR.

Todas las semillas poseen **almidón**, el cual es una fuente de carbohidratos fácilmente disponible para la planta en lo que ésta madura y es capaz de realizar fotosíntesis de manera efectiva. Por lo tanto, al purificar material genético a partir de semillas, es común encontrar almidón en las muestras. Sin embargo, ha sido demostrado que su presencia inhibe la PCR.

El almidón es poco soluble en agua fría y su solubilidad se ve seriamente afectada por la presencia de sales. Por lo que se recomienda realizar la extracción del material genético en frío. Además, el almidón se puede considerar insoluble en alcoholes, por lo que debe eliminarse antes de precipitar el material genético con alcohol, a fin de considerar que la muestra estará libre de él.

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Área de Desarrollo y Validación de Protocolos

Para hacer la remoción del almidón se debe utilizar una sal que sea altamente soluble en el disolvente que se utilizara en las purificaciones finales. En este protocolo se utilizan acetatos porque, a diferencia de otras sales, son muy solubles a altas concentraciones de etanol, son baratas y fáciles de conseguir. La presencia de acetatos disminuye la solubilidad del DNA y del RNA, por lo que se puede lograr que éstos precipiten en concentraciones más bajas de etanol.

Los **polifenoles** comparten muchas propiedades químicas con el DNA y el RNA, por lo que su remoción se hace aprovechando cualquier variación en la solubilidad entre éstos componentes. La presencia de cloruro de sodio altera la solubilidad del DNA y afecta de manera mínima la solubilidad de los polifenoles. Por lo tanto, altas concentraciones de cloruro de sodio ayudan a poder precipitar el DNA y el RNA a bajas concentraciones de Etanol, sin que precipiten los polifenoles (a concentración de etanol mayores o iguales al 70% (v/v), precipitan tanto el DNA y RNA como los polifenoles). Para muestras ricas en polifenoles, como lo son la hoja santa, vid, aguacate, frambuesa, cereza, fresa, dalia, café, algunos cítricos, se recomienda no realizar la precipitación con etanol a concentraciones mayores al 40% (v/v).

La **clorofila** también puede ser un contaminante importante en las muestras vegetales, cuya remoción se realiza con ácido acético y EDTA. El EDTA es un poderoso quelante de iones divalentes tales como el Mg^{2+} y Ca^{2+} , por lo que vuelve insoluble a la clorofila al secuestrar el magnesio de su núcleo. El ácido acético facilita que la clorofila pase a la fase orgánica cuando se purifica usando fenol: cloroformo: alcohol isoamílico.

DESTRUCCIÓN DE LA MUESTRA

Concluido el diagnóstico, y pasado el tiempo de resguardo de la muestra (un mes), la muestra se esteriliza en autoclave durante un tiempo de 15 - 20 minutos a 15-20 libras/ pulgada, antes de ser desechada o incinerada.

RECOMENDACIONES DE TRABAJO

- ✓ Siempre que pipetee una muestra deseche la punta y ocupe una nueva, lo mismo para el caso de los controles positivos y negativos.
- ✓ Utilice las concentraciones de ADN adecuadas
- ✓ Utilice pipetas calibradas.
- ✓ Prepare los reactivos como se indica.

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Área de Desarrollo y Validación de Protocolos

LITERATURA CITADA

Caspersson, T. y Schultz, J. 1939. Pentose nucleotides in the cytoplasm of rowing tissues. *Nature* 143: 602-3.

Jaakola, L., Pirttilä A. Ma., Halonen, M., y Hohtola, A. 2001. Isolation of High Quality RNA from Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Fruit. *Molecular Biotechnology*. 19:201-203.

Lodish, H., Berk, A, Zipursky S. L., Matsudaira, P, Baltimore, D., y Darnell, J. 2000. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman. Section 4.1, Structure of Nucleic Acids. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21514/>).

Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, USA. Pp. 545.

Ochoa, S. 1959. Enzymatic synthesis of ribonucleic acid. Nobel Lecture. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1959/ochoa-lecture.html

Porebski, S., Grant-Bailey, L. y Baum, B.R. 1997. Modification of CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components. *Plant Molecular Biology Reporter* 15(1): 8-15.

