



联合国
粮食及
农业组织

Food and Agriculture
Organization of the
United Nations

Organisation des Nations
Unies pour l'alimentation
et l'agriculture

Продовольственная и
сельскохозяйственная организация
Объединенных Наций

Organización de las
Naciones Unidas para la
Alimentación y la Agricultura

منظمة
الغذية والزراعة
للأمم المتحدة

COMISIÓN DE MEDIDAS FITOSANITARIAS

12.^a reunión
Incheon (República de Corea), 5-11 de abril de 2017
Ajustes realizados en las traducciones de las normas internacionales para medidas fitosanitarias aprobadas en la 11.^a reunión de la Comisión de Medidas Fitosanitarias
Tema 9.4 del programa
Preparado por la Secretaría de la CIPF

I. Introducción

1. La Comisión de Medidas Fitosanitarias en su quinta reunión (CMF-5), celebrada en 2010, aprobó un procedimiento, basado en la creación de grupos de revisión en los distintos idiomas, para corregir errores de tipo editorial en las traducciones de las normas internacionales para medidas fitosanitarias (NIMF) aprobadas.
2. La Secretaría de la CIPF proporciona información sobre el establecimiento de dichos grupos y el procedimiento seguido por estos en el Portal fitosanitario internacional (PFI)¹.

II. Establecimiento de grupos de revisión lingüística

3. Se necesita un coordinador para el Grupo de revisión en ruso.

III. Revisión de las normas aprobadas en la CMF-11 (2016)

4. La Secretaría recibió las NIMF aprobadas en la CMF-11 (2016) con las propuestas de modificación de las versiones en árabe, chino, español y francés formuladas por los respectivos grupos de revisión lingüística. Remitió dichas propuestas a los servicios de traducción de la FAO, que

¹ <https://www.ippc.int/es/core-activities/governance/standards-setting/ispm/language-review-groups>.

examinaron las propuestas de cambios. Las modificaciones propuestas se incorporaron en las NIMF revisadas y se presentan con marcas de revisión en la CMF-12 (2015).

5. En cada uno de los idiomas se llegó a un consenso entre los servicios de traducción de la FAO y los respectivos grupos de revisión sobre todos los cambios propuestos.

6. La Secretaría no recibió propuestas de ajuste a la versión en francés de las NIMF.

7. La Secretaría recordó que, puesto que los protocolos de diagnóstico son aprobados por el Comité de Normas en nombre de la CMF, su aprobación tiene lugar en distintos momentos del año, por lo que su versión en los distintos idiomas puede no estar disponible para someterse al proceso ordinario de los grupos de revisión lingüística que tiene lugar después de la reunión de la CMF. La Secretaría enviará los protocolos de diagnóstico a los grupos de revisión lingüística tan pronto como estén disponibles en los respectivos idiomas.

8. Las NIMF adoptadas en la CMF-11 (2016) (incluidos los tratamientos fitosanitarios [TF] y protocolos de diagnóstico [PD]) se adjuntan al presente documento únicamente en las versiones de este en los respectivos idiomas. Estas son:

- Enmiendas a la NIMF 5 (*Glosario de términos fitosanitarios*) (véase el **Documento adjunto 1**)
- NIMF 37 (*Determinación de la condición de una fruta como hospedante de moscas de la fruta [Tephritidae]*) (véase el **Documento adjunto 2**)
- TF 20 (Tratamiento de irradiación contra *Ostrinia nubilalis*) como anexo de la NIMF 28 (*Tratamientos fitosanitarios para plagas reglamentadas*) (véase el **Documento adjunto 3**);
- TF 21 (Tratamiento térmico con vapor contra *Bactrocera melanotus* y *Bactrocera xanthodes* en *Carica papaya*) como anexo de la NIMF 28 (véase el **Documento adjunto 4**);
- PD 7 (Viroide del tubérculo fusiforme de la papa) como anexo de la NIMF 27 (*Protocolos de diagnóstico para plagas reglamentadas*) véase el **Documento adjunto 5**;
- PD 8 (*Ditylenchus dipsaci* y *Ditylenchus destructor*) (véase el **Documento adjunto 6**);
- PD 9 (Género *Anastrepha* Schiner) (véase el **Documento adjunto 7**);

IV. Decisiones

9. Se invita a la CMF a:

- 1) *tomar nota* de que los grupos de revisión en árabe, chino y español y los servicios de traducción de la FAO han revisado los siguientes textos:
 - Enmiendas a la NIMF 5 (*Glosario de términos fitosanitarios*)
 - NIMF 37 (*Determinación de la condición de una fruta como hospedante de moscas de la fruta [Tephritidae]*);
 - TF 20 (Tratamiento de irradiación contra *Ostrinia nubilalis*) como anexo de la NIMF 28 (*Tratamientos fitosanitarios para plagas reglamentadas*);
 - TF 21 (Tratamiento térmico con vapor contra *Bactrocera melanotus* y *Bactrocera xanthodes* en *Carica papaya*) como anexo de la NIMF 28;
 - PD 7 (Viroide del tubérculo fusiforme de la papa) como anexo de la NIMF 27 (*Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas*);
 - PD 8 (*Ditylenchus dipsaci* y *Ditylenchus destructor*) como anexo de la NIMF 27;
 - PD 9 (Género *Anastrepha* Schiner) como anexo de la NIMF 27.
- 2) *acordar* que, una vez que la Secretaría haya aplicado los cambios señalados con marcas de revisión en los documentos adjuntos 1 a 7 (incluidos en las versiones del presente documento en los idiomas respectivos), la versión anterior de las NIMF en cuestión sea revocada y sustituida por la nueva versión;

-
- 3) *tomar nota* de que el grupo de revisión en ruso no está funcionando por no haberse nombrado un coordinador para el mismo;
 - 4) *alentar* a las partes contratantes a designar un coordinador del grupo de revisión en ruso;
 - 5) *agradecer* los esfuerzos y el duro trabajo de las partes contratantes y organizaciones regionales de protección fitosanitaria que participan en los grupos de revisión en los distintos idiomas, así como de los servicios de traducción de la FAO, con miras a mejorar las versiones de las NIMF en los distintos idiomas.



[1]

**PROYECTO DE ENMIENDAS A LA NIMF 5 (2014):
GLOSARIO DE TÉRMINOS FITOSANITARIOS (1994-001)**

[2]

Fecha de este documento	2015-11-25
Categoría del documento	<i>Enmiendas a la NIMF 5 (Glosario de términos fitosanitarios) 2014 (1994-001)</i>
Etapas principales	<p>El Comité de Expertos sobre Medidas Fitosanitarias (1994) añadió el tema 1994-001, "Enmiendas a la NIMF 5: Glosario de términos fitosanitarios".</p> <p>2006-05: El CN aprobó la especificación GT 5.</p> <p>2012-10: El Grupo Técnico sobre el Glosario de términos fitosanitarios (GTG) revisó la especificación.</p> <p>2012-11: El CN revisó y aprobó la especificación revisada y derogó la especificación 1.</p> <p>2014-02: El GTG examinó el proyecto de enmiendas a la NIMF 5 (2014).</p> <p>2014-05: El CN examinó el texto y lo aprobó para consulta a los miembros.</p> <p>2014-7/11: Consulta a los miembros.</p> <p>2014-12: El GTG revisó las enmiendas y respondió a las observaciones de los miembros.</p> <p>2015-5: El CN-7 aprobó un período de presentación de cuestiones sustanciales sobre el proyecto de NIMF.</p> <p>2015-06/09: Período de presentación de cuestiones sustanciales.</p> <p>2015-10: El GTG examinó las observaciones formuladas en el período de presentación de cuestiones sustanciales; no había cambios para el proyecto de enmiendas.</p> <p>2015-11: El CN eliminó el término "marca" (2013-007) y aprobó el proyecto de enmiendas a la NIMF 5 de 2014 a fin de que se presentara para su adopción.</p>
Notas	<p>2014-05: El CN eliminó los términos "identidad (de un envío)" (2011-001), "seguridad fitosanitaria (de un envío)" (2013-008), "integridad (de un envío)" y "secado en estufa" (2013-006).</p> <p>2014-05-19: La Secretaría editó el texto.</p> <p>2015-05: El CN -7 retiró los términos "corteza" (2013-005) (2013-010) y "examen visual".</p> <p>2015-05-25: El Administrador examinó el texto.</p> <p>2015-11-16: La Secretaría actualizó el proyecto de enmiendas a fin de reflejar el hecho de que en la CMF -10 (2015) se había tomado nota de las enmiendas a tinta relacionadas con la expresión "clase de producto".</p> <p>NOTA: Las explicaciones de cada propuesta se presentan únicamente en la versión del proyecto de enmiendas presentada para consulta a los miembros y al CN. En la reunión de la CMF se presentarán solamente las propuestas.</p>

[4] 1. REVISIONES**[5] 1.1 declaración adicional (2010-006)****[10]** Definición original**[11]**

declaración adicional	Declaración requerida por un país importador que se ha de incluir en el certificado fitosanitario y que contiene información adicional específica sobre un envío en relación con las plagas reglamentadas [FAO, 1990; revisado CIMF, 2005]
------------------------------	---

[12] Revisión propuesta**[13]**

declaración adicional	Declaración requerida por un país importador que se ha de incluir en el certificado fitosanitario y que contiene información adicional específica sobre un envío en relación con las plagas reglamentadas o los artículos reglamentados [FAO, 1990; revisado CIMF, 2005; CMF, 2016]
------------------------------	---

[14] 1.2 grano (2013-018), semillas**[24]** Definiciones originales**[25]**

grano (como clase de producto)	Correspondiente a las semillas destinadas a la elaboración o consumo y no a la siembra (véase semillas) [FAO, 1990; revisado CIMF, 2001;revisado CMF, 2015]
semillas (como clase de producto)	Correspondiente a las semillas para plantar o destinadas a ser plantadas y no al consumo o elaboración (véase grano) [FAO, 1990;revisado CIMF, 2001; revisado CMF, 2015]

[26] Revisión propuesta**[27]**

grano (como clase de producto)	Semillas (en el sentido botánico) para procesamiento o consumo y, pero no para plantar (véase semillas) [FAO, 1990; revisado CIMF, 2001; revisado CMF, 20165]
semillas (como clase de producto)	Semillas (en el sentido botánico) para plantar destinadas a ser plantadas y no al consumo o elaboración (véase grano) [FAO, 1990; revisado CIMF, 2001; revisado CMF, 20165]

[38] 1.3 Madera (2013-011)

46. *Definición original*

47.

madera (como clase de producto)	Correspondiente a la madera en rollo, madera aserrada , virutas o madera para embalaje de estiba con o sin corteza [FAO, 1990; revisado CIMF, 2001; revisado CMF, 2015]
--	---

48. *Revisión propuesta*

49.

madera (como clase de producto)	Productos tales como madera en rollo, madera aserrada , virutas e madera de estiba y residuos de madera con o sin corteza , excluidos el embalaje de madera, el material de madera procesada y los productos de bambú [FAO, 1990; revisado CIMF, 2001; revisado CMF, 2016]
--	---

NORMAS INTERNACIONALES PARA
MEDIDAS FITOSANITARIAS

NIMF 37

**Determinación de la condición de una fruta como
hospedante de moscas de la fruta
(Tephritidae)**

Documento elaborado por la Secretaría de la
Convención Internacional de Protección Fitosanitaria
Adoptado en 2016; publicado en 2016

La FAO fomenta el uso, la reproducción y la difusión del material contenido en este producto informativo. Salvo que se indique lo contrario, se podrá copiar, descargar e imprimir el material con fines de estudio privado, investigación y docencia, o para su uso en productos o servicios no comerciales, siempre que se reconozca de forma adecuada a la FAO como la fuente y titular de los derechos de autor y que ello no implique en modo alguno que la FAO apruebe los puntos de vista, productos o servicios de los usuarios.

Cuando se reproduzca la presente NIMF, debería mencionarse que las versiones actualmente aprobadas de las NIMF pueden obtenerse en: www.ippc.int.

Todas las solicitudes relativas a la traducción y los derechos de adaptación así como a la reventa y otros derechos de uso comercial deberán dirigirse a www.fao.org/contact-us/licence-request o a copyright@fao.org.

Los productos de información de la FAO están disponibles en el sitio web de la Organización (www.fao.org/publications) y pueden adquirirse mediante solicitud por correo electrónico a publications-sales@fao.org.

Las denominaciones empleadas en este producto informativo y la forma en que aparecen presentados los datos que contiene no implican, por parte de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), juicio alguno sobre la condición jurídica o nivel de desarrollo de países, territorios, ciudades o zonas, o de sus autoridades, ni respecto de la delimitación de sus fronteras o límites. La mención de empresas o productos de fabricantes en particular, estén o no patentados, no implica que la FAO los apruebe o recomiende de preferencia a otros de naturaleza similar que no se mencionan. Las opiniones expresadas en este producto informativo son las de su(s) autor(es), y no reflejan necesariamente los puntos de vista o políticas de la FAO.

Historia de la publicación

Esta no es una parte oficial de la norma.

2006-11 El CN añadió el tema *Determinación de la susceptibilidad como hospedantes para la mosca de la fruta (Tephritidae)* (2006-031).

2009-05 El CN aprobó el proyecto de especificación para consulta a los miembros.

2010-02 Consulta a los miembros.

2010-04 El CN aprobó la especificación 50.

2010-10 El GTMF redactó la NIMF.

2011-05 El CN examinó el proyecto de NIMF y lo devolvió al GTMF.

2011-08 El GTMF revisó el proyecto de NIMF.

2012-04 El CN aprobó el proyecto de NIMF para consulta a los miembros.

2012-07 Consulta a los miembros.

2013-05 El CN-7 aprobó un período para presentar cuestiones sustanciales sobre el proyecto de NIMF.

2013-07 Período para presentar cuestiones sustanciales.

2013-11 El CN aprobó el proyecto de NIMF a fin de que se remitiera a la CMF-9 para su ~~aprobación~~adopción.

2014-04 Se recibieron objeciones formales 14 días antes de la CMF-9.

2014-04 El administrador revisó el proyecto de NIMF para responder a las objeciones formales.

2014-05 El CN examinó dicho proyecto y lo sometió al examen del GTMF.

2014-05 El GTMF lo examinó.

2014-11 El CN aprobó el proyecto de NIMF a fin de que se remitiera a la CMF-10 para su ~~aprobación~~adopción.

2015-03 En la CPM-10 (2015) se plantearon inquietudes y el proyecto se remitió al CN.

2015-04 El administrador revisó el proyecto de NIMF (en respuesta a las preocupaciones debatidas por las partes interesadas).

2015-05 El CN aprobó el documento con vistas al período para presentar cuestiones sustanciales.

2015-10 El GTMF revisó el proyecto de NIMF.

2015-11 El CN revisó y aprobó la NIMF para su ~~aprobación~~adopción por la CMF-11.

2016-04 La CMF-11 ~~aprobó~~adoptó la norma.

NIMF 37. 2016. *Determinación de la condición de una fruta como hospedante de moscas de la fruta (Tephritidae)*. Roma, CIPF, FAO.

Última actualización de la historia de publicación: 2016-04

ÍNDICE

Aprobación <u>Adopción</u>	4
INTRODUCCIÓN	4
Ámbito	4
Referencias	4
Definiciones	4
Perfil de los requisitos	5
ANTECEDENTES	5
REQUISITOS GENERALES	6
REQUISITOS ESPECÍFICOS	8
1. Determinación de la condición de hospedante natural utilizando la vigilancia mediante el muestreo de frutas	9
2. Determinación de la condición de hospedante utilizando ensayos sobre el de campo terreno en condiciones seminaturales	9
2.1 Muestreo de frutas	10
2.2 Moscas de la fruta	10
2.3 Fruta	11
2.4 Controles	11
2.5 Diseño de ensayos sobre el terreno <u>de campo</u>	11
3. Manipulación de la fruta para la emergencia y el desarrollo de la mosca de la fruta	12
4. Análisis de los datos	13
5. Mantenimiento de registros y publicación	13
APÉNDICE 1: Bibliografía	14

Aprobación-Adopción

La Comisión de Medidas Fitosanitarias ~~aprobó~~ adoptó esta norma en su undécima reunión, celebrada en abril de 2016.

INTRODUCCIÓN

Ámbito

La presente norma proporciona las directrices para determinar la condición de una fruta como hospedante de moscas de la fruta (Tephritidae) y describe tres categorías para dicha condición de hospedante.

La fruta a que se refiere esta norma abarca ~~las frutas~~ en el sentido botánico, incluidas ~~aquellas~~ las frutas que en ocasiones se consideran hortalizas, ~~como (p. ej., el~~ como (p. ej., el tomate y ~~el~~ melón).

La presente norma comprende metodologías para la vigilancia en condiciones naturales y los ensayos ~~sobre el terreno de campo~~ en condiciones seminaturales que deberían utilizarse a fin de determinar la condición de una fruta no dañada como hospedante de moscas de la fruta en los casos en que dicha condición sea incierta. Esta norma no trata de los requisitos para proteger las plantas contra la introducción y ~~difusión-dispersión~~ de moscas de la fruta.

Referencias

En la presente norma se hace referencia a normas internacionales para medidas fitosanitarias (NIMF). Las NIMF están disponibles en el Portal fitosanitario internacional (PFI): <https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispms>.

El Apéndice 1 y el Apéndice 2 de la NIMF 26 (*Establecimiento de áreas libres de plagas para moscas de la fruta [Tephritidae]*) también se aplican a esta norma.

Definiciones

Las definiciones de los términos fitosanitarios utilizados en esta norma figuran en la NIMF 5 (*Glosario de términos fitosanitarios*). Además de las definiciones que figuran en la NIMF 5, en la presente norma se aplican las siguientes definiciones.

Condición de hospedante (de la fruta, para una mosca de la fruta)	Clasificación de una especie o variedad-cultivar de planta como hospedante natural, hospedante condicional o no hospedante de una especie de mosca de la fruta
Hospedante natural (de la fruta, para una mosca de la fruta)	Una especie o cultivar de planta que se ha demostrado científicamente que en las condiciones naturales se encuentra infestada por la especie objetivo de moscas de la fruta y es capaz de sostener su desarrollo hasta que se conviertan en adultos viables.
Hospedante condicional (de la fruta para una mosca de la fruta)	Una especie o cultivar de planta que no es un hospedante natural, pero que se ha demostrado científicamente que se encuentra infestada por la especie objetivo de moscas de la fruta y es capaz de sostener su desarrollo hasta convertirse en adultos viables según se concluye de las condiciones seminaturales sobre el terreno de campo establecidas en la presente norma.

No hospedante (de la fruta, para una mosca de la fruta)

Una especie o cultivar de planta que no se ha ~~demostrado científicamente que se encuentre encontrado~~ infestada por la especie objetivo de moscas de la fruta, o que no es capaz de sostener su desarrollo hasta ~~que se conviertan~~convertirse en adultos viables en condiciones naturales o en las condiciones seminaturales ~~sobre el terreno de campo~~ -especificadas en la presente norma.

Perfil de los requisitos

La presente norma describe los requisitos para determinar la condición de una fruta ~~concreta~~específica como hospedante de una especie particular de mosca de la fruta y designa tres categorías para la condición de hospedante, ~~a saber~~: hospedante natural, hospedante condicional y no hospedante.

~~Entre~~Los requisitos para determinar la condición de hospedante ~~figuran incluyen~~los siguientes:

- la identificación ~~exacta-precisa~~ de la especie de mosca de la fruta, de la fruta sometida a ~~ensayo-prueba~~ y, para los ensayos ~~de campo, sobre el terreno~~, de la fruta ~~deutilizada para~~ control procedente de un hospedante natural ~~conocido en el caso de los ensayos de campo~~;
- la especificación de los parámetros para la vigilancia de los adultos y las larvas de mosca de la fruta y el diseño experimental en condiciones seminaturales ~~sobre el terreno de campo~~ (p. ej., en jaulas de campo, invernaderos o ramas con frutos ~~envueltas en bolsas embolsadas~~) con objeto de determinar la condición del hospedante y describir las condiciones de la fruta (incluidas las fisiológicas) que han de evaluarse;
- la observación de la supervivencia de las moscas de la fruta en cada etapa de su desarrollo;
- el establecimiento de procedimientos de mantenimiento y manipulación de la fruta para determinar la condición de hospedante;
- la evaluación de los datos experimentales y la interpretación de los resultados.

ANTECEDENTES

Las moscas de la fruta son plagas económicamente importantes y a menudo se requiere la aplicación de medidas fitosanitarias para ~~que se permita permitir~~ el movimiento de su fruta hospedante en el comercio (NIMF 26; NIMF 30 [*Establecimiento de áreas de baja prevalencia de plagas para moscas de la fruta {Tephritidae}*]; NIMF 35 [*Enfoque de sistemas para el manejo del riego de plagas de moscas de la fruta {Tephritidae}*]). La condición de una fruta como hospedante es un elemento importante del análisis de riesgos de plagas (ARP) (NIMF 2, *Marco para el análisis de riesgo de plagas*; NIMF 11, *Análisis de riesgo de plagas para plagas cuarentenarias*). Por consiguiente, deberían armonizarse las categorías y los procedimientos para determinar la condición de hospedante.

~~Cabe~~Es importante señalar que la condición de hospedante podrá variar con el tiempo a causa de cambios en las condiciones biológicas.

Cuando la condición de hospedante es incierta es particularmente necesario proporcionar una orientación armonizada a las organizaciones nacionales de protección fitosanitaria (ONPF) para determinar la condición de ~~una-la~~ fruta como hospedante de moscas de la fruta. ~~Los datos~~La evidencia histórica, los registros de intercepción de plagas y la literatura científica podrán, por lo general, aportar información suficiente sobre la condición de hospedante sin que haya una necesidad adicional de vigilancia de las larvas ~~sobre el terreno~~ ensayos de campo. Sin embargo, los registros históricos y los informes publicados pueden ser a veces poco fiables, por ejemplo:

- La identificación de las especies de mosca de la fruta, así como de las especies o los cultivares de plantas, pueden haber sido incorrecta y tal vez no se disponga de especímenes de referencia para su verificación.

- Los registros de recolección pueden ser incorrectos o dudosos (p. ej., si la condición de hospedante se ha establecido a partir de 1) la captura con una trampa colocada en una planta de la fruta en cuestión; 2) fruta dañada; 3) la simple detección de larvas dentro de la fruta; 4) la contaminación cruzada de muestras).
- Pueden haberse omitido ~~datos detalles~~ importantes, ~~(como p. ej. ejemplo~~ el cultivar, la etapa de madurez, ~~el estado la condición~~ física de la fruta en el momento de la recolección o las condiciones sanitarias del huerto).
- Puede no haberse verificado el desarrollo de las larvas hasta convertirse en adultos viables.

En la bibliografía ~~especializada científica~~ se han documentado protocolos y ensayos exhaustivos para determinar la condición de hospedante de moscas de la fruta. Sin embargo, la falta de uniformidad en la terminología y la metodología contribuye a ~~crear divergencias variaciones~~ en la determinación de la condición de hospedante de moscas de la fruta. La armonización de la terminología, los protocolos y los criterios de evaluación para determinar la condición de hospedante de moscas de la fruta promoverá la coherencia entre los países y las comunidades científicas.

La vigilancia mediante el muestreo de frutas constituye el método más fiable para determinar la condición de hospedante natural. La vigilancia de la infestación natural mediante el muestreo de frutas no interfiere en el comportamiento natural de las moscas de la fruta y tiene en cuenta los elevados niveles de variabilidad de la fruta, del comportamiento de la mosca de la fruta y de los períodos de actividad. ~~El muestreo de frutas comprende su recolección de fruta y la cría de moscas en ellas a fin de determinar si son hospedantes de mosca de la fruta, esto es, si la fruta en cuestión puede sostener el desarrollo de las moscas hasta convertirse en adultos viables. -El muestreo de fruta comprende la recolección de fruta y la cría de moscas en ella para determinar si se trata de un hospedante de mosca de la fruta (esto es, si la fruta en cuestión puede sostener el desarrollo de las moscas de la fruta hasta convertirse en adultos viables).~~

Los ensayos ~~sobre el terreno de campo~~ en condiciones seminaturales permiten que las moscas de la fruta muestren su comportamiento natural de oviposición; además, puesto que la fruta permanece unida a la planta no se deteriora rápidamente durante los ensayos. No obstante, los ensayos ~~sobre el terreno de campo~~ en condiciones seminaturales pueden exigir cuantiosos recursos y pueden verse obstaculizados por variables ambientales.

Los resultados de los ensayos ~~sobre el terreno de campo~~ realizados en un área determinada podrán extrapolarse a áreas comparables si la especie objetivo de moscas de la fruta y la condición fisiológica de la fruta son similares, de manera que no es necesario repetir la determinación de la condición de hospedante de moscas de la fruta en un área separada, pero similar.

REQUISITOS GENERALES

Se puede determinar a cuál de las tres categorías de condición de hospedante (hospedante natural, hospedante condicional y no hospedante) pertenece una fruta ~~mediante la aplicación de las medidas a través de los pasos~~ siguientes, tal y como se resume en el diagrama de flujo (Figura 1):

A. Si la información biológica o histórica disponible ofrece ~~pruebas evidencia~~ suficientes de que la fruta no sostiene la infestación¹ ni el desarrollo de adultos viables, no deberían necesitarse ~~nuevas estudios encuestas~~ o ensayos ~~sobre el terreno de campo~~ y la planta debería ~~clasificarse categorizarse~~ como “no hospedante”.

B. Si la información biológica o histórica disponible ofrece ~~pruebas evidencia~~ suficientes de que la fruta sostiene la infestación y el desarrollo de adultos viables, no deberían ~~necesitarse requerirse~~ ~~nuevas estudios encuestas~~ o ensayos ~~sobre el terreno de campo~~ y la planta debería ~~clasificarse categorizarse~~ como “hospedante natural”.

¹ En adelante, “infestación” se refiere a la infestación de una fruta por una especie objetivo de mosca de la fruta.

C. Si la información biológica o histórica disponible ~~no es~~ ~~pero~~ concluyente debería realizarse una adecuada vigilancia ~~sobre el terreno en el campo~~, mediante el muestreo de frutas o ensayos de campo, para determinar la condición de hospedante. La vigilancia y los ensayos podrán dar lugar a uno de los resultados siguientes:

C1. Si después de la vigilancia ~~sobre el terreno en el campo~~ mediante el muestreo de frutas se detecta infestación con desarrollo de adultos viables, la planta debería ~~catalogarse~~ ~~categorizarse~~ como "hospedante natural".

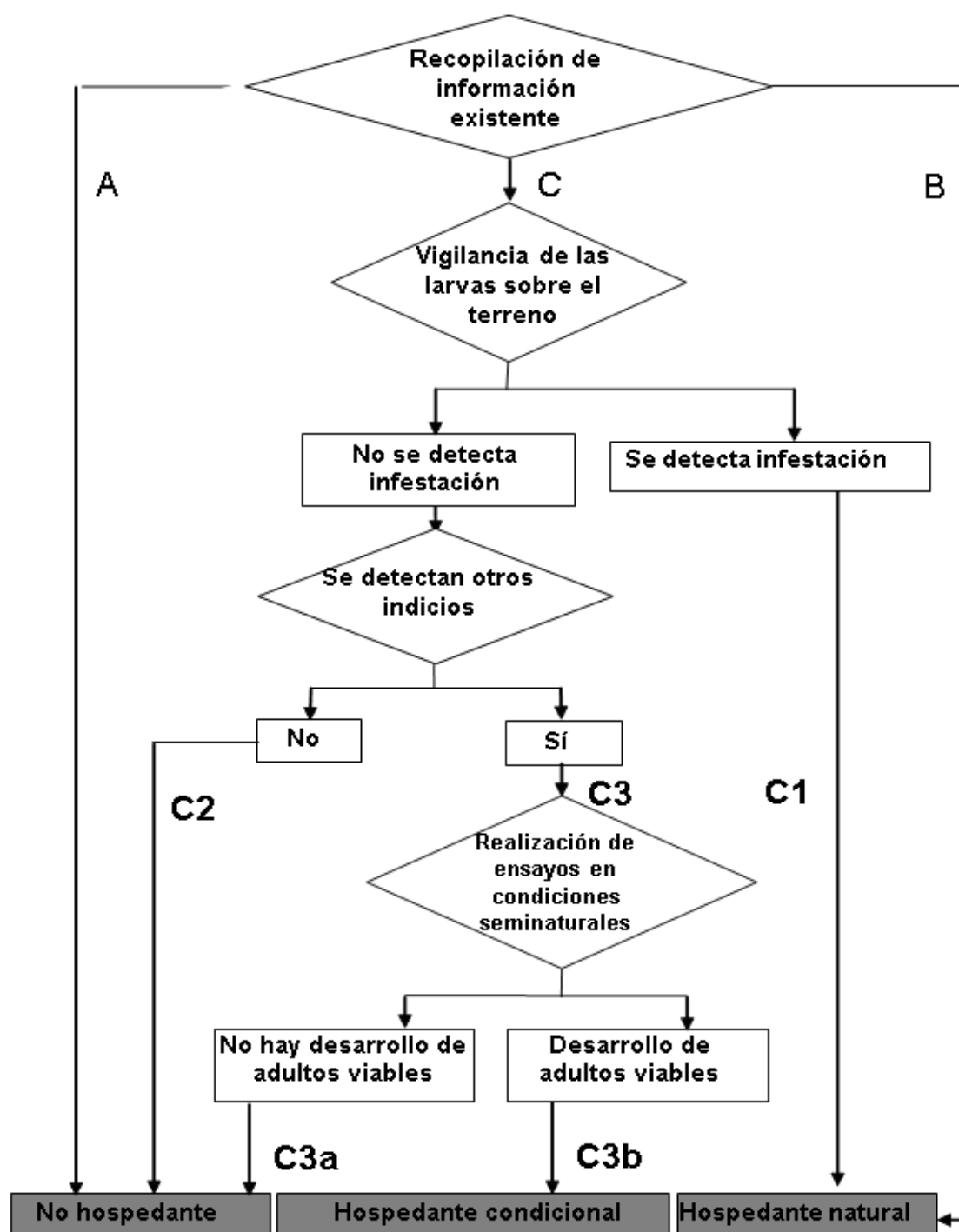
C2. Si después de la vigilancia ~~sobre el terreno en el campo~~ -mediante el muestreo de frutas no se detecta infestación y no hay ningún otro dato que indique que la fruta tiene el potencial de ~~puede~~ resultar infestada tomando en cuenta las condiciones en que se sabe que se comercializa el producto, tales como ~~(por ejemplo, la~~ condición fisiológica, el cultivar y la etapa de maduración~~),~~ la planta podrá ~~catalogarse~~ ~~categorizarse~~ como "no hospedante".

C3. Si después de la vigilancia ~~sobre el terreno en el campo~~ mediante el muestreo de frutas no se detecta infestación, pero la información biológica o histórica disponible indica que la fruta ~~puede resultar~~ tiene posibilidad de resultar infestada, podrán necesitarse ensayos ~~sobre el terreno de campo~~ adicionales en condiciones seminaturales para evaluar si la especie objetivo de moscas de la fruta puede llegar a desarrollar adultos viables en la especie o el cultivar de fruta en cuestión.

C3a. Si la especie objetivo de mosca de la fruta no llega a desarrollar adultos viables, la planta debería ~~catalogarse~~ ~~categorizarse~~ como "no hospedante".

C3b. Si la especie objetivo de mosca de la fruta desarrolla adultos viables, la planta debería ~~catalogarse~~ ~~categorizarse~~ como "hospedante condicional".

Figura 1. Proyecto de NIMF: Etapas para determinar la condición de una fruta como hospedante de moscas de la fruta.



REQUISITOS ESPECÍFICOS

La condición de hospedante podrá determinarse a partir de registros históricos de ~~la~~ producción o datos sobre el comercio o la intercepción que indiquen infestaciones naturales. Si los datos históricos no permiten determinar con claridad la condición de hospedante se debería proceder a la vigilancia mediante el muestreo de frutas para reunir ~~pruebas-evidencia~~ de infestaciones naturales y del desarrollo de adultos viables, o bien podrá ser necesario realizar ensayos ~~sobre el terreno-de campo~~ en condiciones seminaturales. En aquellos casos en que no se haya determinado científicamente la

condición de hospedante mediante la vigilancia, o cuando exista una necesidad concreta de determinar si una fruta es un hospedante condicional o un no hospedante, podrá ser necesario realizar ensayos en condiciones seminaturales ~~sobre el terreno~~ de campo.

Las condiciones artificiales son inherentes a ~~los ensayos~~ las pruebas de laboratorio, en ~~las~~ que a las moscas de la fruta se les ofrece fruta ~~cosechada ya recolectada~~ que sufre cambios fisiológicos rápidos y, por consiguiente, podrá ser más ~~vulnerable-susceptible~~ a la infestación. Por tanto, la detección de infestación en ~~ensayos-pruebas~~ de laboratorio para determinar la condición de hospedante podrá inducir a error. Además, se ha documentado ampliamente que, en condiciones artificiales, las hembras de especies polífagas depositarán sus huevos en casi todas las frutas que se les ofrezcan y, en la mayoría de los casos, las larvas se convertirán en adultos viables. Por tanto, ~~los ensayos~~ las pruebas de laboratorio podrán ~~bastar-ser suficientes~~ para demostrar la condición de no hospedante, pero no son adecuadas para demostrar la condición de hospedante natural o condicional.

Los siguientes elementos son aspectos importantes que deben tenerse en cuenta en la planificación de los ensayos ~~sobre el terreno~~ de campo:

- la identidad de ~~las especies~~ de plantas (incluidos los cultivares, cuando proceda) y ~~las especies~~ objetivo de moscas de la fruta;
- la variabilidad física y fisiológica de la fruta en el área de producción;
- la utilización previa de productos químicos en el área de producción de la fruta;
- la incidencia de la mosca de la fruta objetivo en toda el área de producción y los períodos correspondientes de cosecha y exportación;
- información pertinente, con inclusión de bibliografía y registros sobre la condición de hospedante de la fruta y sobre la especie de mosca de la fruta, así como un examen crítico de dicha información;
- el origen y ~~el estado~~ la condición de cría de la colonia de mosca de la fruta que se va a utilizar;
- las especies y cultivares del hospedante natural conocido que se utilizarán como controles;
- la realización de ensayos ~~sobre el terreno~~ de campo independientes, cuando proceda, para cada especie de mosca de la fruta para la cual se requiere determinar la condición de hospedante;
- la realización de ensayos ~~sobre el terreno~~ de campo independientes para cada cultivar de fruta, si las diferencias de cultivares constituyen la supuesta fuente de variabilidad en la propensión del hospedante a ser infestado;
- la realización de ensayos ~~sobre el terreno~~ de campo en las áreas de producción de fruta;
- observación de ~~las buenas~~ prácticas estadísticas correctas.

1. Determinación de la condición de hospedante natural utilizando la vigilancia mediante el muestreo de frutas

El muestreo de frutas constituye el método más fiable para determinar la condición de hospedante natural. La condición de hospedante natural puede determinarse sobre la base de la confirmación de la infestación natural y el desarrollo de adultos viables mediante el muestreo de frutas durante el período de cosecha.

Las muestras de fruta deberían ser representativas de toda la gama de áreas de producción y condiciones ambientales, así como de las etapas fisiológicas y físicas.

2. Determinación de la condición de hospedante utilizando ensayos de campo ~~sobre el terreno~~ en condiciones seminaturales

El objetivo de los ensayos ~~sobre el terreno~~ de campo es determinar la condición de hospedante, en condiciones específicas, de una fruta que se ha determinado que no es un hospedante natural. Los ensayos podrán incluir el uso de jaulas de campo, invernaderos (por ejemplo de vidrio, de plástico o de malla) y embolsado de ramas con frutas.

La emergencia de un adulto viable en cualquiera de las ~~réplicas-repeticiones~~ de un ensayo ~~sobre el terreno de campo~~ en condiciones seminaturales indica que la fruta es un hospedante condicional.

En los siguientes subapartados se esbozan los elementos que ~~deberían~~ tomarse en consideración al diseñar los ensayos ~~sobre el terreno de campo~~.

2.1 Muestreo de frutas

En el muestreo de frutas realizado durante los ensayos ~~sobre el terreno de campo~~ se aplican los siguientes criterios:

- Siempre que sea posible, el muestreo debería ~~tener por objeto estar dirigido a~~ fruta sospechosa de estar infestada. Por ~~lo demás~~ ~~otra parte~~, los protocolos de muestreo deberían basarse en los principios de aleatoriedad y repetición, así como ser apropiados para cualquier análisis estadístico que se realice.
- El período de tiempo, el número de repeticiones por temporada de ~~cultivo-crecimiento~~ y el número de ~~réplicas-repeticiones~~ deberían ~~dar tomar en cuenta de~~ la variabilidad de las moscas ~~de la fruta objetivo~~ y ~~de~~ la fruta objetivo a lo largo del tiempo y en toda el área de producción. Deberían ~~tomar en dar cuenta también de~~ las condiciones de cosecha temprana o tardía y ser representativos del área propuesta desde la que se ~~despachará-trasladará~~ la fruta. Debería especificarse el número de unidades y peso de la fruta ~~que se requirieron~~ y el número de ~~réplicas-repeticiones~~ por ensayo para determinar la eficacia, así como el nivel de confianza ~~pertinente apropiado~~.

2.2 Moscas de la fruta

Los siguientes ~~críterios-requisitos~~ son aplicables a los procedimientos operativos relacionados con las moscas de la fruta que se utilizan en los ensayos ~~sobre el terreno de campo~~:

- Debería llevarse a cabo la identificación taxonómica de las moscas de la fruta utilizadas para los ensayos ~~sobre el terreno de campo~~, y conservarse especímenes de ~~comprobación-referencia~~.
- Debería recopilarse información básica sobre la especie objetivo de mosca de la fruta, ~~en particular incluyendo~~ su período normal de desarrollo y hospedantes conocidos en el área de producción específica.
- Es ~~conveniente-deseable~~ utilizar poblaciones silvestres para los ensayos ~~sobre el terreno de campo~~. En caso de que no puedan obtenerse moscas silvestres en número suficiente, en la medida de lo posible la ~~antigüedad-edad~~ de la colonia utilizada no debería superar las cinco generaciones al inicio de los ensayos. La población de moscas de la fruta podrá mantenerse en sustrato, pero la generación que se vaya a utilizar en los ensayos debería criarse en el hospedante natural para garantizar un comportamiento normal de oviposición. Las moscas utilizadas en ~~réplicas-repeticiones~~ experimentales deberían ~~pertenecer-provenir de~~ la misma población y generación, esto es, la misma cohorte.
- De ser posible, la colonia de moscas de la fruta debería proceder de la misma área que la fruta objetivo.
- Antes de los ensayos ~~sobre el terreno de campo~~ deberían determinarse los períodos de preoviposición, oviposición y apareamiento para que las ~~moscas~~ hembras apareadas estén expuestas a la fruta en el momento de su máximo potencial reproductivo.
- En la fecha de apareamiento y al comienzo de los ensayos ~~sobre el terreno de campo~~ debería registrarse la edad de las ~~moscas~~ hembras y machos ~~adultos~~.
- El número de ~~moscas~~ hembras apareadas necesarias por fruta debería determinarse en función del tamaño de la fruta, la fecundidad de las hembras y las condiciones del ensayo ~~sobre el terreno de campo~~. El número de moscas ~~de la fruta~~ por ~~réplica-repetición~~ de ensayo debería ~~establecerse-determinarse~~ en función de la biología de la mosca ~~de la fruta~~, la cantidad de fruta que se va a exponer y otras condiciones del ensayo ~~sobre el terreno de campo~~.
- El tiempo de exposición de la fruta a la especie objetivo de mosca de la fruta debería basarse en el comportamiento de oviposición de la mosca ~~de la fruta~~.

- Cada mosca hembra debería utilizarse una sola vez.
- Se debería registrar el número de adultos que mueran durante los ensayos ~~sobre el terreno~~ de campo y reemplazar las moscas de la fruta muertas con adultos vivos de la misma población y generación, esto es, de la misma cohorte. Un nivel alto de mortalidad de adultos podrá ser un indicio de condiciones desfavorables (p.ej. ~~ejemplo~~; temperatura excesiva) o contaminación (p.ej. ~~ejemplo~~; por residuos de ~~insecticidas~~ plaguicidas) de la fruta del ensayo ~~sobre el terreno~~ de campo. En estos casos, deberían repetirse los ensayos en condiciones más favorables.

En los ensayos ~~sobre el terreno~~ de campo repetidos, las moscas de la fruta deberían tener una edad fisiológica semejante y haberse criado en las mismas condiciones.

2.3 Fruta

Los siguientes ~~eriterios-requisitos~~ son aplicables a la fruta utilizada en los ensayos ~~sobre el terreno~~ de campo. La fruta debería:

- pertenecer a la misma especie y al mismo cultivar que la fruta que se va a ~~despachar~~ trasladar;
- proceder de la misma área de producción, o un área representativa de esta, que la fruta que se va a ~~despachar~~ trasladar;
- estar prácticamente exenta-libre de plaguicidas nocivos para las moscas de la fruta, así como de cebos, suciedad, otras moscas de la fruta y plagas;
- estar libre de no presentar ningún daño mecánico o natural;
- cumplir con una calidad comercial determinada en cuanto a color, tamaño y condición fisiológica;
- encontrarse en una etapa de maduración adecuada y ~~espeeífica-especificada~~ (p.ej. ~~ejemplo~~; según el peso en seco o el contenido de azúcar).

2.4 Controles

Se requieren frutas ~~de control~~ que sean hospedantes naturales conocidos en una etapa de maduración conocida como controles para todos los ensayos ~~de camposobre el terreno~~. Estas frutas podrán ser de especies o géneros diferentes de la especie de fruta objetivo. La fruta debería estar libre de toda infestación previa (p.ej. ~~ejemplo~~; por haberse ~~protegido con bolsas~~ embolsado o proceder de un área libre de plagas). Las moscas de la fruta utilizadas en los controles y ~~réplicas-repeticiones del experimento~~ de experimentos (incluido el control) deberían proceder de la misma población y generación, esto es, de la misma cohorte.

Los controles se utilizan para:

- verificar que las moscas hembras sean sexualmente maduras, se hayan apareado y muestren un comportamiento normal de oviposición;
- indicar el nivel de infestación que puede producirse en un hospedante natural;
- indicar el tiempo de desarrollo hasta la etapa adulta en las condiciones del ensayo de campo ~~sobre el terreno~~ en un hospedante natural;
- confirmar que las condiciones ambientales para la infestación son adecuadas.

2.5 Diseño de los ensayos de camposobre el terreno

Para los fines de esta norma, en los ensayos ~~de campo sobre el terreno~~ se emplean jaulas de campo, invernaderos o ramas con fruta ~~envueltas en bolsas~~ embolsadas. Los ensayos deberían ser apropiados para evaluar la forma en que la condición física y fisiológica de la fruta podrá afectar a la condición de hospedante.

Las moscas de la fruta se liberan en jaulas de campo grandes hechas con malla en las que se introducen plantas enteras con frutas o bolsas de malla que contienen las partes de las plantas en las que se halla con la fruta. De manera alternativa, las plantas con frutas podrán colocarse en

invernaderos en los que se liberen las moscas. Las plantas con fruta pueden cultivarse en los ~~invernaderos-recintos~~ o ~~introducirse como plantas~~ en macetas ~~que se introducen en estos~~ para los ensayos. ~~Cabe~~ Es importante señalar que, dado que las hembras de moscas de la fruta quedan confinadas artificialmente dentro del ~~invernadero-recinto~~ específico sometido a observación, estas podrán verse forzadas a depositar los huevos en la fruta de un hospedante condicional.

Los ensayos ~~sobre el terreno~~ de campo deberían realizarse en condiciones adecuadas para la actividad de la mosca de la fruta, especialmente para la oviposición, tal y como se indica a continuación:

- Las jaulas de campo y los invernaderos deberían tener un tamaño y un diseño adecuados a fin de garantizar el confinamiento de las moscas adultas y las plantas del ensayo, permitir un flujo de aire adecuado y posibilitar condiciones que faciliten el comportamiento natural de oviposición.
- Debería proporcionarse a los adultos una cantidad ~~conveniente~~ satisfactoria y suficiente de agua y alimento.
- Las condiciones ambientales deberían ser óptimas, y deberían registrarse durante el período de los ensayos ~~sobre el terreno~~ de campo.
- Podrá mantenerse a ~~los las moscas machos~~ en jaulas o invernaderos junto con las moscas hembras, si ello resulta beneficioso para estimular la oviposición.
- Antes del inicio de los ensayos se deberían eliminar de las jaulas los ~~depredadores-enemigos naturales~~ de la especie objetivo de mosca de la fruta y evitar que vuelvan a entrar.
- Las jaulas deberían protegerse de otros consumidores de frutas; ~~(p. ej. como pájaros y monos)~~.
- Para los controles puede colgarse de las ramas de las plantas fruta de hospedantes naturales conocidos; ~~(pero no de aquellas ramas en las que haya fruta objeto de ensayo)~~. Los controles deben separarse de las frutas objeto de ensayo (en jaulas de campo, invernaderos o ramas embolsadas por separado) a fin de garantizar que el ensayo no constituya una prueba de elección.
- La fruta objeto de ensayo debería permanecer adherida de forma natural a las plantas y ~~podría~~ quedar expuesta a las moscas de la fruta en jaulas de campo, bolsas o invernaderos.
- Las plantas deberían crecer en condiciones que excluyan, en la medida de lo posible, cualquier interferencia de productos químicos que puedan ser nocivos para las moscas de la fruta.
- Una ~~réplica-repetición~~ debería consistir en una bolsa o jaula, colocada preferentemente en una ~~solaplanta~~ en la unidad experimental.
- Se debería ~~vigilar~~ monitorizar y registrar la mortalidad de moscas de la fruta y las moscas muertas deberían ser reemplazadas inmediatamente por moscas vivas de la misma población y generación, esto es, de la misma cohorte, a fin de mantener la misma incidencia de mosca de la fruta.
- La fruta debería cultivarse en condiciones comerciales o en ~~contenedores-recipientes~~ de un tamaño que permita el desarrollo normal de plantas y frutas.
- Después del período de exposición asignado para la oviposición, la fruta debería retirarse de la planta y pesarse y debería registrarse ~~el su~~ número y ~~el peso de la fruta~~.

El tamaño de muestra que se utilizará para alcanzar el nivel de confianza requerido debería determinarse previamente utilizando referencias científicas.

3. Manipulación de la fruta para la emergencia y el desarrollo de la mosca de la fruta

La fruta ~~que se ha recolectado~~ en condiciones naturales (vigilancia mediante el muestreo de frutas) y seminaturales (ensayos ~~sobre el terreno~~ de campo), así como la utilizada para control, debería conservarse hasta que se complete el desarrollo ~~de la larva~~. Este período podrá variar con la temperatura y la condición de hospedante. Las condiciones de manipulación y conservación de la fruta deberían ~~aumentar al máximo~~ maximizar la supervivencia de las moscas de la fruta.

y deberían especificarse en el protocolo de muestreo o en el diseño experimental del ensayo ~~sobre el terreno de campo~~.

La fruta debería almacenarse en una instalación o ~~contenedor recipiente~~ a prueba de insectos, en condiciones que garanticen la supervivencia de las pupas, en particular:

- la temperatura y humedad relativa adecuadas;
- el medio apropiado para la pupación.

Además, las condiciones deberían facilitar la recolección precisa de las larvas y pupas, así como de los adultos viables que emergen de la fruta.

~~Algunos de los~~ Los datos ~~que debena~~ registrarse ~~son los siguientes~~ incluyen:

- las condiciones físicas diarias (p. ej. la temperatura, la humedad relativa) en la instalación donde se conserva la fruta;
- las fechas y el número de larvas y pupas recogidas tanto de la fruta objeto de ensayo como de la utilizada para control, teniendo en cuenta que:
 - el medio podrá tamizarse al final del período de almacenamiento;
 - al final del período de almacenamiento la fruta debería diseccionarse, antes de ser desechada, a fin de determinar la presencia de larvas o pupas vivas y muertas; en función del estado de ~~putrefacción~~ descomposición de la fruta, podrá ser necesario transferir las larvas a un medio de pupación adecuado;
 - deberían pesarse todas las pupas, o una submuestra de ellas, y registrarse las anomalías;
- el número y las fechas de emergencia de todos los adultos ~~clasificados por~~ de cada especie, incluidas las moscas adultas anormales.

4. Análisis de los datos

Los datos obtenidos de la vigilancia de larvas y los ensayos ~~sobre el terreno de campo~~ podrán someterse a un análisis cuantitativo a fin de determinar, por ejemplo:

- los niveles de infestación (p. ej. el número de larvas por fruta, el número de larvas por kilogramo de fruta, el porcentaje de fruta infestada) a un nivel de confianza específico;
- el período de desarrollo de larvas y pupas, y el número de adultos viables;
- el porcentaje de emergencia de adultos.

5. Mantenimiento de registros y publicación

La ONPF debería mantener registros apropiados de la vigilancia de larvas ~~sobre el terreno en el campo~~ y los ensayos de campo para determinar la condición de hospedante, que incluyan los datos siguientes:

- el nombre científico de la especie objetivo de mosca de la fruta;
- el nombre científico de la especie de planta o el nombre del cultivar;
- la ubicación del área de producción de la fruta, incluidas las coordenadas geográficas;
- la ubicación de los especímenes de ~~comprobación~~ referencia de la mosca de la fruta objetivo, que se guardarán en una colección oficial;
- el origen y la cría de la colonia de moscas de la fruta utilizada para los ensayos ~~sobre el terreno de campo~~;
- la condición física y fisiológica de la fruta sometida a ~~ensayo prueba~~ para determinar su infestación por moscas de la fruta;
- el diseño experimental, los ensayos realizados, las fechas, las ubicaciones;
- los datos primarios, los cálculos estadísticos y la interpretación de resultados;
- las principales referencias científicas utilizadas;

- información adicional, incluidas fotografías, que podrá ser específica de la mosca de la fruta, la fruta o la condición de hospedante.

Los registros deberían ponerse a disposición de la ONPF del país importador que así lo solicite.

Las investigaciones deberían, en la medida de lo posible, someterse a revisión externa por expertos y publicarse en una revista científica, o bien estar disponibles por otros medios.

Este apéndice se presenta únicamente como referencia y no constituye una parte prescriptiva de la norma.

APÉNDICE 1: Bibliografía

- Aluja, M., Diaz-Fleisher, F. y Arredondo, J.** 2004. Nonhost status of commercial *Persea americana* "Hass" to *Anastrepha ludens*, *Anastrepha obliqua*, *Anastrepha serpentina*, and *Anastrepha striata* (Diptera: Tephritidae) in Mexico. *Journal of Economic Entomology*, 97: 293-309.
- Aluja, M. y Mangan, R. L.** 2008. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) host status determination: Critical conceptual and methodological considerations. *Annual Review of Entomology*, 53: 473-502.
- Aluja, M., Pérez-Staples, D., Macías-Ordóñez, R., Piñero, J., McPherson, B. y Hernández-Ortiz, V.** 2003. Nonhost status of *Citrus sinensis* cultivar Valencia and *C. paradisi* cultivar Ruby Red to Mexican *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, 96: 1693-1703.
- Norma regional sobre medidas fitosanitarias n.º 4 de la Comisión de Protección Vegetal para Asia y el Pacífico.** 2005. *Guidelines for the confirmation of non-host status of fruit and vegetables to Tephritid fruit flies*. Publicación de la RAP 2005/27. Bangkok, Comisión de Protección Vegetal para Asia y el Pacífico.
- Baker, R. T., Cowley, J. M., Harte, D. S. y Frampton, E. R.** 1990. Development of a maximum pest limit for fruit flies (Diptera: Tephritidae) in produce imported into New Zealand. *Journal of Economic Entomology*, 83: 13-17.
- Cowley, J. M., Baker, R. T. y Harte, D. S.** 1992. Definition and determination of host status for multivoltine fruit fly (Diptera: Tephritidae) species. *Journal of Economic Entomology*, 85: 312-317.
- FAO/OIEA.** 2013. *Trapping manual for area-wide fruit fly programmes*. Viena, División Conjunta FAO/OIEA. 46 págs.
- FAO/OIEA/USDA.** 2014. *Product quality control for sterile mass-reared and released tephritid fruit flies*. Versión 6.0. Viena, OIEA. 164 págs.
- Fitt, G.P.** 1986. The influence of a shortage of hosts on the specificity of oviposition behaviour in species of *Dacus* (Diptera: Tephritidae). *Physiological Entomology*, 11: 133-143.
- Follett, P. A.** 2009. Puncture resistance in "Sharwil" avocado to Oriental fruit fly and Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) oviposition. *Journal of Economic Entomology*, 102: 921-926.
- Follett, P. A. y Hennessey, M. K.** 2007. Confidence limits and sample size for determining nonhost status of fruits and vegetables to tephritid fruit flies as a quarantine measure. *Journal of Economic Entomology*, 100: 251-257.
- Grové T., de Beer, M. S. y Joubert, P. H.** 2010. Developing a systems approach for *Thaumatotibia leucotreta* (Lepidoptera: Tortricidae) on "Hass" avocado in South Africa. *Journal of Economic Entomology*, 103: 1112-1128.
- Hennessey, M. K.** 2007. Guidelines for the determination and designation of host status of a commodity for fruit flies (Tephritidae). Orlando, Florida, USDA-CPHST.
- Norma regional sobre medidas fitosanitarias n.º 30 de la Comisión de Protección Vegetal para Asia y el Pacífico.** 2008. *Directrices para determinar y designar el estatus de una fruta o verdura como hospedante de moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae)*. Ottawa, Organización Norteamericana de Protección a las Plantas.
- NASS (National Agriculture Security Service).** 1991. *Specification for determination of fruit fly host status as a treatment*. Norma 155.02.01.08. Wellington, Ministerio de Agricultura y Pesca de Nueva Zelanda.
- Rattanapun, W., Amornsak, W. y Clarke, A. R.** 2009. *Bactrocera dorsalis* preference for and performance on two mango varieties at three stages of ripeness. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 131: 243-253.

- Santiago, G., Enkerlin, W. Reyes, J. y Ortiz, V.** 1993. Ausencia de infestación natural de moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae) en aguacate “Hass” en Michoacán, México. *Agrociencia serie Protección Vegetal*, 4(3): 349-357.
- Singer, M. C.** 2004. Oviposition preference: its definition, measurement and correlates, and its use in assessing risk of host shifts. En J.M. Cullen, D. T. Briesse, W. M. Kriticos, L. Morin y J. K. Scott, eds. *Proceedings of the XI International Symposium on Biological Control of Weeds*, págs. 235-244. Canberra, CSIRO.
- Thomas, D. B.** 2004. Hot peppers as a host for the Mexican fruit fly *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, 87: 603-608.
- van Klinken, R. D.** 2000. Host specificity testing: Why do we do it and how can we do it better. En R. Van Driesche, T. Heard, A. McClay y R. Reardon, eds. *Host-specificity testing of exotic arthropod biological control agents: The biological basis for improvement in safety*, págs. 54-68. Morgantown, WV, Forest Health Technology Enterprise Team, USDA Forest Service.
- Willard, H. F., Mason, A. C. y Fullaway, D. T.** 1929. Susceptibility of avocados of the Guatemala race to attack by the Mediterranean fruit fly in Hawaii. *Hawaiian Forester and Agriculturist*, 26: 171-176.

La Comisión de Medidas Fitosanitarias adoptó este tratamiento fitosanitario en su 11.ª reunión, celebrada en 2016.

Este anexo es una parte prescriptiva de la NIMF 28.

NIMF 28

Tratamientos fitosanitarios para plagas reglamentadas

TF 20: Tratamiento de irradiación contra *Ostrinia nubilalis*

Ámbito ~~de aplicación~~ del tratamiento

Este tratamiento consiste en la irradiación de frutas y hortalizas con una dosis mínima absorbida de 289 Gy para ~~evitar-prevenir~~ el desarrollo de la F₁ más allá del quinto estadio, o con una dosis mínima absorbida de 343 Gy para ~~impedir-prevenir~~ la eclosión de los huevos de la F₁ tras la irradiación en pupas (~~la el fase estado de desarrollo biológica~~ más tolerante) de *Ostrinia nubilalis* (barrenador europeo del maíz)¹.

Descripción del tratamiento

Nombre del tratamiento	Tratamiento mediante de irradiación contra <i>Ostrinia nubilalis</i>
Ingrediente activo	N/A
Tipo de tratamiento	Irradiación
Plaga objetivo	<i>Ostrinia nubilalis</i> (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae)
Artículos reglamentados objeto del tratamiento	Todas las frutas y hortalizas que son hospedantes de <i>Ostrinia nubilalis</i>

Protocolos de tratamiento

~~Aplicación de una d~~Dosis mínima absorbida de 289 Gy para ~~impedir-prevenir~~ ~~que el desarrollo de~~ la F₁ de *O. nubilalis* se desarrolle más allá del ~~l quinto los~~ estadios ~~inmaduros~~ (de huevos a pupas tardías).

Existe un 95 % de confianza en que el tratamiento conforme a este protocolo ~~impida-prevenga~~ el desarrollo de la F₁ más allá del quinto estadio en no menos del 99,987 % de las pupas tardías de *O. nubilalis*.

~~Aplicación de una d~~Dosis mínima absorbida de 343 Gy para ~~evitar-prevenir~~ la eclosión de los huevos, con efecto en los estadios de huevos a pupas tardías de la F₁ de *O. nubilalis*.

Existe un 95 % de confianza en que el tratamiento conforme a este protocolo ~~evite-prevenga~~ la eclosión de huevos de la F₁ de no menos del 99,9914 % de las pupas tardías de *O. nubilalis*.

¹ El ámbito de los tratamientos fitosanitarios no abarca cuestiones relacionadas con el registro de plaguicidas u otros requisitos nacionales para la aprobación de tratamientos por las partes contratantes. Los tratamientos adoptados por la Comisión de Medidas Fitosanitarias podrán no proporcionar información sobre efectos específicos en la salud humana o la inocuidad alimentaria, los cuales deberán abordarse mediante procedimientos nacionales antes de que las partes contratantes aprueben un tratamiento. ~~Por otra parte~~ Además, para ciertos productos hospedantes se consideran, antes de la ~~aprobación-adopción~~ internacional del tratamiento, sus posibles ~~repercusiones-efectos~~ en la calidad. Sin embargo, la evaluación de los efectos de un tratamiento sobre la calidad de los productos podrá requerir una ~~examen-consideración~~ adicional. Las partes contratantes no tienen obligación de aprobar, registrar o adoptar los tratamientos ~~con vistas a su para~~ utilización en su territorio.

Este tratamiento debería aplicarse de conformidad con los requisitos establecidos en la NIMF 18 (*Directrices para utilizar la irradiación como medida fitosanitaria*).

Estos protocolos de irradiación no deberían aplicarse a frutas y hortalizas almacenadas en atmósfera modificada ya que tal condición podrá afectar la eficacia del tratamiento.

Otra información pertinente

Puesto que la irradiación podrá no ocasionar inmediatamente la muerte, los inspectores podrán encontrar especímenes de *O. nubilalis* vivos (larvas, pupas o adultos), aunque no viables, durante el proceso de inspección. Esto no supone un fallo del tratamiento.

Al evaluar este tratamiento, el Grupo técnico sobre tratamientos fitosanitarios (GTTF) [examinó consideró](#) las cuestiones asociadas con la posible supervivencia de adultos estériles. Si un número suficiente de estos escapara de las frutas y hortalizas infestadas irradiadas y volara hasta las trampas de monitoreo de plagas, esto podría activar una respuesta de cuarentena que posiblemente redundaría en pérdidas económicas y restricciones del comercio. Sobre la base del trabajo descrito en Hallman y Hellmich (2009) y en Hallman *et al.* (2010), el GTTF consideró que el número de supervivientes sanos sería suficientemente bajo como para que tal situación resulte improbable.

Referencias

En el presente anexo se hace referencia a normas internacionales para medidas fitosanitarias (NIMF). Las NIMF están disponibles en el Portal fitosanitario internacional (PFI): <https://www.ippc.int/es/core-activities/standards-setting/ispms>.

Hallman, G. J. y Mangan, R. L. 2009. Ionizing radiation as a phytosanitary treatment against European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) in ambient, low oxygen, and cold conditions. *Journal of Economic Entomology*, 102(1): págs. 64-68.

Hallman, G. J., Levang-Brilz, N. M., Zettler, L. y Winborne, I. C. 2010. Factors affecting ionizing radiation phytosanitary treatments, and implications for research and generic treatments. *Journal of Economic Entomology*, 103(6): págs. 1950-1963.

Historia de la publicación

Esta no es una parte oficial de la norma.

2012: Se presentó el tratamiento (2012-009)

2012-12: El Grupo técnico sobre tratamientos fitosanitarios (GTTF) examinó el tratamiento y solicitó información adicional.

2013-02: El GTTF envió una carta al proponente por conducto de la Secretaría.

2013-05: Se recibió la respuesta del proponente.

2013-07: El GTTF recomendó el texto al Comité de Normas (CN) para consulta a los miembros.

2013-09: El GTTF aprobó el protocolo de tratamiento (en una reunión virtual).

2013-09: El GTTF comenzó a redactar un documento de posición sobre la emergencia de adultos tras la irradiación.

2014-02: El GTTF aprobó el documento de posición sobre la emergencia de adultos tras la irradiación y lo remitió a la Secretaría.

2014-02: El CN aprobó mediante decisión por medios electrónicos el envío para consulta a los miembros.

2014-03: La Secretaría realizó los cambios propuestos en el foro de debate y abrió la encuesta.

2014-03: El CN aprobó el proyecto de tratamiento para consulta a los miembros mediante una encuesta (2014_eSC_May_06).

2015-02: El GTTF examinó las observaciones de la consulta a los miembros.

2015-05: Examen en la reunión virtual del GTTF en mayo.

2015-09: Examen en la reunión del GTTF en septiembre.

2015-10: El CN aprobó el TF a fin de que se presentara para su [aprobación adopción](#) en la CMF (2015_eSC_Nov_06).

2016-04: La CMF-11 [aprobé-adoptó](#) el TF.

NIMF 28. Anexo 20. *Tratamiento de irradiación contra Ostrinia nubilalis*. Roma, CIPF, FAO.

Última actualización de la historia de la publicación: 2016-04

NIMF 28

Tratamientos fitosanitarios para plagas reglamentadas

TF 21: Tratamiento ~~térmico~~ con calor mediante vapor contra *Bactrocera melanotus* y *Bactrocera xanthodes* en *Carica papaya*

Ámbito ~~de aplicación~~ del tratamiento

Este tratamiento consiste en ~~el tratamiento de colocar los~~ frutos de *Carica papaya* en una cámara de aire forzado a alta temperatura para provocar la mortalidad de los huevos y las larvas de *Bactrocera melanotus* y *Bactrocera xanthodes* (mosca de la fruta del Pacífico) con el nivel de eficacia ~~indicado~~ establecido¹.

Descripción del tratamiento

Nombre del tratamiento	Tratamiento térmico con <u>calor</u> mediante vapor contra <i>Bactrocera melanotus</i> y <i>Bactrocera xanthodes</i> en <i>Carica papaya</i>
Ingrediente activo	N/A
Tipo de tratamiento	Físico (aplicación de calor mediante vapor)
Plagas objetivo	<i>Bactrocera melanotus</i> (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) y <i>Bactrocera xanthodes</i> (Broun) (Diptera: Tephritidae)
Artículos reglamentados objeto del tratamiento	Frutos de <i>Carica papaya</i> (L.)

Protocolo de tratamiento

Exposición al calor en una cámara de aire forzado:

- con una humedad relativa de 60 % como mínimo
- con una temperatura del aire en aumento durante 3,5 horas como mínimo desde la temperatura ambiente hasta 48,5 °C o más
- con una temperatura del aire que se mantiene a 48 °C o más durante 3,5 horas como mínimo
- con una temperatura del fruto que se mantiene a 47,5 °C o más en todos los frutos presentes en la cámara durante 20 minutos como mínimo.

Una vez terminado el tratamiento la fruta podrá enfriarse (~~p~~or ejemplo, mediante hidrogenfriamiento) hasta una temperatura central de 30 °C en un período de tiempo que no sea inferior a 70 minutos.

¹ El ámbito ~~de aplicación~~ de los tratamientos fitosanitarios no abarca ~~aspectos~~ cuestiones relacionadas con el registro de plaguicidas u otros requisitos nacionales para la aprobación de tratamientos por las partes contratantes. Los tratamientos ~~aprobados~~ adoptados por la Comisión de Medidas Fitosanitarias podrán no proporcionar información sobre efectos específicos en la salud humana o la inocuidad alimentaria, los cuales deberían abordarse mediante procedimientos nacionales antes de que las partes contratantes aprueben un tratamiento. ~~Por otra parte~~ Además, para ciertos productos hospedantes se consideran, antes de la ~~aprobación~~ adopción internacional del tratamiento, sus posibles ~~repercusiones~~ efectos en la calidad. Sin embargo, la evaluación de los efectos de un tratamiento sobre la calidad de los productos podrá requerir ~~un examen~~ consideración adicional. Las partes contratantes no tienen obligación de aprobar, registrar o adoptar los tratamientos ~~con vistas a su~~ para utilización en su territorio.

Hay un 95 % de confianza en que el tratamiento conforme a este protocolo mate a no menos del 99,9914 % de los huevos y larvas de *B. melanotus* y *B. xanthodes*.

Otra información pertinente

Al evaluar este tratamiento, el Grupo técnico sobre tratamientos fitosanitarios (GTTF) consideró la justificación técnica para incluir otras plagas de moscas de la fruta de la familia de los tefrítidos (*Anastrepha ludens* [Loew], *Anastrepha suspensa* [Loew], *Bactrocera cucurbitae* [Coquillett], *Bactrocera dorsalis* [Hendel], *Bactrocera facialis* [Coquillett], *Bactrocera kirki* [Froggatt], *Bactrocera passiflorae* [Froggatt], *Bactrocera psidii* [Froggatt], *Bactrocera tryoni* [Froggatt] y *Ceratitis capitata* [Wiedemann]) y otras frutas cultivadas (todas las frutas hospedantes de moscas de la fruta de la familia de los tefrítidos) en la descripción del tratamiento tal como se había remitido inicialmente. No obstante, sobre la base de Waddell *et al.*, el GTTF recomendó que se incluyesen únicamente dos plagas de moscas de la fruta de la familia de los tefrítidos, concretamente *B. melanotus* y *B. xanthodes*, y un único fruto, *C. papaya*. (1993).

El cultivo frutícola empleado para elaborar el protocolo fue *C. papaya* Waimanalo Solo.

Referencias

En el presente anexo se hace referencia a normas internacionales para medidas fitosanitarias (NIMF). Las NIMF están disponibles en el Portal fitosanitario internacional (PFI): <https://www.ippc.int/es/core-activities/standards-setting/ispms>.

Waddell, B. C., Clare, G. K., Maindonald, J. H. y Petry, R. J. 1993. *Postharvest disinfestations of Bactrocera melanotus and B. xanthodes in the Cook Islands*. Report 3: Wellington, New Zealand Ministry of Agriculture and Fisheries – Regulatory Authority. 44 págs.

Historia de la publicación

Esta no es una parte oficial de la norma.

2009: Presentación del *Tratamiento con aire forzado a alta temperatura contra ciertas especies de moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae) en frutas* (2009-105).

2010-07: El Grupo técnico sobre tratamientos fitosanitarios (GTTF) examinó el tratamiento y solicitó información adicional.

2012-12: El GTTF pidió que se ampliara el plazo de evaluación.

2013-07: El GTTF cambió el título por *Tratamiento con aire forzado a alta temperatura contra Bactrocera melanotus y B. xanthodes en Carica papaya* (2009-105) y recomendó el texto al CN para consulta a los miembros.

2013-09: El GTTF aprobó el protocolo de tratamiento (en una reunión virtual).

2014-02: El Comité de Normas (CN) aprobó mediante decisión por medios electrónicos el envío para consulta a los miembros.

2014-03: La Secretaría realizó los cambios propuestos en el foro de debate y abrió la encuesta.

2014-03: El CN aprobó el proyecto de tratamiento para consulta a los miembros mediante una encuesta (2014_eSC_May_02).

2015-02: El GTTF examinó las observaciones de la consulta a los miembros.

2015-05: Reunión virtual del GTTF en mayo.

2015-09: Reunión del GTTF en septiembre.

2015-10: El CN aprobó el proyecto de tratamiento para su aprobación en la CMF (2015_eSC_Nov_07).

2016-04: La CMF-11 [aprobó-adoptó](#) el tratamiento fitosanitario.

NIMF 28. Anexo 21. *Tratamiento térmico ~~con~~ mediante vapor contra Bactrocera melanotus y Bactrocera xanthodes en Carica papaya.* Roma, CIPF, FAO.

Última actualización de la historia de la publicación: 2016-04

Este protocolo de diagnóstico fue adoptado por el Comité de Normas, en nombre de la Comisión de Medidas Fitosanitarias, en enero de 2015.

Este anexo es una parte prescriptiva de la NIMF 27.

NIMF 27

Protocolos de diagnóstico para plagas reglamentadas

PD 7: *Viroide del tubérculo fusiforme de la papa (patata)*

Adoptado en 2016; publicado en 2016

Índice

1.	Información sobre plagas.....	2
2.	Información taxonómica.....	3
3.	Detección.....	3
3.1	Muestreo.....	6
3.2	Detección biológica.....	6
3.3	Detección molecular.....	7
3.3.1	Preparación de las muestras	7
3.3.2	Extracción del ácido nucleico	8
3.3.3	Métodos moleculares genéricos para la detección de pospiviroides	10
3.3.3.1	R-PAGE	10
3.3.3.2	Hibridación con una sonda de ARNc marcada con digoxigenina.....	10
3.3.3.3	RT-PCR convencional con los cebadores de Verhoeven <i>et al.</i> (2004) (2004).....	11
3.3.3.4	Análisis GenPospi basado en la RT-PCR en tiempo real (Botermans <i>et al.</i> , 2013)..	11
3.3.4	Métodos moleculares de mayor especificidad para la detección del PSTVd	13
3.3.4.1	RT-PCR convencional con los cebadores de Shamloul <i>et al.</i> (1997).....	13
3.3.4.2	RT-PCR en tiempo real con los cebadores de Boonham <i>et al.</i> (2004) (2004)	13
3.3.4.3	RT-PCR en tiempo real (equipo de Plant Print Diagnostics).....	14
3.4	Controles para las pruebas moleculares	15
3.5	Interpretación de los resultados de la RT-PCR convencional y en tiempo real	16
3.5.1	RT-PCR convencional	16
3.5.2	RT-PCR en tiempo real.....	16
4.	Identificación	17
4.1	Secuenciación y análisis de las secuencias	17
5.	Registros	18
6.	Puntos de contacto para información adicional	19
7.	Agradecimientos	19
8.	Referencias	20

1. Información sobre la plagas

Los viroides son moléculas de cadena simple de ARN monocatenario circulares cerradas covalentemente de entre 239 y 401 nucleótidos de longitud, ~~si no encapsuladas~~ en cápsida, que son replicadas por enzimas del hospedante (Hammond y Owens, 2006). El viroide del tubérculo fusiforme de la papa (patata) (*potato spindle tuber viroid*, PSTVd; género *Pospiviroid*) por lo general tiene una longitud de 359 nucleótidos, pero se han descrito ~~cepas aisladas~~ aislamientos del PSTVd de entre 341 y 364 nucleótidos (Wassenegger *et al.*, 1994; Shamloul *et al.*, 1997; Jeffries, 1998). Se han descrito cepas con efectos leves o graves, según los síntomas que ocasionan en cultivares susceptibles de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), por ejemplo, en el cv. 'Rutgers' ~~de *Solanum lycopersicum* L. (tomate)~~, (Fernow, 1967).

El rango de hospedantes naturales del PSTVd es relativamente reducido. Sus hospedantes naturales primarios son especies de *Solanum* que forman estolones y tubérculos, como *Solanum tuberosum* L. (papa) y *S. lycopersicum* (tomate), aunque también se ha encontrado en *Capsicum annuum*, *Persea americana* y *S. muricatum*. El PSTVd se ha detectado en especies de plantas ornamentales de la familia Solanaceae de ~~multiplicación—propagación~~ principalmente vegetativa (concretamente en *Brugmansia* spp., *Cestrum* spp., *Datura* sp., *Lycianthes rantonetti*, *Petunia* spp., *Physalis peruviana*, *Solanum* spp. y *Streptosolen jamesonii*), pero también en *Chrysanthemum* sp. y en *Dahlia* × *hybrida*, de la familia Asteraceae (para más detalles sobre los hospedantes naturales, véase CABI (s. f.)). ~~Se~~ El rango de hospedantes experimentales es amplio e incluye especies de la familia Solanaceae y también algunas especies de al menos otras nueve familias. La mayoría de los hospedantes ~~muestran—presentan~~ pocos o ningún síntoma de enfermedad (Singh, 1973; Singh *et al.*, 2003).

~~También—~~Se han detectado infecciones de *S. tuberosum* por el PSTVd en algunos países o estados de África, Asia, Europa Oriental, América del Norte (EPPO/CABI, 1997), América Central (Badilla *et al.*, 1999), América del Sur y el Oriente Medio (Hadidi *et al.*, 2003). Sin embargo, su distribución geográfica es más amplia en las especies de plantas ornamentales y en otros hospedantes (véase CABI (s. f.) para la distribución geográfica).

En *Solanum tuberosum* el principal medio de dispersión del PSTVd es la ~~multiplicación—propagación~~ vegetativa, aunque también se disemina por contacto, sobre todo por la maquinaria empleada en el campo de cultivo y por el corte de tubérculos de papa para semilla para siembra (Hammond y Owens, 2006). El PSTVd se transmite por la semilla verdadera de papa — podrá estar infectado hasta el 100% de las semillas (Fernow *et al.*, 1970; Singh, 1970)— y también por el polen (Grasmick y Slack, 1985; Singh *et al.*, 1992). De Bokx y Pirone (1981) ~~notificaron—reportaron~~ una tasa de transmisión baja del PSTVd por el áfido *Macrosiphum euphorbiae*, pero no por los áfidos *Myzus persicae* ni *Aulacorthum solani*. Sin embargo, se ha descrito la transmisión y la adquisición experimentales del PSTVd por *M. persicae* a partir de plantas infectadas a la vez por el PSTVd y el virus del enrollado de la hoja de la papa (*potato leafroll virus*, PLRV) (Salazar *et al.*, 1995; Singh y Kurz, 1997). Posteriormente se demostró que el PSTVd estaba ~~encapsidado—encapsulado de manera heteróloga heterológamente~~ dentro de partículas del PLRV (Querici *et al.*, 1997), un fenómeno que podrá tener repercusiones importantes en la epidemiología y la dispersión del PSTVd en condiciones de campo.

En *Solanum lycopersicum*, el PSTVd se dispersa fácilmente por contacto y se ha comprobado que se transmite por el polen y las semillas (Kryczynski *et al.*, 1988; Singh, 1970). Se ha demostrado que la transmisión mediante semillas de tomate contribuye a la dispersión internacional del PSTVd (van Brunschot *et al.*, 2014) y es posible que el PSTVd también se disperse en semillas de chile (*Capsicum*) infectadas (Lebas *et al.*, 2005).

Las especies de plantas ornamentales infectadas podrán actuar como fuente de inóculo si se manipulan antes de tocar otras plantas susceptibles y se ha comprobado que son una vía para la dispersión internacional del PSTVd (Navarro *et al.*, 2009; Verhoeven *et al.*, 2010). Se comprobó que no había

transmisión del PSTVd por *Apis mellifera*, *Bombus terrestris*, *Frankliniella occidentalis* ni *Thrips tabaci* (Nielsen *et al.*, 2012).

El PSTVd es el único viroide que se sabe que infecta naturalmente a especies cultivadas de *Solanum*, aunque el viroide de la papita mexicana (*Mexican papita viroid*, MPVd) infecta a la especie silvestre *S. cardiophyllum* (Martínez-Soriano *et al.*, 1996). Otras especies de viroides del género *Pospiviroid* infectan experimentalmente a *S. tuberosum* (Verhoeven *et al.*, 2004).

Además del PSTVd, se han detectado otros pospiviroides que infectan a *S. lycopersicum* de manera natural, como el viroide de la exocortis de los cítricos (*citrus exocortis viroid*, CEVd; Mishra *et al.*, 1991), el viroide latente de *Columnnea* (*Columnnea latent viroid*, CLVd; Verhoeven *et al.*, 2004), el viroide de la papita mexicana (*Mexican papita viroid*, MPVd; Ling y Bledsoe, 2009), el viroide del achatamiento del fruto del pimiento (*pepper chat fruit viroid*, PCFVd; Reanwarakorn *et al.*, 2011), el viroide del enanismo apical del tomate (*tomato apical stunt viroid*, TASVd; Walter, 1987), el viroide del enanismo clorótico del tomate (*tomato chlorotic dwarf viroid*, TCDVd; Singh *et al.*, 1999) y el viroide de la planta macho del tomate (*tomato planta macho viroid*, TPMVd; Galindo *et al.*, 1982).

2. Información taxonómica

Nombre: *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd)

Sinónimos en inglés: potato spindle tuber virus, potato gothic virus, tomato bunchy top virus

Posición taxonómica: Pospiviroidae, *Pospiviroid*

Nombres comunes en español: viroide del tubérculo fusiforme de la papa (también “virus” o “enfermedad” del tubérculo fusiforme de la papa o simplemente “tubérculo fusiforme de la papa”), viriote/virus/enfermedad del tubérculo ahusado de la papa

3. Detección

La apariencia y la gravedad de los síntomas varían en función de la cepa de PSTVd, del cultivar y del medio ambiente. En *S. tuberosum*, la infección podrá ser asintomática o ~~causar~~ ~~con~~ ~~producir~~ síntomas ~~desde~~ ~~de~~ leves ~~a~~ ~~hasta~~ ~~graves~~ ~~severos~~ (disminución del tamaño de la planta, crecimiento erecto y filotaxis dextrógira del follaje en vista superior; hojas de color verde oscuro y rugosas). Los tubérculos pueden ser de tamaño reducido, deformes, fusiformes o con forma de mancuerna (alargados con un estrechamiento central), con ojos prominentes manifiestos distribuidos uniformemente (EPPO, 2004). En *S. lycopersicum* los síntomas incluyen retraso del crecimiento, epinastia; rugosidad y torsión lateral de los folíolos nuevos; clorosis, enrojecimiento, fragilidad y necrosis de las hojas; frutos de tamaño reducido y que no maduran completamente (Mackie *et al.*, 2002; Hailstones *et al.*, 2003; Lebas *et al.*, 2005). En *C. annuum* los síntomas son sutiles: márgenes ondulados de las hojas cercanas a la parte superior de la planta (Lebas *et al.*, 2005). Ninguna de las especies de plantas ornamentales investigadas hasta la fecha muestra síntomas (Verhoeven, 2010).

Dado que las infecciones por el PSTVd podrán ser asintomáticas, es necesario realizar pruebas para la detección e identificación del viroide. El PSTVd se puede detectar mediante las pruebas biológicas y moleculares que se muestran como opciones en la Figura 1, pero para la identificación es necesario secuenciar el producto de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP o PCR, por sus siglas en inglés), dado que las pruebas no son específicas para el PSTVd y detectarán también otros viroides. La secuenciación también servirá para evitar la notificación de falsos positivos. Si se considera que la patogenicidad es importante se podrá realizar la indexación biológica. Si la identificación del PSTVd constituye la primera detección en un país, se podrá ~~confirmar~~ ~~solicitar la confirmación~~ del diagnóstico ~~en~~ ~~a~~ otro laboratorio.

Deberían incluirse en todas las pruebas los controles ~~pertinentes~~ ~~apropiados~~ para minimizar el riesgo de ~~resultados~~ falsos positivos o falsos negativos ~~en los resultados~~.

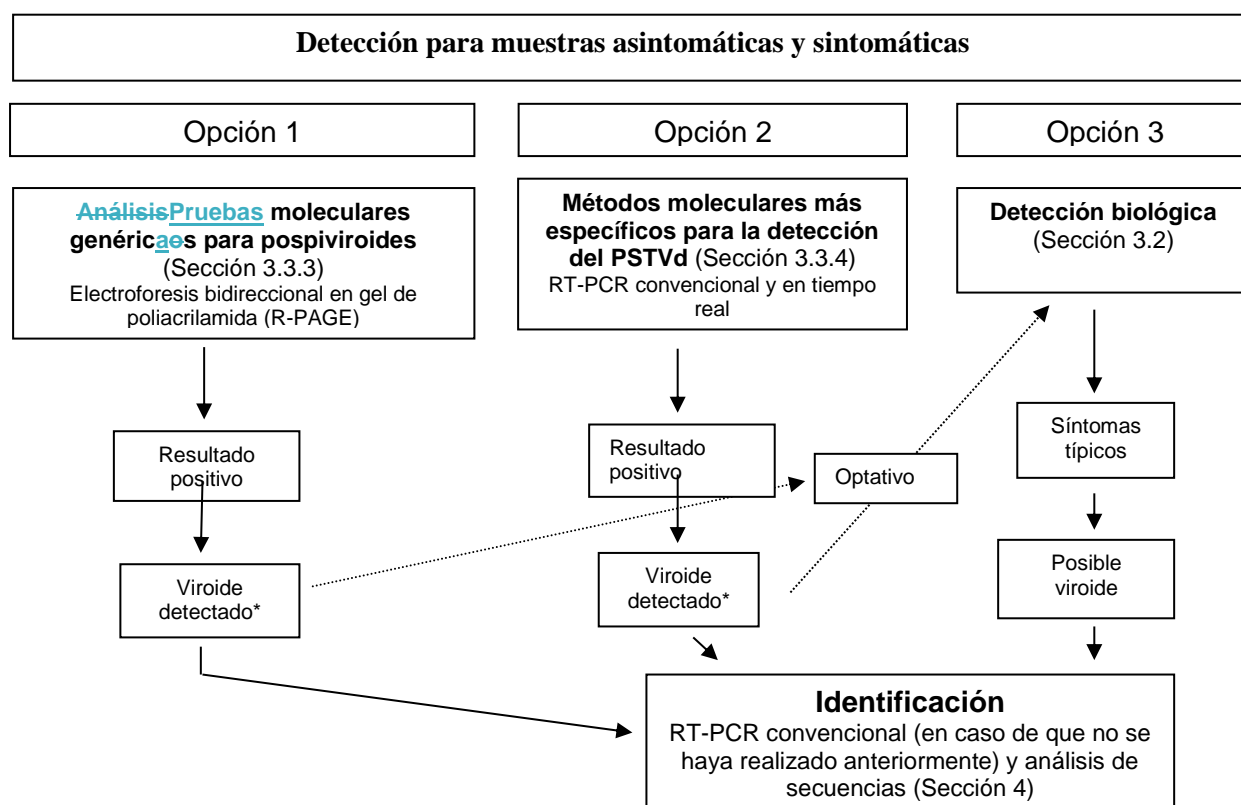


Figura 1. Requisitos mínimos para la detección e identificación del viroide del tubérculo fusiforme de la papa (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd)

* La identificación podrá no ser necesaria en el caso de todas las muestras que den positivo para viroides en determinadas circunstancias, por ejemplo, si se está afrontando un brote del PSTVd.

Nota: Si se sospecha la presencia de un viroide en una muestra (por ejemplo, por la presencia de síntomas característicos) pero se obtiene un resultado negativo en una prueba, debería realizarse otra prueba distinta para confirmar el resultado.

El presente anexo se ocupa de la detección del PSTVd; no se ha elaborado para la detección e identificación de otras especies de pospiviroides. No obstante, para elegir un método de detección e identificación debe tenerse en cuenta la posible presencia de otros viroides. Por lo tanto, en este anexo se describen métodos de detección inespecíficos que detectarán todos los viroides conocidos, incluidos los pospiviroides como el PSTVd. Para la identificación se deberá secuenciar el producto de la PCR.

Se describen protocolos para la detección del PSTVd en hojas, tubérculos y tejido de semilla botánica (verdadera), aunque la detección fiable en el tejido de semilla es especialmente difícil.

En este protocolo de diagnóstico, los métodos (~~entre ellos incluidas~~ las referencias a nombres comerciales) se describen según se publicaron, ya que en ellos se definió el nivel inicial de sensibilidad, especificidad y/o reproducibilidad ~~adquirido alcanzado~~. El uso de nombres de reactivos, productos químicos o equipo en estos protocolos de diagnóstico no implica su aprobación ni la exclusión de otros que también podrán ser adecuados. Los procedimientos de laboratorio presentados en los protocolos podrán ajustarse a las normas de los laboratorios individuales, siempre que estén adecuadamente validadas. La Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas (OEPP) (En EPPO, (2014) se proporcionan recomendaciones relativas a la validación de métodos de fitodiagnóstico.

El rendimiento de una prueba molecular está determinado tanto por la matriz que se va a analizar como por la posterior elección de los métodos de preparación de la muestra, de extracción del ácido nucleico

y [de](#) detección e identificación. En el Cuadro 1 se ofrece una visión general de los datos de validación disponibles para diferentes matrices y combinaciones de métodos. Los ~~por menores~~ [detalles](#) de estos métodos se describen en los párrafos correspondientes o en las referencias indicadas.

3.1 Muestreo

La NIMF 31 (*Metodologías para muestreo de envíos*) brinda orientación general sobre las metodologías de muestreo.

Microplantas de *S. tuberosum* y plantas de *S. tuberosum* cultivadas en invernadero. En el caso de las microplantas, debería utilizarse como muestra la planta completa o deberían tomarse como muestra las dos terceras partes superiores de la planta, en condiciones asépticas para permitir que el resto de la planta continúe creciendo. Las microplantas deberían tener entre cuatro y seis semanas, tallos de aproximadamente 5 cm de longitud y hojas bien formadas. En el caso de las plantas cultivadas en invernadero se debería utilizar un foliolo completamente ~~desarrollado~~ expandido de cada planta. La concentración de viroides es menor a temperaturas bajas y con bajos niveles de iluminación ~~escasa~~, por lo que las plantas se deberían cultivar a una temperatura de al menos mínima de ~~18~~ °C y con un fotoperíodo ~~mínimo de~~ al menos 14 h. Las microplantas o las hojas podrán agruparse; ~~el porcentaje~~ la tasa de agrupamiento dependerá del tipo de método utilizado y debe ser validado.

Plantas de *S. tuberosum* cultivadas en el campo. Debería usarse un foliolo terminal no senescente completamente ~~desarrollado~~ expandido del extremo superior de cada planta. Las hojas podrán agruparse para los análisis; ~~el porcentaje~~ la tasa de agrupamiento dependerá del tipo de método utilizado y debe ser validado.

Tubérculos de *S. tuberosum*. El PSTVd se distribuye de manera sistémica en los tubérculos de *S. tuberosum* infectados (Shamloul *et al.*, 1997) y está también presente, en casi la misma proporción, en distintas partes de los tubérculos infectados tanto de manera primaria como secundaria (Roehorst *et al.*, 2006). La mayor concentración se detecta inmediatamente después de la ~~recolección~~ cosecha. En los tubérculos almacenados a 4 °C la concentración no disminuye significativamente durante un período de hasta tres meses, pero después de seis meses de almacenamiento puede reducirse más de 10⁴ veces. Se puede usar como muestra un único ~~testigo~~ trozo central de cualquier parte del tubérculo, que podrá agruparse; ~~el porcentaje~~ la tasa de agrupamiento dependerá del tipo de método utilizado y debe ser validado.

Hojas de otros cultivos y de especies de plantas ornamentales. Se utilizan hojas jóvenes completamente ~~desarrolladas~~ expandidas. Las hojas podrán agruparse para los análisis; ~~el porcentaje~~ la tasa de agrupamiento dependerá del tipo de método utilizado y debe ser validado. Téngase en cuenta que la concentración de viroides se ve afectada por la edad/madurez de las plantas y que a menudo se producen fluctuaciones estacionales. Además, algunas especies contienen sustancias bioquímicas que podrán inhibir la transmisión a las plantas objeto de análisis (p. ej. *Brugmansia* spp.) o inhibir la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) (p. ej. *Calibrachoa* spp., *Solanum jasminoides* y *S. jamesonii*).

Semillas. La concentración de ~~l~~ viroides podrá variar en gran medida entre distintas semillas y el nivel de infección podrá variar desde menos del 1 % hasta el 100 %. Esto dificulta mucho la recomendación de un tamaño muestral y una porcentaje ~~tasa~~ de agrupamiento (EUPHRESO, 2010). Para *S. lycopersicum* se han empleado porcentajes ~~tasas~~ de agrupamiento de entre 100 y 1000 para una única prueba. ~~El~~ La porcentaje ~~tasa~~ de agrupamiento dependerá del tipo de método utilizado y debe ser validado.

Las semillas de papa se podrán sembrar en un medio de crecimiento (p. ej., compost) en bandejas y las plántulas o plantas se podrán analizar de manera no destructiva utilizando el mismo procedimiento descrito para las plantas cultivadas en invernaderos (EPPO, 2006).

3.2 Detección biológica

La inoculación de plantas de *S. lycopersicum* (cultivares ‘Rutgers’, ‘Money maker’ o ‘Sheyenne’) permitirá la detección de muchos viroides, pero no de todos —p. ej., el tomate no es un hospedante del pospoviroide *Iresine viroid 1* (IrVd-1; Spieker, 1996; Verhoeven *et al.*, 2010)— y aportará pruebas ~~evidencia~~ visuales de la patogenicidad. Sin embargo, ~~algunas~~ cepas aisladas ~~aislamiento~~ formas del

viroide podrán no ser detectadas debido a la ausencia de síntomas y, además, los síntomas podrán no ser diagnósticos para el PSTVd. La indexación biológica podrá requerir una gran cantidad de espacio de invernadero, exige mucho trabajo y podrán necesitarse al menos varias semanas para completar la prueba. No se han realizado investigaciones para comparar la sensibilidad de este método con la de otros métodos descritos en el presente protocolo. Si es menos sensible que los métodos moleculares, podría ser menos adecuado para el análisis de semillas. Sin embargo, en la indexación biológica el viroide podrá amplificarse hasta un nivel que permita la detección por otros métodos.

Se trituran aproximadamente 200 mg a 500 mg de tejidos de hojas, raíces o tubérculos en una pequeña cantidad de tampón fosfato 0,1 M (una dilución 1:1 es adecuada) de inoculación, que contiene carborundo (de grano 400). El tampón fosfato (pH 7,4) se prepara combinando 80,2 ml de K_2HPO_4 1 M con 19,8 ml de KH_2PO_4 1 M y ajustando el volumen hasta 1 litro con agua destilada.

Se inoculan plantas de tomate jóvenes con una o dos hojas completamente **desarrolladas** **expandidas**: tras frotar suavemente la superficie de la hoja con un dedo enguantado, una torunda o un hisopo de algodón inmerso previamente en el inóculo, las hojas se enjuagan inmediatamente con agua hasta eliminar el carborundo. Las plantas se cultivan con una fluctuación diurna de temperatura de 24 °C a 39 °C y un fotoperíodo de 14 h complementado con iluminación de vapor de sodio de aproximadamente 650 $\mu E/m^2/s$ (Grassmick y Slack, 1985). **Unas** **Temperaturas** más bajas y una menor iluminación podrán reducir la sensibilidad del análisis. Las plantas se inspeccionan semanalmente, en busca de síntomas, por un período máximo de seis semanas después de la inoculación. Los síntomas de infección por el PSTVd incluyen retraso del crecimiento, epinastia; rugosidad y torsión lateral de los folíolos nuevos; clorosis, enrojecimiento, fragilidad y necrosis de las hojas.

Un bioensayo en el tomate permitirá detectar muchos pospiviroides (excepto el IrVd-1, véase más arriba); por tanto, se debería **amplificar mediante** **realizar** la RT-PCR **al** **el** ácido nucleico extraído de plantas indicadoras sintomáticas y el producto de la PCR se debería secuenciar a efectos de la identificación.

3.3 Detección molecular

3.3.1 Preparación de las muestras

Microplantas, material **de** **hojas** **foliar** **y** **de** **raíces**. Para moler el material se han utilizado satisfactoriamente tanto morteros como homogeneizadores (p. ej., el Homex 6 (Bioreba)) con bolsas de extracción (Bioreba). La adición de una pequeña cantidad de agua o de tampón de lisis (cuya composición dependerá del método utilizado para la extracción del ácido nucleico) o la congelación de la muestra (p. ej., en nitrógeno líquido) podrá facilitar la homogeneización.

El procedimiento siguiente ha sido validado (véase el Cuadro 1) en combinación con la extracción de ácido nucleico utilizando el método 2 de extracción con partículas magnéticas y el análisis para la detección del género Pospiviroid mediante RT-PCR en tiempo real (en adelante “análisis GenPospi”) descrito en el presente anexo. Se homogeneiza aproximadamente 1 g de tejido en una bolsa de extracción mediante un homogeneizador Homex 6 o manual (Bioreba) con 3,5 ml (**intervalo** **rango** 1:2-1:5 p/v) de tampón de lisis GH plus (compuesto por 6 M de clorhidrato de guanidina; 0,2 M de acetato de sodio, pH 5,2; 25 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y 2,5% de polivinilpirrolidona (PVP)-10). A continuación se incuban las muestras durante 10 min a 65°C y a 850 rpm en un termomezclador (o bien se agitan —invirtiendo el tubo 3 veces— y luego se centrifugan durante 2 min a 16 000 g) antes de la extracción del ácido nucleico.

Tubérculos de *S. tuberosum*. Los **testigos** **trozos** **centrales** extraídos del tubérculo se homogeneizan bien en agua o en tampón de lisis (cuya composición dependerá del método utilizado para la extracción del ácido nucleico; 1 ml por g de **testigo** **trozo** **central** de tubérculo). Se ha utilizado satisfactoriamente un molinillo Homex 6 con bolsas de extracción. La congelación de los **testigos** **trozos** **centrales** (p. ej. a -20 °C) antes de añadir el agua o el tampón de lisis facilita la homogeneización.

Semillas. Para cantidades pequeñas de semillas (< 100), podrá utilizarse un lisador de tejidos (~~eomo~~, p.ej. ~~empe~~, el Retsch TissueLyser (Qiagen). Para cantidades mayores de semillas podrá utilizarse un mezclador de palas (~~eomop. ej.~~, el MiniMix (Interscience)) o un homogeneizador (~~p.ej.~~, ~~eomo~~—el Homex 6) con una cantidad mínima de tampón de lisis (cuya composición dependerá del método utilizado para la extracción del ácido nucleico). Las semillas también se podrán aplastar con un martillo (Bertolini *et al.*, 2014b) o utilizando un mortero. Este último método podrá no ser práctico para un uso rutinario porque tal vez resulte difícil evitar la contaminación cruzada. Otra opción podrá ser congelar la muestra con nitrógeno líquido y triturlarla después en un molino para la desintegración celular (este método también se puede utilizar con otros tipos de tejidos).

El procedimiento siguiente ha sido validado (véase el Cuadro 1) en combinación con la extracción de ácido nucleico utilizando el método 2 de extracción con partículas magnéticas y la prueba de RT-PCR en tiempo real de Boonham *et al.* (2004) descrita en el presente anexo. Cada una de tres submuestras de 1 000 semillas se remoja durante 30-60 min a temperatura ambiente en 20 ml de tampón de lisis GH plus en una bolsa de homogeneización BagPage (Interscience) de 100 ml; se homogeneiza durante 90 s en un homogeneizador BagMixer (Interscience) y se incuba (o se agita y se centrifuga según el procedimiento descrito para las microplantas, el material foliar y las raíces) antes de ~~proceder a~~ la extracción del ácido nucleico.

Impresión o frotis por aplastamiento de los tejidos. Los peciolo de las hojas o los vástagos desprendidos se presionan sobre membranas de nailon. Según Bertolini *et al.* (2008, 2014a), en una membrana de nailon de aproximadamente 0,5 cm² se podrán realizar varias impresiones o frotis por aplastamiento parcialmente superpuestos de distintas hojas o vástagos desprendidos. La membrana que contiene la muestra inmovilizada se corta y se inserta en un microtubo; la muestra inmovilizada se debería manejar con unas pinzas limpias. Las muestras obtenidas por impresión o frotis por aplastamiento se pueden almacenar a temperatura ambiente en un lugar seco y protegido de la luz durante al menos tres meses. Para la extracción del ARN diana de las membranas, a cada microtubo que contiene una muestra inmovilizada se añaden 100 µl de tampón de glicina, luego se mezcla en vórtex y se conserva sobre hielo hasta la amplificación mediante PCR.

3.3.2 Extracción del ácido nucleico

Se podrá utilizar una gran variedad de métodos de extracción de ácido nucleico, desde ~~equipos~~ (kits) comerciales hasta métodos publicados en revistas científicas. Los siguientes ~~equipos-kits~~ de extracción de ácidos nucleicos, tampones y procedimientos se han utilizado satisfactoriamente para la detección del PSTVd.

Kits comerciales. Se podrán utilizar ~~equipos-kits~~ de extracción comerciales, como RNeasy (Qiagen), MasterPure (Epicentre) y Sbeadex maxi plant kit (LGC Genomics), siguiendo las instrucciones del fabricante. RNeasy fue evaluado para la extracción de ARN del PSTVd de diferentes matrices como parte del proyecto de detección y epidemiología de pospiviroides (Detection and Epidemiology of Pospiviroids, DEP) de EUPHRESKO (EUPHRESKO, 2010).