Trejo-Saavedra, D. L. 2002. Desarrollo y validación de metodología para la detección de transgenes en organismos genéticamente modificados y sus subproductos. Tesis CINVESTAV-I. Gto. Depto. de Ing. Genética. Pp.35-51.

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Área de Desarrollo y Validación de Protocolos

ANEXOS

ANEXO 1. INFORMACIÓN DE LAS SUSTANCIAS EMPLEADAS

Acetatode sodio: Modifica el pH acercándolo a la neutralidad. Ayuda a la eliminación total de almidones.

Ácido acético: Al modificar el pH (acidificándolo), hace que la clorofila pierda el magnesio de su núcleo (lo cual se observa a simple vista en algunas muestras, apreciándose la pérdida repentina de color verde al momento de agregar este reactivo), y la clorofila puede ser arrastrada a la fase orgánica. Además, hace fraguar a las gomas y cauchos, haciéndolos insolubles. Es principalmente útil para plantas con cauchos como la papaya y la higuera (En caso de trabajar con éstas plantas se recomienda usar el doble de lo especificado en el protocolo).

Beta-mercapto-etanol (2-sulfhidriletanol): Es un agente reductor de puentes disulfuro de las proteínas. Por equilibrio químico, al ponerlo en contacto con las proteínas, el grupo mercapto reduce a las cisteínas que estén formando puentes disulfuro. Aun en concentraciones muy bajas, es capaz de desnaturalizar a las RNAsas, ya que estas son proteínas que poseen 2 puentes disulfuro y sin ellos no tienen actividad. Es neurotóxico y volátil, debe manejarse en campana.

Cloroformo: Forma una fase orgánica donde quedará atrapado todo lo hidrofóbico y en la interface las proteínas y carbohidratos.

CTAB (Bromuro de hexadecil-trimetil-amonio): Detergente bipolar que desnaturaliza proteínas y disuelve membranas. Ayuda a la liberación del material genético y a lisar las células.

EDTA (Ácido EtilenDiaminoTetraAcético): La capacidad de EDTA para potencialmente donar sus seis pares de electrones para la formación de enlaces covalentes coordinados a cationes metálicos hace al EDTA un ligando hexadentado ayudando a mantener el pH en 8.0, además secuestra metales polivalentes que pueden contaminar el DNA. En el caso particular de plantas, secuestra el calcio que mantiene unidas a las pectinas que forman la pared celular primaria, ayudando así a la liberación de los ácidos nucleicos. También secuestra al magnesio que facilita la solubilidad del DNA y del RNA para que puedan precipitar a concentraciones más bajas de Etanol. Es insoluble en agua fría cuando el pH es menor de 8.0; por ello es

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Área de Desarrollo y Validación de Protocolos

probable que éste se haga soluble hasta que se calienta cerca de la ebullición. La principal toxicidad del EDTA es en el riñón.

Etanol: En este protocolo se utiliza para deshidratar al DNA y el RNA para que precipiten y separarlos de las sustancias que se encuentren en solución con ellos. Es importante que la precipitación se haga a una concentración de 40% (v/v), ya que a concentraciones del 45% (v/v) ya comienza a precipitar polifenoles. Cuando se precipitan polifenoles, la pastilla formada al centrifugar presenta color. Las Pastillas con color presentan espectros de absorción distintos al patrón clásico.

Fenol: Desnaturaliza y arrastra proteínas a la fase orgánica. Ayuda a eliminar polifenoles y taninos que estén solubles. En seres humanos, los efectos de respirar fenol en el aire no se conocen. Gente cuya piel fue expuesta a altos niveles de fenol sufrió daño al hígado, diarrea, obscurecimiento de la orina y anemia hemolítica.

Alcohol Isoamílico: Es un antiespumante.

NaCl (Cloruro de sodio): Ayuda a precipitar almidones, pigmentos, gomas, pectinas y proteínas. A la molaridad de 2.5M ayuda también a romper las células.

PVP 40 (Poli-Vinil-Pirrolidona): Polímero de peso molecular variable que es cercano a los 40000 g/mol. Se utiliza para eliminar pectinas, mucoproteínas (como en nopal), gomas y fenoles. Al ser de cadenas largas, arrastra pectinas y fibras solubles, además de ayudar a precipitar pectinas y fibras insolubles. Es inerte y no modifica el pH. Es muy difícil de hacer soluble, no se recomienda tratar de solubilizarla por separado de las sales, debido a que antes de hacerse soluble adquiere mucha viscosidad (al grado de formar un pseudoplástico), que desaparece al hacerse soluble. Se recomienda mezclar muy bien el PVP en polvo con las sales solubles como NaCl, TRIS y CTAB para que al agregar agua tibia lentamente se incorpore a la solución a la par con las sales. En el protocolo se recomienda PVP 40, pero entre mayor sea el peso molecular promedio del PVP, es más difícil que se haga soluble y arrastra más eficientemente las gomas y fenoles.

SDS (Dodecil-sulfato de sodio): Detergente aniónico fuerte que disuelve membranas celulares y se elimina fácilmente en la fase orgánica al ser de cadena larga. Al centrifugar, promueve la formación de una fase independiente, con apariencia de nata, que contiene a las grasas, ceras y parafinas presentes en la muestra. Desnaturaliza proteínas y les confiere una carga negativa que favorece la unión con la urea para que precipiten. También es un agente caotrópico.

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Área de Desarrollo y Validación de Protocolos

TRIS (tris[hidroximetil] aminometano): Ayuda a mantener el pH del buffer en 8.0, en el cual el DNA y el RNA son más solubles, por lo que es indispensable en la extracción.

DTT (DL-Ditiotreitol): Usado para estabilizar enzimas y otras proteínas las cuales poseen grupos libres sulfhidrilos. Ha demostrado restaurar la actividad perdida por la oxidación de estos grupos *in vitro*. Reduce cuantitativamente enlaces disulfuro y mantiene monotioles en estado reducido.

ANEXO 2. RELACIÓN DE SOLUCIONES

Solución de CTAB al 2% con diferente concentración de NaCl y pH.

Pesar las siguientes sustancias para preparar 1L de CTAB al 2%, con diferente concentración de NaCl y pH.

| CTAB 2% CON NAACL 5 M PH=5.2 | CTAB | PVP (40) | NAACL | TRIS (BASE) | EDTA |
|---|-------------|-----------------|--------------|------------------------|---------------|
| Masa a pesar (g) | 20 | 5 | 146 | 2.4228 | 1.4612 |
| Concentración final | 2% (m/v) | 0.5% (m/v) | 2.5 M | 0.02 M | 0.005 M |
| Peso molecular (g/mol) | 364.48 | 40 000 | 58.4 | 121.14 | 292.24 |

| CTAB 2% con NaCl 0.02M pH=8.0 | CTAB | PVP (40) | NaCl | Tris (Base) | EDTA |
|--|-------------|-----------------|--------------|------------------------|---------------|
| Masa a pesar (g) | 20 | 5 | 11.68 | 2.4228 | 1.4612 |
| Concentración final | 2% (m/v) | 0.5% (m/v) | 0.02M | 0.02 M | 0.005 M |
| Peso Molecular (g/mol) | 364.48 | 40 000 | 58.4 | 121.14 | 292.24 |

| CTAB 2% con NaCl 2.5MpH=8.0 | CTAB | PVP (40) | NaCl | Tris (Base) | EDTA |
|--|-------------|-----------------|-------------|------------------------|---------------|
| Masa a pesar (g) | 20 | 5 | 146 | 2.4228 | 1.4612 |
| Concentración final | 2% (m/v) | 0.5% (m/v) | 2.5M | 0.02 M | 0.005 M |
| Peso Molecular (g/mol) | 364.48 | 40 000 | 58.4 | 121.14 | 292.24 |

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Área de Desarrollo y Validación de Protocolos

Solución Buffer de Acetato de Sodio 3 Molar, pH = 5.2

Pesar las siguientes sustancias para preparar 1L acetato de sodio

| Acetato de Sodio 3M, pH = 5.2 | Acetato de Sodio (CH ₃ COONa) |
|-------------------------------|--|
| Masa a pesar (g) | 180.55 |
| Concentración final | 3 M |
| Peso Molecular (g/mol) | 82.03 |

Ajuste el pH agregando lentamente Ácido acético glacial. Afore a un litro con agua destilada y esterilice por filtración o autoclave.