Método descrito por Mackenzie *et al.* (1997). El tejido vegetal se homogeneiza (1:10 p/v) en tampón de lisis (4 M de isotiocianato de guanidina~~io~~, 0,2 M de acetato de sodio, 25 mM de EDTA, 2,5 % de PVP-40 (p/v) y 1 % de 2-mercaptoetanol (v/v) añadido justo antes de su uso). A continuación se mezcla un mililitro de homogeneizado con 100 µl de N-lauroilsarcosinato de sodio al 20 % (p/v) y se incuba durante 10 min a 70 °C en un termomezclador con agitación a 1 200 rpm. Este método se puede utilizar para extraer ARN de calidad de una amplia gama de especies de plantas.

Método con tampón de EDTA. El tejido vegetal podrá homogeneizarse (1:4 p/v) en un tampón de lisis sencillo (50 mM de NaOH, 2,5 mM de EDTA) y a continuación incubarse (durante 15 min a aproximadamente 25 °C) o centrifugarse (durante 15 min a 4 °C a 12 000 g). A continuación, en función del nivel de sensibilidad requerido, el sobrenadante puede bien utilizarse directamente para la RT-PCR (menos sensible) o puede impregnarse en una membrana de nitrocelulosa y eluirse con agua destilada estéril (más sensible) (Singh *et al.*, 2006). Aunque la concentración del viroide es menor en el método

del EDTA que en los otros métodos de extracción descritos, esto no debería ser un factor limitante cuando el método se utilice con la RT-PCR o con la sonda marcada con digoxigenina (DIG). El método se ha utilizado con *S. lycopersicum* y *S. tuberosum*, así como con diversas especies de plantas ornamentales.

Extracción con fenol-cloroformo y extracción con polietilenglicol (PEG) en dos etapas. Se homogeneiza el tejido vegetal y se extrae el ácido nucleico según [se describe la OEPP \(en EPPO, 2004\)](#). Este método se ha utilizado, en combinación con la electroforesis bidireccional en gel de poliácridamida (R-PAGE), la sonda de ARN marcada con digoxigenina y los métodos de RT-PCR convencionales descritos en este protocolo de diagnóstico, para una gran variedad de especies de plantas y tipos de tejidos (p. ej., [hojas y tubérculos y hojas de papa y hojas](#)).

Extracción con CTAB. Se homogeneiza el tejido vegetal y se extrae el ácido nucleico según [se describe la OEPP \(en EPPO, 2004\)](#). El método de extracción con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) se ha utilizado con la RT-PCR en tiempo real para una gran variedad de especies de plantas y tipos de tejidos (p. ej., [hojas y semillas y hojas de tomate y hojas](#); EUPHRESO, 2010).

Método 1 de extracción con partículas magnéticas. En el siguiente [proceso—procedimiento](#) automatizado se utiliza el procesador de partículas magnéticas KingFisher mL (Thermo Scientific). Con los ajustes pertinentes de los volúmenes se podrán utilizar otros modelos de KingFisher.

[Se maceran](#) ~~Tras macerar~~ al menos 200 mg de tejido de hoja o de tubérculo o hasta 100 semillas de cada muestra, [e se añaden](#) inmediatamente [se añade 40 ml de](#) tampón de extracción [en una proporción de 10 ml](#) por cada g de tejido de hoja o tubérculo y [de 20 ml de tampón](#) por cada g de semilla. Se continúa macerando hasta obtener un lisado celular transparente con un residuo mínimo de tejido intacto. El tampón de extracción está compuesto por 200 µl de solución de pirofosfato tetrasódico (TNaPP) al 8,39 % p/v (pH 10,0–10,9) y 100 µl de emulsión antiespumante (Antifoam B Emulsion, ~~de (Sigma) 1~~) añadidos a 9,8 ml de tampón de lisis de guanidina. El tampón de lisis de guanidina está compuesto por: 764,2 g de clorhidrato de guanidina; 7,4 g de EDTA disódico dihidratado; 30,0 g de PVP-10; 5,25 g de ácido cítrico monohidratado; 0,3 g de citrato trisódico; 5 ml de Triton X-100; 250 ml de etanol puro y 750 ml de agua.

Se decantan aproximadamente 2 ml de lisado en un tubo de microcentrifugadora nuevo y se centrifuga durante 1 min a aproximadamente 5 000 g. Se retira un mililitro de sobrenadante y se coloca en el primer tubo (A) del soporte de tubos de ensayo del procesador KingFisher mL, al cual se añaden 50 µl de partículas magnéticas (MAP Solution A, ~~de (Invitex) 1~~) mezcladas en vórtex. Al tubo B se añade 1 ml de tampón de lisis de guanidina; a los tubos C y D, 1 ml de etanol al 70 %, y al tubo E, 200 µl de agua o de tampón Tris-EDTA 1×.

Se coloca la tira de tubos en el procesador KingFisher mL y se ejecuta el programa (véase la Figura 2). Transcurridos 20 min, la máquina hará una pausa para permitir una fase de calentamiento. La tira de tubos se transfiere a un horno durante 5 min a 65–70 °C; a continuación, se vuelve a introducir en el procesador KingFisher mL y se reanuda el programa. Otros modelos podrán tener incorporada la capacidad de realizar una etapa de calentamiento o pausa para la evaporación. Una vez terminado el proceso, los ácidos nucleicos eluidos se transfieren a un nuevo tubo de microcentrifugadora.

Este método se ha utilizado para una gran variedad de especies de plantas, así como para tubérculos de papa y semillas de tomate, y se ha utilizado con dos de los análisis mediante RT-PCR en tiempo real descritos en este anexo (véanse las secciones 3.3.3.4 y 3.3.4.2). Con el método 1 de extracción con partículas magnéticas se podrán esperar valores de ciclo umbral (Ct) de varios ciclos más que con los de otros métodos de extracción descritos en el presente anexo, pero es un método de extracción valioso debido a su mayor capacidad de procesamiento de muestras (Roehorst *et al.*, 2005).

Plate layout Default: Plate type = KingFisher tubestrip 1000 µl; Plate change message = Change Default
A: volume = 1000, name = Cell lysate or tissue homogenate; volume = 50, name = Magnetic particles;
B: volume = 1000, name = Washing buffer 1 (Various); **C:** volume = 1000, name = Washing buffer 2 (Various);
D: volume = 1000, name = Washing buffer 3 (Various); **E:** volume = 200, name = Elution buffer (Various)
STEPS COLLECT BEADS Step parameters: Name = Collect Beads; Well = A, Default; Beginning of step: Premix = No; Collect parameters: Collect count = 1. **BIND** Step parameters: Name = Lysing, Well = A, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 1min 0s, speed = Fast dual mix; Bind parameters: Bind time = 4min 0s, speed = Slow; End of step: Collect beads = No. **BIND** Step parameters: Name = Lysing, Well = A, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 1min 0s, speed = Fast dual mix Bind; Bind parameters: Bind time = 4min 0s, speed = Slow; End of step: Collect beads = No. **BIND** Step parameters: Name = Lysing, Well = A, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 1min 0s, speed = Fast dual mix; Bind parameters: Bind time = 4min 0s, speed = Slow; End of step: Collect beads = Yes, count = 4. **WASH** Step parameters: Name = Washing, Well = B, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 0s, speed = Fast; Wash parameters: Wash time = 3min 0s, speed = Fast dual mix; End of step: Collect beads = Yes, count = 3. **WASH** Step parameters: Name = Washing, Well = C, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 0s, speed = Fast; Wash parameters: Wash time = 3min 0s, speed = Fast dual mix; End of step: Collect beads = Yes, count = 3. **WASH** Step parameters: Name = Washing, Well = D, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 0s, speed = Fast; Wash parameters: Wash time = 3min 0s, speed = Fast dual mix; End of step: Collect beads = Yes, count = 3. **ELUTION** Step parameters: Name = Elution, Well = E, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 10s, speed = Fast; Elution parameters: Elution time = 20s, speed = Bottom very fast; Pause parameters: Pause for manual handling = Yes, message = Heating, Post mix time = 30s, speed = Bottom very fast; Remove beads: Remove beads = Yes, collect count = 4, disposal well = D

Figura 2. Programa (en inglés) del Procesador de partículas magnéticas KingFisher mL (Thermo Scientific)

Método 2 de extracción con partículas magnéticas. Para este [proceso-procedimiento](#) automatizado se utiliza el [equipo-kit](#) Sbeadex maxi plant (LGC Genomics) con el sistema KingFisher 96 (Thermo Scientific). Se deberían seguir las instrucciones del fabricante, pero se utiliza el tampón de lisis GH plus en lugar del tampón de lisis PN incluido en el [equipo kit](#).

3.3.3 Métodos moleculares genéricos para la detección de pospiviroides

3.3.3.1 R-PAGE

La R-PAGE se ha recomendado como método de detección del PSTVd en hojas infectadas de *S. tuberosum* (EPPO, 2004) pero se determinó que su sensibilidad (límite de detección de 87 893 pg del PSTVd) es menor que la de otros métodos (con límites de detección de al menos 17 pg del PSTVd) evaluados en una prueba interlaboratorios: la sonda de ARNc marcada con digoxigenina; la RT-PCR convencional en dos pasos con los cebadores de Shamloul *et al.* (1997) y el método en tiempo real de Boonham *et al.* (2004) (Jeffries y James, 2005; véase también el Cuadro 1).

Este método también se ha utilizado satisfactoriamente para otras plantas hospedantes, por ejemplo *C. annuum*, *S. tuberosum* (tubérculos) y *S. lycopersicum*. Dada [la-su](#) baja sensibilidad ~~del método~~, tendría que validarse el agrupamiento de las muestras.

La R-PAGE detectará todos los pospiviroides conocidos; por lo tanto, para la identificación del PSTVd se debe realizar la RT-PCR del ácido nucleico y luego secuenciar el producto de la PCR.

3.3.3.2 Hibridación con una sonda de ARNc marcada con digoxigenina

Este método se ha recomendado para la detección del PSTVd [que infecta a las en](#) hojas [infectadas](#) de *S. tuberosum* (EPPO, 2004). Se ha determinado una sensibilidad para la detección del PSTVd en hojas de *S. tuberosum* de al menos 17 pg del PSTVd (Jeffries y James, 2005). El método también se ha usado satisfactoriamente en otros hospedantes, como *Petunia* spp., *S. jasminoides*, *S. lycopersicum* y *S. tuberosum* (tubérculos).

La sonda ~~utilizada, empleada se~~ basada en un monómero completo del PSTVd elaborado por Agdia, Inc.⁹ (número de catálogo: DLP 08000/0001). [Dicha sonda](#) se debería utilizar siguiendo las instrucciones del fabricante o consultando los [pormenores-detalles](#) del método descrito por ~~la OEPP~~ (EPPO, (2004). Además del tampón de Ames (EPPO, 2004), para la extracción del ácido nucleico podrán utilizarse tampón de polietilenglicol (PEG) y otros tampones de extracción.

El método de la sonda de ARNc marcada con digoxigenina detectará todos los pospiviroides conocidos; por lo tanto, para la identificación del PSTVd se debe realizar la RT-PCR del ácido nucleico y luego secuenciar el producto de la PCR.

3.3.3.3 RT-PCR convencional con los cebadores de Verhoeven *et al.* (2004) ~~(2004)~~

En este análisis se utilizan los cebadores Posp1 y Vid de Verhoeven *et al.* (2004). Los cebadores Posp1 detectarán el CEVd, el viroide del enanismo del crisantemo (*Chrysanthemum stunt viroid*, CSVd), el IrVd-1, el MPVd, el PCFVd, el PSTVd, el TASVd, el TCDVd y el TPMVd. Los cebadores Vid detectarán el PSTVd, el TCDVd y, además, el CLVd. La utilización de los cebadores Posp1 y Vid en dos reacciones independientes permitirá detectar todos los pospiviroides. No obstante, un apareamiento erróneo en posiciones críticas del sitio diana del cebador podrá impedir la detección de algunas ~~cepas~~ ~~aisladas~~ ~~aislamientos~~ de pospiviroides (p.ej., con estos cebadores no se detectó una ~~aa~~ ~~cepa~~ ~~aislamientos~~ ~~forma~~ del CLVd; Steyer *et al.*, 2010) y se necesitarán ~~otros~~ cebadores ~~adicionales~~ para detectar ~~estas~~ ~~cepas~~ ~~aislamientos de pospiviroides~~. Se ha comprobado, en estudios *in silico* que las siguientes ~~cepas~~ ~~formas~~ del PSTVd podrán no ser detectadas debido a un apareamiento erróneo del cebador con su secuencia complementaria en posiciones críticas; con los cebadores Posp1: EU879925, EU273604, EF459697, AJ007489, AY372398, AY372394, FM998551, DQ308555 y E00278; con los cebadores Vid: EU273604². Los cebadores Posp1 son mucho más sensibles que los cebadores Vid para la detección del PSTVd.

Cebadores

Posp1-FW (directo): 5'-GGG ATC CCC GGG GAA AC-3' (nucleótidos (nt) 86–102)

Posp1-RE (inverso): 5'-AGC TTC AGT TGT (T/A)TC CAC CGG GT-3' (nt 283–261)

Vid-FW (directo): 5'-TTC CTC GGA ACT AAA CTC GTG-3' (nt 355–16)

Vid-RE (inverso): 5'-CCA ACT GCG GTT CCA AGG G-3' (nt 354–336)

Condiciones de la reacción

Se ha comprobado la fiabilidad del ~~equipo~~ ~~kit~~ One-Step RT-PCR (~~de~~ Qiagen) para la detección del PSTVd, el CEVd, el CLVd, el CSVd, el TASVd y el TCDVd en muestras individuales (EUPHRESCO, 2010) y otros pospiviroides enumerados al comienzo de esta sección. No es necesario utilizar la solución Q descrita en EUPHRESCO (2010). Aunque ~~se~~ podrán emplear ~~se~~ diversos ~~equipos~~ ~~kits~~ de RT-PCR y condiciones de reacción, ~~estos~~ deberían ser validados para comprobar que son idóneos para el ~~uso~~ ~~propósito~~ previsto y ~~se~~ detectan todos los pospiviroides pertinentes.

Se añaden dos microlitros del molde a 23 µl de mezcla maestra compuesta por 1,0 µl de cada cebador directo e inverso (10 µM), 5 µl del tampón One-Step RT-PCR 5×, 1,0 µl de la mezcla enzimática One-Step RT-PCR, 1,0 µl de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) (10 mM de cada uno) y 14 µl de agua. El programa de termociclado es: 30 min a 50 °C; 15 min a 95 °C; 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 60 s a 62 °C y 60 s a 72 °C; y una etapa de extensión final de 7 min a 72 °C.

Electroforesis en gel

Después de la RT-PCR, los productos de la PCR (de aproximadamente 197 pb y 359 pb para los cebadores Posp1 y Vid, respectivamente) se deberían analizar mediante electroforesis en gel (gel de agarosa al 2 %) y los amplicones de la PCR del tamaño correcto se deberían secuenciar para identificar la especie de viroide. En la práctica, la secuenciación del producto de 197 pb siempre ha resultado en la misma identificación que la secuenciación del genoma completo del viroide.

3.3.3.4 Análisis GenPosp1 basado en la RT-PCR en tiempo real (Botermans *et al.*, 2013)

En el análisis GenPosp1 se utiliza la RT-PCR en tiempo real con la sonda TaqMan para detectar todas las especies conocidas del género *Pospiviroid*. Consiste en la realización de dos reacciones en paralelo: la primera (mezcla de reacción 1) tiene como objetivo todos los pospiviroides excepto el CLVd (Botermans *et al.*, 2013); la segunda (mezcla de reacción 2) tiene como objetivo el CLVd específicamente (Monger *et al.*, 2010). Se incluye, a efectos del seguimiento de la extracción del ARN,

un cebador de control interno *nad5* basado en los cebadores desarrollados por Menzel *et al.* (2002) para amplificar el ARNm de mitocondrias vegetales (gen mitocondrial de la NADH deshidrogenasa). La validación del método (véase el Cuadro 1) en hojas de tomate mostró que el análisis GenPospi permitía detectar bar cepas aisladas de todas las especies de pospiviroides conocidas hasta una tasa de infección relativa del 0,13 % (equivalente a una dilución 1:770). El análisis era específico, dado que no se observó reactividad cruzada con otros viroides, e-con virus o ni con los ácidos nucleicos de las plantas hospedantes. En una comparación entre laboratorios se constató que la repetibilidad y la reproductibilidad eran del 100% y que el análisis era robusto. El análisis GenPospi ha demostrado ser un instrumento adecuado para el examen sistemático de especies de pospiviroides a gran escala. Deberá validarse para matrices distintas de las hojas de tomate.

Cebadores

TCR-F 1-1: 5'-TTC CTG TGG TTC ACA CCT GAC C-3' (Botermans *et al.*, 2013)

TCR-F 1-3: 5'-CCT GTG GTG CTC ACC TGA CC-3' (Botermans *et al.*, 2013)

TCR-F 1-4: 5'-CCT GTG GTG CAC TCC TGA CC-3' (Botermans *et al.*, 2013)

TCR-F PCFVd: 5'-TGG TGC CTC CCC CGA A-3' (Botermans *et al.*, 2013)

TCR-F IrVd: 5'-AAT GGT TGC ACC CCT GAC C-3' (Botermans *et al.*, 2013)

TR-R1: 5'-GGA AGG GTG AAA ACC CTG TTT-3' (Botermans *et al.*, 2013)

TR-R CEVd: 5'-AGG AAG GAG ACG AGC TCC TGT T-3' (Botermans *et al.*, 2013)

TR-R6: 5'-GAA AGG AAG GAT GAA AAT CCT GTT TC-3' (Botermans *et al.*, 2013)

CLVd-F: 5'-GGT TCA CAC CTG ACC CTG CAG-3' (Monger *et al.*, 2010)

CLVd-F2: 5'-AAA CTC GTG GTT CCT GTG GTT-3' (Monger *et al.*, 2010)

CLVd-R: 5'-CGC TCG GTC TGA GTT GCC-3' (Monger *et al.*, 2010)

nad5-F: 5'-GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3' (Menzel *et al.*, 2002)

nad5-R: 5'-CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3' (Menzel *et al.*, 2002)

Sondas

pUCCR: 6FAM-5'-CCG GGG AAA CCT GGA-3'-MGB (Botermans *et al.*, 2013)

CLVd-P: 6FAM-5'-AGC GGT CTC AGG AGC CCC GG-3'-BHQ1 (Monger *et al.*, 2010)

nad5-P: VICr-5'-AGG ATC CGC ATA GCC CTC GAT TTA TGT G-3'-BHQ1 (Botermans *et al.*, 2013)

Las dos mezclas de reacción están basadas en el equipo-kit TaqMan RNA to Ct 1-Step (Applied Biosystems).

Mezcla de reacción 1 (todos los pospiviroides excepto el CLVd + *nad5*)

La mezcla de reacción está compuesta por 12,5 µl de mezcla TaqMan RT-PCR 2×, 0,6 µl de mezcla enzimática TaqMan RT 1×, 0,75 µl (10 µM) de cebadores directos (TCR-F 1-1, TCR-F 1-3, TCR-F 1-4, TCR-F IrVd, TCR-F PCFVd y *nad5*-F) y cebadores inversos (TR-R1, TR-R CEVd, TR-R6 y *nad5*-R) (concentración final 0,3 µM de cada uno), 0,25 µl (10 µM) de la sonda TaqMan pUCCR (concentración final 0,1 µM) y 0,5 µl (10 µM) de la sonda TaqMan *nad5*-P (concentración final 0,2 µM). Se añade agua de grado molecular (MGW) y 2 µl de molde de ARN hasta completar un volumen final de 25 µl.

Mezcla de reacción 2 (CLVd + *nad5*)

La mezcla de reacción está compuesta por 12,5 µl de mezcla TaqMan RT-PCR 2×, 0,6 µl de mezcla enzimática TaqMan RT 1×, 0,75 µl (10 µM) de cebadores directos (CLVd-F, CLVd-F2 y *nad5*-F) y cebadores inversos (CLVd-R y *nad5*-R) (concentración final 0,3 µM de cada uno), 0,25 µl (10 µM) de la sonda TaqMan CLVd-P (concentración final 0,1 µM) y 0,5 µl (10 µM) de la sonda TaqMan *nad5*-P (concentración final 0,2 µM). Se añade agua de grado molecular (MGW) y 2 µl de molde de ARN hasta completar un volumen final de 25 µl.

Las condiciones de termociclado para ambas mezclas de reacción son 15 min a 48 °C, 10 min a 95 °C, seguidos de 40 ciclos de (15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C).

Para este método, Botermans *et al.* (2013) interpretaron los valores del l ciclo umbral -(Ct) <32 como positivos; los valores entre 32 y 37 como no concluyentes, que requieren confirmación, y los valores ≥ 37 como negativos. Sin embargo, estos umbrales-valores podrán excluir niveles bajos de infección en algunos tejidos y deberán definirse en cada laboratorio.

3.3.4 Métodos moleculares de mayor especificidad para la detección del PSTVd

3.3.4.1 RT-PCR convencional con los cebadores de Shamloul *et al.* (1997)

En este análisis se utilizan los cebadores de RT-PCR de Shamloul *et al.* (1997), también descritos por Weidemann y Buchta (1998). Estos cebadores detectarán el MPVd, el PSTVd, el TCDVd y el TPMVd. Se ha comprobado, en estudios *in silico*, que las siguientes cepas del PSTVd podrán no ser detectadas debido a un apareamiento erróneo del cebador con su secuencia complementaria en posiciones críticas: AY372394, DQ308555, EF459698 para el cebador inverso. Si el ARN no se amplifica con estos cebadores, se podrán utilizar los cebadores Vid.

Cebadores

3H1-F: 5'-ATC CCC GGG GAA ACC TGG AGC GAA C-3' (nt 89–113)

2H1-R: 5'-CCC TGA AGC GCT CCT CCG AG-3' (nt 88–69)

Método 1 (SuperScript One-Step RT-PCR con Platinum Taq (Invitrogen))

Para cada reacción se añade 1 µl de molde de ARN a 24 µl de mezcla maestra compuesta por 1,7 µl de cada cebador, directo e inverso (15 µM), 12,5 µl de tampón de reacción 2×, 0,5 µl de RT/Platinum Taq y 7,6 µl de agua. El programa de termociclado es el siguiente: 30 min a 43 °C, 2 min a 94 °C, a continuación 10 ciclos de 30 s a 94 °C, 90 s a 68 °C y 45 s a 72 °C, seguidos de 20 ciclos de 30 s a 94 °C, 90 s a 64 °C y 45 s a 72 °C, con una extensión final de 10 min a 72 °C y 1 min a 20 °C.

Método 2 (RT-PCR en dos pasos)

Si se emplea la RT-PCR en dos pasos, la sensibilidad para la detección del PSTVd en *S. tuberosum* es de al menos 17 pg del PSTVd, la menor concentración analizada, pero la sensibilidad conseguida varía entre laboratorios y la mayoría detectan al menos 89 pg del PSTVd (Jeffries y James, 2005). Véase la descripción del método 2 ~~de la OEPPen~~ (EPPO, (2004).

Después de la RT-PCR, los productos de la PCR (de aproximadamente 360 pb) se analizan mediante electroforesis en gel según el procedimiento descrito y los amplicones de la PCR del tamaño correcto se secuencian para identificar la especie de viroide.

Con este método se ha ~~realizado~~utilizado, a efectos un análisis de control interno, ~~un análisis~~ con cebadores *nad5* (Menzel *et al.*, 2002) en una reacción simple (independiente) (Seigner *et al.*, 2008). Los cebadores se ~~utilizaron~~utilizaron en una concentración final de 0,2 µM. El amplicón tiene 181 pb.

nad5 efector: 5'-GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT-3' (nt 968–987 y 1836–1838)

nad5 antisentido: 5'-CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA-3' (nt 1973–1995)

3.3.4.2 RT-PCR en tiempo real con los cebadores de Boonham *et al.* (2004) ~~(2004)~~

Los cebadores y la sonda empleados en este análisis son los descritos por Boonham *et al.* (2004). Sin embargo, ni en este análisis ni en ninguno de los análisis en tiempo real publicados se identificará específicamente el PSTVd. Si se obtiene un positivo con la RT-PCR en tiempo real, la identidad del viroide se deberá determinar mediante RT-PCR convencional y secuenciación.

En el análisis se detectará el PSTVd, el MPVd, el TCDVd y el TPMVd. Se ha determinado una sensibilidad para la detección del PSTVd en *S. tuberosum* con el método de extracción con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) de al menos 17 pg del PSTVd, la menor concentración analizada (Jeffries

y James, 2005). Analizando variantes del PSTVd y oligonucleótidos sintéticos se ha comprobado que con este análisis se detectan todas las variantes de secuencias conocidas. ~~En este análisis~~ Estos se ~~determinaron~~ ~~identificaron a partir de estudios in silico como las~~ posibles incoherencias entre las secuencias de viroides publicadas y las de los cebadores que podrían comprometer la detección (Boonham *et al.*, 2005). Sin embargo, ~~las los eepas aislamientos~~ divergentes VIR-06/7L y VIR-06/10L descritos recientemente por Owens *et al.* (2009) podrán no ser detectados debido a la inserción de una o varias bases adicionales en el sitio de unión de la sonda (W. Monger, comunicación personal, 2011)¹.

Cebadores

PSTV-231-F: 5'-GCC CCC TTT GCGCTG T-3' (nt 232–247)

PSTV-296-R: 5'-AAG CGG TTC TCG GGA GCT T-3' (nt 297–279)

PSTV-251T: FAM-5'-CAG TTG TTT CCA CCG GGT AGTAGC CGA-3' TAMRA (nt 278–252)

Los cebadores COX de control interno amplifican el gen *citocromo oxidasa 1* presente en las mitocondrias vegetales (Weller *et al.*, 2000).

COX-F: 5'-CGT CGC ATT CCA GAT TAT CCA-3'

COX-R: 5'-CAA CTA CGG ATA TAT AAG RRC CRR ACC TG-3'

COXsol-1511T: VIC-5'-AGG GCA TTC CAT CCA GCG TAA GCA-3' TAMRA

La mezcla de reacción es para una placa de 96 pocillos y es una modificación ~~de la descrita en~~ del método de la OEPP (EPPO, 2004) dado que incorpora una reacción doble para la detección del PSTVd y el COX, y una reacción simple para la detección del PSTVd (Roenhorst *et al.*, 2005).

La mezcla de reacción está compuesta por 13,75 µl de agua, 25 µl de 2× Master Mix (Applied Biosystems), 1,25 µl de 40× MultiScribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems), 1,5 µl de cada uno de los cebadores PSTV-231-F y PSTV-296-R (10 µM) y 1,0 µl de la sonda PSTV-251T (5 µM). Esta mezcla de reacción se divide en dos volúmenes iguales de 22 µl, A y B. A la parte A se añaden dos microlitros de agua y a la B se añaden 0,75 µl de cada cebador COX (10 µM) y 0,5 µl de la sonda COXsol-1511T (5 µM). Se añade a cada una de las partes, A y B, 1 µl de ARN diana hasta completar un volumen final de mezcla de reacción de 25 µl en cada pocillo de la placa de reacción. Con la mezcla de reacción A se detectará el PSTVd y con la mezcla de reacción B se detectarán el PSTVd y el COX en una reacción doble.

Las condiciones de termociclado son 30 min a 48 °C, 2 min a 95 °C y 40 ciclos de (15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C).

3.3.4.3 RT-PCR en tiempo real (~~equipo-kit~~ de Plant Print Diagnostics)

Los cebadores y la sonda empleados en este análisis son los descritos por Bertolini *et al.* (2010) y forman parte de un ~~equipo-kit~~ que comercializa Plant Print Diagnostics (Ref. PSTVd/100). El análisis detectará el CLVd, el PSTVd y el TCDVd. Se deberían detectar las 327 cepas aisladas del PSTVd presentes en GenBank, dado que los estudios *in silico* demostraron que todos los apareamientos erróneos del cebador con su secuencia complementaria se daban en posiciones que no eran críticas (N. Duran-Vila, comunicación personal, 2014).

En el Cuadro 1 se ofrecen los datos de validación.

Cebadores

PSTVd-F: 5'-CCT TGG AAC CGC AGT TGG T-3' (nt 339–357)

PSTVd-R: 5'-TTT CCC CGG GGA TCC C-3' (nt 87–102)

PSTVdP: FAM-5'-TCCTGTGGTTACACCTGACCTCCTGA-3' TAMRA (nt 19–45)

¹ A 1 de marzo de 2010 (W. Monger, comunicación personal, 2011).

La mezcla de la PCR contiene los cebadores y la sonda liofilizados (suministrados en el [equipo-kit](#)) a los cuales se puede añadir cualquier mezcla maestra comercial de RT-PCR. Para cada reacción se añaden 3 µl de molde de ARN a 9 µl de mezcla de PCR compuesta por 6 µl de tampón comercial 2× para RT-PCR, 0,6 µl de cada cebador, directo e inverso (10 µM), 0,36 µl de la sonda TaqMan (5 µM), 0,5 µl de mezcla enzimática 25× para RT-PCR y 0,94 µl de agua hasta completar un volumen de reacción final de 12 µl.

Las condiciones de termociclado son 10 min a 48 °C, 10 min a 95 °C y 40 ciclos de (15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C).

Con este método, una muestra se considera positiva cuando da como resultado un valor de Ct <40 y los controles negativos son negativos (no hay amplificación). Una muestra se considera negativa cuando da como resultado un valor de Ct ≥40 y en los controles positivos hay amplificación.

3.4 Controles para las pruebas moleculares

Para considerar [fidedigno-fiable](#) el resultado de las pruebas, en cada serie de aislamiento de ácidos nucleicos y de amplificación del ácido nucleico de la plaga objetivo o del ácido nucleico diana se deberían tener en cuenta los controles adecuados, que dependerán del tipo de prueba utilizada y del grado de certidumbre [necesario-requerido](#). Para la RT-PCR, deberían utilizarse, como mínimo, un control positivo de ácido nucleico, un control interno y un control negativo de amplificación (control sin molde).

Control positivo de ácido nucleico. Este control se utiliza para [determinar-monitorizar](#) la eficiencia de [la prueba-análisis](#) (además de la extracción). Se podrá utilizar ácido nucleico previamente preparado (almacenado) del viroide, el ADN genómico completo amplificado o un control sintético (p. ej., un producto de PCR clonado) generado utilizando el mismo par de cebadores que el empleado para la detección. También se podrá utilizar un control del límite de detección (aunque no es obligatorio).

Control interno. Debería incorporarse al protocolo de la RT-PCR convencional y en tiempo real un gen de mantenimiento vegetal, por ejemplo el COX o el NAD, a fin de descartar la posibilidad de falsos negativos debido a deficiencias en la extracción del ácido nucleico o a su degradación, o a la presencia de inhibidores de la PCR. Preferentemente, los cebadores de control interno se deberían utilizar en una reacción doble con los cebadores del pospiviroide ~~/o del~~ PSTVd. Sin embargo, como esto podrá ser difícil de conseguir sin que se reduzca la sensibilidad de [la prueba-análisis](#) para el viroide, se recomienda, cuando sea posible, realizar una reacción doble de los cebadores del pospiviroide o el PSTVd con los cebadores de mantenimiento vegetal y, además, una reacción simple solamente con los cebadores del pospiviroide ~~/o el~~ PSTVd.

Se ha demostrado que el fragmento del gen mitocondrial *nad5* de la *NADH deshidrogenasa 5* es un indicador fiable del rendimiento del procedimiento de extracción y de la etapa de la transcripción inversa (RT) en la RT-PCR convencional (Menzel *et al.*, 2002). Se ha probado en muchas especies de plantas, entre las que pueden citarse: *S. tuberosum* y otras especies de *Solanum* (*S. bonariensis*, *S. dulcamara*, *S. jasminoides*, *S. nigrum*, *S. pseudocapsicum*, *S. rantonnetii* y *S. sisymbirifolium*), *Acnistus arborescens*, *Atropa belladonna*, *Brugmansia* spp., *Capsicum* spp., *Cestrum* spp., *Lochroma cyanea*, *Nicotiana* spp. y *Physalis* spp. (Seigner *et al.*, 2008). Los cebadores *nad5* contienen un intrón y, por tanto, no amplificarán a partir de ADN. El ARN se amplifica una vez eliminado el intrón.

Aunque el COX se ha utilizado como control interno en este protocolo, los cebadores COX amplificarán el ARN y el ADN. Por lo tanto, solamente proporciona una indicación de la calidad del ADN amplificable, en lugar de únicamente del ARN, y no constituye un control de la etapa de la transcripción inversa [\(RT, por sus siglas en inglés\)](#).

Cuando en la descripción de un método de PCR no se mencione el [control interno](#) COX o el *nad5* el laboratorio debería elegir un control interno y validarlo.

Control negativo de amplificación (control sin molde). Este control es necesario para la RT-PCR convencional y en tiempo real a fin de descartar falsos positivos por contaminación durante la

preparación de la mezcla de reacción. El agua de calidad apta para PCR que se utilizó para preparar la mezcla de reacción se añade en la fase de amplificación.

Control positivo de extracción. Este control se utiliza para velar por que el ácido nucleico del viroide objetivo se haya extraído en una cantidad y con una calidad suficientes para realizar la RT-PCR y que el viroide objetivo sea detectable. El ácido nucleico del viroide se extrae de tejido infectado del hospedante o de tejido vegetal sano al que se ha añadido ~~una concentración~~ del viroide.

En el control positivo debe utilizarse aproximadamente una décima parte de la cantidad de tejido foliar utilizada por planta para la extracción de ARN. Si se agrupan las muestras, se deberá ajustar de manera acorde la cantidad de control positivo (p. ej., 10 lotes de muestras de 20 mg agrupadas para la extracción de ARN, 2 mg de hoja infectada + 198 mg de tejido de papa sano). Si no hay detección, debería repetirse ~~el análisis la prueba~~ o reducirse ~~el porcentaje la tasa~~ de agrupamiento hasta lograr una detección fiable.

Para la RT-PCR, deben adoptarse precauciones a fin de evitar la contaminación cruzada por aerosoles procedentes del control positivo o de las muestras positivas. El control positivo empleado en el laboratorio debería secuenciarse a fin de que esta secuencia se pueda comparar fácilmente con la secuencia obtenida de los amplicones de la PCR del tamaño correcto. Otra opción es elaborar controles positivos sintéticos que contengan una secuencia conocida que, de nuevo, se puede comparar con los amplicones de la PCR del tamaño correcto.

Control negativo de extracción. Este control se utiliza para ~~controlar~~ ~~monitorizar~~ la contaminación durante la extracción del ácido nucleico o la reacción cruzada con el tejido hospedante. El control comprende ácido nucleico extraído de tejido no infectado del hospedante y posteriormente amplificado. Cuando se analicen muchas muestras positivas se recomienda utilizar varios controles.

3.5 Interpretación de los resultados de la RT-PCR convencional y en tiempo real

3.5.1 RT-PCR convencional

La PCR específica del viroide solo se considerará válida si:

- el control positivo de ácido nucleico genera un producto del tamaño correcto para el viroide, y
- no se producen amplicones del tamaño correcto para el viroide en el control negativo de extracción ni en el control negativo de amplificación.

Si también se ~~recurrer~~ ~~usan~~ ~~a~~ cebadores COX o *nad5* de control interno, entonces el control negativo (tejido vegetal sano), si se utiliza, el control positivo de ácido nucleico y cada una de las muestras analizadas deben producir una banda de 181 pb (*nad5*). Si no se logra la amplificación de las muestras con los cebadores de control interno, la causa puede ser, por ejemplo, una deficiente extracción del ácido nucleico, que no se incluyó el ácido nucleico en la mezcla de la reacción, que ha fallado la etapa de la transcripción inversa ~~(RT)~~, que el extracto de ácido nucleico contiene compuestos inhibidores de la PCR o que el ácido nucleico se ha degradado.

~~Una Las~~ muestras se considerarán ~~a~~ positivas si produce ~~a~~ un amplicón del tamaño correcto. Para identificar la especie de viroide se debe secuenciar el producto de la PCR.

3.5.2 RT-PCR en tiempo real

La RT-PCR en tiempo real solo se considerará válida si:

- el control positivo de ácido nucleico produce una curva de amplificación con los cebadores específicos del viroide, y
- no se observa ninguna curva de amplificación (esto es, el valor de Ct es 40 u otro valor de Ct definido por el laboratorio después de haber sido validado) con el control negativo de extracción ni con el control negativo de amplificación.

Si también se ~~recurre-usan~~ a cebadores COX y *nad5* de control interno, entonces el control negativo, (si se utiliza), el control positivo de ácido nucleico y cada una de las muestras del análisis deben producir una curva de amplificación. Si las muestras no producen una curva de amplificación con los cebadores de control interno, la causa puede ser, por ejemplo, una deficiente extracción del ácido nucleico, que no se incluyó el ácido nucleico en la mezcla de la reacción, que el extracto de ácido nucleico contiene compuestos inhibidores de la PCR o que el ácido nucleico se ha degradado.

~~Las~~ Una muestras se considerará positivas si produce una curva de amplificación típica. En las secciones 3.3.3.4 y 3.3.4.3 se proporciona información específica sobre el ~~valor de ciclo umbral de Ct~~ para dos métodos.

4. Identificación

El PSTVd se debería identificar secuenciando el producto obtenido mediante los métodos de RT-PCR convencionales empleando los cebadores de Shamloul o Vid descritos en las secciones 3.3.4.1 y 3.3.3.3, respectivamente, y buscando una coincidencia de la secuencia en las bases de datos públicas de secuencias genéticas. Para la identificación se podrá necesitar la ayuda de especialistas en el análisis de secuencias. Si la amplificación del producto de la PCR es escasa o si la muestra está infectada por más de un pospiviroides, la clonación del producto de la PCR podrá permitir que se obtenga una secuencia.

En caso de que se necesite confirmar un resultado positivo obtenido en una muestra mediante la RT-PCR en tiempo real, la muestra se debería volver a analizar mediante RT-PCR convencional para poder secuenciar e identificar el producto obtenido. La secuenciación directa del producto de la PCR en tiempo real proporcionará una información sobre la secuencia que no permite una identificación fiable. Permitirá determinar que el producto de la PCR es un viroide, pero no permitirá identificar la especie ni diferenciarlo del control positivo empleado. Sin embargo, dada la mayor sensibilidad de la RT-PCR en tiempo real, es posible que con la RT-PCR convencional no se obtenga ningún producto. En el caso de las muestras agrupadas, la repetición del análisis con submuestras más pequeñas podría mejorar la fiabilidad de la amplificación mediante la RT-PCR convencional. Otra opción podrá ser inocular las muestras en plantas de tomate para ~~incrementar~~ aumentar que la concentración del viroide ~~aumente~~ hasta niveles que sean detectables mediante la RT-PCR convencional. No obstante, este enfoque no ha sido evaluado y si los resultados no son concluyentes podrá ser necesario repetir el muestreo y ~~el análisis~~ la prueba.

4.1 Secuenciación y análisis de las secuencias

El análisis de las secuencias solo debería realizarlo una persona con experiencia. Si no se dispone de instalaciones para realizar la secuenciación ~~de los productos de la PCR~~ internamente, ~~la labor se lo~~ debería ~~encargar~~ realizar en a una empresa comercial; ~~La empresa que~~ especificará sus ~~los~~ requisitos pertinentes para la secuenciación de los productos de la PCR. Se envían a la empresa, para la secuenciación, el producto purificado (y los cebadores directo e inverso, si se han solicitado). Algunas empresas también podrán purificar el producto si es necesario.

Si la secuenciación se realiza internamente, se deberían establecer los métodos y aplicarlos. Se debería ~~secuenciar~~ las ~~descada~~ cadenas del producto de la PCR, utilizando los cebadores de la PCR como cebadores de secuenciación. Las dos cadenas de ADN secuenciadas independientemente (utilizando los cebadores directo e inverso) se deberían ensamblar en un único cóntigo, confirmando la lectura (identidad) de nucleótidos en todas las posiciones. Es preferible utilizar ensambladores (p. ej., los programas informáticos software Geneious, CLC Genomics Workbench o Lasergene) que analizan la información de los electroferogramas (archivos de registro de secuencias). Las discrepancias entre las dos cadenas se deberían codificar como bases ambiguas en la secuencia corregida. La secuencia de consenso corregida (determinada comparando las dos cadenas) puede entonces compararse con las secuencias de pospiviroides que figuren en una base de datos pertinente. En el caso de una infección mixta, el cromatograma podrá no ser legible y se debería clonar y secuenciar el producto de la PCR.

En los pospiviroides se requiere una alineación cuidadosa, ya que puede haber diferencias de unos pocos nucleótidos que sean cruciales para identificar el viroide como una plaga reglamentada o no reglamentada. Para la identificación inicial del PSTVd, podrán mantenerse en la secuencia de consenso

las secuencias de los cebadores (~~de~~cebadores Shamloul o Vid), dado que esos cebadores están situados en las regiones más conservadas del genoma del viroide y no es probable que influyan en la identificación. Si se observan adeninas sobresalientes incorporadas por la polimerasa durante la elongación, deben ser eliminadas. Para la identificación, se aconseja utilizar una secuencia de consenso corregida que comience en la posición 1 del genoma del viroide para compararla con una de las bases de datos exhaustivas de nucleótidos. La búsqueda se debería realizar en la base de datos GenBank de registros de nucleótidos no redundantes del sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (NCBI) o en el Archivo Europeo de Nucleótidos (ENA) del sitio web del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL) utilizando el programa de alineación de secuencias BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Además, la identificación debería basarse en la agrupación específica en un árbol filogenético (método neighbour joining) de las coincidencias detectadas por el programa BLAST.

Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), el criterio principal para la identificación de una especie es una identidad de secuencias de más del 90 % (Owens *et al.*, 2011). Sin embargo, si la secuencia obtenida muestra una identidad cercana al 90 % deberían incluirse otros parámetros, como las propiedades biológicas. El Grupo para el estudio de los viroides del ICTV está debatiendo actualmente la clasificación de los viroides y los criterios para la delimitación de las especies.

Cuando se requiere una exactitud del 100 % en la secuencia, por ejemplo, cuando se va a registrar una secuencia en una base de datos o cuando se sospecha la existencia de una nueva especie de viroide, es necesario realizar una segunda PCR en la cual se incluirá la región de las secuencias del cebador utilizado en la primera PCR, así como las bases ambiguas de la primera PCR, ~~en su caso~~. A tal efecto, podrá ser necesario diseñar un nuevo conjunto de cebadores a partir de la secuencia inicial, aunque el uso de los pares de cebadores de Shamloul y Vid podrá ser suficiente.

5. Registros

Los registros y las ~~pruebas-evidencias~~ deberían conservarse según lo descrito en la NIMF 27 (*Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas*).

En las situaciones en que los resultados del diagnóstico puedan ~~repereutir-afectar a sobre~~ otras partes contratantes, en ~~concreto-particular~~ en casos de incumplimiento o en ~~zonas-áreas~~ donde se detecte el PSTVd por primera vez, se debería conservar también el siguiente material adicional de un modo que garantice su plena rastreabilidad:

- la muestra original (si aún está disponible) debería conservarse congelada a -80°C o liofilizarse y conservarse a temperatura ambiente;
- cuando proceda, las extracciones de ARN deberían conservarse a -80°C ;
- cuando proceda, los productos de la amplificación mediante RT-PCR deberían conservarse a entre -20°C y -80°C ;
- los archivos de registro de las secuencias de ADN utilizados a fin de generar la secuencia de consenso para la identificación de las muestras.

Si se comprueba que ~~la-el cepa aislamiento~~ estudiado~~oa~~ posee características moleculares o biológicas diferentes de las de ~~otroas cepasaislamientos~~ registrados anteriormente, se debería ofrecer a una colección o repositorio de plagas vegetales reconocido, (p. ej., el Q-bank (~~una~~ base de datos exhaustiva de plagas cuarentenarias y enfermedades de las plantas), o la DSMZ (colección alemana de microorganismos y cultivos celulares del ~~Instituto~~ Leibniz ~~Institute~~).

Si hay ~~indicios-evidencia~~ de que alguno de ~~lasos análisispruebas~~ descrita~~es~~ no detectan una ~~cepaaislamiento~~ del PSTVd, se deberían enviar ~~los detalles del aislamiento información sobre la cepa~~ (preferiblemente el número de acceso del GenBank) a la Secretaría de la CIPF.

6. Puntos de contacto para información adicional

Puede obtenerse información adicional sobre este protocolo en las siguientes fuentes:

Science and Advice for Scottish Agriculture (SASA), Roddinglaw Road, Edinburgh EH12 9FJ, Escocia (Reino Unido) (Dr. C.J. Jeffries, correo electrónico: colin.jeffries@sasa.gsi.gov.uk).

National Plant Protection Organization, PO Box 9102, 6700 HC Wageningen (Países Bajos) (Dr. J.W. Roenhorst, correo electrónico: j.w.roenhorst@nvwa.nl; Dr. J.Th.J. Verhoeven, correo electrónico: j.th.j.verhoeven@nvwa.nl).

Department of Environment and Primary Industries, Biosciences Research Division, AgriBio, 5 Ring Road, La Trobe University, Bundoora, Victoria 3083 (Australia) (Dr. B. Rodoni, correo electrónico: brendan.rodoni@depi.vic.gov.au).

Canadian Food Inspection Agency (CFIA), Charlottetown Laboratory, 93 Mt Edward Road, Charlottetown, PE, C1A 5T1 (Canadá) (Dr. H. Xu, correo electrónico: huimin.xu@inspection.gc.ca).

Conselleria de Agricultura de la Generalitat Valenciana, Centro de Protección Vegetal y Biotecnología (IVIA), 46113 Moncada, Valencia (España) (Dr. N. Duran-Vila, correo electrónico: duran_nur@gva.es).

USDA-APHIS, Plant Germplasm Quarantine Program BARC-E, BLD 580, Powder Mill Road, Beltsville, MD 20705 (Estados Unidos) (Dr. J.A. Abad, correo electrónico: jorge.a.abad@aphis.usda.gov).

Laboratorios Biológicos, Dirección General de Servicios Agrícolas, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Millán 4703, Montevideo (Uruguay) (Dr. A. Etchevers, correo electrónico: anitaetchevers@hotmail.com).

Podrán presentar solicitudes de revisión de los protocolos de diagnóstico las organizaciones nacionales de protección fitosanitaria (ONPF), las organizaciones regionales de protección fitosanitaria (ORPF) o los órganos auxiliares de la Comisión de Medidas Fitosanitarias (CMF), por conducto de la Secretaría de la CIPF (ippc@fao.org), que las remitirá al Grupo técnico sobre protocolos de diagnóstico (GTPD).

7. Agradecimientos

El primer proyecto de este protocolo fue redactado por C. J. Jeffries (SASA, Reino Unido), J. W. Roenhorst (organización nacional de protección fitosanitaria de los Países Bajos), B. Rodoni (Department of Environment and Primary Industries, Australia), H. Xu (CFIA, Canadá), N. Duran-Vila (IVIA, España), A. Etchevers (Laboratorios Biológicos, Uruguay) y J.A. Abad (Servicio de Inspección Zoosanitaria y Fitosanitaria (APHIS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), Estados Unidos) (véase la Sección 6 para más información). Asimismo, J.Th.J. Verhoeven (organización nacional de protección fitosanitaria de los Países Bajos) colaboró de forma destacada en la elaboración del presente protocolo.

Debe agradecerse a S.L. Nielsen (Dinamarca); L. Seigner, S. Winter y M. Wassenegger (Alemania); H. Koenraad (Países Bajos) y A. Fox, T. James, W. Monger y V. Mulholland (Reino Unido) las muy útiles observaciones formuladas durante la elaboración de este protocolo.

8. Referencias

En la presente norma se hace también referencia a otras normas internacionales para medidas fitosanitarias (NIMF). Las NIMF están disponibles en el Portal fitosanitario internacional (PFI): <https://www.ippc.int/es/core-activities/standards-setting/ispms>.