Solución amortiguadora de Ácido Acético/Acetato de Sodio 2 Molar, pH=4.85

| Ácido Acético/Acetato de Sodio 2 Molar, pH=4.85 | Acetato de Sodio (CH ₃ COONa) | Ácido acético glacial (C ₂ H ₄ O ₂) |
|---|--|---|
| Masa a pesar (g) o Volumen a medir (mL) | 91 | 51.5 |
| Concentración final | 2 M | 5.15% |
| Peso Molecular (g/mol) | 82.03 | 60,05 |

Etanol-Metanol-Ácido Acético (21:3:1)

Mida y mezcle las siguientes soluciones

| Etanol:Metanol:Ácido Acético (21:3:1) | Etanol Absoluto (C ₂ H ₆ O) | Metanol (CH ₄ O) | Ácido acético glacial (C ₂ H ₄ O ₂) |
|---|---|-----------------------------|---|
| Masa a pesar (g) o Volumen a medir (mL) | 525 | 75 | 25 |
| Concentración final | 21 | 3 | 1 |
| Peso Molecular (g/mol) | 46.07 | 32.04 | 60.05 |

Solución de SDS al 10%

Para preparar un litro pese el reactivo

| Solución de SDS al 10% | SDS (NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄) |
|---|--|
| Masa a pesar (g) o Volumen a medir (mL) | 100 |
| Concentración final | 10 |
| Peso Molecular (g/mol) | 288,372 |

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Área de Desarrollo y Validación de Protocolos

Solución amortiguadora de Acetato de Sodio 3M, pH = 5.2

Preparación de 1Litro.

| Acetato de Sodio 3M, pH = 5.2 | Acetato de Sodio (CH₃COONa) | Ácido acético glacial (C₂H₄O₂) |
|---|---|--|
| Masa a pesar (g) o Volumen a medir (mL) | 180.55 | 45.7 |
| Concentración final | 3 M | 4.57% |
| Peso Molecular (g/mol) | 82.03 | 60.05 |

Solución de Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico (25:24:1)

Para preparar 1L agregue lo siguiente en un frasco ámbar. Almacenar a 4°C.

| Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico (25:24:1). | Fenol (C₆H₆O) | Cloroformo (CHCl₃) | Alcohol Isoamílico (CH₃)₂CHCH₂CH₂OH) |
|---|--|--|---|
| Masa a pesar (g) o Volumen a medir (mL) | 500 | 480 | 20 |
| Concentración final | 25 | 24 | 1 |
| Peso Molecular (g/mol) | 94,11124 | 119.38 | 88.15 |

Preparación de la solución de Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1)

Para preparar 1 L agregue lo siguiente en un frasco ámbar, almacenar a 4°C.

| Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1) | Cloroformo (CHCl₃) | Alcohol Isoamílico (CH₃)₂CHCH₂CH₂OH) |
|--|--|---|
| Masa a pesar (g) o Volumen a medir (mL) | 960 | 40 |
| Concentración final | 24 | 1 |
| Peso Molecular (g/mol) | 119.38 | 88.15 |

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Área de Desarrollo y Validación de Protocolos

TBE (10X) pH 8.0

Para preparar 1L

| Etanol: Agua: Metanol (7:3:2) | Tris base (C₄H₁₁NO₃) | Ácido bórico (H₃BO₃) | EDTA-Na₂ |
|---|--|---|----------------------------|
| Masa a pesar (g) o Volumen a medir (mL) | 111.6 | 84.2 | 9.8 |
| Concentración final | 7 | 3 | 2 |
| Peso Molecular (g/mol) | 121.14 | 61.83 | 372.2g/mol |