- Badilla, R., Hammond, R. y Rivera, C.** 1999. First report of Potato spindle tuber viroid in Costa Rica. *Plant Disease*, 83, pág. 1072.
- Bertolini, E., Cambra, M., Serra, P., López, M.M., Lopes, S., Durán-Vila, N., Ayres, J., Bové, J.** 2010. *Procedimiento directo de detección específica de los viroides* Potato spindle tuber viroid y Citrus exocortis viroid mediante dianas inmovilizadas y RT-PCR a tiempo real y kit para su detección. Patente española n.º 2.387.172.
- Bertolini, E., Felipe, R.T.A., Sauer, A.V., Lopes, S., Arilla, A., Vidal, E., Mourão-Filho, F.A.A., Nunes, W.M.C., Bové, J.M., López, M.M. y Cambra, M.** 2014a. Tissue-print and squash real-time polymerase chain reaction for direct detection of ‘*Candidatus Liberibacter*’ species in citrus plants and psyllid vectors. *Plant Pathology*, doi:10.1111/ppa.12197.
- Bertolini, E., Moreno, A., Capote, N., Olmos, A., De Luis, A., Vidal, E., Pérez-Panadés, J. y Cambra, M.** 2008. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 120, págs. 177-188.
- Bertolini, E., Teresani, G.R., Loiseau, M., Tanaka, F.A.O., Barbé, S., Martínez, C., Gentit, P., López, M.M. y Cambra, M.** 2014b. Transmission of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ in carrot seeds. *Plant Pathology*, doi:10.1111/ppa.12245.
- Boonham, N., Fisher, T. y Mumford, R.A.** 2005. Investigating the specificity of real-time PCR assays using synthetic oligonucleotides. *Journal of Virological Methods*, 130: págs. 30-35.
- Boonham, N., González, L., Lilia Peralta, E., Blockley, A., Walsh, K., Barker, I. y Mumford, R.A.** 2004. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd). *Journal of Virological Methods*, 116: págs. 139-146.
- Botermans, M., van de Vossen, B.T.L.H., Verhoeven, J.Th.J., Roenhorst, J.W., Hooftman, M., Dekter, R. y Meekes, E.T.M.** 2013. Development and validation of a real-time RT-PCR assay for generic detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 187, págs. 43-50.
- CABI.** Sin fecha Invasive species compendium. Datasheet for Potato spindle tuber viroid. Wallingford (Reino Unido), CABI. Disponible en <http://www.cabi.org/isc/datasheet/43659>, (consultado el 18 de agosto de 2014).
- De Bokx, J.A. y Pirone, P.G.** 1981. Transmission of Potato spindle tuber viroid by aphids. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 87, págs. 31-34.
- EPPO (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas, OEPP).** 2004. Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/33 Potato spindle tuber viroid. *EPPO Bulletin*.
- EPPO (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas, OEPP).** 2006. Phytosanitary procedures. PM 3/21 (2). Post-entry quarantine for potato. *EPPO Bulletin* 34, págs. 443-454.
- EPPO (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas, OEPP).** 2014. PM 7/98 (2) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *EPPO Bulletin* 44, págs. 117-147.
- EPPO/CABI (I.M. Smith, D.G. McNamara, P.R. Scott y M. Holderness, eds).** 1997. *Quarantine pests for Europe*, 2.ª edición. Wallingford (Reino Unido), CABI. 1425 págs.
- EUPHRESO.** 2010. *Detection and epidemiology of pospiviroids (DEP)* EUPHRESO Final Report. York (Reino Unido), EUPHRESO. Disponible en: <http://www.pestalert.org/oprDetail.cfm?oprID=536> (consultado el 15 de mayo de 2013).
- Fernow, K.H.** 1967. Tomato as a test plant for detecting mild strains of potato spindle tuber virus. *Phytopathology*, 57, págs. 1347-1352.
- Fernow, K.H., Peterson, L.C. y Plaisted, R.L.** 1970. Spindle tuber virus in seeds and pollen of infected plants. *American Potato Journal*, 47, págs. 75-80.

- Galindo, J., Smith, D.R. y Diener, T.O.** 1982. Etiology of planta macho, a viroid disease of tomato. *Phytopathology*, 72, págs. 49-54.
- Grasmick, M.E. y Slack, S.A.** 1985. Symptom expression enhanced and low concentrations of potato spindle tuber viroid amplified in tomato with high light intensity and temperature. *Plant Disease*, 69, págs. 49-51.
- Hadidi, A., Mazyad, H.M., Madkour, M.A. y Bar-Joseph, M.** 2003. Viroids in the Middle East. En *Viroids* (A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles y J. Semancik, eds.), págs. 275-278. Melbourne (Australia), CSIRO Publishing. 392 págs.
- Hailstones, D.L., Tesoriero, L.A., Terras, M.A. y Dephoff, C.** 2003. Detection and eradication of *Potato spindle tuber viroid* in tomatoes in commercial production in New South Wales, Australia. *Australasian Plant Pathology*, 32, págs. 317-318.
- Hammond, R.W. y Owens, R.A.** 2006. Viroids: New and continuing risks for horticultural and agricultural crops. APSnet. St Paul, MN (Estados Unidos), American Phytopathological Society (APS). Disponible en: <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Viroids.aspx> (consultado el 20 de diciembre de 2012).
- Jeffries, C.** 1998. *Technical guidelines for the safe movement of germplasm*. N.º 19. *Potato*. Roma (Italia), FAO/IPGRI. 177 págs.
- Jeffries, C. y James, C.** 2005. Development of an EU protocol for the detection and diagnosis of *Potato spindle tuber pospiviroid*. *EPPO Bulletin*, 35: págs. 125-132.
- Kryczynski, S., Paduch-cichal, E. y Skrzeczkowski, L.J.** 1988. Transmission of three viroids by seed and pollen of tomato plants. *Journal of Phytopathology*, 121, págs. 51-57.
- Lebas, B.S.M., Clover, G.R.G., Ochoa-Corona, F.M., Elliott, D.R., Tang, Z. y Alexander, B.J.R.** 2005. Distribution of *Potato spindle tuber viroid* in New Zealand glasshouse crops of capsicum and tomato. *Australasian Plant Pathology*, 34, págs. 129-133.
- Ling, K.S. y Bledsoe, M.E.** 2009. First report of Mexican papita viroid infecting greenhouse tomato in Canada. *Plant Disease*, 93, pág. 839.
- Mackenzie, D.J., McLean, M.A., Mukerji, S. y Green, M.** 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 81, págs. 222-226.
- Mackie, A.E., McKirdy, S.J., Rodoni, B. y Kumar, S.** 2002. Potato spindle tuber viroid eradicated in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, 31, págs. 311-312.
- Martinez-Soriano, J.P., Galindo-Alonso, J., Maroon, C.J.M., Yucel, I., Smith, D.R. y Diener, T.O.** 1996. Mexican papita viroid: Putative ancestor of crop viroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, págs. 9397-9401.
- Menzel, W., Jelkmann, W. y Maiss, E.** 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with co-amplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, 99, págs. 81-92.
- Mishra, M.D., Hammond, R.W., Owens, R.A., Smith, D.R. y Diener, T.O.** 1991. Indian bunchy top disease of tomato plants is caused by a distinct strain of citrus exocortis viroid. *Journal of General Virology*, 72, págs. 1781-1785.
- Monger, W., Tomlinson, J., Boonham, N., Virscek Marn, M., Mavric Plesko, I., Molinero-Demilly, V., Tassus, X., Meekes, E., Toonen, M. y Papayiannis, L.** 2010. Development and inter-laboratory evaluation of real-time PCR assays for the detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 169, págs. 207-210.
- Murcia, N., Serra, P., Olmos, A. y Duran-Vila, N.** 2009. A novel hybridization approach for detection of citrus viroids. En *Molecular and Cellular Probes*, 23, págs. 95-102.

- NAK** (Servicio holandés para la inspección de semillas y patatas de siembra). 2011. *Pospiviroid: Detection of pospiviroid in potato leaves by real-time RT-PCR*. Base de datos de conocimientos diagnósticos de la Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas (OEPP). París (Francia), OEPP. Disponible en: <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (consultado el 18 de agosto de 2014).
- Naktuinbouw**. 2012a. *Pospiviroid: Real-time RT-PCR (TaqMan RT-PCR) for pospiviroids in leaves of horticultural crops*. Base de datos de conocimientos diagnósticos de la Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas (OEPP). París (Francia), OEPP. Disponible en: <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (consultado el 18 de agosto de 2014).
- Naktuinbouw**. 2012b. *Potato spindle tuber viroid: Real-time RT-PCR (TaqMan RT-PCR) for Potato spindle tuber viroid (PSTVd) and/or Tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd) in leaf material of horticultural crops*. Base de datos de conocimientos diagnósticos de la Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas (OEPP). París (Francia), OEPP. Disponible en: <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (consultado el 18 de agosto de 2014).
- Naktuinbouw**. 2012c. *Potato spindle tuber viroid: Detection of Potato spindle tuber viroid (PSTVd) and/or Tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd) in tomato seed with real-time RT-PCR (TaqMan RT-PCR)*. Base de datos de conocimientos diagnósticos de la Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas (OEPP). París (Francia), OEPP. Disponible en: <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (consultado el 18 de agosto de 2014).
- Navarro B, Silletti M.R, Trisciuzzi, V.N. y Di Serio, F.** 2009. Characterization of Potato spindle tuber viroid infecting tomato in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 91, págs. 723-726.
- Nielsen, S.L., Enkegaard, A., Nicolaisen, M., Kryger, P., Marn, M.V., Pleško, I.M., Kahrer, A. y Gottsberger, R.A.** 2012. No transmission of Potato spindle tuber viroid shown in experiments with thrips (*Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*), honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus terrestris*). *European Journal of Plant Pathology*, 133: págs. 505-509.
- NPPO-NL** (Centro de Referencia Nacional, Organización Nacional de Protección Fitosanitaria de los Países Bajos). 2013a. *Pospiviroid: Validation of a conventional RT-PCR assay for detection and preliminary identification of pospiviroids (expect [sic] CLVd) by Posp1-FW/Posp1-RE*. Base de datos de conocimientos diagnósticos de la Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas (OEPP). París (Francia), OEPP. Disponible en: <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (consultado el 18 de agosto de 2014).
- NPPO-NL** (Centro de Referencia Nacional, Organización Nacional de Protección Fitosanitaria de los Países Bajos). 2013b. *Potato spindle tuber viroid: Validation of a conventional RT-PCR assay for detection and identification of CLVd, PSTVd and TCDVd using primers Vid-FW/RE (Verhoeven et al. 2004)*. Base de datos de conocimientos diagnósticos de la Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas (OEPP). París (Francia), OEPP. Disponible en: <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (consultado el 18 de agosto de 2014).
- NPPO-NL** (Centro de Referencia Nacional, Organización Nacional de Protección Fitosanitaria de los Países Bajos). 2013c. *Potato spindle tuber viroid: Validation of a conventional RT-PCR test for detection and identification of PSTVd, TCDVd, MPVd and TPMVd using primers 2H1/3H1 described by Shamoul et al. (1997)*. Base de datos de conocimientos diagnósticos de la Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas (OEPP). París (Francia), OEPP. Disponible en: <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (consultado el 18 de agosto de 2014).

- NPPO-NL** (Centro de Referencia Nacional, Organización Nacional de Protección Fitosanitaria de los Países Bajos). 2013d. *Pospiviroid: Development and validation of a real-time RT-PCR assay for generic detection of Pospiviroids*. Base de datos de conocimientos diagnósticos de la Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas (OEPP). París (Francia), OEPP. Disponible en: <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (consultado el 18 de agosto de 2014).
- Owens, R.A., Flores, R., Di Serio, F., Li, S.-F., Pallas, V., Randles, J.W., Sano, T. y Vidalakis, G.** 2011. Viroids. En *Virus Taxonomy* (A.M.Q. King, M.J. Adams, E.B. Carstens y E.J. Lefkowitz, eds.). Noveno informe del International Committee on Taxonomy of Viruses, págs. 1221-1234. Londres (Reino Unido), Elsevier Academic Press. 1259 págs.
- Owens, R.A., Girsova, N.V., Kromina, K.A., Lee, I.M., Mozhaeva, K.A. y Kastalyeva, T.B.** 2009. Russian isolates of *Potato spindle tuber viroid* exhibit low sequence diversity. *Plant Disease*, 93, págs. 752-759.
- Querci, M., Owens, R.A., Bartolini, I., Lazarte, V. y Salazar, L.F.** 1997. Evidence for heterologous encapsidation of potato spindle tuber viroid in particles of potato leafroll virus. *Journal of General Virology*, 78, págs. 1207-1211.
- Reanwarakorn, K., Klinkong, S. y Porsoongnurn, J.** 2011. First report of natural infection of *Pepper chat fruit viroid* in tomato plants in Thailand. *New Disease Reports*, 24: pág. 6.
- Roehorst, J.W., Jansen, C.C.C., Kox, L.F.F., De Haan, E.G. y Van den Bovenkamp, G.W.** 2006. Real-time RT-PCR voor grootschalige toetsing van aardappel op het aardappelspindelknolviroïde. *Gewasbescherming*, 37, págs. 198-203 (en neerlandés).
- Roehorst, J.W., Jansen, C.C.C., Kox, L.F.F., de Haan, E.G., van den Bovenkamp, G.W., Boonham, N., Fisher, T. y Mumford, R.A.** 2005. Application of real-time RT-PCR for large-scale testing of potato for Potato spindle tuber pospiviroid. *EPPO Bulletin* 35, págs. 133-140.
- Salazar, L.F., Querci, M., Bartolini, I. y Lazarte, V.** 1995. Aphid transmission of potato spindle tuber viroid assisted by potato leafroll virus. *Fitopatologia*, 30, págs. 56-58.
- Seigner, L., Kappen, M., Huber, C., Kistler, M. y Köhler, D.** 2008. First trials for transmission of Potato spindle tuber viroid from ornamental Solanaceae to tomato using RT-PCR and an mRNA based internal positive control for detection. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 115, págs. 97-101.
- Shamloul, A.M., Hadidi, A., Zhu, S.F., Singh, R.P. y Sagredo, B.** 1997. Sensitive detection of potato spindle tuber viroid using RT-PCR and identification of a viroid variant naturally infecting pepino plants. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19, págs. 89-96.
- Singh, R.P.** 1970. Seed transmission of potato spindle tuber virus in tomato and potato. *American Potato Journal*, 47, págs. 225-227.
- Singh, R.P.** 1973. Experimental host range of the potato spindle tuber virus. *American Potato Journal*, 50, págs. 111-123.
- Singh, R.P., Boucher, A. y Somerville, T.H.** 1992. Detection of potato spindle tuber viroid in the pollen and various parts of potato plant pollinated with viroid-infected pollen. *Plant Disease*, 76, págs. 951-953.
- Singh, R.P., Dilworth, A.D., Singh, M. y Babcock, K.M.** 2006. An alkaline solution simplifies nucleic acid preparation for RT-PCR and infectivity assays of viroids from crude sap and spotted membrane. *Journal of Virological Methods*, 132, págs. 204-211.
- Singh, R.P. y Kurz, J.** 1997. RT-PCR analysis of PSTVd aphid transmission in association with PLRV. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19, págs. 418-424.
- Singh, R.P., Nie, X. y Singh, M.** 1999. Tomato chlorotic dwarf viroid: An evolutionary link in the origin of pospiviroids. *Journal of General Virology*, 80, págs. 2823-2828.
- Singh, R.P., Ready, K.F.M. y Nie, X.** 2003. Viroids on solanaceous species. En A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles & J. Semancik, eds. *Viroids*, págs. 125-133. Melbourne (Australia), CSIRO Publishing. 392 págs.

- Spieker, R.L.** 1996. A viroid from *Brunfelsia undulata* closely related to the *Columnnea* latent viroid. *Archives of Virology*, 141, págs. 1823-1832.
- Steyer, S., Olivier, T., Skelton, A., Nixon, T. y Hobden, E.** 2010. *Columnnea* latent viroid (CLVd): First report in tomato in France. *Plant Pathology*, 59, pág. 794.
- van Brunshot, S.L., Verhoeven, J.Th.J., Persley, D.M., Geering, A.D.W., Drenth, A. y Thomas, J.E.** 2014. An outbreak of Potato spindle tuber viroid in tomato is linked to imported seed. *European Journal of Plant Pathology*, doi:10.1007/s10658-014-0379-8.
- Verhoeven, J.Th.J.** 2010. *Identification and epidemiology of pospiviroids*. Universidad de Wageningen, Wageningen (Países Bajos). (Tesis). Disponible en: <http://edepot.wur.nl/137571> (consultada el 20 de diciembre de 2012).
- Verhoeven, J.Th.J., Hüner, L., Virscek Marn, M., Mavric Plesko, I. y Roenhorst, J.W.** 2010. Mechanical transmission of Potato spindle tuber viroid between plants of *Brugmansia suaveolens*, *Solanum jasminoides*, potatoes and tomatoes. *European Journal of Plant Pathology*, 128, págs. 417-421.
- Verhoeven, J.Th.J., Jansen, C.C.C., Willemsen, T.M., Kox, L.F.F., Owens, R.A. y Roenhorst, J.W.** 2004. Natural infections of tomato by *Citrus exocortis* viroid, *Columnnea* latent viroid, *Potato spindle tuber viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid*. *European Journal of Plant Pathology*, 110, págs. 823-831.
- Walter, B.** 1987. Tomato apical stunt. En *The viroids* (T.O. Diener, ed.), págs. 321–328. Nueva York (Estados Unidos), Plenum Press. 365 págs.
- Wassenegger, M., Heimes, S. y Sängler, H. L.** 1994. An infectious viroid RNA replicon evolved from an *in vitro*-generated non-infectious viroid deletion mutant via a complementary deletion in vivo. *EMBO Journal*, 13, págs. 6172-6177.
- Weidemann, H.L. y Buchta, U.** 1998. A simple and rapid method for the detection of potato spindle tuber viroid (PSTVd) by RT-PCR. *Potato Research*, 41, págs. 1-8.
- Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N.C., Boonham, N., y Stead, D.E.** 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, págs. 2853-2858.

Cuadro 1. [Sinopsis](#) [Descripción general](#) y datos de validación [correspondientes a los](#) [de los](#) protocolos utilizados para la detección del viroide del tubérculo fusiforme de la papa (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd) en distintos tipos de material hospedante.

Matriz	Tamaño de la muestra	Preparación de las muestras	Extracción del ácido nucleico	Método de detección	Observaciones sobre la validación
Hojas de tomate	1 g	3,5 ml (1:2–1:5 p/v) de tampón de lisis GH plus con homogeneizador Homex 6 (Bioreba)	RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) o Sbeadex maxi plant kit (LGC Genomics) con el sistema KingFisher 96 (Thermo Scientific)	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) en tiempo real (RT-PCR): análisis GenPospi, Botermans <i>et al.</i> (2013)	Límite de detección: detección de todas las especies de pospiviroides hasta una tasa de infección relativa ¹ del 0,13 % (equivalente a una dilución de 1:770) con una certeza del 99,7 % para la dilución de hojas de tomate infectadas en tomate sano. Especificidad analítica: muy específico para las especies de pospiviroides. Selectividad: sin influencia de las hojas de tomate Repetibilidad y reproductibilidad: 100 % (Naktuinbouw, 2012a; Botermans <i>et al.</i> , 2013; NPPO-NL, 2013d)
Hojas de tomate	1 g	3,5 ml (1:2–1:5 p/v) de tampón de lisis GH plus con homogeneizador Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	RT-PCR en tiempo real: Boonham <i>et al.</i> (2004)	Límite de detección: detección de una dilución de hojas de tomate infectadas en tomate sano de hasta 1:10 000. Especificidad analítica: detección del viroide de la papita mexicana (<i>Mexican papita viroid</i> , MPVd), el viroide del tubérculo fusiforme de la papa (<i>Potato spindle tuber viroid</i> , PSTVd), el viroide del enanismo clorótico del tomate (<i>Tomato chlorotic dwarf viroid</i> , TCDVd) y el viroide de la planta macho del tomate (<i>Tomato planta macho viroid</i> , TPMVd) (algunas cepas). Selectividad: sin influencia de las hojas de tomate. Repetibilidad y reproductibilidad: 100 % (Naktuinbouw, 2012b)
Hojas de tomate	1 g	3,5 ml (1:2–1:5 p/v) de tampón de lisis GH plus con homogeneizador Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	RT-PCR: cebadores Pospi1-FW y Pospi1-RE de Verhoeven <i>et al.</i> (2004)	Límite de detección: detección de todas las especies de pospiviroides (excepto el viroide latente de <i>Columnea</i> (<i>Columnea latent viroid</i> , CLVd)) hasta al menos una tasa de infección relativa del 2,5 % para la dilución de hojas de tomate infectadas en tomate sano. Especificidad analítica: detección del viroide latente del lúpulo (<i>Hop latent viroid</i> , HpLVd, género <i>Cocadviroid</i>) y el PSTVd. Selectividad: sin influencia de las hojas de tomate Repetibilidad y reproductibilidad: 100 % (NPPO-NL, 2013a)
Hojas de tomate	1 g	3,5 ml (1:2–1:5 p/v) de tampón de lisis GH plus con homogeneizador Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	RT-PCR: cebadores Vid-FW y Vid-RE de Verhoeven <i>et al.</i> (2004)	Límite de detección: detección del CLVd, el PSTVd y el TCDVd hasta al menos una tasa de infección relativa del 100 % (el 10 % para el CLVd*) para la dilución de hojas de tomate infectadas en tomate sano. * Cebadores diseñados originalmente para detectar el CLVd complementario a los cebadores Pospi1-FW y Pospi1-RE para la RT-PCR (Verhoeven <i>et al.</i> , 2004) Especificidad analítica: detección del CLVd, el PSTVd y el TCDVd. Selectividad: sin influencia de las hojas de tomate Repetibilidad y reproductibilidad: 100 % (NPPO-NL, 2013b)

Matriz	Tamaño de la muestra	Preparación de las muestras	Extracción del ácido nucleico	Método de detección	Observaciones sobre la validación
Hojas de tomate	1 g	3,5 ml (1:2–1:5 p/v) de tampón de lisis GH plus con homogeneizador Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	RT-PCR: Shamloul <i>et al.</i> (1997)	Límite de detección: detección hasta una tasa de infección relativa de al menos el 10 % para la dilución de hojas de tomate infectadas en tomate sano. Especificidad analítica: detección del MPVd, el PSTVd, el TCDVd y el TPMVd (algunas cepas). Selectividad: sin influencia de las hojas de tomate Repetibilidad y reproductibilidad: 100 % (NPPO-NL, 2013c)
Semillas de tomate	3 000 semillas (analizadas en tres submuestras de 1 000)	20 ml (1:2–1:5 p/v) de tampón de lisis GH plus con homogeneizador BagMixer (Interscience)	Sbeadex maxi plant kit con el sistema KingFisher 96	RT-PCR en tiempo real: Boonham <i>et al.</i> (2004)	Mismos parámetros de desempeño que para las hojas de tomate. La probabilidad de detección de una semilla infectada en una muestra de 1 000 semillas es > 95% cuando se analizan tres submuestras de 1 000 semillas cada una. Debido a la rápida contaminación cruzada del PSTVd de frutas infectadas a semillas sanas durante el procesamiento de las semillas (usando tratamiento con pectinasa y fermentación) hay una probabilidad alta de que haya más semillas infectadas-contaminadas en una muestra (Naktuinbouw, 2012c).
Hojas de papa (cultivadas en semillero) y plantas de papa <i>in vitro</i>	200 mg	20 µL de dodecil sulfato sódico al 10 %, 180 µl de tampón de extracción LiCl, 400 µl de fenol-cloroformo con un mortero	Extracción con fenol-cloroformo y extracción con polietilenglicol (PEG) en dos etapas	Electroforesis bidireccional en gel de poliacrilamida (R-PAGE) ²	Límite de detección: 2 465 pg del PSTVd; este fue el menos sensible de los métodos moleculares estudiados en una prueba interlaboratorios internacional. Especificidad analítica: detección de todos los pospiviroides conocidos. Selectividad: sin influencia de la variedad de papa, ni del uso de hojas de papa o de plantas <i>in vitro</i> . Repetibilidad y reproductibilidad: reproducibilidad del 51 % para 87 893 pg del PSTVd (la concentración más alta del PSTVd analizada) y del 42 % en el límite de detección.
Hojas de papa (cultivadas en sala de crecimiento semillero) y plantas de papa <i>in vitro</i>	200 mg	1:1,5 p/v en tampón de Ames (EPPO, 2004) con un mortero	Inmovilización en membrana (Agdia, Inc.), extracción con fenol cloroformo y PEG en dos etapas	Sonda marcada con digoxigenina ²	Límite de detección: al menos 17 pg del PSTVd (la menor concentración analizada). Especificidad analítica: detección de todos los pospiviroides conocidos. Selectividad: sin influencia de la variedad de papa, ni del uso de hojas de papa o de plantas <i>in vitro</i> . Repetibilidad y reproductibilidad: reproducibilidad del 100 % para 87 893 pg del PSTVd y del 23 % para 17 pg del PSTVd.
Hojas de papa (cultivadas en semillero) y plantas de papa <i>in vitro</i>	50 mg–500 mg	1:9 p/v tampón RH (Qiagen) con tubo de microcentrifugadora y micropistilo u homogeneizador Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	RT-PCR convencional en dos pasos ² con los cebadores de Shamloul <i>et al.</i> (1997)	Límite de detección: al menos 17 pg del PSTVd. Especificidad analítica: detección del MPVd, el PSTVd, el TCDVd y el TPMVd. Selectividad: sin influencia de la variedad de papa, ni del uso de hojas de papa o de plantas <i>in vitro</i> . Repetibilidad y reproductibilidad: reproducibilidad del 78 % para 87 893 pg del PSTVd (la concentración más alta del PSTVd analizada) y del 44 % para 17 pg del PSTVd.

Matriz	Tamaño de la muestra	Preparación de las muestras	Extracción del ácido nucleico	Método de detección	Observaciones sobre la validación
Hojas de papa (cultivadas en semillero) y plantas de papa <i>in vitro</i>	1 g	3,5 ml (1:2–1:5 p/v) de tampón de lisis GH plus con homogeneizador Homex 6	Sbeadex maxi plant kit con el sistema KingFisher 96	RT-PCR en tiempo real: análisis GenPospi, Botermans <i>et al.</i> (2013)	Mismos parámetros de desempeño que para las hojas de tomate. Especificidad analítica: sin reacción cruzada con los virus comúnmente presentes en la papa. Selectividad: sin influencia de las hojas de papa ni las plantas <i>in vitro</i> . Validado para porcentajes-tasas de agrupamiento de hasta 100 (100 % de detección en muestras compuestas por 1 hoja infectada y 99 sanas; NAK, 2011).
Hojas de papa (cultivadas en sala de crecimiento semillero) y plantas y tubérculos de papa <i>in vitro</i>	1,5 g de hojas o 5 g de tubérculos	Aproximadamente 600 µl de tampón para las hojas o aproximadamente 3 ml de tampón para los tubérculos (la elección del tampón depende el método de extracción utilizado)	RNeasy Plant Mini Kit, extracción con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) o con el equipo kit de aislamiento de ARN Purescript (Gentra Systems; téngase en cuenta que este equipo kit ya no se encuentra disponible comercializa)	RT-PCR en tiempo real: Boonham <i>et al.</i> (2004)	Límite de detección: detección de una dilución de hasta 1:10 000 de tejido infectado en tejido sano. Especificidad analítica: detección del MPVd, el PSTVd, el TCDVd, el TPMVd (algunas cepas); sin reacción cruzada con los virus comúnmente presentes en la papa. Selectividad: sin influencia del uso de hojas de papa o de plantas y tubérculos <i>in vitro</i> . Repetibilidad y reproductibilidad: 100 % (prueba interlaboratorios en cuatro laboratorios). Validado para porcentajes-tasas de agrupamiento de hasta 100 (100 % de detección en muestras compuestas por 1 hoja infectada y 99 sanas; Roenhorst <i>et al.</i> , 2005, 2006).
Especies de plantas ornamentales (hojas)	1 g	3,5 ml (1:2–1:5 p/v) de tampón de lisis GH plus con homogeneizador Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit o Sbeadex maxi plant kit con el sistema KingFisher 96	RT-PCR en tiempo real: análisis GenPospi, Botermans <i>et al.</i> (2013)	Mismos parámetros de desempeño que para las hojas de tomate. Sensibilidad analítica: la concentración de pospiviroides y la selectividad (elementos-componentes inhibidores) en la savia de las hojas depende de la especie de planta. Validado para porcentajes-tasas de agrupamiento de hasta 25 para <i>Brugmansia</i> , <i>Calibrachoa</i> , <i>Cestrum</i> , <i>Dahlia</i> , <i>Nematanthus</i> , <i>Petunia</i> , <i>Solanum jasminoides</i> y <i>Streptosolen jamesonii</i> . Téngase en cuenta que para <i>Calibrachoa</i> , <i>S. jasminoides</i> y <i>S. jamesonii</i> se han observado efectos de la matriz en diluciones de más de 100. En algunos cultivos, como <i>Dahlia</i> , parece que solo el período de verano es adecuado para la realización de análisis (fiabes) (Naktuinbouw, 2012a).
Especies de plantas ornamentales (hojas)	1 g	3,5 ml (1:2–1:5 p/v) de tampón de lisis GH plus con homogeneizador Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit o Sbeadex maxi plant kit con el sistema KingFisher 96	RT-PCR en tiempo real: Boonham <i>et al.</i> (2004)	Mismos parámetros de desempeño que para las hojas de tomate. Sensibilidad analítica: la concentración de pospiviroides y la selectividad (elementos-componentes inhibidores) en la savia de las hojas depende de la especie de planta. Validado para porcentajes-tasas de agrupamiento de hasta 25 para <i>Brugmansia</i> , <i>Calibrachoa</i> , <i>Dahlia</i> , <i>Petunia</i> , <i>S. jasminoides</i> y <i>S. jamesonii</i> . Téngase en cuenta que para <i>Calibrachoa</i> , <i>S. jasminoides</i> y <i>S. jamesonii</i> se han observado efectos de la matriz en diluciones de más de 100. En algunos cultivos, como <i>Dahlia</i> , parece que solo el período de verano es adecuado para la realización de análisis (fiabes) (Naktuinbouw, 2012b).

Matriz	Tamaño de la muestra	Preparación de las muestras	Extracción del ácido nucleico	Método de detección	Observaciones sobre la validación
Hojas de tomate; hojas, tubérculos y semillas de papa, y especies de plantas ornamentales (hojas)	1 g de hojas, de tubérculos de papa o de impresiones de hoja sobre membranas de nailon	10 ml (1:10 p/v) de solución salina con tampón fosfato (PBS) con homogeneizador Homex 6	Métodos directos (impresión de tejidos), RNeasy Plant Mini Kit o PowerPlant RNA Isolation Kit (Mo Bio)	RT-PCR en tiempo real: Bertolini <i>et al.</i> (2010)	<p>Límite de detección: detección de una dilución de hasta 1:10 000 de hojas de <i>S. jasminoides</i> infectadas en hojas de <i>S. jasminoides</i> y tomate sanas.</p> <p>Especificidad analítica: detección del CLVd, el PSTVd y el TCDVd.</p> <p>Selectividad: sin influencia del uso de las hojas o tubérculos de papa o de semillas de tomate.</p> <p>Repetibilidad y reproductibilidad: 100 % (prueba interlaboratorios en tres laboratorios).</p> <p>La sensibilidad diagnóstica fue del 100 %, la especificidad diagnóstica del 100 % y la exactitud relativa comparada con un método de hibridación molecular (Murcia <i>et al.</i>, 2009) fue del 100 %. La validación de la prueba se realizó con 208 muestras de campo de <i>S. jasminoides</i>, <i>Brugmansia</i> spp., <i>Datura</i> spp., <i>Petunia</i> spp., <i>Dendrathera</i> spp., papa y tomate. De las 208 muestras, 43 fueron verdaderos positivos y 150 verdaderos negativos con ambas técnicas. Quince muestras dieron falsos positivos mediante hibridación, detectándose el viroide del enanismo apical del tomate (<i>Tomato apical stunt viroid</i>, TASVd) y el viroide de la exocortis de los cítricos (<i>Citrus exocortis viroid</i>, CEVd). Ninguna muestra dio un falso negativo.</p>

¹ Debido a que se desconoce la concentración del viroide en el material original analizado, en algunos de los análisis el límite de detección (sensibilidad) se expresa como valor relativo. La savia de hoja infectada sin diluir se considera infectada al 100 % (en una proporción de 1 g de material foliar en 3 ml de tampón). El límite de detección relativo se determinó analizando ocho diluciones sucesivas de savia de hoja infectada en savia de hoja sana. El límite de detección relativo se define como [el promedio la media](#) de la tasa de infección relativa más baja que aún podía detectarse de cada [cepa aislamiento](#) (ciclo umbral (Ct) <32), y se añadieron tres desviaciones típicas para proporcionar un valor conservador, con una certeza del 99,7 % (Botermans *et al.*, 2013).

² Los tres métodos —R-PAGE, sonda marcada con digoxigenina y RT-PCR convencional en dos pasos con los cebadores de Shamloul *et al.* (1997)— fueron comparados en una prueba interlaboratorios internacional (Jeffries y James, 2005).

Historia de la publicación

Esta no es una parte oficial de la norma

2007-03: En la segunda reunión de la CMF se añadió el tema al programa de trabajo (2006-002).

2012-11: El GTPD revisó el proyecto de protocolo.

2013-03: El CN aprobó, mediante decisión por medios electrónicos, presentar el texto para consulta a los miembros (2013_eSC_May_10).

2013-07: Consulta a los miembros.

2014-07: El GTPD examinó el proyecto de protocolo.

2014-09: Aprobado por el GTPD por vía electrónica y remitido al CN para que apruebe su adopción (2014_eTPDP_September_01).

2014-11: El CN aprobó, mediante decisión por medios electrónicos, el período de notificación del PD (2014_eSC_Nov_13).

2014-12: Período de notificación

2015-01: El CN ~~aprobó~~ adoptó el PD en nombre de la CMF (no se recibieron objeciones formales).

NIMF 27. Anexo 7, Viroide del tubérculo fusiforme de la papa (*patata*) (2016). Roma, CIPF, FAO.

2015-07: La Secretaría de la CIPF incorporó enmiendas editoriales y modificó el formato de las normas de acuerdo con el procedimiento de revocación de normas aprobado en la CMF-10 (2015).

2016-05: El CN aprobó la revisión técnica de este PD en relación con la secuencia del cebador COX-F de control interno, de conformidad con la referencia bibliográfica ofrecida (Weller *et al.*, 2000) (sección 3.3.4.2, “RT-PCR en tiempo real con los cebadores de Boonham *et al.* [2004]”) (2016_eSC_May_15). El GTPD señaló que ambas secuencias (la de la versión anterior del PD y la actual secuencia conforme a Weller *et al.*, 2000) funcionaban.

Última modificación de la historia de la publicación: 2016-05.

Este protocolo de diagnóstico fue adoptado por el Comité de Normas, en nombre de la Comisión de Medidas Fitosanitarias, en agosto de 2015.

Este anexo es una parte prescriptiva de la NIMF 27

NIMF 27

Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas

PD 8: *Ditylenchus dipsaci* y *Ditylenchus destructor*

Adoptado en 2015; publicado en 2016

Índice

1.	Información sobre la plaga	3
1.1	<i>Ditylenchus dipsaci</i>	3
1.2	<i>Ditylenchus destructor</i>	4
2.	Información taxonómica	4
3.	Detección	5
3.1	Hospedantes y síntomas	5
3.1.1	<i>Ditylenchus dipsaci</i>	5
3.1.2	<i>Ditylenchus destructor</i>	9
3.2	Extracción de los nematodos	10
3.2.1	Extracción de los bulbos y del ajo	10
3.2.2	Extracción de muestras de tierra y de materiales vegetales	10
4.	Identificación	12
4.1	Identificación morfológica	12
4.1.1	Preparación de los especímenes	12
4.1.2	Caracteres morfológicos de diagnóstico	12
4.2	Identificación molecular	16
4.2.1	<i>Ditylenchus dipsaci</i>	16
4.2.2	<i>Ditylenchus destructor</i>	17
4.2.3	Extracción de ADN	17
4.2.4	Análisis mediante RCP-PLFR de la región ITS del ADNr para la identificación de <i>D. dipsaci</i> y <i>D. destructor</i>	17

4.2.5	Prueba de RCP basada en SCAR para la identificación de <i>D. dipsaci</i>	19
4.2.6	Prueba de RCP específica para 18S e ITS1 para la identificación de <i>D. dipsaci</i>	20
4.2.7	Prueba de RCP específica para ADNr 5.8S para la identificación de <i>D. dipsaci</i>	20
4.2.8	Prueba de RCP específica para ADNr 5.8S e ITS para la identificación de <i>D. dipsaci</i>	21
4.2.9	Prueba de RCP basada en SCAR para la identificación de <i>D. dipsaci</i>	21
4.2.10	Controles para las pruebas moleculares	22
4.2.11	Interpretación de los resultados de la RCP convencional	22
5.	Registros	23
6.	Puntos de contacto para información adicional	23
7.	Agradecimientos	23
8.	Referencias	23
9.	Figuras	29

1. Información sobre la plaga

Las especies que forman el género *Ditylenchus* ~~Felipe Filipjev~~, 1936, están formado por un gran número de especies distribuidas por todo el mundo, y la mayoría de ellas son ~~fitófagas~~ ~~micófagas~~. Sin embargo, algunas especies de este género tienen gran importancia como plagas de plantas superiores (Saturhan y Brzeskiesque, 1991). Aunque ciertas plantas (p. ej., ~~como~~ la remolacha, la alfalfa o el trébol) pueden verse afectadas tanto por *Ditylenchus dipsaci* como por *Ditylenchus destructor*, ambas especies raramente ~~coinciden~~ ~~están presentes~~ en la misma planta (Andrássy y Farkas, 1988).

1.1 *Ditylenchus dipsaci*

D. dipsaci sensu lato (s.l.), ~~o el~~ nematodo del tallo ~~y el bulbo~~, ~~infesta~~ ~~ataca~~ a más de 1 200 especies de plantas silvestres y cultivadas. Este nematodo tiene como hospedantes muchas ~~malas hierbas~~ ~~malezas~~ y ~~gramíneas~~ ~~pastos~~, que podrán tener una función importante en su supervivencia en ausencia de plantas cultivadas. Los análisis morfológicos, bioquímicos, moleculares y cariológicos de distintas poblaciones y razas de *D. dipsaci* s.l. ~~han sugerido~~ ~~indican~~ que se trata de un complejo formado por al menos 30 razas, con rangos de hospedantes limitados. Jeszke *et al.* (2013) dividieron este complejo en dos grupos. El primero, ~~llamado~~ *D. dipsaci sensu stricto* (s.s.), ~~está~~ formado por poblaciones diploides caracterizadas por un tamaño “normal” y ~~que~~ comprende la mayoría de las poblaciones registradas hasta la fecha. El segundo grupo es poliploide y actualmente comprende *Ditylenchus gigas* Vovlas *et al.*, 2011 (la “raza gigante” de *D. dipsaci* que parasita a *Vicia faba* (haba)); *D. weischeri* Chizhov *et al.*, 2010 (que parasita a *Cirsium arvense* (cardo cundidor)); y tres especies no descritas de *Ditylenchus* llamadas D, E y F, que están asociadas a especies vegetales de Fabaceae, Asteraceae y Plantaginaceae, respectivamente (Jeszke *et al.*, 2013). De todas estas especies, solo *D. dipsaci* s.s. y su variante morfológicamente más grande *D. gigas* son plagas de las plantas de importancia económica. El presente protocolo contiene información para distinguir entre *D. dipsaci* s.s. y *D. gigas*.

D. dipsaci vive principalmente como endoparásito en ~~los las órganos partes~~ aéreas de las plantas (tallos, hojas y flores), pero también ~~infesta~~ ~~ataca~~ bulbos, tubérculos y rizomas. Este nematodo ~~se es~~ ~~transmite~~ ~~transportado~~ por las semillas de *V. faba*, *Medicago sativa* (alfalfa), *Allium cepa* (cebolla), *Trifolium* spp. (tréboles), *Dipsacus* spp. (cardos) y *Cucumis melo* (melón) (Sousa *et al.*, 2003; Sikora *et al.*, 2005). Una característica muy importante es que en su cuarto estado juvenil puede resistir la desecación durante largo tiempo, en ocasiones 20 años o más (Barker y Lucas, 1984). Cuando el tejido vegetal comienza a secarse, ~~los estos~~ nematodos se agrupan en un estado criptobiótico formando masas algodonosas (Figura 1), o “lana de nematodos” (Figura 1), que se observan a menudo en las semillas de vainas muy infestadas y en los residuos vegetales secos (p. ej., los que permanecen en el campo después de la ~~recolección cosecha~~). La presencia ~~en semillas y material vegetal seco~~ de nematodos infectivos en el cuarto estado juvenil ~~en semillas y material vegetal seco~~ es importante para la ~~dispersión~~ ~~diseminación~~ pasiva del nematodo a grandes distancias. En estado desecado el nematodo puede sobrevivir al paso por el tracto intestinal del ganado porcino y bovino, en la superficie o en el interior de las semillas ~~infestadas~~ ~~infectadas~~ (Palmisano *et al.*, 1971).

Aunque *D. dipsaci* se considera una plaga de las plantas superiores, Viglierchio (1971) ~~notificó~~ ~~comunicó~~ que una población californiana de *D. dipsaci* de *Allium sativum* (ajo) podía reproducirse en hongos del suelo (*Verticilium* y *Cladosporium*) en condiciones de laboratorio.

Se sabe que *D. dipsaci* es un vector externo de bacterias fitopatógenas (p. ej., *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* [sin. *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosum*, *Corynebacterium insidiosum*], que causa ~~la podredumbre~~ ~~el marchitamiento~~ de la alfalfa).

Según ~~la Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas~~ (EPPO, (2013a), *D. dipsaci* está presente en las siguientes regiones (excluidas las intercepciones): Europa, Asia, África, América del Norte, América Central y el Caribe, América del Sur y Oceanía.

1.2 *Ditylenchus destructor*

D. destructor, o ~~anguilulosis~~ nematodo de la pudrición de la papa (patata), ~~infesta-ataca~~ casi exclusivamente ~~los las órganos partes~~ subterráneas de las plantas (p. ej., tubérculos, rizomas y órganos subterráneos de tipo caulinar). Es una especie prácticamente cosmopolita, común en las regiones templadas y responsable de ~~graves~~ pérdidas severas en la producción de papa y lúpulo (EPPO, 2013a). El nematodo tiene un rango de hospedantes amplio, que comprende más de 90 especies vegetales, entre las que hay plantas ornamentales, plantas cultivadas y ~~malas hierbas malezas~~. *Solanum tuberosum* (papa/patata) es el principal hospedante; sus tubérculos desarrollan una podredumbre húmeda o seca que se ~~transmitirá-dispersará~~ a otros tubérculos durante el almacenamiento. En determinadas condiciones, los organismos causantes de la podredumbre húmeda podrán producir ~~graves-grandes~~ daños en los tubérculos, pero también ~~destruirán-matarán~~ los nematodos. *D. destructor* solo puede sobrevivir cuando el tubérculo es invadido por organismos que producen podredumbre seca. Rojankovski y Ciurea (1986) encontraron 55 especies de bacterias y hongos asociadas a *D. destructor* en tubérculos de *S. tuberosum*, siendo la mayoría del género *Fusarium* spp. el más común.

Otros hospedantes comunes son *Ipomoea batatas* (batata), los lirios bulbosos (híbridos y selecciones a partir de *Iris xiphium* e *Iris xiphioides*), *Taraxacum officinale* (diente de león), *Humulus lupulus* (lúpulo), *Tulipa* spp. (tulipán), *Leopoldia comosa* (jacinto silvestre o comoso), *Hyacinthus orientalis* (jacinto común), *Gladiolus* spp. (gladiolo), *Dahlia* spp. (dalia), *Coronilla varia* (coronilla) y *Anthyllis vulneraria* (vulneraria), *Beta vulgaris* (remolacha azucarera, remolacha forrajera y remolacha), *Calendula officinalis* (caléndula), *Daucus carota* (zanahoria), *Petroselinum crispum* (perejil) y *Trifolium* spp. (trébol rojo, blanco y alsike) (Sturhan y Brzeski, 1991). En ausencia de plantas superiores, *D. destructor* se reproduce con facilidad en el micelio de unas 70 especies de hongos y se ha comprobado que destruye las hifas de los ~~hongos champiñones~~ cultivados (Sturhan y Brzeski, 1991). La especie es capaz de sobrevivir a la desecación y a las bajas temperaturas, pero no forma masas algodonosas como *D. dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936. En cambio, esta especie hiberna en forma de huevos, por lo que estos son más vitales para *D. destructor* que para *D. dipsaci*. *D. destructor* es una plaga reglamentada en de las papas de siembrasemilla y los bulbos de flores en muchos países (Sturhan y Brzeski, 1991). Se ~~notificó-reportinformeó de~~ la presencia de *D. destructor* en *Arachis hypogaea* (maní, cacahuete) en Sudáfrica, pero actualmente se considera que estos registros corresponden a una especie diferente, *Ditylenchus africanus* Wendt, Swart, Vrain y Webster, 1995, de morfología y morfometría muy similares a *D. destructor*.

Según ~~la Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas (EPPO, (2013a)~~, *D. destructor* está presente en las siguientes regiones (excluidas las intercepciones): Europa, Asia, África Austral, América del Norte, América del Sur y Oceanía.

2. Información taxonómica

Nombre: *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936

Sinónimos: los sinónimos de la especie tipo *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936 se enumeran en Siddiqi (2000)

Posición taxonómica: Nematoda, Secernentea, Diplogasteria, Tylenchida, Tylenchina, Tylenchoidea, Anguinidae

Nombres comunes: acebollado del centeno, anguilulosis de la avena, cebollino del centeno, nematodo de la cebolla (español) (base de datos de la EPPO: <https://gd.eppo.int>, consultada el 30/11/2015)

Nota: *D. dipsaci* se considera actualmente un complejo de especies formado por un gran número de razas biológicas y de poblaciones que difieren principalmente en la preferencia de hospedante. En consecuencia, un total de 13 especies nominales se han considerado sinónimas de *D. dipsaci* y se han diferenciado hasta 30 razas biológicas, que se distinguen principalmente por el rango de hospedantes y por lo general se nombran según su planta hospedante principal.

Nombre: *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945

Sinónimos: ninguno

Posición taxonómica: Nematoda, Secernentea, Diplogasteria, Tylenchida, Tylenchina, Tylenchoidea, Anguinidae

Nombres comunes: anguilulosis de la patata, nematodo de la patata, nematodo de la pudrición de la papa (español) (base de datos de la EPPO: <https://gd.eppo.int>, consultada el 30/11/2015)

De Ley y Blaxter (2003) han creado el sistema de clasificación más reciente, ~~basado~~ que combina en observaciones morfológicas, ~~en~~ datos moleculares y ~~en~~ el análisis cladístico.

3. Detección

Tanto *D. dipsaci* como *D. destructor* producen los siguientes síntomas comunes que permiten su detección: engrosamiento, deformación, ~~alteración del color~~ decoloración y retraso del crecimiento de ~~los las órganos partes~~ aéreas de la planta, y necrosis o pudrición de los bulbos y los tubérculos (Thorne, 1945).

Ditylenchus dipsaci

D. dipsaci muestra adaptación al parasitismo en su capacidad de invadir el tejido parenquimatoso compacto tras la lisis enzimática de la capa péctica o ~~de~~ laminillas medias entre paredes celulares adyacentes, lo que hace que las células se separen y se redondeen. Esto ocasiona la típica apariencia brillante o textura harinosa de los tejidos infestados, que recuerda la carne de una manzana sobremadura (Southey, 1993).

Según Vovlas *et al.* (2011), la infestación de *V. faba* por *D. gigas* (~~la raza~~ nematodo gigante ~~del nematodo~~ del tallo y el bulbo) produce engrosamiento y deformación del tejido del tallo o lesiones que se vuelven marrón rojizo y luego negras. ~~Las plantas con~~ En infestaciones grave severas, las producen semillas ~~infestadas apareciendo~~ deformadas, más oscuras, deformadas y de menor tamaño pequeñas que las semillas ~~de plantas~~ no infestadas; y además, presentan punteado necrótico en la superficie. Además de *V. faba*, son hospedantes ~~las especies~~ *Lamium purpureum*, *Lamium album*, *Lamium amplexicaule*, *Ranunculus arvensis*, *Convolvulus arvensis* y *Avena sterilis*.

Ditylenchus destructor

D. destructor ~~suele infectar~~ comúnmente los órganos las partes subterráneas de las plantas (tubérculos y estolones de ~~la~~ papa; rizomas de ~~la~~ menta y raíces del ~~lúpulo~~ y ~~la~~ lila), ocasionando ~~alteración del color~~ decoloración y pudrición del tejido vegetal. A veces también resultan ~~infectadas~~ stados los órganos las partes aéreas, lo que provoca enanismo, engrosamiento y ramificación del tallo, ~~así como~~ y enanismo, abarquillado y ~~alteración del color~~ decoloración de las hojas (p. ej., en la papa) (Sturhan y Brzeski, 1991). Sin embargo, lo más frecuente es no encontrar síntomas de infección en ~~los órganos las partes~~ aéreas de las plantas.

3.1 Hospedantes y síntomas

3.1.1 *Ditylenchus dipsaci*

Según Sturhan y Brzeski (1991) los hospedantes principales de *D. dipsaci* son Gramineae: *Avena sativa* (avena), *Secale cereale* (centeno), *Zea mays* (maíz), *Triticum aestivum* (trigo); Liliaceae: *A. cepa*, *A. sativum*, *Tulipa* spp.; Leguminosae: *M. sativa*, *Vicia* spp., *Pisum sativum*, *Trifolium* spp.; Solanaceae: *S. tuberosum*, *Nicotiana* spp.; Cruciferae: *Brassica campestris*, y ~~Amarilidaceae~~ Amaryllidaceae: *Narcissus* spp. Otros hospedantes son *D. carota*, *Fragaria* spp. (fresa/frutilla), *B. vulgaris*, *H. orientalis*, *Allium ampeloprasum* (puerro silvestre), *Phlox drummondii*, *Phlox paniculata*, *Dianthus* spp. (clavel),

Apium graveolens (apio), *Hydrangea* spp., *Lens culinaris* (lenteja), *Brassica napus* (colza), *Petroselinum crispum* y *Helianthus annuus* (girasol).

En una planta hospedante podrán albergarse presentes varias generaciones sucesivas de *D. dipsaci* durante una temporada de crecimiento. Si las partes afectadas de la planta se necrosan debido a las lesiones ocasionadas por la plaga, los nematodos abandonan el hospedante antes de que termine de morir completamente. Cuando no disponen de plantas hospedantes, los nematodos se pueden introducir en otras plantas no hospedantes y alimentarse de ellas durante un cierto tiempo, aunque no pueden reproducirse en plantas distintas de sus no hospedantes (Andrássy y Farkas, 1988). Los síntomas más frecuentes-comunes de infestación por *D. dipsaci* son el raquitismo y clorosis de las plantas; el engrosamiento, raquitismo, deformación o presencia de agallas en tallos, peciolos y flores, y la pudrición y presencia de lesiones necróticas en bulbos y rizomas, que a menudo se observan en forma de anillos marrones al cortar los bulbos. *D. dipsaci* también podrá infestar las semillas, por ejemplo, de *Phaseolus vulgaris* (judía cometodo, habichuela verde o judía verde), *V. faba*, *Allium* spp. y *M. sativa*. Las semillas pequeñas generalmente no muestran signos-síntomas de infestación visibles, pero las semillas más grandes podrán tener manchas y la superficie contraída con manchas decoloradas.

3.1.1.1 Síntomas específicos de las Gramineae

Avena sativa y *Secale cereale* (McDonald y Nicol, 2005). Las hojas se deforman, los tallos se engrosan y se produce una número anormal de macollos-proliferación patológica de retoños; la planta es achaparrada, arbustiva y raquílica. En el cultivo de *S. cereale*, *D. dipsaci* está presente sobre todo en suelos ligeros-livianos pobres en humus y de forma natural en zonas áreas donde se cultiva centeno regularmente. Los primeros signos de infestación se pueden observar a finales del otoño, pero son más evidentes en la primavera. En cultivos de centeno, la presencia de varias manchas en plantas con retraso del crecimiento en cultivos de centeno indica que el cultivo está afectado por daños ocasionados por la plaga. Como las plantas de *A. sativa* infestadas tienen un crecimiento más lento, su color verde destaca cuando el cultivo amarillea. El *T. aestivum* afectado presenta los mismos síntomas que los demás otros cereales y solo es infestado-atacado por *D. dipsaci* en Europa central y oriental (Rivoal y Cook, 1993).

Zea mays no es un mal-buen hospedante de *D. dipsaci*, pero la invasión de los tejidos del tallo en plantas jóvenes produce necrosis en esos tejidos y ocasiona el encamado o la muerte de la planta antes de la recolección cosecha (Rivoal y Cook, 1993). Las hojas de las plantas infestadas son quebradizas y están retorcidas en espiral. Los entrenudos se acortan y la parte-baja-base del tallo se ahueca, mientras que las plantas más grandes se rompen-quiebran y se encaman.

3.1.1.2 Síntomas específicos de las Liliaceae

Allium cepa, *Allium sativum* y *Allium cepa* var. *aggregatum* (chalote). En la mayoría de las especies de *Allium* la infestación por *D. dipsaci* produce una deformación característica de las hojas y los bulbos (figuras 2, 3 y 4). La base de las plantas jóvenes se hincha y las hojas se deforman. Los bulbos infestados más viejos muestran engrosamiento (hinchazón) de las escamas, a menudo con grietas abiertas en el plato basal (Potter y Olthof, 1993). Cuando *A. cepa* es infestada-atacada por *D. dipsaci*, su apariencia es escarchada, debido a la disolución de las células ocasionada por la alimentación del nematodo (Ferris y Ferris, 1998). Los bulbos infestados tienden a pudrirse en poco tiempo durante el almacenamiento (Bridge y Hunt, 1986). Las escamas internas del bulbo en general son atacadas más severamente suelen sufrir una infestación más intensa que las externas. A medida que avanza la temporada, los bulbos se ablandan y cuando se cortan se percibe el pardeamiento de las escamas en círculos concéntricos. En cambio, *D. dipsaci* no induce deformación de las hojas ni engrosamiento en *A. sativum*, pero ocasiona amarilleamiento y necrosis-muerte de las hojas (Netscher y Sikora, 1990). Mollov *et al.* (2012) notificaron-reportinformaron por primera vez de la presencia de *D. dipsaci* en *A. sativum* en Minesota (Estados Unidos de América). Los síntomas detectados en los órganos aéreos de la planta fueron retraso del crecimiento y clorosis, mientras que los bulbos presentaban necrosis, subdesarrollo y deformación. En las hojas de *Allium* spp. infestadas podrán aparecer pequeñas vesículas (p. ej., zonas hinchadas como

~~ampollas). –No se observan síntomas de infestación en semillas infestadas de *Allium*. mientras que en las semillas no se observan síntomas.~~

***Tulipa* spp.** (Southey, 1993). Los síntomas de ~~la infestación~~ ataque por *D. dipsaci* ~~en el~~ tulipán, tanto en las plantas en crecimiento como en los bulbos, son bastante diferentes de los de *Narcissus* spp. En el campo, la infestación se detecta mejor en la floración; el primer signo es una lesión ~~decolorada-pálida o purpúrea-púrpura~~ en un lado del tallo, inmediatamente por debajo de la flor, que se dobla hacia la lesión. La lesión aumenta de tamaño, la epidermis se resquebraja —revelando debajo un tejido laxo típico— y el daño se extiende hacia abajo y a menudo hacia arriba, a los pétalos. En ~~las infestaciones~~ ataques más graves severos, se ~~produce una extensión de~~ extienden lesiones similares desde las axilas foliares hacia abajo, por los tallos, y el crecimiento podrá distorsionarse. Las infestaciones comienzan en la base de los bulbos nuevos, que surgen de yemas laterales de la base de los tallos existentes. Al retirar las escamas marrones exteriores, la infección se puede ver y notar en las escamas exteriores carnosas en forma de zonas blandas grises o marrones. Los bulbos ~~infectados~~ no muestran anillos marrones como en el narciso y en el jacinto.

3.1.1.3 Síntomas específicos ~~de las~~ *Leguminosae*

***Medicago sativa*.** *D. dipsaci* es ~~la plaga de el~~ nematodos ~~plaga~~ más importante de *M. sativa*. La infestación se produce con facilidad en los suelos más pesados y durante épocas de lluvias abundantes o en ~~superficies-áreas~~ regadas por ~~aspersor~~ aspersión. La llamada “bandera blanca”, ~~relacionada-asociada~~ con la pérdida de clorofila foliar, suele ser una ~~síntoma~~ característica de los cultivos infestados en condiciones de déficit hídrico (Griffin, 1985). En los campos infestados hay a menudo ~~zonas-áreas~~ irregulares de crecimiento escaso. Los síntomas típicos del ~~ataque la infestación~~ por nematodos incluyen el engrosamiento basal, el enanismo y la torsión de los tallos y las hojas, el acortamiento de los entrenudos y la ~~formación de~~ abundante ~~seia de~~ yemas axilares, que ~~lleva a producen una número~~ anormal de proliferación patológica de nuevos tallos ~~que dando~~ una apariencia arbustiva a la planta (McDonald y Nicol, 2005). Las plantas infestadas a veces no alcanzan una altura suficiente para su uso como heno (Ferris y Ferris, 1998) y a menudo no producen espigas florales (McDonald y Nicol, 2005). En la alfalfa, *D. dipsaci* es un factor predisponente para *Phytophthora megasperma*. El daño por *D. dipsaci* aumenta ~~cuando en las plantas enfermas y quebradas hay también con la~~ presencia de otros nematodos, saprófagos (de las especies *Rhabditis*, *Cephalobus* y *Panagrolaimus*) ~~en las plantas enfermas y quebradas, los cuales que~~ contribuyen a acelerar su muerte (Andrássy y Farkas 1988). En las semillas de *Medicago* infestadas no se observan síntomas ~~de infestación~~.

***Trifolium* spp.** (Cook y Yeates, 1993). Los síntomas son bastante similares a los descritos para *M. sativa*, excepto en los tréboles rojo y blanco. La plaga invade el trébol rojo, sobre todo con tiempo frío y lluvioso. En el campo aparecen grandes ~~áreas~~ ~~círculos~~ ~~ares~~ de plantas enfermas; las más afectadas son las plantas del interior, y las situadas en el centro suelen estar marchitas. Las plantas se engrosan en la base, como bulbos, y las hojas se vuelven quebradizas y marchitas y sus ~~venas nervaduras~~ se engrosan visiblemente. Los primordios florales se hinchan en forma de agallas; una sola agalla ~~floral~~ podrá contener 5 000 nematodos (Courtney, 1962). Los tallos de trébol blanco ~~infectados~~ ~~stados~~ por *D. dipsaci* son cortos y están engrosados, las yemas forman matas y las partes infestadas se ~~tornan de color marrón~~ ~~amarroñan~~ en verano o en otoño. Las hojas son más estrechas de lo habitual, pero con peciolo más gruesos y más cortos. Los botones florales están engrosados en la base (Andrássy y Farkas, 1988).

3.1.1.4 Síntomas específicos ~~de las~~ *Solanaceae*

***Solanum tuberosum*.** *D. dipsaci* produce una podredumbre en forma de embudo que se extiende hacia el interior del tubérculo más que la podredumbre superficial causada por *D. destructor*. El nematodo invade los tallos y las hojas y esto origina el típico retraso del crecimiento de la planta acompañado de una ~~fuerte-severa~~ deformación de los tallos y los peciolo (Evans y Trudgill, 1992).

***Nicotiana* spp.** (Johnson, 1998). Los nematodos ~~juveniles~~ infectivos (en el cuarto estado ~~juvenil~~) penetran en las hojas y los tallos de las plántulas de tabaco con tiempo húmedo y provocan pequeños engrosamientos amarillos (agallas) que podrán extenderse 40 cm o más por encima del suelo. Al ~~medida~~

que aumentar el número de agallas, se inicia una necrosis prematura del tejido vegetal. Las hojas ~~más bajas inferiores~~ podrán desprenderse y las ~~más altas superiores~~ amarillentarse amarillas. Las agallas acaban por pudrirse, lo que detiene el crecimiento de las plantas ~~infestadas infectadas~~. Finalmente, y especialmente sobre todo con tiempo frío y húmedo y en suelos pesados, los tallos ~~infestados infectados~~ se rompen quiebran y las plantas se caen.

3.1.1.5 Síntomas específicos ~~de las~~ Cruciferae

La infección ~~infestación~~ por *D. dipsaci* en ~~nabizas (B. campestris)~~ maduras podrá producir una pudrición ~~grave-severa~~ de la corona.

3.1.1.6 Síntomas específicos ~~de las~~ Amarilidaceae Amaryllidaceae

Narcissus spp. (Southey, 1993). Los síntomas típicos son la presencia en las hojas de engrosamientos similares a ampollas de color amarillento pálido (vesículas) y los anillos marrones concéntricos que se pueden ver al cortar los bulbos transversalmente (figuras 5 y 6). Cuando los bulbos se cortan longitudinalmente se observa que la necrosis comienza por el cuello y se extiende hacia abajo. Los engrosamientos se observan mejor antes de la floración, cuando las hojas están en crecimiento activo. En ~~las infestaciones ataques~~ leves, es más fácil detectar los engrosamientos palpando con los dedos índice y pulgar que visualmente. La ~~infestación-infección~~ por *D. dipsaci* se puede detectar en los bulbos secos causando un ~~daño~~ mínimo ~~a los mismos de daños~~ mediante un corte justo por debajo del cuello. Una ~~inspección examen~~ exhaustivoa en las etapas iniciales de la infestación revela ~~zonas áreas~~ brillantes y esponjosas en las que las células se han separado; poco después se produce una necrosis parda.

3.1.1.7 Síntomas específicos ~~de en~~ otros hospedantes

Fragaria spp. *D. dipsaci* es la única especie de *Ditylenchus* considerada patógena de la fresa (Brown *et al.*, 1993). El daño se ~~observa en las~~ manifiesta por las hojas, pequeñas y deformes, y los peciolo, cortos, gruesos y retorcidos.

Familia Asparagaceae, subfamilia Scilloideae (jacintos) y otros bulbos (Southey, 1993). Los síntomas en los bulbos son los mismos que en *Narcissus spp.*, pero generalmente no se observan engrosamientos evidentes en las hojas de las plantas. El follaje podrá presentar rayas amarillo pálido, deformación y a menudo un ligero engrosamiento. Otros bulbos liliáceos por lo general muestran los mismos síntomas que los jacintos. Los síntomas de infestación en las Amaryllidaceae son similares a los de *Narcissus spp.*; por ejemplo, *Galanthus spp.* y *Nerine spp.* muestran engrosamientos en las hojas y anillos marrones concéntricos en los bulbos.

Beta vulgaris y *Daucus carota* (Cooke, 1993). Al alimentarse, *D. dipsaci* destruye el punto ~~vegetativo de crecimiento~~ de las plántulas (ocasionando la formación de múltiples coronas); los cotiledones y las hojas podrán retorcerse, hincharse y deformarse, y se podrán formar agallas en las hojas o en los peciolo de las plantas algo más ~~desarrolladas viejas~~. Más avanzada la temporada, el nematodo al alimentarse de la corona podrá causar una podredumbre conocida como ~~podredumbre cancro~~ de la corona, pudrición de la corona o del cuello, cuya primera manifestación visible son unas pústulas grisáceas en relieve, normalmente en las cicatrices de las hojas. La pudrición se desarrolla seguidamente hacia afuera y hacia abajo, expandiéndose por el hombro de la ~~raíz-planta~~ y permitiendo que la corona se desprenda al tirar de ella. En *D. carota*, otros síntomas podrán consistir en el desarrollo anormal de las hojas y la ~~alteración del color~~ decoloración de la parte superior de la raíz principal. Los síntomas se producen principalmente en la raíz y el tallo de la planta, entre 2 cm y 4 cm por debajo y por encima del nivel del suelo. Las infestaciones ~~graves-severas~~ causan la ~~neerosis-muerte~~ de las hojas y la podredumbre de la corona, especialmente en otoño (Figura 7).

Phlox paniculata y otras plantas ornamentales (Southey, 1993). En el flox, los síntomas típicos de los brotes infestados son el engrosamiento y fragilidad y el acortamiento de los entrenudos de los tallos, que tienen tendencia a rajarse. ~~La rizadura~~ El arrugamiento y reducción del limbo de las hojas superiores (las más altas podrán verse reducidas a delgados filamentos) son síntomas característicos y exclusivos

de este hospedante. Ejemplos de plantas reportadas como hospedantes con ~~Se han registrado~~ crecimiento anormal, engrosamiento y otros síntomas son las ~~en~~ especies y cultivares ~~hospedantes~~ de *Anemone*, *Calceolaria*, *Cheiranthus*, *Gypsophila*, *Helenium*, *Heuchera*, *Lychnis*, *Lysimachia* y *Penstemon* (Roberts, 1981). Edwards (1937) ~~notificó~~ reportó/comunicó retraso del crecimiento, malformación foliar, pudrición y ausencia de floración en *Primula* spp. Las plantas leñosas no suelen resultar ~~infestadas~~ atacadas, pero *D. dipsaci* ~~podrá~~ puede infestar a *Hydrangea*, causando deformación de los brotes no leñosos, engrosamiento de los peciolo y las ~~venas~~ nervaduras principales y un ~~arrugamiento pronunciado~~ acusada rizadura del limbo de las hojas. Las hojas ~~rizadas~~ arrugadas suelen ser el primer signo de ~~infestación~~ infección. Otra planta leñosa, *Yucca smaliana*, muestra deformación foliar y engrosamientos similares a ampollas.

3.1.2 *Ditylenchus destructor*

Según Sturhan y Brzeski (1991), *D. destructor* parasita principalmente tubérculos (p. ej., papa y dalia), bulbos (p. ej., lirios bulbosos, tulipanes y gladiolos) y raíces cultivadas (p. ej., remolacha azucarera y zanahoria) y es capaz de destruir las hifas de *Agaricus hortensis* (champiñón ~~común~~ cultivado). Otros hospedantes son *I. batatas*, *A. sativum*, *P. vulgaris*, *Angelica sinensis* (dong quai, angélica china o gingseng hembra), *Panax ginseng* (ginsén o ginseng), *Taraxacum officinale*, *Begonia* spp. y bulbos de *Erytrionium denscanis* (diente de perro).

***Solanum tuberosum* y *Dahlia* spp.** Durante el período de crecimiento no hay ~~signos~~ síntomas visibles. Los nematodos normalmente penetran en los tubérculos de papa a través de los estolones. ~~La mayoría de los nematodos~~ se localizan en el límite entre las partes ~~que padece~~ de color pardo y las que no están dañadas. Si se toma una pequeña muestra de esta parte del tubérculo y se coloca en agua, la masa de pequeños nematodos se puede apreciar incluso con una simple lupa. Los primeros síntomas de ~~infestación~~ infección por *D. destructor* son manchas pequeñas, de aspecto calizo, blancas o de color claro, que se pueden observar justo por debajo de la piel del tubérculo (Brodie, 1998). Estas manchas después se agrandan y se oscurecen gradualmente (pasando de gris a marrón oscuro y a negro) y adquieren una textura esponjosa (Figura 8) que es, sobre todo, el resultado de la invasión secundaria por bacterias, hongos y nematodos saprófitos (Brodie, 1998). Los tubérculos afectados ~~gravemente~~ suelen ~~presentar~~ presentar típicamente ~~zonas~~ áreas ligeramente hundidas, con la superficie agrietada, arrugada y apergaminada. La piel no es ~~invadida~~ atacada, pero se vuelve delgada y se agrieta a medida que los tejidos subyacentes ~~infestados~~ infectados se secan y encogen (Brodie, 1998). ~~Al final del proceso~~ Finalmente se podrá producir la momificación de todo el tubérculo. ~~Los~~ Dichos tubérculos ~~enteros~~ totalmente dañados; ~~estos tubérculos momificados~~ flotan en el agua (Figura 9). Por el contrario, la piel de *S. tuberosum* no suele agrietarse por la infestación por *D. dipsaci*. Los nematodos se siguen reproduciendo dentro de los tubérculos después de la ~~recolección~~ cosecha y podrán llegar a formar poblaciones muy numerosas. Los síntomas podrán ser más visibles después del almacenamiento. Por lo general, en los tubérculos infestados se producen infecciones secundarias por hongos, bacterias y nematodos de vida libre.

***Beta vulgaris*.** La infestación produce lesiones necróticas oscuras en las raíces y los rizomas. Dallimore y Thorne (1951) ~~notificaron~~ reportaron/comunicaron síntomas similares a los del cancro de la corona ~~la pudrición del cuello~~. En la remolacha azucarera no solo ocasionan pérdida de rendimiento sino también una reducción del contenido de azúcar.

***Daucus carota*.** La infestación produce grietas transversales en la piel de la zanahoria y manchas blancas en el tejido cortical. Las infecciones secundarias por hongos y bacterias en esas ~~zonas~~ áreas también podrán producir descomposición. ~~Los~~ Este ~~daños~~ se observan fácilmente en una sección transversal de la zanahoria. El nematodo continúa con su actividad destructora durante el almacenamiento en invierno y las zanahorias dejan de ser aptas para el consumo.

***Iris* spp. y *Tulipa* spp.** (Southey, 1993). La infestación produce marcas lineales grisáceas que se extienden hacia arriba desde la placa basal por las escamas carnosas exteriores. A medida que avanza la infestación, ~~los~~ el ~~daños~~ se extienden por la superficie del bulbo y a través de sus tejidos y se produce una pudrición secundaria seca y fibrosa que causa el hundimiento ~~colapso~~ del bulbo. Cuando se secciona

transversalmente un bulbo infestado se perciben claramente unas manchas marrones anulares. El amarilleo y el marchitamiento descendente del follaje son síntomas secundarios causados por el daño en el bulbo y el ~~eventual posterior~~ cese del ~~funcionamiento~~ ~~la actividad fisiológica~~ de las raíces.

La infestación por *D. destructor* de los cormos de la planta ornamental *Liatris spicata* (liatris o liátride) ~~conservada-almacenada~~ en cámaras frigoríficas en Sudáfrica se manifestó en forma de podredumbre negruzca con nematodos vivos en diferentes estados en el tejido adyacente a las ~~zonas-áreas~~ en descomposición (Van der Vegte y Daiber, 1983).

3.2 Extracción de los nematodos

3.2.1 Extracción de los bulbos y del ajo

Para extraer los nematodos, las escamas afectadas de los bulbos (principalmente las interiores) o los dientes de ajo afectados se cortan en pequeños trozos y se ponen en un recipiente (p. ej., una placa de Petri) con agua de grifo a temperatura ambiente. Para obtener una suspensión clara los trozos se podrán colocar sobre un tamiz de 200 µm a 250 µm de abertura cubierto con papel de filtro, que actúa como soporte (~~método-técnica~~ del plato de Oostenbrink). Al cabo de 1 hora o más, los nematodos se pueden observar con una lupa binocular (con un aumento de al menos 40×).

3.2.2 Extracción de las muestras de ~~tierra-suelo~~ y de materiales vegetales

El método del embudo de Baermann es una técnica de referencia para la extracción de nematodos de muestras de ~~tierra-suelo~~ y de materiales vegetales (bulbos, raíces, ~~peladuras-cáscaras~~ de papa y semillas). Se ajusta un tubo de goma al tallo del embudo y se cierra mediante una pinza de muelle o de tornillo. El embudo se coloca en un soporte y se llena casi hasta el borde con agua de grifo. ~~El~~ ~~La muestra de suelo~~ ~~La tierra~~ o el tejido vegetal cortado en pedazos pequeños se coloca dentro de un trozo de muselina o en papel tisú, que se dobla alrededor del material y se sumerge suavemente en el agua del embudo. Los nematodos activos atraviesan el tejido y se hunden hasta el fondo del cuello del embudo. Transcurridas unas horas, o al día siguiente, se extrae una pequeña cantidad del agua que contiene los nematodos y se observa al microscopio (Flegg y Hooper, 1970).

Una variante de esta técnica consiste en sustituir el embudo por un plato. Se deshacen los terrones de ~~la tierra-suelo~~ y se retiran las piedras y los residuos vegetales. La muestra de ~~tierra-suelo~~ (50 ml) se distribuye uniformemente en un círculo de papel absorbente de una sola capa sobre un tamiz de plástico de malla gruesa colocado sobre un recipiente de plástico. Se añade agua al recipiente hasta que ~~la tierra~~ ~~la muestra de suelo~~ esté completamente húmeda pero no sumergida. El recipiente se cubre con una placa de Petri grande que hace de tapa para reducir la evaporación de agua. Esta estructura se mantiene al menos 24 horas; después se desecha ~~la tierra~~ ~~el suelo~~ y la suspensión de nematodos se vierte del recipiente a un plato para su examen con la ayuda de un microscopio de disección. ~~La~~ ~~El~~ ~~La muestra de suelo~~ ~~tierra~~ se puede sustituir por tejido vegetal picado finamente (Kleynhans, 1997).

La técnica del nebulizador de Seinhorst para bulbos y raíces se diferencia del método del embudo de Baermann en que la savia de la planta y los productos tóxicos de la descomposición se eliminan mediante lavado. Para plantas como *Narcissus* spp. debería preferirse este método al del embudo de Baermann. Con este método, se coloca un embudo de Baermann o un plato de Oostenbrink en una nube o niebla de agua para evitar el agotamiento del oxígeno. La nube se produce mediante difusores que pulverizan agua sobre el material vegetal o bien hacia arriba, de manera que las ~~gotículas-gotitas~~ caigan suavemente sobre el material vegetal. Los nematodos vivos abandonan el tejido vegetal y son lavados hacia el embudo o el plato, donde sedimentan. Los nematodos se recogen en intervalos de 24 a 48 horas en un vaso de precipitados de vidrio abriendo la pinza de tornillo ajustada a la salida del embudo, o bien los especímenes se recogen en un tamiz de 20 µm a 25 µm. ~~Pueden realizarse múltiples~~ ~~Las~~ extracciones ~~pueden continuarse~~ durante ~~hasta-un máximo de~~ cuatro semanas. Esta técnica se describe en Hooper (1986).

Otro método para extraer *Ditylenchus* spp. de ~~muestras-material~~ vegetales se adaptó a partir de una descripción de Oliveira *et al.* (2013). El material vegetal se corta en trozos de 1 cm que se ~~introducen~~ colocan en frascos de 500 ml llenos de agua de grifo. Se perforan dos agujeros en las tapas de los frascos; uno da acceso al tubo de una bomba de acuario y el otro sirve de salida de aire. El material se mantiene durante 72 horas continuamente aireado con ayuda de la bomba. La suspensión resultante se vierte a través de un tamiz de 1 000 µm para retirar los residuos vegetales y luego a través de un tamiz de 38 µm para extraer los nematodos. En este método, la aireación de la suspensión evita la pudrición del material vegetal, de manera que la proliferación de hongos y bacterias que se alimentan de este material es mínima y muchos de los nematodos permanecen vivos. La agitación que genera la aireación de la suspensión del material vegetal ayuda a desprender más nematodos del tejido radicular y, por tanto, se consigue una estimación mucho más precisa ~~del grado de~~ la infestación del material vegetal.

Los nematodos también se pueden extraer del material vegetal mediante el método de Coolen y D'Herde (1972). El material vegetal se lava, se corta en pedazos de aproximadamente 0,5 cm y se maceran porciones de 5 g en 50 ml de agua de grifo en una ~~mezcladora-licuadora~~ doméstica a la velocidad de mezclado más baja durante 1 min. La desventaja de este método es que los especímenes de nematodos de mayor tamaño, como los adultos de *D. dipsaci*, pueden ser cortados en la ~~mezcladoralicuadora~~. La suspensión de nematodos y fragmentos de tejidos se lava a través de un tamiz de 750 µm colocado sobre otro de 45 µm. El residuo que queda en el tamiz de 45 µm se recoge y se vierte en dos tubos de centrifugadora de 50 ml. Se añade a cada tubo aproximadamente 1 ml de caolín, se agita bien la mezcla y a continuación se centrifuga durante 5 min a 3 000 rpm. El sobrenadante se decanta y se añade a los tubos una solución de sacarosa (densidad 1,13 g/cm³). La mezcla se agita bien y se centrifuga durante 1 min a 1 750 rpm. El sobrenadante se lava a través de un tamiz de 45 µm, y el residuo se recoge para estudiar los nematodos.

El procedimiento de ~~análisis-prueba aplicado a~~ legumbres secas y otros cultivos de leguminosas para detectar la presencia de *D. dipsaci* consta de dos pasos: 1) remojo ~~de~~ de una cantidad de semillas en agua con aireación de un día para otro y 2) ~~realizar la~~ extracción de una porción de las semillas empapadas con nebulización durante tres días. La presencia de nematodos en el agua de remojo y en el extracto de la nebulización se determina mediante el tamizado de las fracciones acuosas de cada uno de los dos pasos y la posterior observación al microscopio para la identificación. El proceso lleva aproximadamente siete días, pero se puede acortar a tres días eliminando el paso 2 (la extracción con nebulización). El procedimiento modificado ~~comprende-consiste en~~ el remojo de las ~~legumbres~~ leguminosas en agua con aireación durante toda la noche, seguido del tamizado y la observación al microscopio para la identificación.

Para la extracción de nematodos de una muestra de ~~tierra-suelo~~ se puede utilizar el siguiente método (según Kleynhans, 1997). La muestra de suelo ~~La tierra~~ (250 ml) se lava a través de un tamiz de malla gruesa (2 mm) recogiendo el agua filtrada en un cubo de 5 litros y luego se añade agua de grifo hasta completar el volumen del cubo. La suspensión se ~~remueve-agita~~ y luego se deja reposar durante 30 segundos antes de verterla a través de un tamiz de 45 µm. Este procedimiento se repite con ~~la tierra~~ el suelo del cubo otras dos veces, pero los tiempos de reposo se acortan, primero a 20 segundos y luego a 10 segundos. El residuo del tamiz de 45 µm se transfiere a tubos de centrifugadora de 50 ml. Si la solución de los tubos es muy arenosa se ~~pueden~~ pueden añadir 5 ml de caolín a los tubos (mezclando bien) para facilitar la sedimentación de los nematodos. Los tubos se centrifugan durante 7 min a 1 750 rpm. El sobrenadante de cada tubo se decanta y se desecha. Se añade a los tubos una solución de azúcar (450 g/litro de agua) y esta mezcla de azúcar y ~~tierra-suelo~~ se agita bien antes de volver a centrifugarla durante 3 minutos a 1 750 rpm. El sobrenadante se vierte a través de un tamiz de 45 µm y el residuo, que contiene los nematodos, se recoge en un vaso de precipitados para ser examinado. Esta es una técnica básica y, en función de la habilidad del técnico y del tipo de ~~tierra-suelo~~, se podrán perder hasta el 40% de los nematodos. Otros métodos que se podrán emplear para la extracción de nematodos de ~~muestras de suelo~~ muestras de tierra son la técnica de Cobb modificada por Flegg y el método del elutriador de Oostenbrink (EPPO, 2013c). En Hooper *et al.* (2005) se describen diferentes métodos de extracción adaptados en función del tamaño, la densidad y la movilidad de los nematodos.

4. Identificación

La identificación de *Ditylenchus* spp. por medios morfológicos está limitada a los especímenes adultos; en el examen deben observarse preferiblemente tanto los machos como las hembras de una especie con un microscopio de gran resolución. El uso de preparaciones microscópicas de buena calidad debería permitir identificar con certeza los especímenes de *D. dipsaci* y *D. destructor* adultos tan solo mediante el examen morfológico. La identificación morfológica de especímenes juveniles de *Ditylenchus* en una muestra solo debería utilizarse para confirmar la presencia de la especie en la muestra. Como las especies micófagas de *Ditylenchus* contaminan con frecuencia ~~el la~~ material vegetal en descomposición, deben tomarse precauciones al identificar especímenes tanto en muestras de material vegetal como de ~~tierrasuelo~~.

4.1 Identificación morfológica

La identificación de *D. dipsaci* y *D. destructor* debería basarse preferiblemente en métodos morfológicos. Los métodos moleculares desarrollados para identificar a estas especies se pueden utilizar cuando los niveles de infestación sean bajos o cuando solo haya presencia de especímenes juveniles. Los métodos moleculares se pueden utilizar con adultos atípicos o ~~que hayan resultado~~ dañados, y ~~en~~ con todas las etapas de desarrollo, incluidos los estados juveniles, en ~~para los~~ que la identificación morfológica de la especie no es posible.

4.1.1 Preparación de los especímenes

Las preparaciones temporales, para la identificación rápida o para el estudio de características que se observan mejor en especímenes sin fijar, se realizan de la siguiente manera (Kleynhans, 1997):

- Los especímenes vivos se transfieren a una pequeña gota de agua sobre un portaobjetos.
- El portaobjetos se calienta brevemente pasándolo sobre la llama de una ~~lámpara mechero~~ de alcohol, comprobando frecuentemente el movimiento de los nematodos. Se debería dejar de calentar tan pronto como los especímenes dejen de retorcerse.
- Se coloca un cubreobjetos y se sellan los bordes con esmalte de uñas. Una vez seco el esmalte, el portaobjetos con los especímenes está ~~preparado pronto~~ para su estudio.

Para el microscopio óptico, se extraen los nematodos vivos de ~~la muestra de la~~ tierrasuelo o del material vegetal, se matan con calor suave (65 °C-70 °C), se fijan con solución de FAA (35 % de agua destilada, 10 % de formol (formaldehído al 40 %), 5 % de ácido acético glacial, 50 % de alcohol al 95 %) (Andrássy, 1984), se transfieren a glicerol (Hooper *et al.*, 2005) y se montan en glicerina anhidra sobre portaobjetos con cubreobjetos, como se describe en Seinhorst (1959) y Goodey (1963).

Para la identificación mediante microscopía óptica se recomienda el uso de un microscopio diferencial de contraste de interferencia con aumentos de 500× a 1 000× (con objetivos de inmersión en aceite).

4.1.2 Caracteres morfológicos de diagnóstico

Hay claves de diagnóstico para las especies de *Ditylenchus* publicadas en Viscardi y Brzeski (1993) y en Brzeski (1998). En el Cuadro 1 (a continuación) se ~~ofrece~~ presenta una clave para distinguir *Ditylenchus* spp. de otros géneros de tilénquidos y afelénquidos.

Cuadro 1. Clave para distinguir *Ditylenchus* spp. de otros géneros de tilénquidos y afelénquidos

1	Abertura de la glándula esofágica dorsal cerca de la base del estilete; bulbo medio redondeado, ovoide o ausente	Tylenchida – 2
	Abertura de la glándula esofágica dorsal en el bulbo medio; bulbo medio prominente, normalmente oblongo	Aphelenchida
2	La parte anterior del esófago (procorpus) y el bulbo medio no están unidos en una única estructura; el estilete nunca es excepcionalmente largo	3
	El procorpus se ensancha gradualmente y se fusiona con el bulbo medio; estilete muy largo, con la base a menudo situada en la parte anterior del bulbo medio	Otros géneros
3	Hembra adulta vermiforme	4
	La hembra adulta es un parásito sésil sacciforme o piriforme en raíces	Otros géneros
4	Bulbo medio valvular	5
	Bulbo medio sin válvula ¹	Otros géneros
5	Glándulas esofágicas contenidas en el bulbo basal, que no solapa o que solapa ligeramente el intestino; estructura cefálica raramente conspicua; estilete de débil a moderadamente fuerte	6
	Glándulas esofágicas de aspecto lobular que solapan el intestino; estructura cefálica marcada; estilete muy grande	Otros géneros
6	Ovario único prodélfico; vulva posterior	7
	Hembra con dos ovarios y anfidélfica; vulva ligeramente postecuatorial	Otros géneros
7	Hembra no hinchada con crustaformeria en forma de útero en columna con cuatro filas de cuatro células; en los machos, la bursa rodea un tercio o más de la cola	<i>Ditylenchus</i>
	Hembra hinchada con crustaformeria de más de 20 células	Otros géneros

Fuente: Adaptado de Heyns (1971) y Siddiqi (2000).

¹ Unas pocas especies de *Ditylenchus* que no son fitoparásitas carecen de bulbo medio valvular.

D. africanus, *D. destructor*, *D. dipsaci*, *D. gigas* y *D. myceliophagus* tienen una morfología y una morfometría similares, pero se pueden diferenciar entre sí mediante las siguientes características (Cuadro 2), siempre que sea posible medir y estudiar tanto especímenes machos como hembras.

4.1.2.1 Descripción de *Ditylenchus dipsaci*

Basado en Sturhan y Brzeski (1991), Wendt *et al.* (1995) y Brzeski (1998). Véanse los detalles y vistas de la Figura 10.

Dimensiones (criterios descritos en EPPO, 2013b). (Especímenes procedentes de avena, *Avena sativa* L., según Blake, 1962, en Hooper, 1972.). ($n = 48 \text{♀♀}$): $L = 1,3 \text{ mm} \pm 0,009$; $a = 62 \pm 5,6$; $b = 15 \pm 1,4$; $c = 14 \pm 2,1$; $V = 80 \pm 1,5$. ($n = 23 \text{♂♂}$): $L = 1,3 \text{ mm} \pm 0,017$; $a = 63 \pm 11,3$; $b = 15 \pm 1,7$; $c = 14 \pm 2,1$; $C = 72$.

Morfología general. Cuerpo recto o casi recto en relajación. Banda lateral con cuatro líneas. Región cefálica continua con el contorno del cuerpo (Figura 10B). Estilete de 10-13 μm de longitud en las hembras y 10-12 μm en los machos. Cono del estilete de aproximadamente la mitad de la longitud del estilete, nódulos redondeados y bien desarrollados. Bulbo medio muscular con engrosamientos de las paredes del lumen de 4-5 μm de longitud (Figura 10A). Bulbo basal desplazado o que solapa el intestino unos pocos micrómetros. Poro excretor opuesto a la parte posterior del istmo o bulbo glandular. La parte postvulvar del saco uterino ocupa aproximadamente la mitad o ligeramente más de la distancia vulva-ano (Figura 10D). La bursa rodea las tres cuartas partes de la cola en los machos. Espículas de 23-28 μm de longitud. En ambos sexos, cola cónica con terminación aguda.

Caracteres morfológicos de diagnóstico. El número de líneas laterales (cuatro) (Figura 10F), el estilete comparativamente largo, la longitud del saco postvulvar y la cola aguda (Figura 10D) son los caracteres distintivos de esta especie (Andrássy, 2007). *D. dipsaci* se puede distinguir de *D. gigas* por el cuerpo más corto de las hembras (1,0-1,7 mm frente a 1,6-2,2 mm) y la mayor distancia vulva-ano (202-266 μm frente a 132-188 μm) (Vovlas *et al.*, 2011). Cuando se observan en vista lateral, la espícula está más curvada en *D. dipsaci* que en *D. destructor* (Figura 10C). En Karssen y Willemsen (2010) se ofrece más información sobre la espícula y su utilidad para la identificación de *D. dipsaci* y *D. destructor*. Debe señalarse que la semilla de *V. faba* contiene principalmente larvas en el cuarto estado.

4.1.2.2 Descripción de *Ditylenchus destructor*

Basado en Sturhan y Brzeski (1991) y Brzeski (1998). Véanse los detalles y vistas de la Figura 11.

Dimensiones (según Goodey, 1952, de especímenes procedentes de diversas plantas superiores hospedantes). ($n = 237 \text{♀♀}$): $L = 1,07 (0,69-1,89) \text{ mm}$; $a = 32 (18-49)$; $b = 7 (4-12)$; $c = 17 (9-30)$; $V = 80 (73-90)$. ($n = 231 \text{♂♂}$): $L = 0,96 (0,76-1,35) \text{ mm}$; $a = 35 (24-50)$; $b = 7 (4-11)$; $c = 14 (11-21)$; $C = 65 (40-84)$.

Morfología general. Los adultos de *D. destructor* son animales diminutos de aspecto vermiforme, de 0,8-1,4 mm de longitud, 23-47 μm de anchura y ligeramente arqueados ventralmente. Los adultos presentan una considerable variabilidad morfométrica en función del hospedante y la edad. El aspecto general de los machos y las hembras es similar. Banda lateral con seis líneas (Figura 11F) que se reducen a dos en las regiones del cuello y la cola. Cutícula y región cefálica finamente anilladas, región cefálica a menudo más estrecha que el cuerpo adyacente, en la que se distinguen unos cuatro anillos cefálicos mediante microscopía electrónica de barrido (Wendt *et al.*, 1995). Estilete de 10-12 μm de longitud, aunque ocasionalmente se han descrito especímenes con estiletes de 14 μm . Cono del estilete del 45-50% de la longitud del estilete, con nódulos definidos, redondeados e inclinados hacia atrás. Bulbo medio muscular con engrosamientos de las paredes del lumen (o válvula) de unos de 3 μm de longitud. El bulbo posterior solapa ligeramente el intestino en la porción dorsal del cuerpo, aunque ocasionalmente se observan especímenes con el bulbo glandular separado (Figura 11A). Poro excretor opuesto a las glándulas esofágicas. El saco postvulvar se extiende unas tres cuartas partes de la distancia vulva-ano (Figura 11E). Huevos dos veces más largos que anchos (Andrássy, 2007). Labios de la vulva gruesos y elevados (Figura 11B). Ovario anterior ensanchado, que a veces alcanza la región esofágica. Parte postvulvar del saco uterino del 40-98% de la distancia vulva-ano, sin función de espermateca (Figura 11E). La bursa de los machos rodea la cola en un 50-90% de su longitud. Espículas de 24-27 μm

de longitud. La forma de la espícula de *D. dipsaci* difiere de la de *D. destructor* en que presenta un túmulo ventral en la región del cálamo de la espícula (Figura 12) (Karssen y Willemssen, 2010). Testículos ensanchados cercanos a la base del esófago. En ambos sexos, cola cónica, de longitud de tres a cinco veces la anchura anal del cuerpo, normalmente curvada ventralmente y con terminación redondeada.

Caracteres morfológicos de diagnóstico. *D. destructor* es similar a *D. dipsaci*, pero se diferencia de esa especie por la banda lateral con seis líneas (Figura 11F), el saco postvulvar más largo y la terminación de la cola finamente redondeada (Figura 11D). Morfológicamente, *D. destructor* se diferencia de *D. africanus* principalmente por la longitud del estilete, que puede solapar ligeramente, y la longitud de la espícula, lo cual implica que debe haber machos presentes en la población. Dado que la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR [por sus siglas en inglés](#)) es suficientemente sensible para detectar diferencias entre géneros emparentados estrechamente, Wendt *et al.* (1995) utilizaron polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP [por sus siglas en inglés](#)) para distinguir *D. destructor* de *D. africanus*. Cuando se observan en vista lateral, la espícula está menos curvada en *D. dipsaci* que en *D. destructor* (Figura 11C).

Observaciones. Los caracteres mencionados podrán variar y la identificación hasta el nivel de la especie es casi imposible basándose en un único espécimen. Se recomienda examinar al menos un espécimen macho y uno hembra. Las líneas laterales del macho, por ejemplo, podrán en ocasiones reducirse a cuatro cerca de la cola, según un patrón similar al de *D. dipsaci*.

Cuadro 2. ~~Análisis comparativo de e~~[Comparación entre las características](#) diagnósticas de *Ditylenchus africanus*, *Ditylenchus destructor*, *Ditylenchus dipsaci*, *Ditylenchus gigas* y *Ditylenchus myceliophagus*

Caracteres	<i>D. destructor</i> (según Hooper, 1973)	<i>D. africanus</i> (según Wendt <i>et al.</i> , 1995)	<i>D. myceliophagus</i> (según Hesling, 1974)	<i>D. gigas</i> (según Vovlas <i>et al.</i> , 2011)	<i>D. dipsaci</i> (según Hooper, 1972)
Longitud del cuerpo de la hembra (mm)	0,8-1,9	0,7-1,1	0,6-1,4	1,6-2,2	1,0-1,7
Número de líneas laterales	6	6-15	6	4	4
Forma de la terminación de la cola	Redondeada	Redondeada	Redondeada	De aguda a finamente redondeada	Aguda
c (longitud del cuerpo/longitud de la cola) de la hembra	14-20	8,8-16,9	8,2-17	15,7-27,6	11-20
Bulbo posterior	Corto, solapa dorsalmente	Corto, solapa dorsalmente	Corto, solapa dorsalmente	Solapa ligeramente	No solapa
Longitud del estilete (µm) de la hembra	10-14	8-10	7-8	10,5-13,0	10-12
Distancia-Longitud SUP/vulva-ano (%) ¹	53-90	37-85	30-69	Aprox. 50 ²	40-70

Caracteres	<i>D. destructor</i> (según Hooper, 1973)	<i>D. africanus</i> (según Wendt <i>et al.</i> , 1995)	<i>D. myceliophagus</i> (según Hesling, 1974)	<i>D. gigas</i> (según Vovlas <i>et al.</i> , 2011)	<i>D. dipsaci</i> (según Hooper, 1972)
Longitud de la espícula (µm)	24-27	17-21	15-20	23,5-28	23-28
Longitud de la bursa (como % de la longitud de la cola)	50-70	48-66	20-55	72-76	40-70
Preferencia de hospedante ³	Plantas superiores y micelios de hongos	Cacahuets (maníes) y hongos	Micelios de hongos	Plantas superiores	Plantas superiores y hongos

¹ SUP: saco uterino postvulvar (parte postvulvar del saco uterino).

² Calculado a partir de la descripción de la especie.

³ Útil en caso de que los criterios morfológicos sean confusos.

4.2 Identificación molecular

En caso necesario, la identificación de la especie, *D. dipsaci* o *D. destructor*, ~~podrá~~ puede realizarse mediante análisis molecular, especialmente cuando las especies se puedan confundir (p. ej., *D. myceliophagus*, *D. africanus* o *D. gigas*) y no sea posible distinguirlas de manera concluyente de la especie objetivo mediante el estudio morfológico.

~~Para ello~~ En este caso, la solución que contiene los especímenes de nematodo se debería almacenar preferentemente en condiciones de frío (es decir, refrigerada) durante no más de unos pocos días antes de la extracción del ADN.

En este protocolo de diagnóstico, los métodos (~~con inclusión de~~ incluyendo las referencias a nombres comerciales) se describen según se publicaron, ya que con ello se definió el nivel inicial de sensibilidad, especificidad y/o reproducibilidad adquirido. El uso de nombres de reactivos, productos químicos o equipo en estos protocolos de diagnóstico no implica su aprobación ni la exclusión de otros que también podrán ser adecuados. Los procedimientos de laboratorio presentados en los protocolos podrán ajustarse a las normas de los laboratorios individuales, siempre que estén adecuadamente validadas.

4.2.1 *Ditylenchus dipsaci*

Se han desarrollado diversos métodos moleculares para la identificación de *D. dipsaci*.

La diversidad genética entre las especies de *Ditylenchus* y el concepto de razas en la especie *D. dipsaci* se investigaron mediante hibridación de Southern (Wendt *et al.*, 1993) y electroforesis (Tenente y Evans, 1997; Palazova y Baicheva, 2002).

Asimismo se han investigado a fondo métodos moleculares, principalmente la RCPPCR o la RCPPCR-PLFRRLFP para la identificación de especies y la detección de la variabilidad poblacional mediante el análisis de secuencias ~~para el análisis de la variabilidad poblacional~~ (Leal-Bertioli *et al.*, 2000; Zouhar *et al.*, 2002).

Se han publicado seis pruebas moleculares (RCPPCR, RCPPCR-RLFPLFR) que se pueden utilizar para la identificación de *D. dipsaci* y que se describen en las secciones 4.2.4 a 4.2.9. En la descripción

de cada prueba se incluye su especificidad, así como el género y la especie de nematodo utilizados para evaluar la prueba.

El análisis molecular de secuencias de ADN ribosómico (ADNr) de diferentes regiones (la región ITS1-5.8S-ITS2 [donde ITS son las siglas en inglés de “espaciador transcrito interno”], el fragmento D2-D3 del gen 28S, la subunidad pequeña 18S, un fragmento del gen mitocondrial de la *citocromo c oxidasa I* [ADN mitocondrial o ADNmt] y las secuencias génicas *hsp90* [ADN nuclear o ADNn]) permite distinguir claramente *D. gigas* de *D. dipsaci* s.s. (Vovlas *et al.*, 2011).

4.2.2 *Ditylenchus destructor*

El diagnóstico molecular de *D. destructor* ~~mediante análisis molecular~~ se basa en la RCPPCR-PLFRRFLP o en la secuenciación de la región ITS del gen del ARNr.

Wendt *et al.* (1993) demostraron que la RCPPCR-RFLPPLFR de la región ITS permitía distinguir especímenes de *D. destructor* parásitos de la papa de dos razas de *D. dipsaci* y de *D. myceliophagus* y publicaron los patrones de diagnóstico mediante RLFPPLFR de las tres especies. *D. africanus* se puede distinguir de *D. destructor* mediante una combinación de los siguientes caracteres: PLFR-RFLP generados por siete enzimas de restricción en la región ITS del ADNr.

Ji *et al.* (2006) determinaron los patrones de PLFR-RFLP de varias poblaciones de *D. destructor* de la batata y revelaron varias diferencias entre ellos.

Powers *et al.* (2001) secuenciaron por primera vez la región ITS1 de *D. dipsaci*, pero la base de datos GenBank contiene actualmente más de 50 registros de fragmentos de ARNr de *D. destructor* ~~obtenidos~~ recogidos en distintas localidades y plantas hospedantes.

4.2.3 Extracción de ADN

Se transfieren varios juveniles o adultos a un microtubo y se extrae el ADN según se describe en Webster *et al.* (1990).