Etanol: Agua: Metanol (7:3:2)

Para preparar 120 mL

| Etanol: Agua: Metanol (7:3:2) | Etanol (C₂H₆O) | Agua (H₂O) | Metanol |
|---|---|----------------------------------|----------------|
| Masa a pesar (g) o Volumen a medir (mL) | 70 | 30 | 20 |
| Concentración final | 7 | 3 | 2 |
| Peso Molecular (g/mol) | 46,07 | | 32.04 |

ANEXO 3. ESPECTRO DE ABSORCIÓN CLÁSICO DE DNA Y RNA EN NANODROP.

Se considera que la muestra extraída tiene una buena pureza las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230, son mayores a 1.5 y se considera muy pura si estas relaciones están entre los valores de 1.8 a 2.0. No se recomienda realizar reacciones de PCR a partir de muestras de material genético cuya concentración sobrepase los 500ng/μL, ya que se puede generar una inhibición por sustrato. En tal caso se sugiere diluir la muestra hasta que la concentración final del DNA esté entre 50 y 100ng/μL.

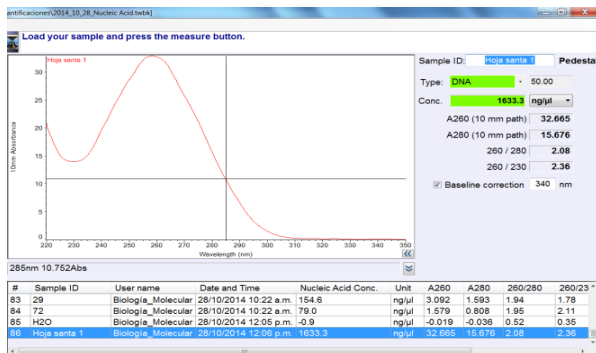


Figura. 4. Curva obtenida en el espectrofotómetro (nanodrop) para medir la concentración de DNA

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

ANEXO 4. SOLICITUD DE DIAGNÓSTICO FITOSANITARIO

I. DATOS DE LA MUESTRA

| | | | |
|--|------------------------|------------------------------|--|
| Fecha de registro: | No. de registro: | | |
| Producto/Hospedero y/o insecto: | Parte vegetal enviada: | Variedad: | |
| Órgano de donde se colecto: | Uso del producto: | Fase fenológica del cultivo: | |
| Fecha de muestreo: | Fecha de envió | Cantidad: | |
| Frascos <input type="checkbox"/> Cepas <input type="checkbox"/> Tubos <input type="checkbox"/> Sobres <input type="checkbox"/> Macerado <input type="checkbox"/> RNA/DNA <input type="checkbox"/> Suelo <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/> | | | |
| Nombre del colector: | | | |

II. PROCEDENCIA

| | | |
|--|----------------------------------|---------------------------------------|
| Campo <input type="checkbox"/> Huerto <input type="checkbox"/> Bodega <input type="checkbox"/> Trampa <input type="checkbox"/> Invernadero <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/> (Especifique) | Coordenadas GPS y anexar croquis | Nombre del predio/Invernadero/Huerto: |
| | | No. Lote/Registro: |
| Localidad o población | Municipio y Estado: | |

III. DATOS DEL INTERESADO

| | |
|---------------------|--------------------|
| Nombre completo: | RFC: |
| Domicilio completo: | Teléfono con lada: |

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria

Área de Desarrollo y Validación de Protocolos

| | | | | | | |
|------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------|----------------------|---------------------|---------|
| Localidad/Colonia: | | | | | Correo electrónico: | |
| Micología | Bacteriología | Virología | Nematología | Entomología | Biología Molecular | Malezas |
| Motivo del Diagnóstico | | | | | | |
| Campaña Fitosanitaria | Vigilancia Epidemiológica | Sospecha de nueva plaga | Corroboración | Programa Exportación | Programa Emergente | Otros |

*Todos son datos obligatorios cuando se disponga de ellos.

Recibe

Envía