4.2.4 ~~Análisis mediante Prueba~~ RCPPCR-RLFPPLFR de la región ITS del ADNr para ~~la~~ identificación de *D. dipsaci* y *D. destructor*

Estae ~~análisis~~prueba fue desarrolladae por Wendt *et al.* (1993).

Metodología

En estae ~~análisis~~prueba se utilizan como cebadores universales las siguientes secuencias de la región ITS del ADNr (según se describen en Vrain *et al.* [1992]):

18S: 5'-TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT-3'

26S: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3'

Los amplicones correspondientes a *D. dipsaci* y *D. myceliophagus* tienen 900 pares de bases (pb), y el correspondiente a *D. destructor* tiene 1 200 pb.

La amplificación se realiza con equipos-kits de PCR que contienen ADN polimerasa Taq, nucleótidos y tampón de reacción, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Los parámetros de ciclado de la ~~PCR~~¹ consisten en un primer ciclo de 1,5 min a 96 °C, 30 s a 50 °C y 4 min a 72 °C; 40 ciclos de 45 s a 96 °C, 30 s a 50 °C y 4 min a 72 °C; y un ciclo final de 45 s a 96 °C, 30 s a 50 °C y 10 min a 72 °C. Tras la amplificación del ADN, 2-5 µl del producto se revelan en un gel de agarosa al 1%. El remanente se almacena a -20 °C y se utiliza para analizar los ~~PCR~~ RFLP. Varias enzimas de restricción son útiles para distinguir *D. destructor* y *D. dipsaci* de otras especies de *Ditylenchus*; por ejemplo, *HaeIII*, *HpaII*, *HinfI* y *RsaI* (Wendt *et al.*, 1993). En el Cuadro 3 se indican las longitudes de los fragmentos de restricción generados por estas enzimas de diagnóstico.

¹ Los parámetros de ciclado de la ~~RCP-PCR~~ son los descritos en el artículo original (Wendt *et al.*, 1993). Las mejoras en los termocicladores y los reactivos para la ~~RCP-PCR~~ podrán conllevar la revisión de estos parámetros de ciclado.

Cuadro 3. Longitud aproximada (pb) de los fragmentos RFLP-de-restricción de la región ITS del ADNr de especies de *Ditylenchus* generados por cuatro enzimas de restricción

Enzima	<i>D. destructor</i>	<i>D. myceliophagus</i>	<i>D. dipsaci</i>	<i>D. gigas</i> ¹	<i>D. africanus</i>
Producto de la <u>RCP-PCR</u> sin restricción	1 200	900	900	900	1 000
<i>HaeIII</i>	450, 170	450, 200	900	800, 200	650, 540
<i>HpaII</i>	1 000	900	320, 200, 180	600, 200	950
<i>HinfI</i>	780, 180	630, 310	440, 350, 150	350, 150	450, 340, 150, 130, 100
<i>RsaI</i>	600, 250, 170	900	450, 250, 140	490, 450	690, 450

Fuente: Wendt *et al.* (1993, 1995).

pb: pares de bases; ITS: espaciador transcrito interno; RCP-PCR: reacción en cadena de la polimerasa; RLFP-PCR: polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción; ARNr: ARN ribosómico.

¹ Denominado raza gigante de *D. dipsaci* en la publicación original.

4.2.5 Prueba de RCP-PCR basada en SCAR para la identificación de D. dipsaci

Esta prueba de RCP-PCR basada en regiones amplificadas caracterizadas por secuencias (SCAR) desarrollada por Esquibet *et al.* (2003) se diseñó como prueba específica a nivel de especie para *D. dipsaci*, diferenciando entre las razas normal y gigante. Se evaluó respecto a *D. myceliophagus* (una población), la raza normal de *D. dipsaci* (11 poblaciones de diferentes hospedantes y procedencias) y la raza gigante de *D. dipsaci*, descrita como *D. gigas* por Vovlas *et al.* (2011) (11 poblaciones de distintas procedencias aisladas de *V. faba*).

Metodología

Los cebadores específicos para *D. dipsaci* utilizados son:

D. dipsaci (raza normal):

H05: 5' -TCA AGG TAA TCT TTT TCC CCA CT-3'

H06: 5'-CAACTG CTA ATG CGT GCT CT-3'

D. dipsaci (raza gigante, descrita como *D. gigas* por Vovlas *et al.* (2011)):

D09: 5' -CAA AGT GTT TGA TCG ACT GGA-3'

D10: 5'-CAT CCC AAA ACA AAG AAA GG-3'

El amplicón correspondiente a *D. dipsaci* (raza normal) tiene aproximadamente 242 pb y el correspondiente a *D. dipsaci* (raza gigante) 198 pb. Con ambos pares de cebadores no se observa amplificación con especies y razas distintas de la especie y raza no-objetivo (Esquibet *et al.*, 2003).

Los 10 µl de la mezcla de la RCP-PCR están compuestos por: 1,5 mM de MgCl₂, 250 µM de cada dNTP, 690 nM de cada cebador para la RCP-PCR dúplex (H05-H06) o (D09-D10) o 500 nM de cada cebador

para la **RCP-PCR** múltiplex (H05-H06-D09-D10) y 0,5 U de polimerasa de ADN Taq. Los parámetros de ciclado son: desnaturalización inicial de 3 min a 94 °C; 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 59 °C y 1 min a 72 °C; y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de la **RCP-PCR** se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa.

4.2.6 Prueba de **PCR-RCP** específica para 18S e ITS1 para ~~la identificación de~~ *D. dipsaci*

Esta prueba desarrollada por Subbotin *et al.* (2005) se diseñó como prueba específica para *D. dipsaci* s.s. (solo la raza normal). Se evaluó respecto a *D. destructor* (una población), la raza normal de *D. dipsaci* (18 poblaciones de diferentes hospedantes y procedencias) y *Ditylenchus* sp. (12 poblaciones de distintos hospedantes y procedencias).

Metodología

Los cebadores específicos para *D. dipsaci* utilizados son:

ADNrDNA2: 5' -TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3' -(Vrain *et al.*, 1992)

DitNF1: 5'-TTA TGA CAA ATT CAT GGC GG-3'

El amplicón correspondiente a *D. dipsaci* s.s. (no incluye la raza gigante, más tarde llamada *D. gigas*) tiene aproximadamente 263 pb. No se observa amplificación con especies ~~distintas de la especie no~~ objetivo.

Los 25 µl de la mezcla de la **RCP-PCR** están compuestos por: 1× de tampón de **RCP-PCR** 10× con 15 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 60 nM de cada cebador y 1 U de polimerasa de ADN Taq. La **RCP-PCR** se realiza en un termociclador de tipo Peltier de 96 pocillos (PTC100, MJ Research²) con los siguientes parámetros de ciclado: una fase inicial de 4 min a 94 °C; 35 ciclos de 15 s a 94 °C, 30 s a 57 °C y 30 s a 72 °C; y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de la **RCP-PCR** se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa.

4.2.7 Prueba de **RCP-PCR** específica para ADNr 5.8S para ~~la identificación de~~ *D. dipsaci*

Esta prueba desarrollada por Marek *et al.* (2005) se diseñó como prueba específica para *D. dipsaci*. Se evaluó respecto a *D. dipsaci* (tres poblaciones europeas de diferentes hospedantes) y poblaciones de géneros no ~~buscados-objetivo~~ (*Globodera pallida*, *Bursaphelenchus xylophilus*, *Rhabditis* spp.).

Metodología

Se crearon dos pares de cebadores específicos para la identificación de *D. dipsaci*, pero el más sensible (detección de 10 pg de ADN objetivo) fue:

PF1: 5' -AAC GGC TCT GTT GGC TTC TAT-3'

PR1: 5'-ATT TAC GAC CCT GAG CCA GAT-3'

Con este par de cebadores el amplicón correspondiente a *D. dipsaci* tiene aproximadamente 327 pb.

Los 25 µl de la mezcla de la **RCP-PCR** están compuestos por: tampón de Taq 1×, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 10 pmol de cada cebador (par de cebadores PF1-PR1) y 1,5 U de polimerasa de

² En este protocolo de diagnóstico, los métodos (con inclusión de las referencias a nombres comerciales) se describen según se publicaron, ya que con ello se definió el nivel inicial de sensibilidad, especificidad y/o reproducibilidad adquirido. El uso de nombres de reactivos, productos químicos o equipo en estos protocolos de diagnóstico no implica su aprobación ni la exclusión de otros que también podrán ser adecuados. Los procedimientos de laboratorio presentados en los protocolos podrán ajustarse a las normas de los laboratorios individuales, siempre que estén adecuadamente validadas.

ADN Taq (Fermentas²). La prueba de **RCP-PCR** se realiza en un termociclador de tipo Peltier de 96 pocillos (PTC200, MJ Resarch²) con los siguientes parámetros de ciclado: 3 min a 94 °C; 30 ciclos de 2 min a 94 °C, 30 s a 62 °C y 2 min a 72 °C; y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de la **RCP-PCR** se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa.

4.2.8 Prueba de **RCP-PCR** específica para ADNr 5.8S e ITS para la identificación de *D. dipsaci*

Esta prueba desarrollada por Kerkoud *et al.* (2007) se diseñó como prueba específica para *D. dipsaci*. Se evaluó respecto a *D. dipsaci* (diez poblaciones de diferentes hospedantes y procedencias), *D. africanus*, *D. destructor*, *D. myceliophagus*, *Aphelenchoides ritzemabosi* (una población por cada especie) y *Ditylenchus* sp. (según la publicación y actualmente descrita como *D. gigas*) (diez poblaciones de distintas procedencias aisladas de *V. faba*).

Metodología

Se utilizan dos pares de cebadores específicos, uno para la identificación de *D. dipsaci* solamente y otro para la identificación de *D. gigas* y *D. dipsaci*. La utilización de ambos pares de cebadores permite distinguir a *D. gigas* de *D. dipsaci*. Estos cebadores son:

Primer par de cebadores:

DdpS1: 5' -TGG CTG CGT TGA AGA GAA CT-3'

ADNrDNA2: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3' (Vrain *et al.*, 1992)

El amplicón correspondiente a *D. dipsaci* tiene aproximadamente 517 pb. No se observa amplificación de especies no **buscadas objetivo**, incluida *D. gigas*.

Segundo par de cebadores:

DdpS2: 5' -CGA TCA ACC AAA ACA CTA GGA ATT-3'

ADNrDNA2: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3' (Vrain *et al.*, 1992)

El amplicón correspondiente a *D. dipsaci* y *D. gigas* tiene aproximadamente 707 pb.

Los 20 µl de la mezcla de la **RCP-PCR** están compuestos por: 1,5 mM de tampón de amplificación con una concentración final de 5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada cebador (en la **RCP-PCR** simplex con DdpS1-**ADNrDNA2** o DdpS2-**ADNrDNA2**; en la **RCP-PCR** dúplex, la concentración final de cebador DdpS1 es de 0,5 µM, mientras que es de 1 µM para DdpS2 y **ADNrDNA2**) y 1 U de polimerasa de ADN Taq (MP Biomedicals²). La **RCP-PCR** se realiza en un termociclador de tipo Peltier de 96 pocillos (GeneAmp 9600 PCR System, Perkin Elmer²) con los siguientes parámetros de ciclado: 1 min a 94 °C; 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 45 s a 72 °C; y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de la **RCP-PCR** se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa.

4.2.9 Prueba de **RCP-PCR** basada en SCAR para la identificación de *D. dipsaci*

Esta prueba de **RCP-PCR** basada en SCAR desarrollada por Zouhar *et al.* (2007) se diseñó como prueba específica para *D. dipsaci*. Se evaluó solamente respecto a *D. dipsaci* (diez poblaciones europeas de diferentes hospedantes).

Metodología

Se diseñaron dos pares de cebadores específicos para la identificación de *D. dipsaci*:

Primer par de cebadores:

DIT_2 forward: 5' -GCA ATG CAC AGG TGG ATA AAG-3'

DIT_2 reverse: 5'-CTG TCT GTG ATT TCA CGG TAG AC-3'

Con este par de cebadores el amplicón correspondiente a *D. dipsaci* tiene aproximadamente 325 pb.

Segundo par de cebadores:

DIT_5 forward: 5' -GAA AAC CAA AGA GGC CGT AAC-3'

DIT_5 reverse: 5'-ACC TGA TTC TGT ACG GTG CAA-3'

Con este par de cebadores el amplicón correspondiente a *D. dipsaci* tiene aproximadamente 245 pb.

Los 25 µl de la mezcla de la **RCP-PCR** están compuestos por: tampón de **RCP-PCR** 1× (Fermentas²), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 10 pmol de cada cebador (bien del par de cebadores DIT_2 o del DIT_5), 1,5 U de polimerasa de ADN Taq (Fermentas²) y 50 ng de ADN como molde. La **RCP-PCR** se realiza en un termociclador de tipo Peltier de 96 pocillos (PTC200, MJ Research²) con los siguientes parámetros de ciclado: 3 min a 94 °C; 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 30 s a 60 °C y 1 min a 72 °C; y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de la **RCP-PCR** se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa.

4.2.10 Controles para las pruebas moleculares

Para considerar fidedigno el resultado de las pruebas, en cada serie de aislamiento de ácidos nucleicos y de amplificación del ácido nucleico de la plaga objetivo o del ácido nucleico objetivo se deberían tener en cuenta los controles adecuados, que dependerán del tipo de prueba utilizada y del grado de certidumbre necesario requerido. Deberían utilizarse, como mínimo, un control positivo de ácido nucleico, un control negativo de amplificación y un control negativo de extracción.

Control positivo de ácido nucleico. Este control se utiliza para hacer un seguimiento de la eficiencia de la amplificación (además así como de la extracción). Se podrá utilizar ácido nucleico previamente preparado (almacenado) del nematodo objetivo.

Control negativo de amplificación (control sin molde). Este control es necesario para la **RCP-PCR** convencional a fin de descartar falsos positivos por contaminación durante la preparación de la mezcla de reacción. El agua de calidad apta para **RCP-PCR** que se utilizó para preparar la mezcla de reacción se añade en la fase de amplificación.

Control negativo de extracción. Este control se utiliza para hacer un seguimiento de la contaminación durante la extracción del ácido nucleico. El control comprende la extracción del ácido nucleico y la posterior amplificación solamente del tampón de extracción. Cuando se prevé analizar un gran número de muestras positivas se recomienda utilizar ~~varios~~ controles múltiples.

4.2.11 Interpretación de los resultados de la **RCP-PCR** convencional

La **RCP-PCR** específica del patógeno solo se considerará válida si se cumplen los dos criterios siguientes:

- el control positivo produce un amplicón del tamaño correcto para la especie de nematodo objetivo,
- no se producen amplicones del tamaño correcto para la especie de nematodo objetivo en el control negativo de extracción ni en el control negativo de amplificación.

5. Registros

Los registros y las pruebas-evidencias deberían conservarse según lo descrito en la NIMF 27 (*Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas*).

En los casos en los que otras partes contratantes puedan verse afectadas en forma desfavorable por el diagnóstico, los registros y las pruebas-evidencias (en particular, especímenes preservados o montados en portaobjetos, fotografías de estructuras morfológicas distintivas, extractos de ADN y fotografías de geles, según corresponda) deberían conservarse por lo menos durante un año.

6. Puntos de contacto para información adicional

Puede obtenerse información adicional sobre este protocolo en las siguientes fuentes:

Biosystematics Division, ARC-PPRI, Private Bag X134, Queenswood, 0121 República de Sudáfrica (Antoinette Swart; correo electrónico: SwartA@arc.agric.za).

Plant Pest Diagnostic Center, California Department of Food and Agriculture, 3294 Meadowview Road, Sacramento, CA 95832-1448, Estados Unidos de América (Sergei Subbotin; correo electrónico: subbotin@ucr.edu).

Charlottetown Laboratory – Potato Diseases, Canadian Food Inspection Agency, 93 Mount Edward Rd, Charlottetown PEI, C1A 5T1, Canadá (Harvinder Bennypaul; correo electrónico: bennypaulhs@inspection.gc.ca).

Podrán presentar una solicitud de revisión de un protocolo de diagnóstico las organizaciones nacionales de protección fitosanitaria (ONPF), las organizaciones regionales de protección fitosanitaria (ORPF) o los órganos auxiliares de la Comisión de Medidas Fitosanitarias (CMF) a través de la Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (ippc@fao.org), que a su vez remitirá la solicitud al Grupo técnico sobre protocolos de diagnóstico (GTPD).

7. Agradecimientos

El presente protocolo fue redactado por Antoinette Swart (Unidad de nematología, División de biosistemática, ARC-PPRI, República de Sudáfrica), Eliseo Jorge Chaves (INTA-Estación Experimental de Balcarce, Laboratorio de Nematología, Argentina) y Renata C.V. Tenente (EMBRAPA, Recursos Genéticos y Biotecnología, Brasil).

La descripción de las técnicas moleculares fue realizada por Sergei Subbotin (Centro de diagnóstico de plagas vegetales, Departamento de Alimentos y Agricultura de California, 3294 Meadowview Road, Sacramento, CA 95832-1448, Estados Unidos de América).

Los siguientes nematólogos mejoraron el protocolo con sus observaciones:

- Harvinder Bennypaul (Agencia Canadiense de Inspección de Alimentos, Canadá)
- Johannes Hallmann (Instituto Julius Kühn, Alemania)
- Mikhail Pridannikov (Centro de Parasitología, Instituto de Ecología y Evolución A.N. Severtsov, Rusia)
- P. Castillo (Instituto de Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, España).

8. Referencias

La presente norma refiere a las Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias (NIMF). Las NIMF se encuentran disponibles en el Portal fitosanitario internacional (PFI): <https://www.ippc.int/es/core-activities/standards-setting/ispm>.

- Andrássy, I.** 1984. *Klasse Nematoda (Ordnungen Monhysterida, Desmoscolecida, Araeolaimida, Chromadorida, Rhabditida)*. En *Bestimmungsbücher zur Bodenfauna Europas*, págs. 24-25. Stuttgart (Alemania), Gustav Fischer Verlag. 509 págs.
- Andrássy, I.** 2007. *Free-living nematodes of Hungary (Nematoda Errantia) II*. En *Pedazoológica Hungarica*, n.º 4, págs. 145-154. Budapest, Museo de historia natural de Hungría y Grupo de investigación de zoología sistemática de la Academia Húngara de las Ciencias. 496 págs.
- Andrássy, I. y Farkas, K.** 1988. *Kertészeti növények fonálféreg kártevői*. Budapest (Hungría), Mezőgazdasági Kiadó, págs. 181-198. 418 págs.
- Barker, J.R. y Lucas, G.B.** 1984. *Nematode parasites of tobacco*. En *Plant and insect nematodes* (W.R. Nickle, ed.), págs. 213-242. Nueva York (Estados Unidos de América), Marcel Dekker Inc. 925 págs.
- Bridge, J. y Hunt, D.** 1986. *Nematodes*. En *Pest control in tropical onions*, págs. 65-77. Londres (Reino Unido), Instituto de desarrollo tropical e investigación y Oficina de la Administración de Desarrollo de Ultramar, Instituto de desarrollo tropical e investigación, 109 págs.
- Brodie, B.B.** 1998. *Potato*. En *Plant and nematode interactions* (K.R. Barker, G.A. Pederson y G.L. Windham, eds.), págs. 567-594. Madison, WI (Estados Unidos de América), American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. y Soil Science Society of America, Inc. 772 páginas.
- Brown, D.J.F., Dalmasso, A. y Trudgill, D.L.** 1993. *Nematode pests of soft fruits and vines*. En *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture* (K. Evans, D.L. Trudgill y J.M. Webster, eds.), págs. 427-462. Wallingford (Reino Unido), CABI. 656 págs.
- Brzeski, M.W.** 1998. *Nematodes of Tylenchina in Poland and temperate Europe*. Varsovia (Polonia), Museo e Instituto de Zoología, Academia Polaca de las Ciencias. 397 págs.
- Chizhov, V.N., Borisov, B.A. y Subbotin, S.A.** 2010. *A new stem nematode, Ditylenchus weischeri sp.n. (Nematoda: Tylenchida), a parasite of Cirsium arvense (L) Scop. in the Central Region of the Non-Chernozem Zone of Russia*. *Russian Journal of Nematology*, 18, págs. 95-102.
- Cook, R. y Yeates, G.W.** 1993. *Nematode pests of grassland and forage crops*. En *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture* (K. Evans, D.L. Trudgill y J.M. Webster, eds.), págs. 305-350. Wallingford (Reino Unido), CABI. 656 págs.
- Cooke, D.** 1993. *Nematode parasites of sugarbeet*. En *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture* (K. Evans, D.L. Trudgill y J.M. Webster, eds.), págs. 133-169. Wallingford (Reino Unido), CABI. 656 págs.
- Coolen, W.A. y D'Herde, C.J.** 1972. *A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue*. Gante (Bélgica), Ministerio de Agricultura, Centro de Investigación Agrícola Estatal. 77 págs.
- Courtney, W.D.** 1962. *Stem nematode of red clover in the Pacific Northwest*. *Bulletin of the Washington State Agricultural Experiment Station*, 640, págs. 1-17.
- Dallimore, C.E. y Thorne, G.** 1951. *Infection of sugar beets by Ditylenchus destructor Thorne, the potato rot nematode*. *Phytopathology*, 41, págs. 872-874.
- De Ley, P. y Blaxter, M.** 2003. *A new system for Nematoda: Combining morphological characters with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa*. *Nematological Monographs and Perspectives*, 2, págs. 1-21.
- Edwards, E.E.** 1937. *On the eelworm disease of primulas caused by Anguillula dipsaci, Kühn*. *Journal of Helminthology*, 15, págs. 221-232.
- EPPO** (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas). 2013a. *PQR: EPPO Plant Quarantine Data Retrieval System*. (Disponible en: <http://www.eppo.org/DATABASES/pqr/pqr.htm>).
- EPPO** (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas). 2013b. *Diagnostic protocols for regulated pests. Pictorial glossary of morphological terms in nematology*.

- Documento técnico de la EPPO N.º 1056 (Rev. 4). (Disponible en: http://www.eppo.int/QUARANTINE/diag_activities/EPPO_TD_1056_Glossary.pdf).
- EPPO** (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas). 2013c. *Nematode extraction*. EPPO Standard PM 7/119(1). *EPPO Bulletin*, 43, págs. 471-485.
- Esquibet, M., Grenier, E., Plantard, O., Andaloussi, F.A. y Caubel, G.** 2003. *DNA polymorphism in the stem nematode Ditylenchus dipsaci: Development of diagnostic markers for normal and giant races*. *Genome*, 46, págs. 1077-1083.
- Evans, K. y Trudgill, D.L.** 1992. *Pest aspects of potato production Part 1. The nematode pests of potato*. En *The potato crop* (P.M. Harris, ed.), 2.ª edición, págs. 438-475. Londres (Reino Unido), Chapman and Hall. 909 págs.
- Ferris, J.M. y Ferris, V.R.** 1998. *Biology of plant parasitic nematodes*. En *Plant and nematode interactions* (K.R. Barker, G.A. Pederson y G.L. Windham, eds.), págs. 21-36. Madison, WI (Estados Unidos de América), American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. y Soil Science Society of America, Inc. 772 páginas.
- Filipjev, I.N.** 1936. *On the classification of the Tylenchinae*. En *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 3, págs. 80-82.
- Flegg, J.J.M. y Hooper, D.J.** 1970. *Extraction of free-living stages from soil*. En *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes* (J.F. Southey, ed.), Technical Bulletin 2, págs. 5-22. Londres (Reino Unido), Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 148 págs.
- Goodey, J.B.** 1952. *The influence of the host on the dimensions of the plant parasitic nematode, Ditylenchus destructor*. *Annals of Applied Biology*, 30, págs. 468-474.
- Goodey, J.B.** 1963. *Soil and freshwater nematodes*. Harpenden (Reino Unido), Departamento de Nematología, Estación Experimental de Rothamsted y London, Methuen & Co. Ltd. 544 págs.
- Griffin, G.D.** 1985. *Nematode parasites of alfalfa, cereals and grasses*. En *Plant and insect nematodes* (W.R. Nickle, ed.), págs. 243-322. Nueva York (Estados Unidos de América), Marcel Dekker Inc. 925 págs.
- Hesling, J.J.** 1974. *Ditylenchus myceliophagus*. *CIH descriptions of plant-parasitic nematodes*, Set 3, No. 36. St Albans (Reino Unido) Commonwealth Institute of Helminthology (CIH). 4 págs.
- Heyns, J.** 1971. *A guide to the plant and soil nematodes of South Africa*. Ciudad del Cabo (Sudáfrica), A.A. Balkema. 233 págs.
- Hooper, D.J.** 1972. *Ditylenchus dipsaci*. *CIH descriptions of plant-parasitic nematodes*, Set 1, No. 14. St Albans (Reino Unido) Commonwealth Institute of Helminthology (CIH). 4 págs.
- Hooper, D.J.** 1973. *Ditylenchus destructor*. *CIH descriptions of plant-parasitic nematodes*, Set 2, No. 21. St Albans (Reino Unido) Commonwealth Institute of Helminthology (CIH). 4 págs.
- Hooper, D.J.** 1986. *Extraction of nematodes from plant tissue*. En *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes* (J.F. Southey, ed.), Reference Book 402, 6.ª ed., págs. 51-58. Londres (Reino Unido), Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 202 págs.
- Hooper, D.J., Hallmann, J. y Subbotin, S.A.** 2005. *Methods for extraction, processing and detection of plant and soil nematodes*. En *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture* (M. Luc, R.A. Sikora y J. Bridge, eds.), 2.ª ed., págs. 53-86. Wallingford (Reino Unido), CABI. 871 págs.
- Jeszke, A., Budziszewska, M., Dobosz, R., Stachowiak, A., Protasewicz, D., Wieczorek, P. y Obreńska-Stęplowska, A.** 2013. *A comparative and phylogenetic study of the Ditylenchus dipsaci, Ditylenchus destructor and Ditylenchus gigas populations occurring in Poland*. (Comunicación breve) *Journal of Phytopathology*, 162, págs. 61-67.
- Ji, L., Wang, J.C., Yang, X.L., Huang, G.M. y Lin, M.S.** 2006. *[PCR-RFLP patterns for differentiation of three Ditylenchus species.] Revista de la Facultad de Agricultura de Nanjing*, 29, págs. 39-43 (en chino).
- Johnson, C.S.** 1998. *Tobacco*. En *Plant and nematode interactions* (K.R. Barker, G.A. Pederson y G.L. Windham, eds.), págs. 487-522. Madison, WI (Estados Unidos de América), American Society

- of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. y Soil Science Society of America, Inc. 772 páginas.
- Karssen, G. y Willemsen, N.M.** 2010. *The spiculum: An additional useful character for the identification of Ditylenchus dipsaci and D. destructor (Nematoda: Anguinidae)*. *EPPO Bulletin* 40, págs. 211-212.
- Kerkoud, M., Esquibet, M. y Plantard, O.** 2007. *Identification of Ditylenchus species associated with Fabaceae seeds based on a specific polymerase chain reaction of ribosomal DNA-ITS regions*. *European Journal of Plant Pathology*, 118, págs. 323-332.
- Kleynhans, K.P.N.** 1997. *Collecting and preserving nematodes. A manual for a practical course in nematology by SAFRINET, the southern African (SADC) LOOP of BioNET-INTERNATIONAL, ARC*. Pretoria (Sudáfrica), Institución de investigación para la protección vegetal. 52 págs.
- Kühn, J.** 1857. *Über das Vorkommen von Anguillulen in erkrankten Blüthenköpfen von Dipsacus fullonum L.*, *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, 9, págs. 129-137.
- Leal-Bertioli, S.C.M., Tenente, R.C.V. y Bertioli, D.J.** 2000. *ITS sequence of populations of the plant-parasitic nematode Ditylenchus dipsaci*. *Nematologia Brasileira*, 24, págs. 83-85.
- Marek, M., Zouhar, M., Rysanek, P. y Havranek, P.** 2005. *Analysis of ITS sequences of nuclear rDNA and development of a PCR-based assay for the rapid identification of the stem nematode Ditylenchus dipsaci (Nematoda: Anguinidae) in plant tissues*. *Helminthologia*, 42, págs. 49-56.
- McDonald, A.H. y Nicol, J.M.** 2005. *Nematode parasites of cereals*. En *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture* (M. Luc, R.A. Sikora y J. Bridge, eds.), 2.ª ed., págs. 131-192. Wallingford (Reino Unido), CABI. 896 págs.
- Mollov, D.S., Subbotin, S.A. y Rosen, C.** 2012. *First report of Ditylenchus dipsaci on garlic in Minnesota*. *Plant Disease*, 96, pág. 1707.
- Nemapix.** pág. 1999. J.D. Eisenback y U. Zunke, eds. *A journal of nematological images*, Vol. 2. Blacksburg, Virginia (Estados Unidos de América), Mactode Publications.
- Nemapix.** 2000. J.D. Eisenback y U. Zunke, eds. *A journal of nematological images*, Vol. 1., 2.ª ed. Blacksburg, Virginia (Estados Unidos de América), Mactode Publications.
- Nemapix.** pág. 2002. J.D. Eisenback y U. Zunke, eds. *A journal of nematological images*, Vol. 3. Blacksburg, Virginia (Estados Unidos de América), Mactode Publications.
- Netscher, C. y Sikora, J.W.** pág. 1990. *Nematodes in vegetables*. En *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture* (M. Luc, R.A. Sikora y J. Bridge, eds.), 2.ª ed., págs. 237-283. Wallingford (Reino Unido), CABI. 896 págs.
- Oliveira, R.D.L., Santin, Â.M., Seni, D.J., Dietrich, A., Salazar, L.A., Subbotin, S.A., Mundo-Ocampo, M., Goldenberg, R. y Barreto, R.W.** 2013. *Ditylenchus gallaeformans sp.n. (Tylenchida: Anguinidae): A neotropical nematode with biocontrol potential against weedy Melastomataceae*. *Nematology*, 15, págs. 179-196.
- Palazova, G. y Baicheva, O.** 2002. *Electrophoretic studies of Ditylenchus dipsaci (Kuhn, 1857) Filipjev, 1936 from two hosts: Allium sativum and Allium cepa*. *Experimental Pathology and Parasitology*, 5, págs. 39-40.
- Palmisano, A.M., Tacconi, R. y Trotti, G.C.** 1971. *Sopravvivenza di Ditylenchus dipsaci (Kühn) Filipjev Nematoda: tylenchidae) al processo digestivo nei suini, equini e bovini*. *Redia*, 52, págs. 725-737.
- Potter, J.W. y Olthof, T.H.A.** 1993. *Nematode pests of vegetable crops*. En *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture* (K. Evans, D.L. Trudgill y J.M. Webster, eds.), págs. 171-208. Wallingford (Reino Unido), CABI. 656 págs.
- Powers, T.O., Szalanski, A.L., Mullin, P.G., Harris, T.S., Bertozzi, T. y Griesbach, J.A.** 2001. *Identification of seed gall nematodes of agronomic and regulatory concern with PCR-RFLP of ITS1*. *Journal of Nematology*, 33, págs. 191-194.

- Rivoal, R. y Cook, R.** 1993. *Nematode pests of cereals*. En *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture* (K. Evans, D.L. Trudgill y J.M. Webster, eds.), págs. 259-304. Wallingford (Reino Unido), CABI. 656 págs.
- Roberts, H.** 1981. *New or unusual host-plant records for plant-parasitic nematodes, 1977-80*. *Plant Pathology*, 30, 182.
- Rojankovski, E. y Ciurea, A.** 1986. *Contributions to the study of interactions between the potato rot nematode, Ditylenchus destructor Thorne, and fungi in the potato disease complex*. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz*, 22, págs. 101-106.
- Seinhorst, J.W.** 1959. *A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin*. *Nematologica*, 4, págs. 67-69.
- Siddiqi, M.R.** 2000. *Tylenchida parasites of plants and insects*, 2.ª ed. Wallingford (Reino Unido), CABI. 864 págs.
- Sikora, R.A., Greco, N. y Silva, J.F.V.** 2005. *Nematode parasites of food legumes*. En *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture* (M. Luc, R.A. Sikora y J. Bridge, eds.), 2.ª ed., págs. 259-318. Wallingford (Reino Unido), CABI. 896 págs.
- Sousa, A.I., Gomes, V.F. y Tenente, R.C.V.** 2003. *Tratamento físico aplicado as sementes de melao (Cucumis melo L.), importadas da Holanda, na erradicação de Ditylenchus dipsaci (Khun, 1857) Filipjev, 1936*. *Nematologia Brasileira*, 27, págs. 223-225.
- Southey, J.F.** 1993. *Nematodes of ornamental and bulb crops*. En *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture* (K. Evans, D.L. Trudgill y J.M. Webster, eds.), págs. 463-500. Wallingford (Reino Unido), CABI. 656 págs.
- Sturhan, D. y Brzeski, M.W.** 1991. *Stem and bulb nematodes, Ditylenchus spp.* En *Manual of Agricultural Nematology*, (W.R. Nickle, ed.), págs. 423-464. Nueva York (Estados Unidos de América), Marcel Decker Inc. 1064 págs.
- Subbotin, S.A., Madani, M., Krall, E., Sturhan, D. y Moens, M.** 2005. *Molecular diagnostics, taxonomy and phylogeny of the stem nematode Ditylenchus dipsaci species complex based on the sequences of the ITS-rDNA*. *Phytopathology*, 95, págs. 1308-1315.
- Tenente, R.C.V. y Evans, A.A.F.** 1997. *Electrophoresis of proteins from several races of Ditylenchus dipsaci recovered from dried infested courgette tissue*. *Nematologia Brasileira*, 21, págs. 84-91.
- Thorne, G.** 1945. *Ditylenchus destructor, n. sp., the potato rot nematode, and Ditylenchus dipsaci (Kuhn, 1857) Filipjev, 1936, the teasel nematode (Nematoda: Tylenchidae)*. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 12, págs. 27-33.
- Van der Vegte, F.A. y Daiber, K.C.** 1983. *A preliminary report on the occurrence of Ditylenchus destructor on the ornamental Liatris spicata and efforts to eradicate the former*. *Actas del 6.º Simposio y Asamblea General de la Sociedad Nematológica del África austral*.
- Viglierchio, D.R.** 1971. *Race genesis in Ditylenchus dipsaci*. *Nematologica*, 17, págs. 386-392.
- Viscardi, T. y Brzeski, M.W.** 1993. *DITYL: Computerized key for species identification of Ditylenchus (Nematoda: Anguinidae)*. *Fundamental and Applied Nematology*, 16, págs. 389-392.
- Vovlas, N., Troccoli, A., Palomares-Rius, J.E., De Luca, F., Liébanas, G., Landa, B.B., Subbotin, S.A. y Castillo, P.** 2011. *Ditylenchus gigas n.sp. parasitizing broad bean: A new stem nematode singled out from the Ditylenchus dipsaci species complex using a polyphasic approach with molecular phylogeny*. *Plant Pathology*, 60, págs. 762-775.
- Vrain, T.C., Wakarchuk, A.C., Levesque, A.C. y Hamilton, R.I.** 1992. *Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the Xiphinema americanum group*. *Fundamental and Applied Nematology*, 15, págs. 563-573.
- Webster, J. M., Anderson, R. V., Baillie, D. L., Beckenbach, K., Curran, J. y Rutherford, T.** 1990. *DNA probes for differentiating isolates of the pinewood nematode species complex*. *Revue de Nématologie*, 13, págs. 255-263.

- Wendt, K. R., Swart, A., Vrain, T. C. y Webster, J. M.** 1995. *Ditylenchus africanus sp.n. from South Africa: A morphological and molecular characterization. Fundamental and Applied Nematology*, 18, págs. 241-250.
- Wendt, K. R., Vrain, T. C. y Webster, J. M.** 1993. *Separation of three species of Ditylenchus and some host races of D. dipsaci by restriction fragment length polymorphism. Journal of Nematology*, 25, págs. 555-563.
- Zouhar, M., Marek, M., Douda, O., Mazáková, J. y Ryšánek, P.** 2007. *Conversion of sequence-characterized amplified region (SCAR) bands into high-throughput DNA markers based on RAPD technique for detection of the stem nematode Ditylenchus dipsaci in crucial plant hosts. Plant Soil and Environment*, 53, págs. 97-104.
- Zouhar, M., Marek, M., Licinio, J. y Ryšánek, P.** 2002. *Using point mutations in rDNA for differentiation of bioraces of Ditylenchus dipsaci from the Czech Republic. Plant Protection Science*, 38 (Especial 2), págs. 358-360.

9. Figuras



Figura 1. Semilla de *Vicia faba* ~~infectada~~^{infestada} por *Ditylenchus dipsaci*, con presencia de masas algodonosas (o "lana de nematodos").

Fotografía por gentileza de G. Caubel, Nemapix (1999).



Figura 2. *Allium sativum* ~~infectado~~^{infestado} por *Ditylenchus dipsaci*.

Fotografía por gentileza de G. Caubel, Nemapix (1999).



Figura 3. Plantas jóvenes de *Allium cepa* ~~infestadas~~ infectadas por *Ditylenchus dipsaci*.
Fotografía por gentileza de E. Hennig, State Plant Health and Seed Inspection Service, Torun (Polonia).



Figura 4. Bulbo de ajo ~~infestado~~~~infectado~~ por *Ditylenchus dipsaci*.
Fotografía por gentileza de G. Caubel, Nemapix (2002).



Figura 5. ~~Plantas de~~ *Narcissus* spp. ~~infestadas~~~~infectado~~ por *Ditylenchus dipsaci*.
Fotografía por gentileza de G. Caubel, Nemapix (1999).



Figura 6. Sección transversal de bulbo de *Narcissus* sp. infestado-infectado por *Ditylenchus dipsaci*. Fotografía por gentileza de C.W. Laughlin, Nemapix (2002).



Figura 7. Sección transversal de remolacha azucarera infestada-infectada por *Ditylenchus dipsaci*. Fotografía por gentileza de C. Hogger, Nemapix (1999).



Figura 8. Sección transversal de papa infestada-infectada por *Ditylenchus destructor* comparada con una papa no infestada-infectada.

Fotografía por gentileza de S. Ayoub, Nemapix (2000).



Figura 9. Papas con distintos grados-niveles de infestación por *Ditylenchus destructor*.

Fotografía por gentileza de H. Andersen.

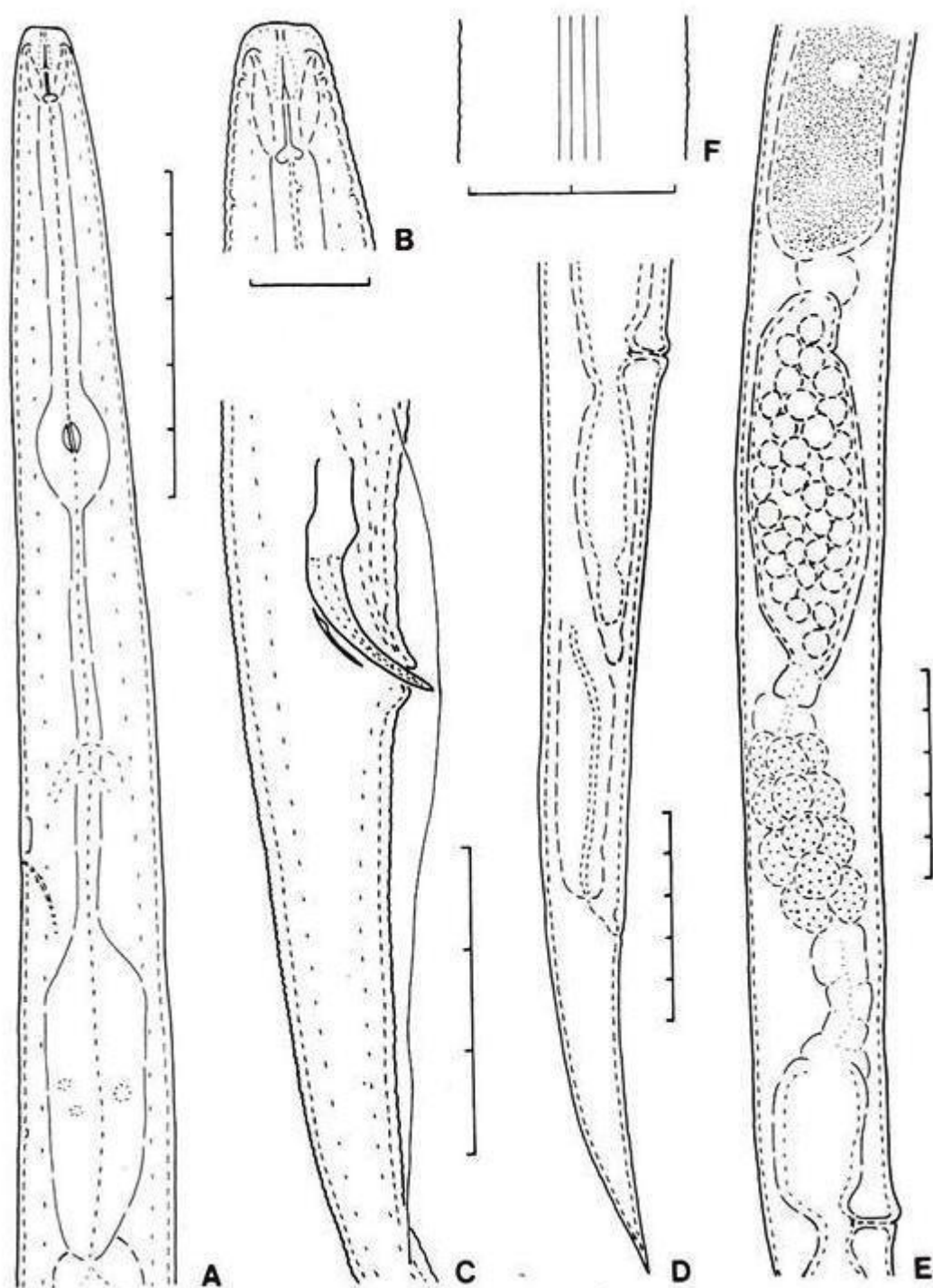


Figura 10. *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936 (según Sturhan y Brzeski, 1991). A) hembra, región esofágica; B) región cefálica de la hembra; C) macho, región de las espículas; D) hembra, región caudal; E) parte del aparato reproductor de la hembra, y F) banda lateral en la región media. Cada unidad de las barras de medida equivale a 10 μm .

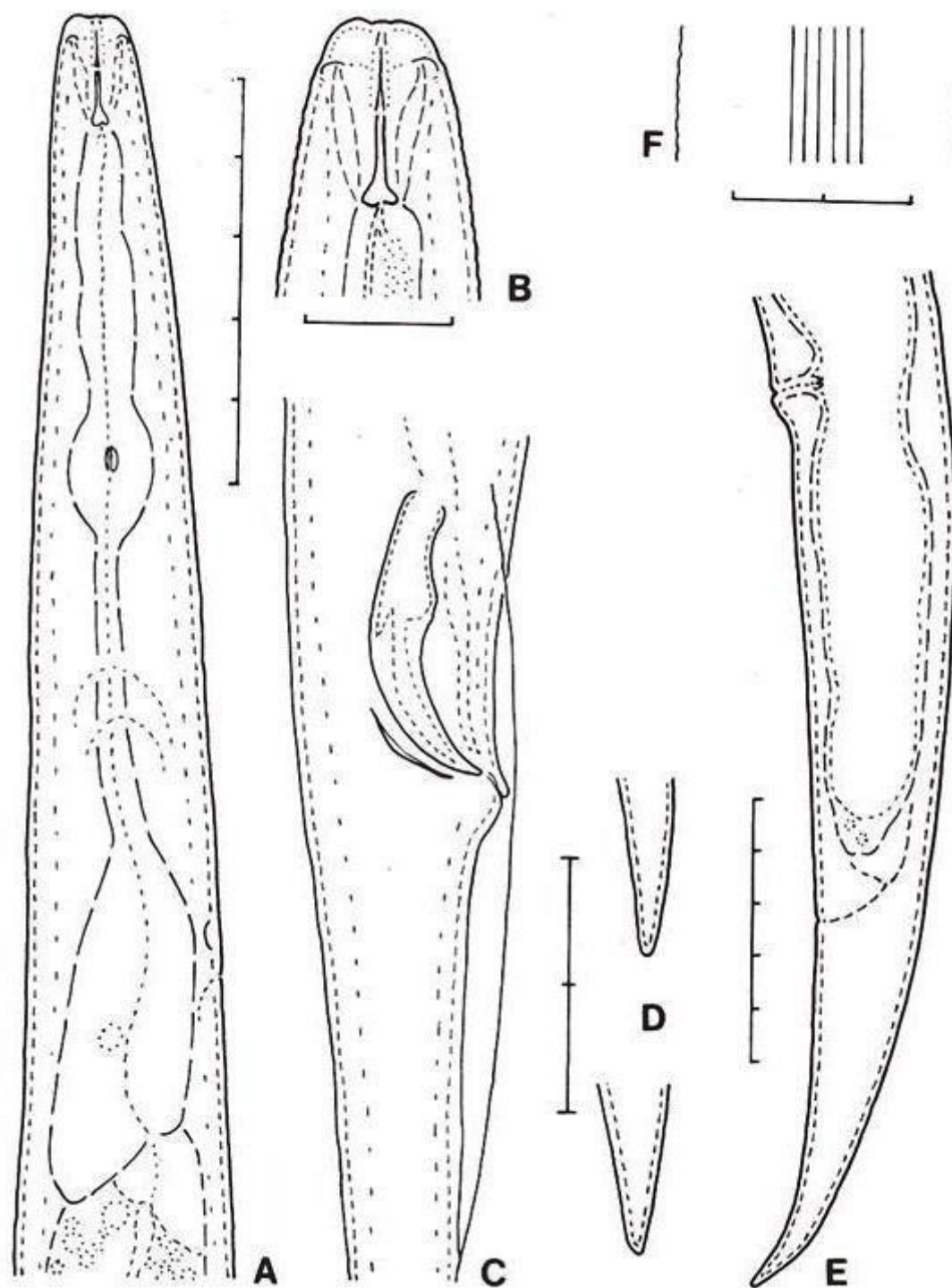


Figura 11. *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945 (según Sturhan y Brzeski, 1991). A) hembra, región esofágica; B) hembra, región cefálica; C) macho, región de las espículas; D) terminación de la cola de dos hembras; E) hembra, región caudal, y F) banda lateral en la región media. Cada unidad de las barras de medida equivale a 10 μ m.

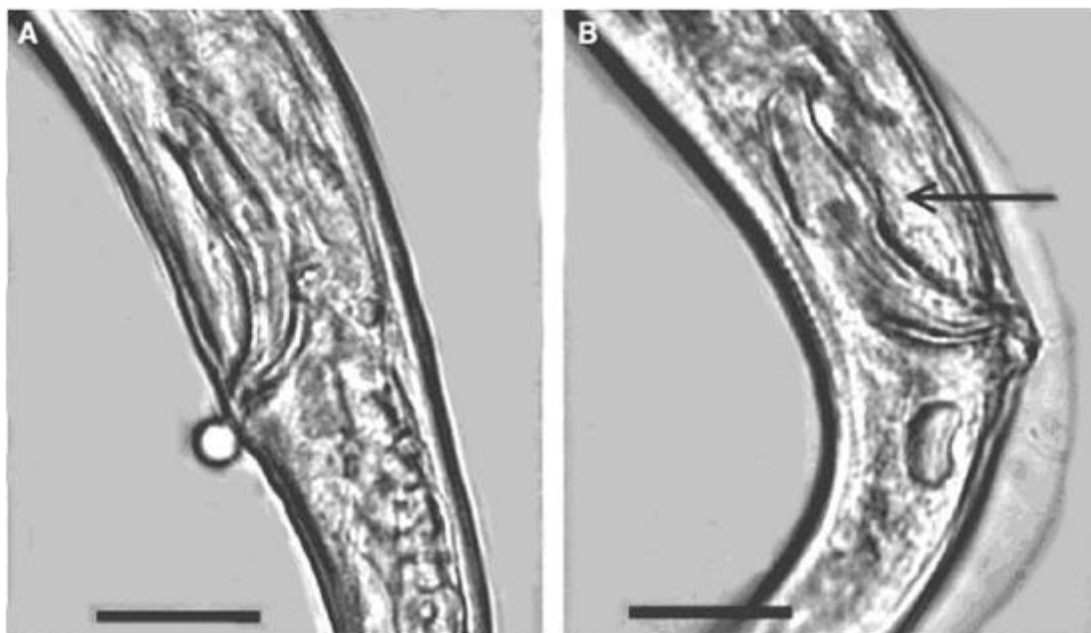


Figura 12. Espícula de *Ditylenchus*: A) *D. dipsaci* y B) *D. destructor*. La flecha señala el tumor. Las barras de escala equivalen a 12 μ m.

Fotografía por gentileza de Karssen y Willemsen (2010).

Historia de la publicación

Esta no es una parte oficial de la norma

2006-04: En la primera reunión de la CMF (2006) se añadió el tema al programa de trabajo (Nematodos, 2006-008).

2004-11: El CN añadió la cuestión: *Ditylenchus destructor* / *D. dipsaci* (2004-017).

2010-07: Proyecto presentado en la reunión del GTPD.

2013-04: Consulta de expertos.

2013-06: Proyecto presentado en la reunión del GTPD.

2014-05: El CN aprobó presentar el texto para consulta a los miembros (2014_eSC_May_11).

2014-07: Consulta a los miembros.

2015-04: El GTPD aprobó el proyecto para someterlo al CN (2015_eTPDP_Apr_03).

2015-06: El CN aprobó el período de notificación del PD (2015_eSC_Nov_02).

2015-08: El CN ~~aprobó~~ adoptó el PD en nombre de la CMF (no se recibieron objeciones formales).

NIMF 27. Anexo 8. *Ditylenchus dipsaci* y *Ditylenchus destructor* (2015). Roma, CIPF, FAO.

Última modificación de la historia de la publicación: 2016-01.

Este protocolo de diagnóstico fue adoptado por el Comité de Normas, en nombre de la Comisión de Medidas Fitosanitarias, en agosto de 2015.

El anexo es una parte prescriptiva de la NIMF 27.

NIMF 27

Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas

PD 9: Género *Anastrepha* Schiner

Adoptado en 2015; publicado en 2016

Índice

1.	Información sobre la plaga	1
2.	Información taxonómica	3
3.	Detección	4
3.1	Inspección de las frutas	4
3.2	Inspección de trampas	4
4.	Identificación	4
4.1	Preparación de los adultos para la identificación	5
4.1.1	Cría de larvas para obtener adultos	5
4.1.2	Preparación de los adultos para el examen microscópico	5
4.2	Preparación de las larvas para la identificación	6
4.2.1	Manipulación de la muestra biológica	6
4.2.2	Preparación de las larvas para el examen microscópico	6
4.3	Identificación morfológica de los adultos	7
4.3.1	Identificación del género <i>Anastrepha</i> Loew	7
4.3.2	Clave para los adultos de especies de gran importancia económica del género <i>Anastrepha</i>	8
4.4	Identificación morfológica del tercer estadio larvario	9
4.4.1	Clave para el tercer estadio larvario de géneros de Tephritidae de gran importancia económica en las Américas	9
4.4.2	Clave para el tercer estadio larvario de especies de gran importancia económica del género <i>Anastrepha</i>	10
5.	Registros	16
6.	Puntos de contacto para información adicional	17
7.	Agradecimientos	17
8.	Referencias	18
9.	Figuras	21

1. Información sobre la plaga

La familia Tephritidae se compone de unas 4 450 especies agrupadas en aproximadamente 500 géneros (Norrbon *et al.*, 1999a, 1999b; Norrbom, 2004b) (en 2014, la cifra ascendía a unas 4 700 especies (A.L. Norrbom, comunicación personal, 2014)), distribuidos por las regiones templadas, tropicales y subtropicales de todo el mundo. *Anastrepha* Schiner (Tephritidae: Toxotrypanini) es el género más grande de tefrítidos de las Américas y comprende más

de 250 especies presentes desde el sur de los Estados Unidos (Texas y Florida) hasta el norte de la Argentina (Hernández-Ortiz, 1992; Foote *et al.*, 1993; Hernández-Ortiz y Aluja, 1993; Norrbom, 2004b; Norrbom *et al.*, 2012). Al menos siete especies del género *Anastrepha* se consideran plagas de gran importancia económica debido a que ~~afectan~~ atacan a frutas cultivadas muy importantes (p. ej., el mango y los cítricos) y a su amplio rango de hospedantes. Estas siete especies son: *A. fraterculus* (Wiedemann), *A. grandis* (Macquart), *A. ludens* (Loew), *A. obliqua* (Macquart), *A. serpentina* (Wiedemann), *A. striata* Schiner y *A. suspensa* (Loew). *A. fraterculus* (Wiedemann) está reconocido como un complejo de especies crípticas (Hernández-Ortiz *et al.*, 2004, 2012; Selivon *et al.*, 2004, 2005; Vera *et al.*, 2006, Cáceres *et al.*, 2009). El presente protocolo de diagnóstico para *Anastrepha* se ocupa de la identificación morfológica del género y de las especies de gran importancia económica. Para más información general sobre las especies de Tephritidae, véase Norrbom (2010).

La duración del ciclo de vida de los tefrítidos varía en función de las especies y de las condiciones ambientales y climáticas (Basso, 2003). Las hembras de *Anastrepha* ~~ponen~~ depositan sus huevos en el interior de los frutos. El número de huevos depositados en cada fruto es variable y depende principalmente de características del fruto hospedante como el tamaño y la madurez (Malavasi *et al.*, 1983), ~~pero además cada especie~~ Al parecer, cada especie tiene además tener un límite innato ~~de en~~ cuanto al número de huevos depositados (Aluja *et al.*, 1999). Al cabo de unos días los huevos eclosionan y emergen las larvas, que generalmente se alimentan de la pulpa del fruto pero en algunos casos también de las semillas, o exclusivamente de las semillas. Las larvas maduras suelen abandonar el fruto para pupar en el suelo, pero en algunos casos la pupación puede tener lugar dentro del fruto. Los adultos suelen emerger después de un período pupal de 16 a 25 días y necesitan ~~a continuación~~, de 5 a 20 días para alcanzar la maduración sexual luego de la emergencia. Durante ~~esta fase~~ este proceso las moscas se alimentan de secreciones de homópteros, de heces de aves y del jugo producido por frutos maduros (Prokopy y Roitberg, 1984).

La relación entre las especies de *Anastrepha* y sus plantas hospedantes no se conoce bien. ~~De-Se ha informado que de~~ las más de 330 especies hospedantes que existen, pertenecientes a 48 familias, muchas ~~se han son documentado reportado como~~ hospedantes de unas pocas especies generalistas de *Anastrepha* (Norrbom y Kim, 1988; Norrbom, 2004a), mientras que aún no se conocen las plantas que sirven de alimento a muchas otras especies del género. Además, la información actual incluye muchos registros dudosos, así como informes de infestaciones inducidas solamente en condiciones de laboratorio. Si se limita la lista de hospedantes a las infestaciones naturales, se conocen los hospedantes de aproximadamente el 39,8 % de las especies de *Anastrepha* (Hernández-Ortiz y Aluja, 1993).

La introducción de especies exóticas cultivadas, como *Mangifera indica* y *Citrus* spp., ha permitido a algunas especies ~~de plagas~~ de *Anastrepha* ampliar su área de distribución original y mejorar su ~~capacidad potencial de~~ reproductividad. Sin embargo, estas especies continúan presentando preferencias marcadas por ciertos hospedantes nativos, lo que es probablemente indicativo de sus relaciones con sus hospedantes originales. En este sentido, las especies *A. suspensa*, *A. fraterculus* y *A. striata* se reproducen principalmente en hospedantes de la familia Myrtaceae; *A. ludens*, en Rutaceae; *A. obliqua*, en Anacardiaceae; *A. serpentina*, en Sapotaceae, y *A. grandis*, en Cucurbitaceae (Norrbom, 2004a).

Entre los hospedantes nativos de la región tropical de las Américas parece existir una asociación ancestral con plantas productoras de látex, en particular de la familia Sapotaceae. Los frutos de las sapotáceas son hospedantes frecuentes de los grupos de especies *dentata*, *leptozona*, *serpentina*, *daciformis*, *robusta* y *cryptostrepha*. Los frutos de las mirtáceas son también hospedantes muy importantes: se han registrado casi 26 especies de *Anastrepha* que se alimentan de plantas de esta familia, la mayoría de ellas del complejo de especies *A. fraterculus* (Norrbom y Kim, 1988; Norrbom *et al.*, 1999c).

2. Información taxonómica

Nombre: *Anastrepha* Schiner, 1868

Sinónimos: *Acrotoxa* Loew, 1873; *Pseudodacus* Hendel, 1914; *Phobema* Aldrich, 1925; *Lucumaphila* Stone, 1939

Posición taxonómica: Insecta: Diptera: Tephritidae, Trypetinae, Toxotrypanini

Nombres comunes: véase el Cuadro 1.

Cuadro 1. Nombres comunes y sinónimos de especies de moscas de la fruta de gran importancia económica del género *Anastrepha*

Nombre común	Especie de <i>Anastrepha</i>	Sinónimos
Mosca sudamericana de la fruta	Complejo de especies <i>Anastrepha fraterculus</i> (Wiedemann, 1830)	<i>Tephritis mellea</i> Walker, 1837
		<i>Trypeta unicolor</i> Loew, 1862
		<i>Anthomyia frutalis</i> Weyenbergh, 1874
		<i>Anastrepha fraterculus</i> var. <i>soluta</i> Bezzi, 1909
		<i>Anastrepha peruviana</i> Townsend, 1913
		<i>Anastrepha braziliensis</i> Greene, 1934
		<i>Anastrepha costarukmanii</i> Capoor, 1954
		<i>Anastrepha scholae</i> Capoor, 1955
		<i>Anastrepha pseudofraterculus</i> Capoor, 1955
		<i>Anastrepha lambayecae</i> Korytkowski y Ojeda, 1968
Mosca de las cucurbitáceas	<i>Anastrepha grandis</i> (Macquart, 1846)	<i>Anastrepha schineri</i> Hendel, 1914
		<i>Anastrepha latifasciata</i> Hering, 1935
Mosca mexicana de la fruta	<i>Anastrepha ludens</i> (Loew, 1873)	<i>Anastrepha lathana</i> Stone, 1942
Mosca de la ciruela, mosca del mango, mosca de las Indias Occidentales	<i>Anastrepha obliqua</i> (Macquart, 1835)	<i>Anastrepha fraterculus</i> var. <i>mombinpraeoptans</i> Sein, 1933
		<i>Anastrepha fraterculus</i> var. <i>ligata</i> Lima, 1934
		<i>Anastrepha trinidadensis</i> Greene, 1934
Mosca del zapote o de los zapotes	<i>Anastrepha serpentina</i> (Wiedemann, 1830)	<i>Urophora vittithorax</i> Macquart, 1851
Mosca de la guayaba	<i>Anastrepha striata</i> Schiner, 1868	<i>Dictya cancellaria</i> Fabricius, 1805 (véase Norrbom <i>et al.</i> , 1999b)
Mosca del Caribe	<i>Anastrepha suspensa</i>	<i>Anastrepha unipuncta</i> Sein, 1933

de la fruta	(Loew, 1862)	<i>Anastrepha longimacula</i> Greene, 1934
-------------	--------------	--

3. Detección

Las moscas de la fruta se pueden detectar mediante inspección ~~como larvas en su forma larvaria~~ dentro de las frutas y como pupas en los contenedores en los que se transporta la fruta, o se pueden capturar ~~los como~~ adultos al aire libre mediante sistemas de trapeo.

3.1 Inspección de las frutas

Se pueden encontrar frutas infestadas en ~~envíos embarques~~ importados o exportados, en equipajes e incluso en aviones o en vehículos de transporte terrestre. Se seleccionan para inspección frutas con ~~zonas áreas~~ blandas, manchas oscuras, podredumbre, orificios o lesiones cuyo origen pueda ser la oviposición por las hembras o ~~las~~ actividades ~~de~~ de alimentación de las larvas. El examen visual para la detección de perforaciones realizadas por las hembras de mosca durante la oviposición debería realizarlo un experto con microscopio. Si se observan orificios de salida de larvas, se debería inspeccionar la presencia de pupas en los contenedores de fruta. No es probable encontrar larvas en el segundo y tercer estadio ni pupas cuando se recolectan y se empacan frutas inmaduras; sin embargo, esas frutas podrían hospedar huevos y larvas en el primer estadio, que son más difíciles de detectar. Las frutas potencialmente infestadas que muestren perforaciones típicas de la oviposición por las hembras de mosca se deberían ~~abrir-cortar con un cuchillo~~ para buscar huevos o larvas en su interior. El éxito de la detección depende de la minuciosidad en el muestreo y el examen de las frutas.

3.2 Inspección de trampas

En el Apéndice 1 de la NIMF 26 (*Establecimiento de áreas libres de plagas para moscas de la fruta [Tephritidae]*) se ofrece orientación relativa al trapeo de moscas de la fruta del género *Anastrepha*. En general, los sistemas de monitoreo establecidos para la detección de adultos de moscas ~~de~~ de la fruta en árboles, ya sea en regiones productoras de fruta o en ~~zonas áreas~~ fronterizas entre países, requieren la utilización de trampas McPhail cebadas con atrayentes alimenticios o sintéticos. Los cebos, que a menudo son ~~fuentes importantes ricos en~~ de amonio, deberían estar reconocidos y aprobados internacionalmente (p. ej., en la NIMF 26). Los métodos específicos de distribución de trampas y los ~~plazos intervalos~~ de revisión de las trampas deben ajustarse a las reglamentaciones fitosanitarias ~~del país nacionales~~.

4. Identificación

La taxonomía del género *Anastrepha* está basada en la morfología externa de los adultos y en los caracteres de la terminalia de las hembras (Stone, 1942; Hernández-Ortiz, 1992; Zucchi, 2000; Norrbom *et al.*, 2012). Los caracteres morfológicos de los estadios inmaduros de la mayoría de las especies de *Anastrepha* no están bien documentados, por lo que su utilidad para el reconocimiento de las especies es menor (White y Elson-Harris, 1992) que la morfología de los adultos. Sin embargo, ~~hay~~ en la bibliografía científica ~~hay~~ cierta información acerca de las estructuras de los huevos y del tercer estadio larvario que es útil para el diagnóstico de algunas especies (Steck y Wharton, 1988; Steck *et al.*, 1990; Frías *et al.*, 2006, 2008, 2009; Dutra *et al.*, 2011a, 2011b, 2012, 2013; Figueiredo *et al.*, 2011). Existen claves de identificación de larvas para las siete especies de *Anastrepha* de gran importancia económica (Sección 1, ~~relación del~~ ~~presentadas en el~~ Cuadro 1) (Steck *et al.*, 1990; Carroll *et al.*, 2004) pero ~~al utilizarlas se~~ deberían ~~utilizarse ten~~ ~~teniendo~~ en cuenta sus limitaciones.

Aunque aparentemente es posible distinguir el tercer estadio larvario de algunas especies de *Anastrepha* (Berg, 1979; Steck y Wharton, 1988; Carroll y Wharton, 1989; Steck *et al.*, 1990; White y Elson-Harris, 1992; Carroll *et al.*, 2004; Frías *et al.*, 2006; Hernández-Ortiz *et al.*, 2010), en la mayoría de las especies descritas los datos disponibles están basados en muestreos muy limitados. Además, el estudio de otras especies estrechamente emparentadas que aún no han sido caracterizadas podrá ~~hacer que disminuya~~ ~~reducir~~ la fiabilidad de este método. Por este motivo, estos diagnósticos

deberían realizarlos expertos y deberían evaluar toda la información disponible. El método de identificación más fiable es criar las larvas hasta el estadio adulto.

Se cree que varias especies ~~de~~ plagas de *Anastrepha* comprenden múltiples especies crípticas (aún por describir) que son imposibles de distinguir morfológicamente o para cuyo reconocimiento se requiere un análisis morfométrico (Hernández-Ortiz *et al.*, 2004, 2012).

Para profundizar en esta idea, el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) ha coordinado un proyecto internacional de investigación para describir las especies crípticas del complejo de especies *A. fraterculus*. Como parte de este proyecto se ha examinado la utilidad de los métodos moleculares para el diagnóstico dentro del género. ~~En base a~~ ~~Con~~ la información disponible, los métodos de identificación como el basado en el código de barras de ADN del gen de la *citocromo oxidasa I* no son fiables para algunas especies de dípteros, entre ellas varias especies ~~de~~ plagas importantes (Will *et al.*, 2005; Meier *et al.*, 2006; Virgilio *et al.*, 2010; Lopes *et al.*, 2013). Se han realizado algunos avances con el análisis del espaciador transcrito interno (ITS)1 (p. ej., Sonvico *et al.*, 2004, número de registro en GenBank AY686689) y esta información se ha ~~relacionado-asociado~~ con la caracterización morfológica de los especímenes y con el análisis del cariotipo, así como con estudios de apareamientos cruzados (Basso, 2003).

En consecuencia, los métodos de identificación incluidos en el presente protocolo de diagnóstico están basados en caracteres morfológicos.

4.1 Preparación de los adultos para la identificación

4.1.1 Cría de larvas para obtener adultos

Las frutas se ~~disponen-colocan~~ en jaulas cubiertas con tela o con una malla fina y con un medio de pupación estéril (p. ej., vermiculita, arena o serrín húmedos) en el fondo. Una vez que ~~las larvas~~ emerjan de las frutas, ~~las larvas~~ se trasladarán al sustrato para la pupación. Se recomienda incubar cada fruta por separado. Se ~~deben~~ observar ~~todas-lascada~~ muestras y las pupas se deben recoger diariamente. Las pupas se colocan en recipientes con el medio de pupación y se cubren con una tapa firme que permita una ventilación adecuada. Cuando emergen los adultos, se deben mantener con vida durante 48-72 h para permitir que el tegumento y las alas adquieran rigidez y la coloración característica de la especie. A continuación los adultos se introducen en etanol al 70 % (etanol al 96 % para los estudios moleculares del ADN), que los mata y conserva, o bien se los mata con acetato de etilo o con algún otro agente y se montan en alfileres. En el caso de las hembras ~~de mosca~~, inmediatamente después de matarlas (antes de que se endurezcan) es útil presionar suavemente la parte apical del preabdomen con unas pinzas y luego presionar la base y el ápice del ovíscapo para exponer la punta del acúleo (para que no sea necesario diseccionarla posteriormente).

4.1.2 Preparación de los adultos para el examen microscópico

Para el reconocimiento de los estadios adultos de las especies se debería conservar el espécimen completo, ya sea en seco (fijado con un alfiler) o en etanol al 70 %. El examen de las alas y del acúleo es especialmente importante. El examen del acúleo se debe realizar con un aumento de aproximadamente 400×. El ala y el acúleo de cada espécimen se pueden montar bajo dos cubreobjetos independientes en un mismo portaobjetos. La disección y el montaje solamente debería realizarlos una persona con experiencia, ya que la disección de la terminalia de la hembra de *Anastrepha* es difícil y las partes útiles se dañan con facilidad.

4.1.2.1 Acúleo

Para diseccionar el ovíscapo (sintergosternito 7), la membrana eversible y el acúleo de una hembra es preferible cortar el abdomen completo. En el caso de los especímenes conservados en seco (fijados con un alfiler) para retirar el abdomen se recomienda utilizar unas tijeras de disección finas. Es necesario limpiar el abdomen, para lo cual se puede colocar en una solución de hidróxido ~~de sodio~~ ~~sódico~~ (NaOH) al 10 % o de hidróxido de potasio (KOH) al 10 % y calentar en un baño de agua en ebullición durante 10-15 min, lavar la estructura con agua destilada y luego retirar el contenido del

interior con ayuda de una lupa binocular y unas pinzas de disección. El acúleo y la membrana eversible deberían quedar expuestos. En este paso es posible examinar el acúleo al microscopio directamente en una o dos gotas de glicerina. Posteriormente, la estructura se puede transferir a un microvial con glicerina y fijarse con un alfiler bajo el espécimen montado en seco. Para las preparaciones permanentes, procédase según se describe en la Sección 4.1.2. Si el acúleo se monta de forma permanente en posición ventral, se impide la observación de algunos caracteres que se aprecian mejor en la vista lateral, por lo cual suele ser preferible la conservación en un microvial con glicerina.

4.1.2.2 Alas

Los caracteres de las alas normalmente se pueden observar sin montarlas, por lo que no se recomienda hacerlo como práctica general. Podrá ser necesario para realizar estudios morfométricos, pero no lo es para la observación de los caracteres utilizados en la clave de la Sección 4.3.2. Si se realizan preparaciones permanentes, se recomienda cortar una de las alas desde la base (se prefiere el ala derecha porque facilita la comparación con las imágenes descritas en las publicaciones científicas y en este protocolo de diagnóstico).

4.2 Preparación de las larvas para la identificación

4.2.1 Manipulación de la muestra biológica

Como se indica en la Sección 4, para la identificación definitiva podrá ser necesaria la observación de los caracteres de los adultos. Si se encuentran estadios inmaduros se recomienda conservar unas pocas larvas para su examen morfológico tratándolas con agua caliente (Sección 4.2.2) y ~~a continuación~~ almacenándolas luego en etanol al 70 %. El resto de las larvas y las pupas se crían con el fin de obtener especímenes adultos para la identificación (Sección 4.1.1).

El examen morfológico de las larvas (Sección 4.2.2) se puede realizar con larvas sin montar, mediante una lupa binocular; con larvas montadas en un portaobjetos, utilizando un microscopio compuesto, o bien con larvas secadas a punto crítico, utilizando un microscopio electrónico de barrido. El montaje de las larvas en portaobjetos puede impedir el ~~posterior~~ análisis posterior de caracteres morfológicos. En las larvas montadas en portaobjetos puede examinarse la morfología externa (p. ej., los espiráculos anteriores y posteriores, las carinas bucales) y también estructuras internas, como el esqueleto cefalofaríngeo (figuras 21-44), utilizando un microscopio óptico con un objetivo de 20×, 40× o más aumentos. La morfología externa de las larvas solo se puede observar detalladamente y a gran resolución con un microscopio electrónico de barrido (figuras 45-61). Por lo tanto, no se recomienda montar en portaobjetos todos los especímenes de una muestra o la única larva disponible para el diagnóstico, sino que se deberían guardar larvas sin montar para futuros análisis.

4.2.2 Preparación de las larvas para el examen microscópico

Con el fin de preparar los especímenes para el examen, las larvas deben tratarse en agua caliente; a tal efecto -las larvas vivas ~~para el examen, se deben someter a tratamiento en agua caliente (por ejemplo, se pondrán~~ durante 2-4 min en agua a ~~aproximadamente una temperatura aproximada de 65 °C).~~ Tras dejar enfriar las larvas hasta temperatura ambiente, se sumergen en alcohol al 50 % durante 15-30 min y luego se transfieren los especímenes a un vial hermético (de 15-25 ml) lleno de alcohol al 70 %. Es aconsejable ~~dejar~~ colocar en el vial ~~de~~ una etiqueta con toda la información sobre la muestra. Estas muestras están listas para su examen con lupa binocular o para su posterior preparación a efectos del montaje en portaobjetos o del examen con microscopio electrónico de barrido.

Con el fin de preparar los especímenes para el montaje en portaobjetos es necesario retirar (limpiar) todo el contenido interno para permitir la observación de la cutícula, la abertura bucal, el esqueleto cefalofaríngeo y los espiráculos anteriores, así como la placa espiracular posterior y los lóbulos anales. Para ello se realizan dos incisiones transversales en la larva, una por detrás de la región cefálica y los espiráculos anteriores, y otra antes del segmento caudal. A continuación, la larva se debe sumergir en un tubo de ensayo con una solución de NaOH al 10 % o de KOH al 10 % y calentarse en un baño de agua en ebullición durante 10-15 min. Después, el contenido interior del espécimen puede retirarse

cuidadosamente con unas pinzas y agua destilada ~~con ayuda de~~bajo una lupa binocular (con un aumento de ~~al menos~~45× o mayor).

Se pueden realizar preparaciones permanentes sobre portaobjetos con bálsamo del Canadá o Euparal. Antes de proceder a ello, las estructuras limpias se deben deshidratar colocándolas en soluciones de etanol al 50 %, al 75 % y al 100 %, durante 25 min en cada una. Para ~~la preparación el~~montaje con bálsamo del Canadá, los especímenes se deberían transferir a esencia de espliego durante 15 min para aclararlos y montarlos inmediatamente sobre un portaobjetos con una o dos gotas de bálsamo del Canadá. Cuando se utilice Euparal como medio de montaje, las estructuras se deberían transferir desde el etanol al 100 % a esencia de clavo durante unos 30 min para aclararlas antes de montarlas. En ambos casos los portaobjetos se deben dejar secar durante varios días (~~aunque~~se puede reducir el tiempo colocándolos en un horno), pero se pueden examinar al microscopio con pocos aumentos inmediatamente después del montaje. Los portaobjetos se deberían etiquetar.

Para la observación con microscopio electrónico de barrido, los especímenes (almacenados en alcohol) se deben limpiar primero en los viales con agua destilada ~~a la que se ha añadido con~~ una gota de jabón líquido como agente tensioactivo. A continuación deberían ~~aclararse enjuagarse~~ bien con agua destilada y deshidratarse pasándolos por una serie de baños de etanol al 70 %, 80 % y 95 %, y tres de etanol puro (15 min en cada baño). Los especímenes se deberían secar a punto crítico y recubrirse con oro-paladio (Carroll y Wharton, 1989). Se pueden encontrar técnicas similares en otras fuentes (p. ej., Frías *et al.*, 2006, 2008, 2009).

4.3 Identificación morfológica de los adultos

4.3.1 Identificación del género *Anastrepha* Loew

Adultos (Figura 1). Cabeza (Figura 2-A): normalmente amarilla con dos a ocho setas frontales y una o dos setas orbitales (en ocasiones, ausencia de la seta orbital posterior); seta ocelar por lo general muy débil o indiferenciada; presencia de setas postocelar, central y vertical lateral. Tórax (~~Figuras~~Figuras 2-B, 3): macrosetas del tórax normalmente negras, pardo-rojizas o naranjas, rara vez amarillas doradas; escudo normalmente de amarillo a naranja, en ocasiones predominantemente ~~en~~ pardo oscuro o a veces con franjas o manchas pardas oscuras o negras, siempre con dos a cinco franjas amarillas; mesonoto con las siguientes setas: una postpronotal, dos notopleurales, una supra-alar presutural, una supra-alar postsutural, una postalar, una intra-alar, una dorsocentral, una acrostical (raramente ausente) y dos escutelares.

Alas (Figura 4): presencia de discontinuidad subcostal; vena transversa *R-M* en posición distal o media de la celda discal (*dm*); celda basal cubital (*bcu*) con extensión posteroapical bien desarrollada; vena *M* por lo general claramente recurvada anteriormente en el ápice (de forma acusada en todas las especies que son plagas) y que no se conecta con la vena costal en un ángulo de 90°. Patrón alar con bandas de color naranja a pardo con el siguiente perfil típico: la banda costal (C), en la base del margen costal, incluye toda vena *R₁*, la celda subcostal y el pterostigma; la banda S se extiende desde el ápice de la celda *bcu* a través de la celda *dm* y la vena transversa *R-M*, alcanza el margen costal y continúa hasta el ápice del ala; la banda V, con forma de “V” invertida, presenta un brazo proximal (banda subapical), a lo largo de la vena transversa *DM-cu*, y un brazo distal (banda apical posterior), que surge de la celda *m*, convergentes en la celda *r₄₊₅*; brazo distal con frecuencia incompleto o ausente. Este patrón alar típico está modificado en algunas especies de importancia económica (véase la clave de especies de la Sección 4.3.2).

Terminalia de los machos (Figura 5): epandrio extendido en vista lateral con el surstilo lateral corto o elongado; surstilo central más corto que el lateral con dos prensisetas apicales robustas negruzcas; proctígero membranoso, escasamente esclerotizado lateral y ventralmente; falo elongado, generalmente más largo que el ovíscapo de la hembra; distifalo ligeramente esclerotizado con un esclerito apical en forma de “T”, distifalo a veces ausente en especies que no son plagas.

Terminalia de las hembras (Figura 6): ovíscapo tubular de longitud variable; membrana eversible (normalmente invertida dentro del ovíscapo) en el ápice con un conjunto de ganchos esclerotizados

(también llamado rásper) en su parte dorsal; acúleo (normalmente invertido dentro de la membrana eversible y del ovíscapo) con una fuerte esclerotización, algunas veces con márgenes laterales aserrados en el ápice.

4.3.2 Clave para los adultos de especies de gran importancia económica del género

Anastrepha

Clave adaptada de Hernández-Ortiz *et al.* (2010). Si desea información [adicional](#) acerca de las estructuras morfológicas y sobre otras especies de *Anastrepha*, consulte Norrbom *et al.* (2012). En los cuadros 2 y 4 se presentan los caracteres morfológicos para el diagnóstico del género *Anastrepha*.

1. Ala con la banda C interrumpida justo al final de la vena R_1 por una marca hialina bien delimitada en la celda r_1 ; presencia de setas orbitales anteriores y posteriores; brazo distal de la banda V generalmente presente al menos de manera parcial, pero si está ausente, entonces el patrón alar es de color pardo oscuro o negruzco2

– Ala con la banda C completa desde la base hasta el ápice del ala, algunas veces difusa en la celda r_1 ; seta orbital posterior a menudo ausente; brazo distal de la banda V ausente. Todos los siguientes caracteres deben estar presentes: mitad basal de la banda S completa desde el ápice de la celda bcu a través de la vena transversa $R-M$ y conectada con la banda C; celda r_{2+3} completamente pigmentada en toda su longitud; vena R_{2+3} prácticamente recta en toda su longitud; celda br por lo general hialina entre las venas $BM-Cu$ y $R-M$ (Figura 7); terguitos abdominales amarillos; escudo con franjas dorsocentrales pardo oscuras; acúleo de la hembra extremadamente largo (5,3-6,2 mm) y habitualmente de más de 0,10 mm de ancho; punta del acúleo con dientes en forma de “V”, márgenes laterales no aserrados (Figura 14); presencia de distifalo en los machos. (Las larvas infestan los melones) *Anastrepha grandis* (Macquart)

2. Escudo predominantemente pardo oscuro con franjas de pardas a negras3

– Escudo amarillo o naranja, sin manchas pardo oscuras excepto en ocasiones sobre la sutura escudo-escutelar4

3. Patrón alar mayoritariamente pardo oscuro; brazo distal de la banda V completamente ausente (Figura 8); terguitos abdominales predominantemente pardo oscuros con una marca central blanca en forma de “T”; pleura torácica mayoritariamente parda que contrasta fuertemente con unas manchas amarillas; acúleo de la hembra de 2,6-3,8 mm de longitud, punta del acúleo de 0,37-0,46 mm de longitud y 0,14-0,17 mm de anchura con márgenes laterales finamente aserrados en 0,5-0,7 distal (Figura 15). (Las larvas infestan los frutos de las sapotáceas) *Anastrepha serpentina* (Wiedemann)

– Patrón alar predominantemente naranja y ligeramente pardo; brazo distal de la banda V normalmente presente (Figura 9); terguitos abdominales y pleura amarillos o naranjas; escudo con dos franjas amplias dorsocentrales conectadas en el margen posterior en forma de “U”, sin sétulas en una pequeña zona sobre la sutura transversal pero con microtriquias blancas densas que contrastan con las sétulas negras; acúleo de la hembra de 1,95-2,30 mm de longitud y punta ancha de 0,24-0,31 mm de longitud y 0,17-0,20 mm de anchura (Figura 16). (Las larvas infestan las guayabas) *Anastrepha striata* Schiner

4. Banda apical anterior del ala (= sección distal de la banda S) estrecha o de anchura moderada y que no alcanza el ápice de la vena M ; banda V con brazos separados en el vértice superior o bien unidos pero con una amplia marca hialina entre ellos y la vena M ; sutura escudo-escutelar con o sin una mancha parda central; acúleo variable5

– Banda apical anterior del ala (= sección distal de la banda S) extremadamente ancha, que alcanza el ápice de la vena M ; banda V ancha y completa, con brazos ampliamente conectados en el vértice superior, marca hialina entre ellos y vena M pequeña o ausente (Figura 10); presencia por lo general de un gran punto pardo redondeado en la parte central de la sutura escudo-escutelar; acúleo de la hembra

de 1,4-1,6 mm de longitud, punta de 0,19-0,23 mm de longitud y 0,10-0,13 mm de anchura, márgenes laterales aserrados en 0,50-0,65 distal (Figura 17).....**Anastrepha suspensa (Loew)**

5. Longitud del acúleo de la hembra menor que 2,0 mm (generalmente de 1,4-1,9 mm), punta corta y ancha con grandes dientes en los lados; otros caracteres variables**6**

– Longitud del acúleo de la hembra mayor que 2,5 mm (generalmente de 3,3-5,8 mm); punta del acúleo de 0,28-0,42 mm de longitud, con una constricción moderada cerca de su parte media; márgenes laterales no aserrados o finamente aserrados en 0,55 distal o menos (Figura 18); subescutelo siempre con manchas pardas laterales evidentes que en ocasiones se extienden al medioterguito (Figura 3-B); patrón alar como en la Figura 11. (Las larvas normalmente infestan los cítricos y el mango).....**Anastrepha ludens (Loew)**

6. Subescutelo completamente amarillo, solo el medioterguito presenta manchas pardas laterales (Figura 3-C); ausencia de mancha parda en la sutura escudo-escutelar; punta del acúleo de 0,16-0,20 mm de longitud, con serraduras laterales en los dos tercios o cuatro quintos distales (Figura 19); patrón alar como en la Figura 12. (Las larvas normalmente infestan los mangos o los frutos de *Spondias*)**Anastrepha obliqua (Macquart)**

– Presencia de amplias manchas pardo oscuras a negras laterales en medioterguito y subescutelo (Figura 3-A); presencia por lo general de mancha parda en sutura escudo-escutelar; acúleo de 1,4-1,9 mm de longitud, punta del acúleo de 0,20-0,28 mm de largo, con márgenes laterales provistos de 8 a 14 dientes que ocupan los dos quintos a tres quintos distales (Figura 20); patrón alar variable (Figura 13) **Complejo de especies *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann)**

4.4 Identificación morfológica del tercer estadio larvario

4.4.1 Clave para el tercer estadio larvario de géneros de Tephritidae de gran importancia económica en las Américas

Clave adaptada de Frías *et al.* (2006). Si desea más información sobre la morfología de las larvas de estos géneros y especies relacionadas, consulte White y Elson-Harris (1992), Carroll *et al.* (2004) y Frías *et al.* (2006, 2008).

1. Mandíbula de más de 0,3 mm de longitud. Apodema ventral de la mandíbula ancho y redondeado en el ápice (Figura 26). Pelos espiraculares más cortos que la anchura de la abertura espiracular central (Figura 49).....***Toxotrypana Gerstaecker***

– Mandíbula de menos de 0,3 mm de longitud. Apodema ventral de la mandíbula agudo en el ápice (figuras 22-24). Pelos espiraculares más largos que la anchura de la abertura espiracular central (como en la Figura 50)**2**

2. Puente hipofaríngeo estrecho en la zona subapical del esclerito hipofaríngeo (Figura 21). Presencia de dientes preorales y orales (Figura 47); carinas bucales por lo general no aserradas (figuras 45, 47). Grupo de sensilios dorsolaterales equidistante entre la antena y el palpo maxilar.....***Rhagoletis Loew***

– Puente hipofaríngeo estrecho en la parte media del esclerito hipofaríngeo (como en las figuras 27-32). Ausencia de dientes preorales y orales; carinas bucales habitualmente con márgenes aserrados (Figura 48). Grupo de sensilios dorsolaterales más cerca del palpo maxilar que de la antena **3**

3. Región posterior de la mandíbula sin cuello definido (Figura 23). Ausencia de tubérculo caudal (Figura 59)..... ***Anastrepha Schiner***

– Región posterior de la mandíbula con cuello definido (figuras 22, 24). Presencia de tubérculo caudal (Figura 60).**4**

4. Carinas bucales con dientes redondeados más cortos (Figura 48)***Ceratitis McLeay***

– Carinas bucales con dientes largos y puntiagudos (a diferencia del caso anterior)

Bactrocera Macquart**4.4.2 Clave para el tercer estadio larvario de especies de gran importancia económica del género *Anastrepha***

Clave adaptada de Steck *et al.* (1990). En el Cuadro 3 se presentan los caracteres morfológicos del tercer estadio larvario para el diagnóstico de las especies de *Anastrepha*.

La distribución geográfica y los hospedantes se mencionan solamente como información adicional sobre el origen frecuente de la especie.

1. Espiráculos posteriores prominentes respecto de la superficie corporal; o bien setas o procesos conspicuos en la mayoría de los segmentos corporales; o bien aberturas espiraculares posteriores sinuosas **No Tephritidae**

– Espiráculos posteriores prácticamente a nivel de la superficie corporal; si hay presencia de tubérculos, solamente en el segmento caudal; aberturas espiraculares posteriores elongadas u ovales (figuras 49-50) (Tephritidae)..... **2**

2. Dientes preorales quitinizados y prominentes adyacentes a la abertura bucal, o esclerito dental conspicuo (Figuras 45, 47); y/o tubérculos caudales muy desarrollados; o larvas tomadas de la papaya sin tubérculos caudales y con sensilios caudales muy reducidos **Otros Tephritidae (no *Anastrepha*)**

– Ausencia de dientes preorales y esclerito dental ausente o poco visible (Figura 48); tubérculos caudales moderadamente desarrollados como máximo (*Anastrepha*) **3**

3. Presencia, en dos o más segmentos abdominales, de espínulas dorsales independientes y cónicas, en menos de cinco o seis filas en los segmentos torácicos T2 y T3 (Figura 61); procesos espiraculares posteriores SP-I y SP-IV (Figura 46) con una media de seis o más troncos con cerdas de, como mínimo, un tercio de la longitud de la abertura espiracular (figuras 40, 44)..... **4**

– Ausencia de espínulas dorsales en todos los segmentos abdominales o, si están presentes, solamente en el segmento abdominal A1 (algunos especímenes de *A. ludens*) **5**

4. Espiráculo anterior con 28-37 túbulos (Figura 43); esqueleto cefalofaríngeo como en la Figura 32. (Principales hospedantes: las larvas se desarrollan en frutos de Cucurbitaceae; distribución: de Panamá a la Argentina)..... *Anastrepha grandis*

– Espiráculo anterior con 12 a 23 túbulos (Figura 39); esqueleto cefalofaríngeo como en la Figura 31. (Principales hospedantes: las larvas se desarrollan en frutos de Myrtaceae; distribución: región tropical de las Américas)..... *Anastrepha striata*

5. Presencia de espínulas dorsales en el segmento torácico T3 (Figura 61)..... **6**

– Ausencia de espínulas dorsales en el segmento torácico T3 (a diferencia del caso anterior)..... **7**

6. Carinas bucales en 11 a 17 filas, habitualmente con márgenes enteros; espiráculos anteriores con 12 a 20 túbulos (figuras 33, 51); aberturas espiraculares posteriores de longitud 3,1-4,6 veces mayor que la anchura (Figura 34). Esqueleto cefalofaríngeo como en la Figura 27. (Principales hospedantes: las larvas se desarrollan en frutos de *Citrus* spp. [Rutaceae] o de *Mangifera indica*; distribución: desde el sur de Texas, en los Estados Unidos, hasta Panamá)..... *Anastrepha ludens*

– Carinas bucales en 8 a 11 filas con dientes robustos, claramente redondeados y muy espaciados; espiráculos anteriores con 9 a 15 túbulos (Figura 41); aberturas espiraculares posteriores de longitud 2,5-3,5 veces mayor que la anchura (Figura 42). Esqueleto cefalofaríngeo como en la Figura 29. (Principales hospedantes: las larvas se desarrollan en frutos de Myrtaceae; distribución: Florida en los Estados Unidos y las Antillas)..... *Anastrepha suspensa*

7. Procesos espiraculares posteriores SP-I y SP-IV con 5 a 11 (por término medio 8) troncos basales cortos (Figura 36); carinas bucales habitualmente en 12 a 14 filas; espiráculo anterior con 13 a 19 túbulos en una única fila (Figura 35); lóbulos anales generalmente bífidos (como en la Figura 57). Esqueleto cefalofaríngeo como en la Figura 30. (Principales hospedantes: las larvas se desarrollan en frutos de Sapotaceae; distribución: región tropical de las Américas).....

..... ***Anastrepha serpentina***

– Procesos espiraculares posteriores SP-I y SP-IV con 8 a 18 (por término medio 13) troncos basales largos; carinas bucales en 7 a 10 filas; espiráculo anterior con 9 a 18 túbulos en una única fila (como en la Figura 34); lóbulos anales enteros o bífidos (figuras 57, 58) **8**

8. Procesos espiraculares posteriores SP-II generalmente con tres a seis troncos basales; aberturas espiraculares posteriores de longitud 3,0–4,9 veces mayor que la anchura (Figura 38). Esqueleto cefalofaríngeo como en la Figura 28. (Principales hospedantes: las larvas se desarrollan en frutos de Anacardiaceae; distribución: región tropical de las Américas, incluidas las Antillas).....

..... ***Anastrepha obliqua***

– Procesos espiraculares posteriores SP-II generalmente con cuatro a nueve troncos basales; aberturas espiraculares posteriores de longitud 2,5–4,0 veces mayor que la anchura (Figura 46). (Distribución: región tropical de las Américas)..... **Complejo de especies *Anastrepha fraterculus* (Weidemann)**

Cuadro 2. Caracteres morfológicos para el diagnóstico del género *Anastrepha* empleados en las claves del presente protocolo

Estado de desarrollo biológico	Estructura	Descripción
Larva	Mandíbula	Menos de 0,3 mm de longitud; región posterior sin cuello definido; ausencia de diente preapical
	Espiráculos posteriores	Pelos espiraculares más largos que la anchura de las aberturas espiraculares centrales
	Puente hipofaríngeo	Estrecho, situado en la parte media del esclerito hipofaríngeo
	Dientes preorales y orales	Ausentes
	Carinas bucales	Generalmente aserradas
	Órgano sensorial oral	Dilatado
Adulto	Quetotaxia de la cabeza	De dos a ocho setas frontales y una o dos setas orbitales; setas ocelares muy poco desarrolladas o apenas visibles; setas postocelares monocromas
	Quetotaxia del mesonoto	Una seta postpronotal, dos notopleurales, una supra-alar presutural, una supra-alar postsutural, una postalar, una intra-alar, una dorsocentral, una acrostical (raramente ausente) y dos escutelares.
	Alas	Venas: vena <i>M</i> por lo general claramente recurvada anteriormente en el ápice (de forma acusada en todas las especies que son plagas) y que no se conecta con la vena costal en un ángulo de 90°; vena transversa <i>r-m</i> en posición distal o media de la celda discal (<i>dm</i>), celda basal cubital (<i>bcu</i>) con extensión posteroapical bien desarrollada
		Patrón alar: banda C en la base del margen costal; banda S (desde el ápice de la celda <i>bcu</i> a través de la celda <i>dm</i> y la vena transversa <i>r-m</i>); banda V, con forma de "V" invertida, que presenta un brazo proximal (banda subapical), sobre <i>dm-cu</i> , y un brazo distal (banda apical posterior), que surge de la celda <i>m</i> , convergentes en la celda <i>R</i> ₄₊₅
	Genitalia de los machos	Surstilo lateral corto o elongado; surstilo central más corto que el lateral con dos prensisetas apicales; proctígero escasamente esclerotizado lateral y ventralmente; distifalo ligeramente esclerotizado con un esclerito apical en forma de "T"; distifalo a veces ausente en especies que no son plagas
	Genitalia de las hembras	Oviscapto tubular de longitud variable; membrana eversible en el ápice con un conjunto de ganchos esclerotizados (también llamado rásper) en su parte dorsal; acúleo con una fuerte esclerotización, de longitud variable, algunas veces con márgenes laterales aserrados en el ápice

Cuadro 3. Caracteres morfológicos del tercer estadio larvario para el diagnóstico de especies de *Anastrepha*

Especie	Estructura	Descripción
Complejo de especies <i>Anastrepha fraterculus</i>	Carinas bucales	7 a 10 filas
	Espiráculo anterior	9 a 18 túbulos en una única fila
	Espínulas dorsales	Segmentos abdominales: ausentes
		Segmentos torácicos: ausentes en T3
	Espiráculos posteriores	SP-I y SP-IV con 10 a 17 troncos largos; SP-II generalmente con 6 a troncos; aberturas de longitud 2,5–3,5 veces mayor que la anchura
	Lóbulos anales	Enteros en algunas poblaciones, bífidos en otras
<i>Anastrepha grandis</i>	Carinas bucales	8 a 13 filas
	Espiráculo anterior	28 a 37 túbulos
	Espínulas dorsales	Segmentos abdominales: presencia en dos o más segmentos
		Segmentos torácicos: presencia en T2 y T3
	Espiráculos posteriores	SP-I y SP-IV con seis o más troncos con cerdas de longitud un tercio de la longitud de la abertura espiracular
	Lóbulos anales	Bífidos
<i>Anastrepha ludens</i>	Carinas bucales	11 a 17 filas; márgenes enteros
	Espiráculo anterior	12 a 20 túbulos
	Espínulas dorsales	Segmentos abdominales: presencia en A1
		Segmentos torácicos: presencia en T3
	Espiráculos posteriores	Aberturas de longitud 3,1–4,6 veces mayor que la anchura
	Lóbulos anales	Bífidos
<i>Anastrepha obliqua</i>	Carinas bucales	7 a 10 filas
	Espiráculo anterior	9 a 18 túbulos en una única fila
	Espínulas dorsales	Segmentos abdominales: ausencia
		Segmentos torácicos: ausencia en T3
	Espiráculos posteriores	SP-I y SP-IV con 10 a 17 troncos largos; SP-II generalmente con 3 a 6 troncos; aberturas de longitud 3-4,5 veces mayor que la anchura
	Lóbulos anales	Enteros

Especie	Estructura	Descripción
<i>Anastrepha serpentina</i>	Carinas bucales	12 a 18 filas
	Espiráculo anterior	13 a 19 túbulos en una única fila
	Espínulas dorsales	Segmentos abdominales: ausencia
		Segmentos torácicos: ausencia en T3
	Espiráculos posteriores	SP-I y SP-IV con seis a nueve troncos cortos
	Lóbulos anales	Generalmente bífidos (ocasionalmente enteros)
<i>Anastrepha striata</i>	Carinas bucales	5 a 8 filas
	Espiráculo anterior	12 a 23 túbulos
	Espínulas dorsales	Segmentos abdominales: presencia en dos o más segmentos; segmentos torácicos: presencia en T2 y T3
	Espiráculos posteriores	SP-I y SP-IV con seis o más troncos, longitud de las cerdas de un tercio o más de la longitud de la abertura espiracular
	Lóbulos anales	Enteros o parcialmente bífidos
<i>Anastrepha suspensa</i>	Carinas bucales	8 a 11 filas; márgenes con dientes robustos, claramente redondeados y muy espaciados
	Espiráculo anterior	9 a 15 túbulos
	Espínulas dorsales	Segmentos abdominales: ausencia
		Segmentos torácicos: presencia en T3
	Espiráculos posteriores	Aberturas de longitud 2,5-3,5 veces mayor que la anchura
	Lóbulos anales	–

Cuadro 4. Caracteres morfológicos de los adultos para el diagnóstico de especies de *Anastrepha*

Especie	Estructura	Descripción
Complejo de especies <i>Anastrepha fraterculus</i>	Quetotaxia de la cabeza	Presencia de seta orbital posterior
	Tórax	Presencia de amplias manchas pardas laterales en medioterguito y subescutelo; sutura escudo-escutelar generalmente con mancha central parda
	Alas	Brazo distal de la banda S con desarrollo normal, que no alcanza el ápice de la vena <i>M</i> ; banda V conectada con o separada de la banda S en el vértice superior
	Genitalia de las hembras	Acúleo de 1,4-1,9 mm de longitud; punta del acúleo de 0,20-0,28 mm de longitud; márgenes laterales con 8 a 14 dientes que ocupan los dos quintos a tres quintos distales
<i>Anastrepha grandis</i>	Quetotaxia de la cabeza	Setas orbitales posteriores generalmente ausentes
	Tórax	Escudo con franjas dorsocentrales pardo oscuras
	Alas	Banda C completa a lo largo de la vena costal; mitad basal de la banda S (en la celda discal) completa desde el ápice de la celda <i>bcu</i> a través de la vena transversa <i>R-M</i> y conectada con la banda C por arriba; celda <i>r</i> ₂₊₃ completamente pigmentada en toda su longitud; vena <i>R</i> ₂₊₃ prácticamente recta; celda <i>br</i> por lo general hialina entre las venas <i>bm-cu</i> y <i>r-m</i>
	Genitalia de las hembras	Acúleo extremadamente largo (5,3-6,2 mm) y habitualmente de más de 0,10 mm de ancho; punta del acúleo con dientes en forma de “V”, márgenes laterales no aserrados
<i>Anastrepha ludens</i>	Quetotaxia de la cabeza	Presencia de seta orbital posterior
	Tórax	Subescutelo siempre con manchas pardas laterales, que en ocasiones se extienden al medioterguito
	Alas	Banda V generalmente no conectada con la banda S y con brazos separados en el vértice superior
	Genitalia de las hembras	Acúleo generalmente de 3,3–5,8 mm de longitud; punta del acúleo de 0,28-0,42 mm de longitud, 0,12–0,14 mm de anchura, con una constricción moderada cerca de su parte media; márgenes laterales no aserrados o finamente aserrados en 0,55 distal o menos
<i>Anastrepha obliqua</i>	Quetotaxia de la cabeza	Presencia de seta orbital posterior
	Tórax	Subescutelo completamente amarillo, solo el medioterguito presenta manchas pardas laterales; sutura escudo-escutelar sin mancha central parda
	Alas	Brazo distal de la banda S con desarrollo normal, que no alcanza el ápice de la vena <i>M</i> ; banda V generalmente conectada con la banda S en el vértice superior
	Genitalia de las hembras	Acúleo menor de 2,0 mm de longitud; punta del acúleo de 0,16-0,20 mm de longitud, con serraduras laterales en los dos tercios a cuatro quintos distales

Especie	Estructura	Descripción
<i>Anastrepha serpentina</i>	Quetotaxia de la cabeza	Presencia de seta orbital posterior
	Tórax	Tórax predominantemente pardo o pardo rojizo que contrasta con manchas amarillas; escudo predominantemente pardo con tres franjas amarillas
	Alas	Patrón alar predominantemente pardo oscuro; brazo distal de la banda V completamente ausente
	Genitalia de las hembras	Acúleo de 2,6-3,8 mm de longitud; punta del acúleo de 0,37-0,46 mm de longitud, 0,14-0,17 mm de anchura, márgenes laterales finamente aserrados en 0,5-0,7 distal
<i>Anastrepha striata</i>	Quetotaxia de la cabeza	Presencia de seta orbital posterior
	Tórax	Escudo con dos franjas amplias dorsocentrales conectadas en el margen posterior en forma de "U", sin sétulas en una pequeña zona sobre la sutura transversal
	Alas	Patrón alar predominantemente naranja y pardo; brazo distal de la banda V presente o ausente
	Genitalia de las hembras	Acúleo de 1,95-2,30 mm de longitud; punta del acúleo ancha, de 0,24-0,31 mm de longitud, 0,17-0,20 mm de anchura
<i>Anastrepha suspensa</i>	Quetotaxia de la cabeza	Presencia de seta orbital posterior
	Tórax	Sutura escudo-escutelar con un gran punto negro redondeado en la parte central; medioterguito completamente amarillo o con manchas pardas laterales
	Alas	Banda apical anterior (= sección distal de la banda S) extremadamente ancha y que alcanza el ápice de la vena M; banda V ancha, completa y con brazos ampliamente conectados en el vértice superior
	Genitalia de las hembras	Acúleo de 1,4-1,6 mm de longitud; punta del acúleo de 0,19-0,23 mm de longitud, 0,10-0,13 mm de anchura, márgenes laterales aserrados en 0,50-0,65 distal

5. Registros

Los registros y las [pruebas evidencias](#) deberían conservarse según lo descrito en la Sección 2.5 de la NIMF 27 (*Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas*).

En los casos en los que el diagnóstico pueda ~~repercutir~~ [afectar a](#) ~~en~~ otras partes contratantes, los registros y el material de referencia (en particular, los especímenes preservados o montados en portaobjetos y las fotografías de estructuras morfológicas distintivas, según corresponda) deberían ~~anár~~ depositarse en un museo o en otra colección permanente.

6. Puntos de contacto para información adicional

Puede obtenerse información adicional sobre este protocolo en las siguientes fuentes:

Instituto de Ecología A.C., Red de Interacciones Multitróficas, Xalapa, Veracruz (México) (Vicente Hernández-Ortiz; correo electrónico: vicente.hernandez@inecol.mx).

Systematic Entomology Laboratory, United States Department of Agriculture (USDA), Washington, D.C. (Estados Unidos) (Allen L. Norrbom; correo electrónico: anorrbom@sel.barc.usda.gov).

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Departamento de Entomologia, Piracicaba (Brasil) (Roberto A. Zucchi; correo electrónico: razucchi@usp.br).

Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación, Instituto de Entomología, Santiago (Chile) (Daniel Frías; correo electrónico: daniel.frias@umce.cl).

Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, Gainesville, FL (Estados Unidos) (Gary Steck; correo electrónico: gary.steck@freshfromflorida.com).

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía, Buenos Aires (Argentina) (Alicia Basso; correo electrónico: bassoalicia@yahoo.com).

APHIS, United States Department of Agriculture (USDA), Mission Laboratory, TX (Estados Unidos) (Norman B. Barr; correo electrónico: Norman.B.Barr@aphis.usda.gov).

Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Dirección General de Servicios Agrícolas, Departamento Laboratorios Biológicos, Montevideo (Uruguay) (Andrea Listre; correo electrónico: allbme@gmail.com).

Podrán presentar una solicitud de revisión de un protocolo de diagnóstico las organizaciones nacionales de protección fitosanitaria (ONPF), las organizaciones regionales de protección fitosanitaria (ORPF) o los órganos auxiliares de la Comisión de Medidas Fitosanitarias (CMF) por conducto de la Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (ippc@fao.org), que a su vez remitirá la solicitud al Grupo técnico sobre protocolos de diagnóstico (GTPD).

7. Agradecimientos

Este protocolo fue redactado por V. Hernández-Ortiz (Instituto de Ecología A.C., Red de Interacciones Multitróficas, México, véase la sección anterior) con la colaboración de N. Vaccaro (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Concordia, Argentina) y A. Basso (Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía, Argentina, véase la sección anterior).

Asimismo, los siguientes expertos colaboraron de forma destacada en la elaboración del presente protocolo:

A.L. Norrbom (Laboratorio de Entomología Sistemática [SEL], Departamento de Agricultura de los Estados Unidos [USDA], *Smithsonian Institution*, Estados Unidos, véase la sección anterior)

R.A. Zucchi (Escuela Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidad de Sao Paulo, Brasil, véase la sección anterior)

D. Frías (Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación, Chile, véase la sección anterior)

N.B. Barr (Servicio de Inspección Zoosanitaria y Fitosanitaria [APHIS], Departamento de Agricultura de los Estados Unidos [USDA], Estados Unidos, véase la sección anterior)

G. Steck (Departamento de Agricultura y Servicios al Consumidor de Florida, División de Industria Vegetal [FDACS-DPI], Estados Unidos, véase la sección anterior)

A.L. Terra, (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Dirección General de Servicios Agrícolas, Uruguay)

A. Listre (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Dirección General de Servicios Agrícolas, Uruguay)

O. Volonterio (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Dirección General de Servicios Agrícolas, Uruguay)

- M. Malipatil (Universidad La Trobe, *Bioprotection, Biosciences Research Division, Department of Environment and Primary Industries* [Victoria], Australia)
- V. Balmès (Anses, *Laboratoire de la santé des végétaux, Unité entomologie et plantes invasives*, Francia).

8. Referencias

En la presente norma refiere a las Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias. Las NIMF se encuentran disponibles en el Portal fitosanitario internacional (PFI): <https://www.ippc.int/es/core-activities/standards-setting/ispms>).

- Aluja, M., Piñero, J., Jácome, I., Díaz-Fleischer, F. y Sivinski, J. 1999. Behavior of flies in the genus *Anastrepha* (Trypetinae: Toxotrypanini). En: Aluja, M. y Norrbom, A.L., eds. *Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior*, págs. 375-406. Boca Ratón, Florida (Estados Unidos), CRC Press.
- Basso, A.L. 2003. *Caracterización genética de los componentes del “complejo Anastrepha fraterculus” (Anastrepha spp. Diptera: Tephritidae, Trypetinae) (Wiedemann) mediante análisis de la variabilidad cromosómica*. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires (Argentina). (Tesis doctoral).
- Berg, G.H. 1979. *Clave ilustrada de larvas de moscas de la fruta de la familia Tephritidae*. El Salvador, Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. 36 págs.
- Cáceres, C., Segura, D.F., Vera, M.T., Wornoayporn, V., Cladera, J.L., Teal, P., Sapountzis, P., Bourtzis, P., Zacharopoulou, A. y Robinson, A.S. 2009. Incipient speciation revealed in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) by studies on mating compatibility, sex pheromones, hybridization, and cytology. *Biological Journal of the Linnean Society*, 97, págs. 152-165.
- Carroll, L.E., Norrbom, A.L., Dallwitz, M.J. y Thompson, F.C. 2004. *Pest fruit flies of the world: Larvae*. Versión: 8 de diciembre de 2006. (Disponible en <http://delta-intkey.com/ffl/>, consultado el 18 de marzo de 2015).
- Carroll, L.E. y Wharton, R.A. 1989. Morphology of the immature stages of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 82, págs. 201-214.
- Dutra, V.S., Ronchi-Teles, B., Steck, G.J. y Gomes Silva, J. 2011a. Description of eggs of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in the *spatulata* group using scanning electron microscopy. *Annals of the Entomological Society of America*, 104(5), págs. 857-862.
- Dutra, V.S., Ronchi-Teles, B., Steck, G.J. y Gomes Silva, J. 2011b. Egg morphology of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in the *fraterculus* group using scanning electron microscopy. *Annals of the Entomological Society of America*, 104(1), págs. 16-24.
- Dutra, V.S., Ronchi-Teles, B., Steck, G.J. y Gomes Silva, J. 2012. Description of larvae of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in the *fraterculus* group. *Annals of the Entomological Society of America*, 105(4), págs. 529-538.
- Dutra, V.S., Ronchi-Teles, B., Steck, G.J. y Gomes Silva, J. 2013. Description of eggs of *Anastrepha curitis* and *Anastrepha leptozona* (Diptera: Tephritidae) using SEM. *Annals of the Entomological Society of America*, 106(1), págs. 13-17.
- Figueiredo, J.V.A., Perondini, A.L.P., Ruggiero, E.M., Prezotto, L.F. y Selivon, D. 2011. External egg-shell morphology of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Acta Zoologica*, Estocolmo (Suecia), doi: 10.1111/j.1463-6395.2011.00533.x.
- Foote, R.H., Blanc, F.L. y Norrbom, A.L. 1993. *Handbook of the fruit flies (Diptera: Tephritidae) of America North of Mexico*. Ithaca, Nueva York (Estados Unidos), Comstock Publishing Associates, Cornell University Press. 571 págs.
- Frías, D., Hernández-Ortiz, V. y López Muñoz, L. 2009. Description of the third-instar of *Anastrepha leptozona* Hendel (Diptera: Tephritidae). *Neotropical Entomology*, 38(4), págs. 491-496.

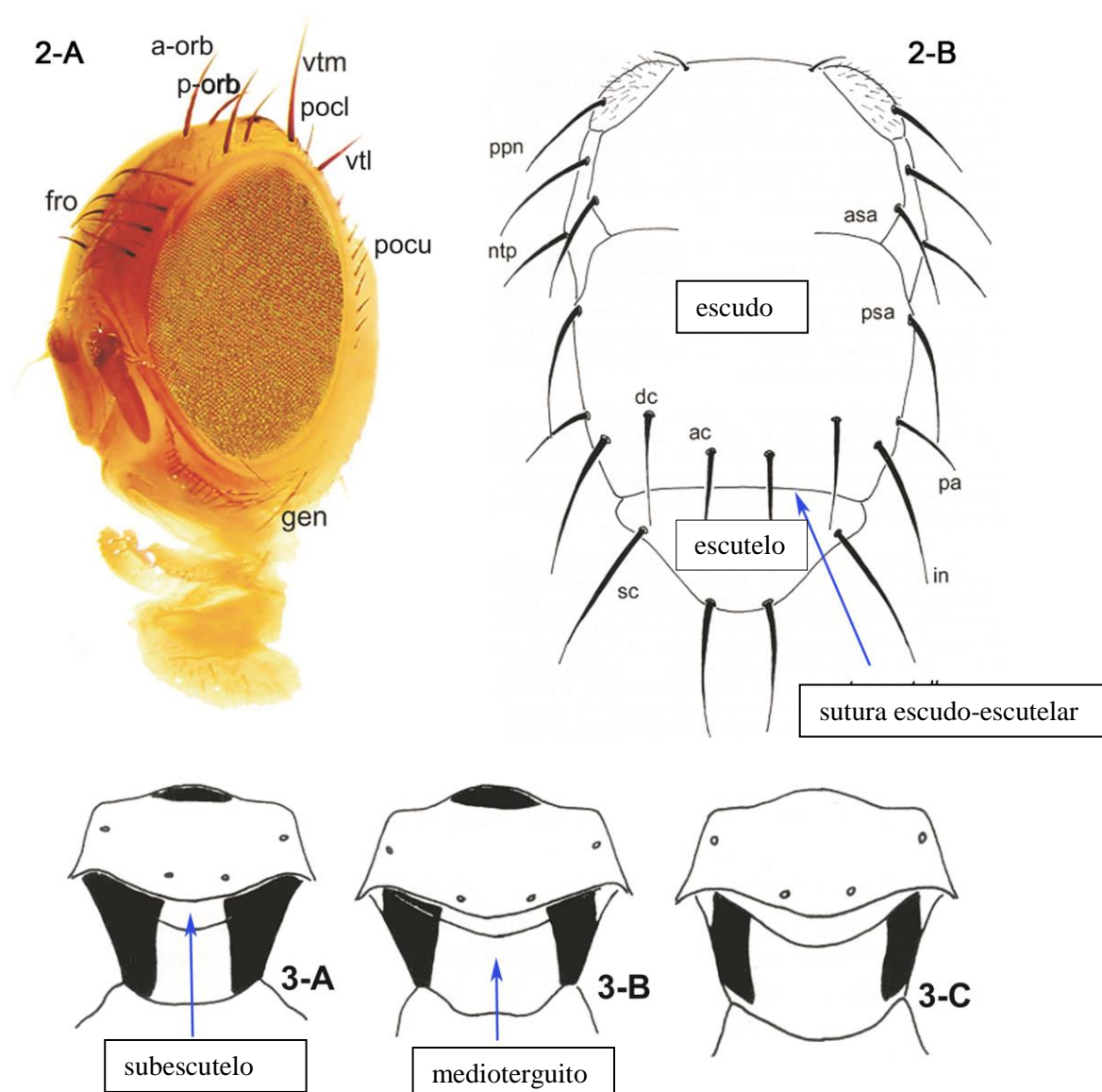
- Frías, D., Hernández-Ortiz, V., Vaccaro, N., Bartolucci, A. y Salles, L.** 2006. Comparative morphology of immature stages in some frugivorous species of fruit flies (Diptera: Tephritidae). En *Biotaxonomy of the Tephritoidea* (Freidberg, A., ed.), *Israel Journal of Entomology*, 35-36, págs. 423-457.
- Frias, D., Selivon, D. y Hernández-Ortiz, V.** 2008. Taxonomy of immature stages: New morphological characters for Tephritidae larvae identification. En *Fruit flies of economic importance: From basic to applied knowledge* (Malavasi, A., Sugayama, R., Zucchi, R., y Sivinski, J., eds.). Actas del Simposio Internacional sobre Moscas de la Fruta de Importancia Económica, Salvador (Brasil), 10-15 septiembre de 2006, págs. 29-44.
- Hernández-Ortiz, V.** 1992. *El género Anastrepha Schiner en México. Taxonomía, distribución y sus plantas huéspedes*. Publicación n.º 33. Xalapa (México), Instituto de Ecología. 167 págs.
- Hernández-Ortiz, V. y Aluja, M.** 1993. Listado de especies del género neotropical *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) con notas sobre su distribución y plantas hospederas. *Folia Entomológica Mexicana*, 88, págs. 89-105.
- Hernández-Ortiz, V., Bartolucci A.F., Morales-Valles, P., Frías, D. y Selivon, D.** 2012. Cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex: A multivariate approach for the recognition of South American morphotypes. *Annals of the Entomological Society of America*, 105(2), págs. 305-318.
- Hernández-Ortiz, V., Gómez-Anaya, J.A., Sánchez, A., McPherson, B.A. y Aluja, M.** 2004. Morphometric analysis of Mexican and South American populations of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae) and recognition of a distinct Mexican morphotype. *Bulletin of Entomological Research*, 94, págs. 487-499.
- Hernández-Ortiz, V., Guillén-Aguilar, J. y López, L.** 2010. Taxonomía e Identificación de Moscas de la Fruta de Importancia Económica en América. En *Moscas de la Fruta: Fundamentos y Procedimientos para su Manejo* (Montoya, P., Toledo, J. y Hernández, E., eds.), págs. 49-80. México, D.F. (México), S y G Editores.
- Lopes, G.N., Arias, O.R., Cônsoli, F.L. y Zucchi, R.A.** 2013. The identity of specimens of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae) with atypical aculeus tip. *Neotropical Entomology*, 42(6), págs. 618-627.
- Malavasi, A., Morgante, J.S. y Prokopy, R.J.** 1983. Distribution and activities of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) flies on host and non-host trees. *Annals of the Entomological Society of America*, 76, págs. 286-292.
- Meier, R., Shiyang, K., Vaidya, G., y Ng, P.K.** 2006. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: A tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology*, 55(5), págs. 715-728.
- Norrbom, A.L.** 2004a. Host plant database for *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Diptera: Tephritidae: Toxotrypanini). *Diptera Data Dissemination Disk* (CD-ROM) 2.
- Norrbom, A.L.** 2004b. Updates to biosystematic database of world Diptera for Tephritidae through 1999. *Diptera Data Dissemination Disk* (CD-ROM) 2.
- Norrbom, A.L.** 2010. *Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) Taxonomy Pages*. Beltsville, Maryland (Estados Unidos), Laboratorio de Entomología Sistemática, Servicio de Investigación agrícola (ARS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). (Disponible en <http://www.sel.barc.usda.gov/diptera/tephriti/tephriti.htm>, consultado el 18 de octubre de 2010).
- Norrbom, A.L., Carroll, L.E. y Freidberg, A.** 1999a. Status of knowledge. En *Fruit fly expert identification system and systematic information database* (Thompson, F.C., ed.), págs. 9-47. *Myia* (1998) 9, vii + 524 págs. y *Diptera Data Dissemination Disk* (CD-ROM) (1998) 1.
- Norrbom, A.L., Carroll, L.E., Thompson, F.C., White, I.M. y Freidberg, A.** 1999b. Systematic database of names. En *Fruit fly expert identification system and systematic information database* (Thompson, F.C., ed.), págs. 65-251. *Myia* (1998) 9, vii + 524 págs. y *Diptera Data Dissemination Disk* (CD-ROM) (1998) 1.

- Norrbom, A.L. y Kim, K.C. 1988. *A list of the reported host plants of the species of Anastrepha (Diptera: Tephritidae)*. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, APHIS 81-52. 114 págs.
- Norrbom, A.L., Korytkowski, C.A., Zucchi, R.A., Uramoto, K., Venable, G.L., McCormick, J. y Dallwitz, M.J. 2012. *Anastrepha and Toxotrypana: Descriptions, illustrations, and interactive keys*. Versión: 31 de agosto de 2012. (Disponible en <http://delta-intkey.com>, consultado el 18 de marzo de 2015).
- Norrbom, A.L., Zucchi, R.A. y Hernández-Ortiz, V. 1999c. Phylogeny of the genera *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotrypanini) based on morphology. En: Aluja, M. y Norrbom, A.L., eds. *Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior*, págs. 299-342. Boca Ratón, Florida (Estados Unidos), CRC Press.
- Prokopy, R.J. y Roitberg, B.D. 1984. Foraging behavior of true fruit flies. *American Scientist*, 72, págs. 41-49.
- Selivon, D., Perondini, A.L.P., Morgante, J.S. 2005. A genetic-morphological characterization of two cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 98, págs. 367-381.
- Selivon, D., Vretos, C., Fontes, L. y Perondini, A.L.P. 2004. New variant forms in the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). En *Proceedings of the 6th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance* (Barnes, B.N., ed.), Stellenbosch (Sudáfrica), 2004, págs. 253-258. Stellenbosch (Sudáfrica), Isteg Scientific Publications.
- Sonvico, A., Benseñor, L., Basso, A. y Quesada-Allué, L.A. 2004. *Anastrepha fraterculus internal transcribed spacer 1, complete sequence*. Número de muestra AY686689 de GenBank.
- Steck, G.J., Carroll, L.E., Celedonio-Hurtado, H. y Guillén-Aguilar, J. 1990. *Methods for identification of Anastrepha larvae (Diptera: Tephritidae), and key to 13 species*. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 92, págs. 333-346.
- Steck, G.J. y Wharton, R.A. 1988. Description of immature stages of *Anastrepha interrupta*, *A. limae*, and *A. grandis* (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 81, págs. 994-1003.
- Stone, A. 1942. *The fruit flies of the genus Anastrepha*. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) Miscellaneous Publication 439. Washington, D.C. (Estados Unidos), USDA, págs. 1-112, 2012. (Disponible en <http://www.sel.barc.usda.gov/diptera/tephriti/tephriti.htm>).
- Vera, M.T., Cáceres, C., Wornoayporn, V., Islam, A., Robinson, A.S., De La Vega, M.H., Hendrichs, J. y Cayol, J.P. 2006. Mating incompatibility among populations of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 99, págs. 387-397.
- Virgilio, M., Backeljau, T., Nevado, B., y De Meyer, M. 2010. Comparative performances of DNA barcoding across insect orders. *BMC Bioinformatics*, 11(1), pág 206.
- White, I.M. y Elson-Harris, M.M. 1992. *Fruit flies of economic significance: Their identification and bionomics*. Wallingford (Reino Unido), CABI. 601 págs.
- Will, K.W., Mishler, B.D. y Wheeler, Q.D. 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology*, 54, págs. 844-851.
- Zucchi, R.A. 2000. Taxonomia. En Malavasi, A. y Zucchi, R.A., eds. *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil. Conhecimento básico e aplicado*, págs. 13-24. Riberao Preto (Brasil), Holos Editora.

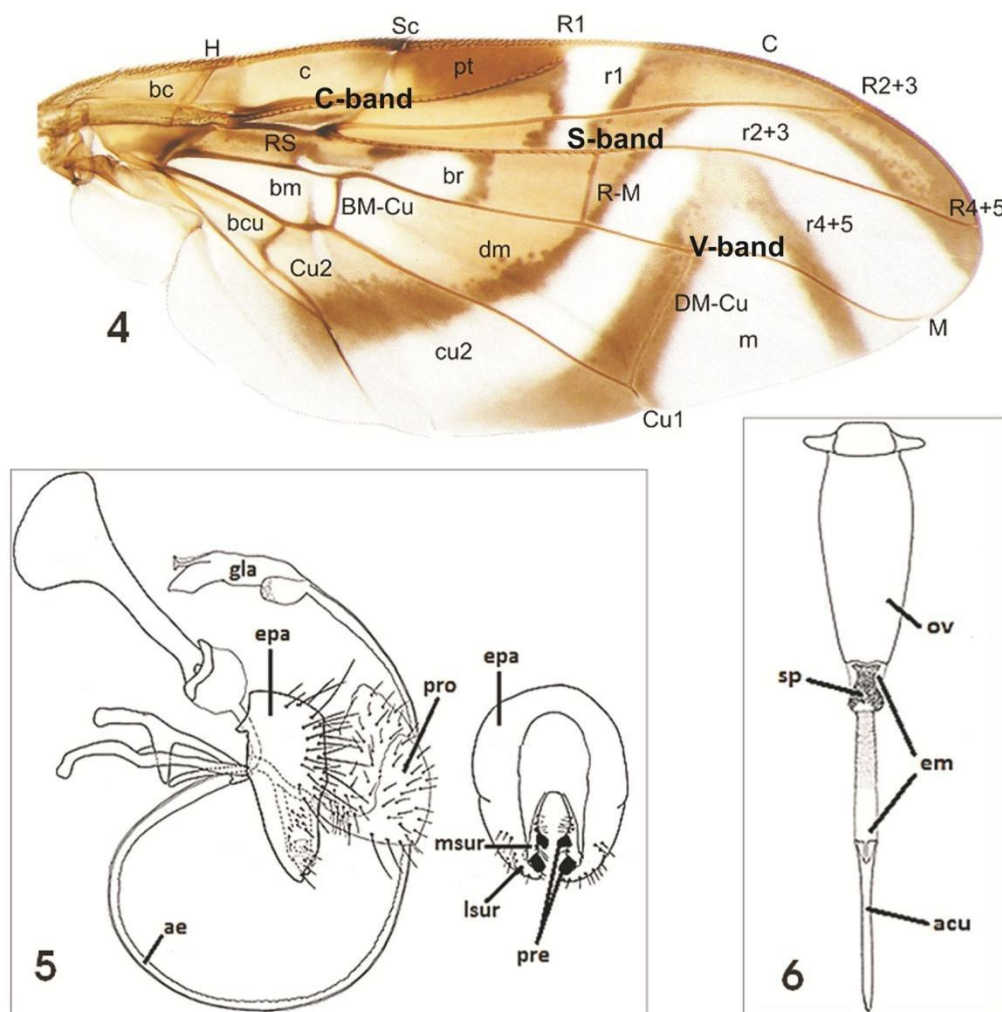
9. Figuras



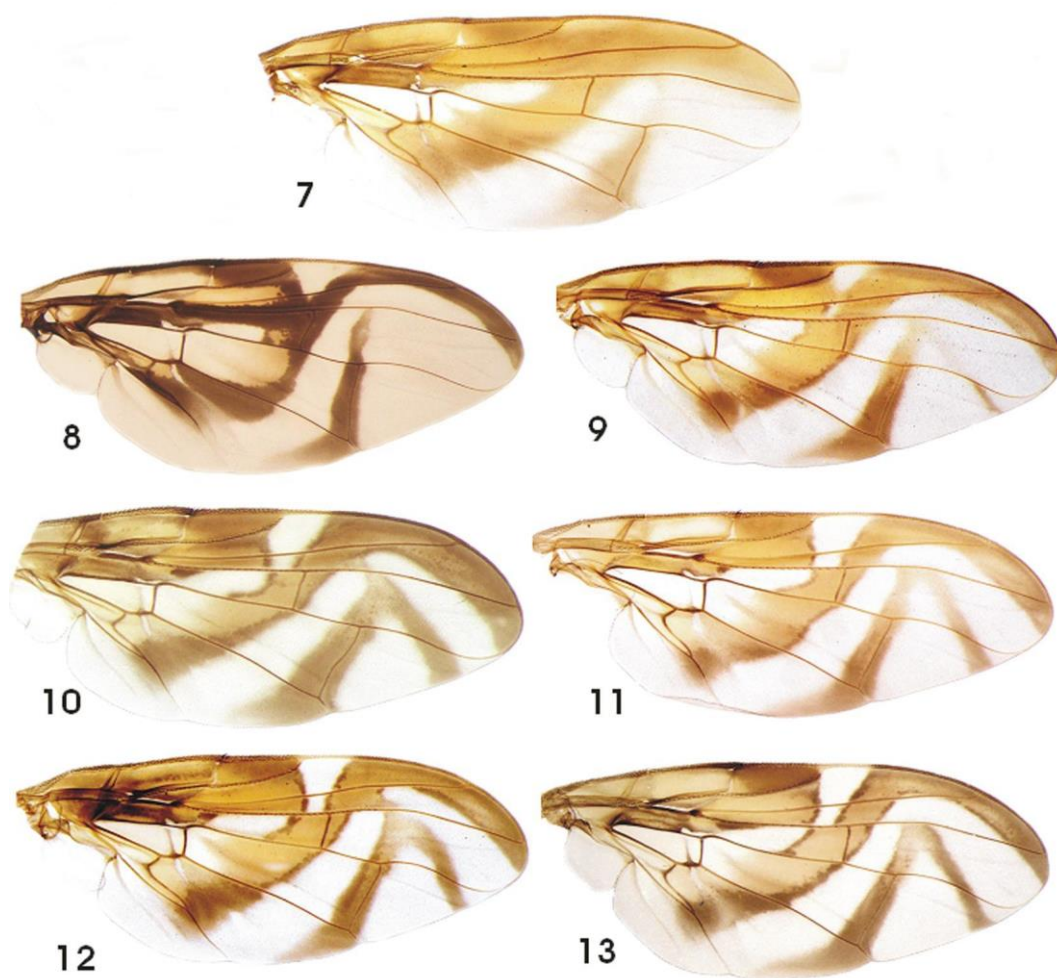
Figura 1. Hábitus general de hembra adulta de *Anastrepha ludens* (mosca mexicana de la fruta) en vista dorsal. Microfotografía por gentileza de V. Hernández-Ortiz.



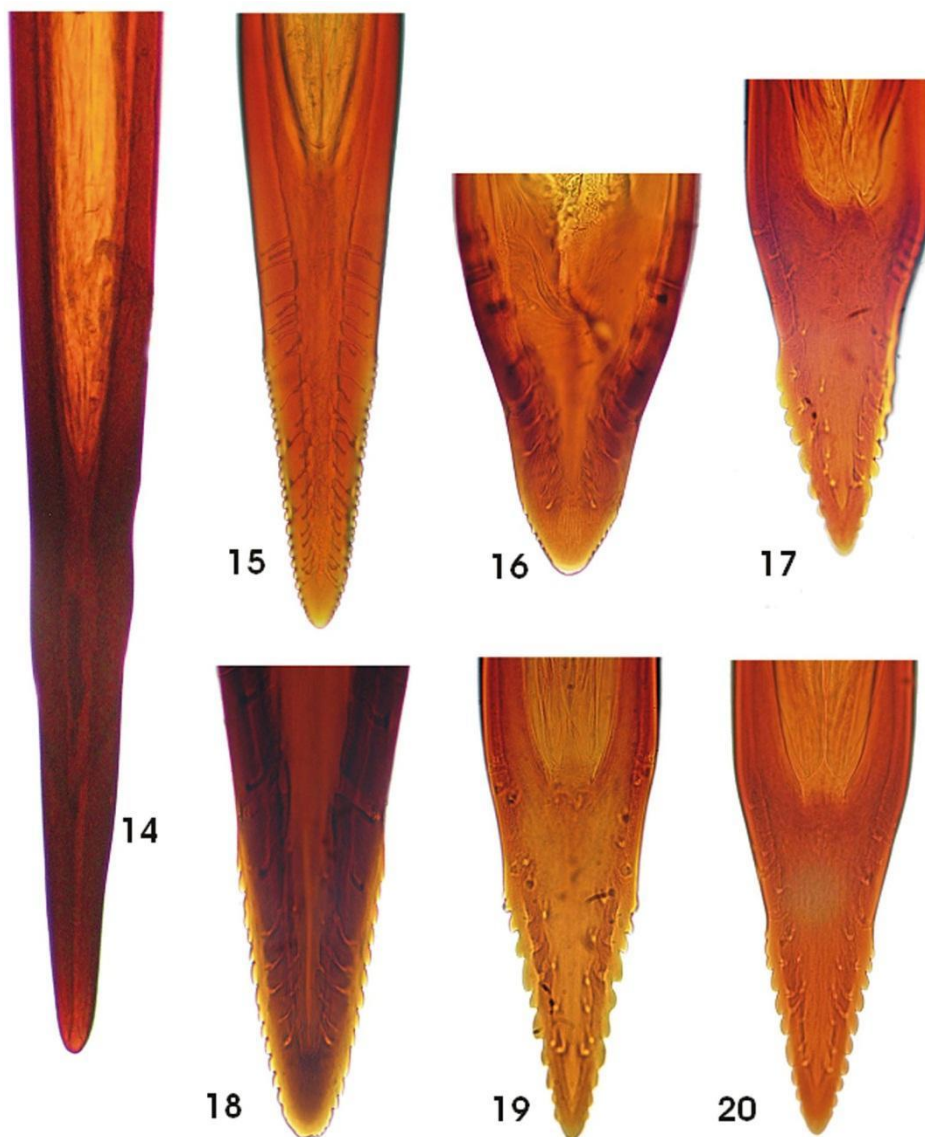
Figuras 2-3. 2-A) Morfología de la cabeza de las especies de *Anastrepha*, vista frontolateral. *a-orb*: setas orbitales anteriores; *fro*: setas frontales; *gen*: gena; *pocl*: setas postocelares; *pocu*: setas postoculares; *p-orb*: seta orbital posterior; *vtl*: seta vertical lateral; *vtm*: seta vertical central. 2-B) Vista dorsal y quetotaxia del tórax. *ac*: acrostical; *asa*: supra-alar presutural; *dc*: dorsocentral; *in*: intra-alar; *ntn*: notopleurales; *pa*: postalar; *ppn*: postpronotal; *psa*: supra-alar postsutural; *sc*: escutelares. 3) Medioterguito y subescutelo, vista posterodorsal: 3-A) *A. fraterculus*; 3-B) *A. ludens*, y 3-C) *A. obliqua*.
Fuente: Figura 1-A adaptada de Hernández-Ortiz et al. (2010); figuras 2 y 3 adaptadas de Hernández-Ortiz (1992).



Figuras 4-6. 4) Patrón alar de *Anastrepha* y nomenclatura de las venas y las celdas (vista dorsal). 5) Terminalia del macho de las especies de *Anastrepha*. ae: edeago; epa: epandrio; gla: distifalo; lsur: surstilo lateral; msur: surstilo central; pre: prensietas; pro: proctigero. 6) Terminalia de la hembra de las especies de *Anastrepha*. acu: acúleo; em: membrana eversible; ov: oviscapto; sp: ganchos esclerosados (ráspers).
Fuente: Figura 4 adaptada de Hernández-Ortiz et al. (2010); figuras 5 y 6 adaptadas de Norrbom et al. (2012).

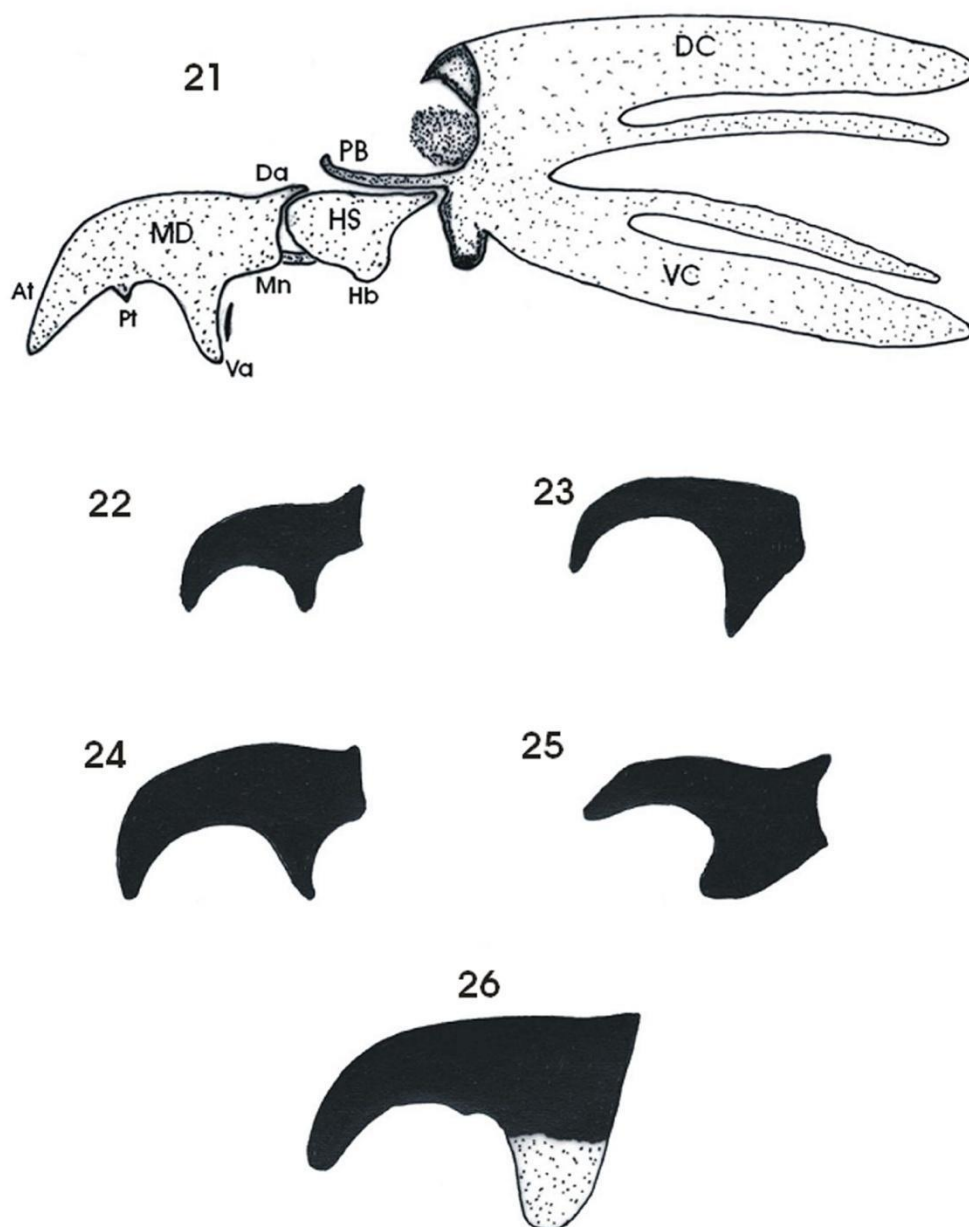


Figuras 7-13. Patrón alar de varias especies de *Anastrepha*: **7)** *A. grandis*; **8)** *A. serpentina*; **9)** *A. striata*; **10)** *A. suspensa*; **11)** *A. ludens*; **12)** *A. obliqua*, y **13)** *A. fraterculus* (Brasil).
Fuente: Todas las figuras se han adaptado de Hernández-Ortiz et al. (2010).

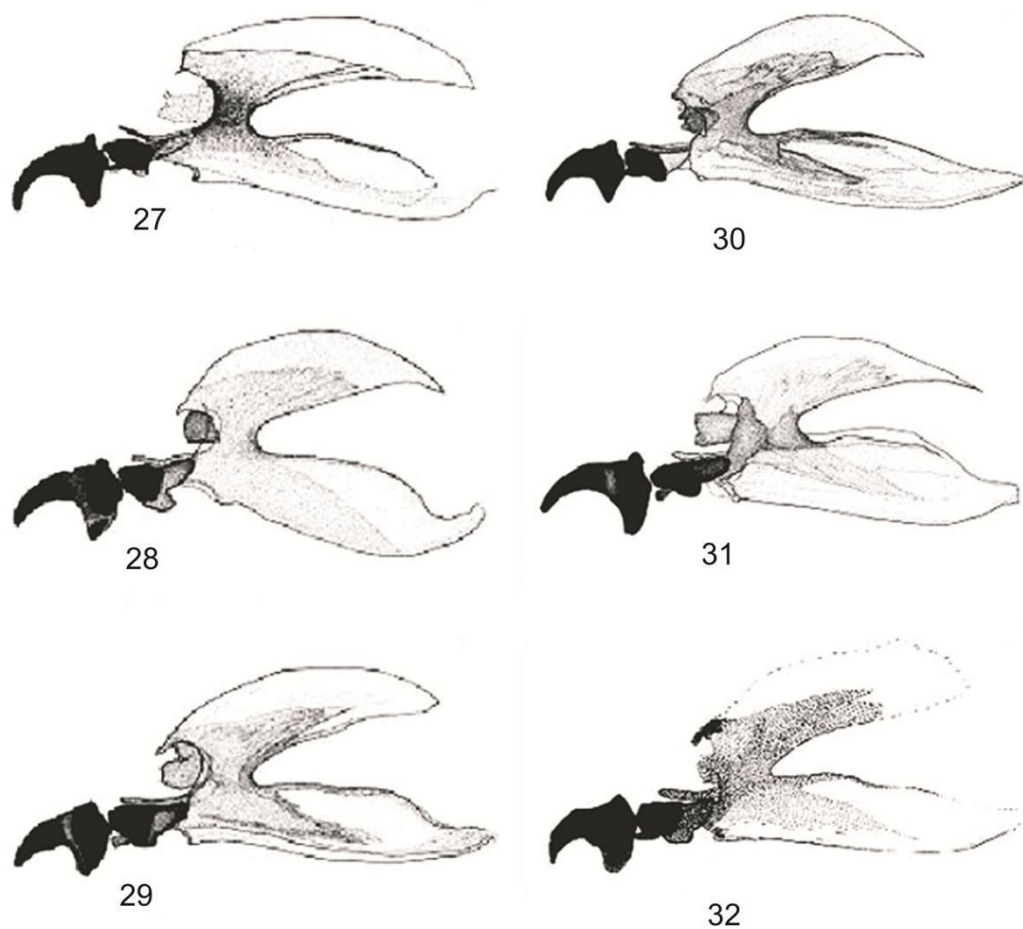


Figuras 14-20. Morfología de la punta del acúleo de especies de *Anastrepha* de gran importancia económica. **14)** *A. grandis*; **15)** *A. serpentina*; **16)** *A. striata*; **17)** *A. suspensa*; **18)** *A. ludens*; **19)** *A. obliqua*; y **20)** *A. fraterculus* (Brasil).

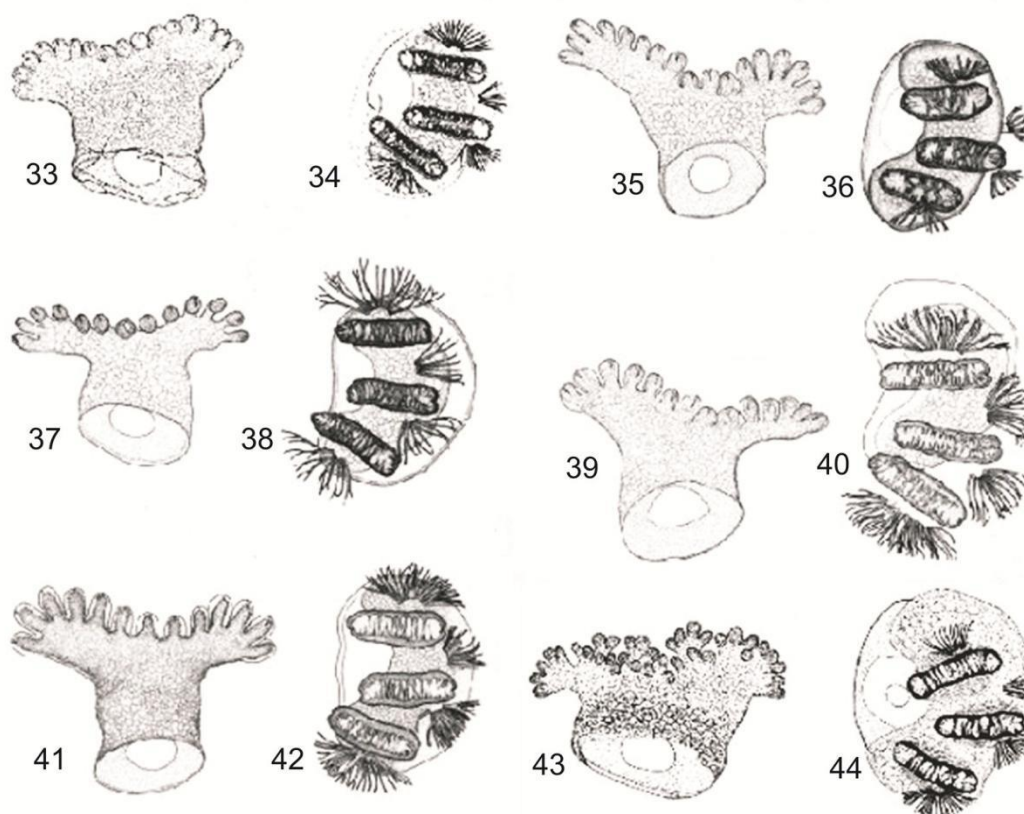
Fuente: Todas las figuras se han adaptado de Hernández-Ortiz et al. (2010).



Figuras 21-26. 21) Morfología del esqueleto cefalofaríngeo del tercer estadio larvario. Vista lateral del gancho mandibular del tercer estadio larvario: 22) *Ceratitís capitata*; 23) *Anastrepha obliqua*; 24) *Bactrocera dorsalis*; 25) *Rhagoletis tomatis*, y 26) *Toxotrypana* sp. At: diente apical; DC: cuerno dorsal; DS: esclerito dental; Hb: puente hipofaríngeo; HS: esclerito hipofaríngeo; MD: mandíbula; Mn: cuello de la mandíbula; PB: barra parastomal; Pt: diente preapical; Va: apodema ventral, VC: cuerno ventral.
Fuente: Todas las figuras se han adaptado de Frías et al. (2006).



Figuras 27-32. Esqueleto cefalofaríngeo del tercer estadio larvario de varias especies de *Anastrepha*: 27) *A. ludens*; 28) *A. obliqua*; 29) *A. suspensa*; 30) *A. serpentina*; 31) *A. striata*; y 32) *A. grandis*.
Fuente: Todas las figuras se han adaptado de Carroll et al. (2004).



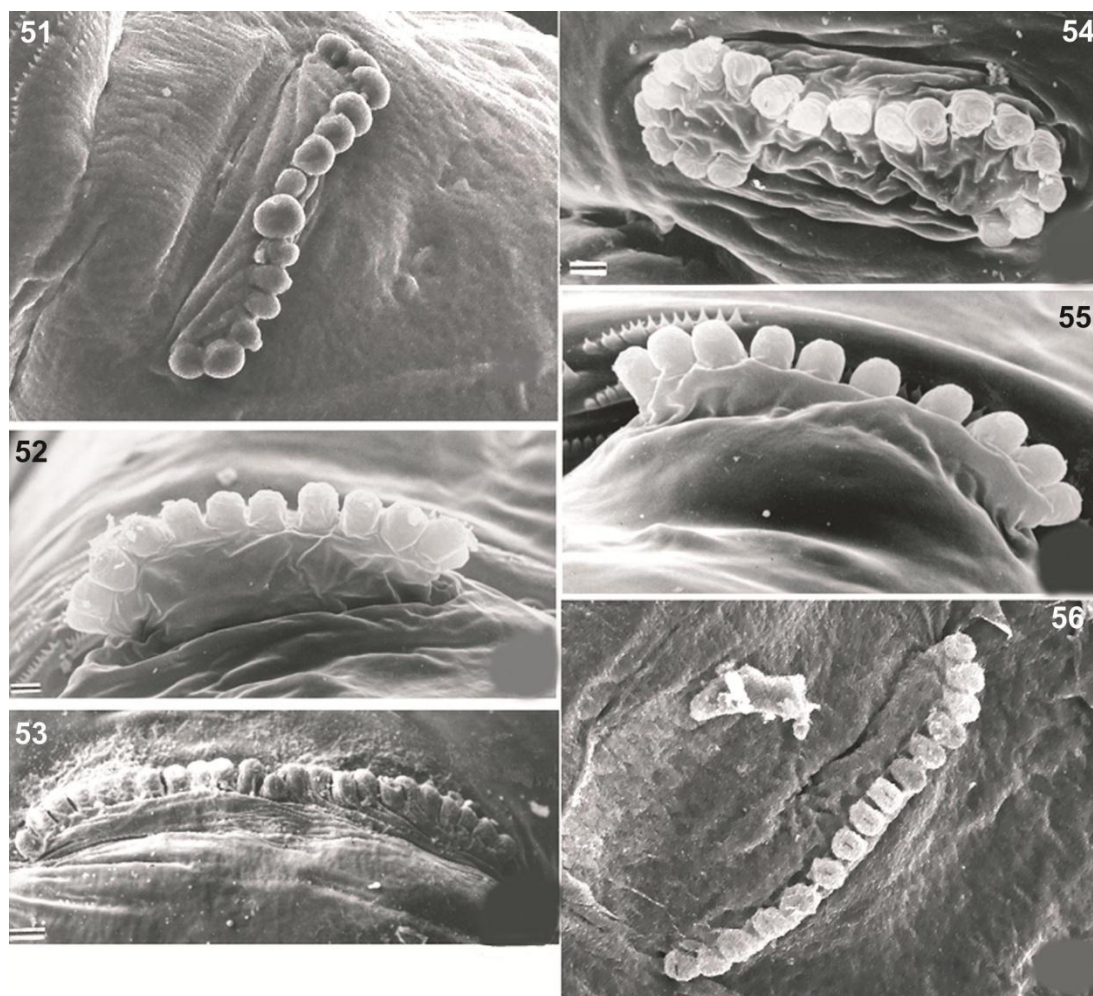
Figuras 33-44. Espiráculos anteriores y posteriores del tercer estadio larvario de varias especies de *Anastrepha*: 33, 34) *A. ludens*; 35, 36) *A. serpentina*; 37, 38) *A. obliqua*; 39, 40) *A. striata*; 41, 42) *A. suspensa*; y 43, 44) *A. grandis*.

Fuente: Todas las figuras se han adaptado de Carroll et al. (2004).



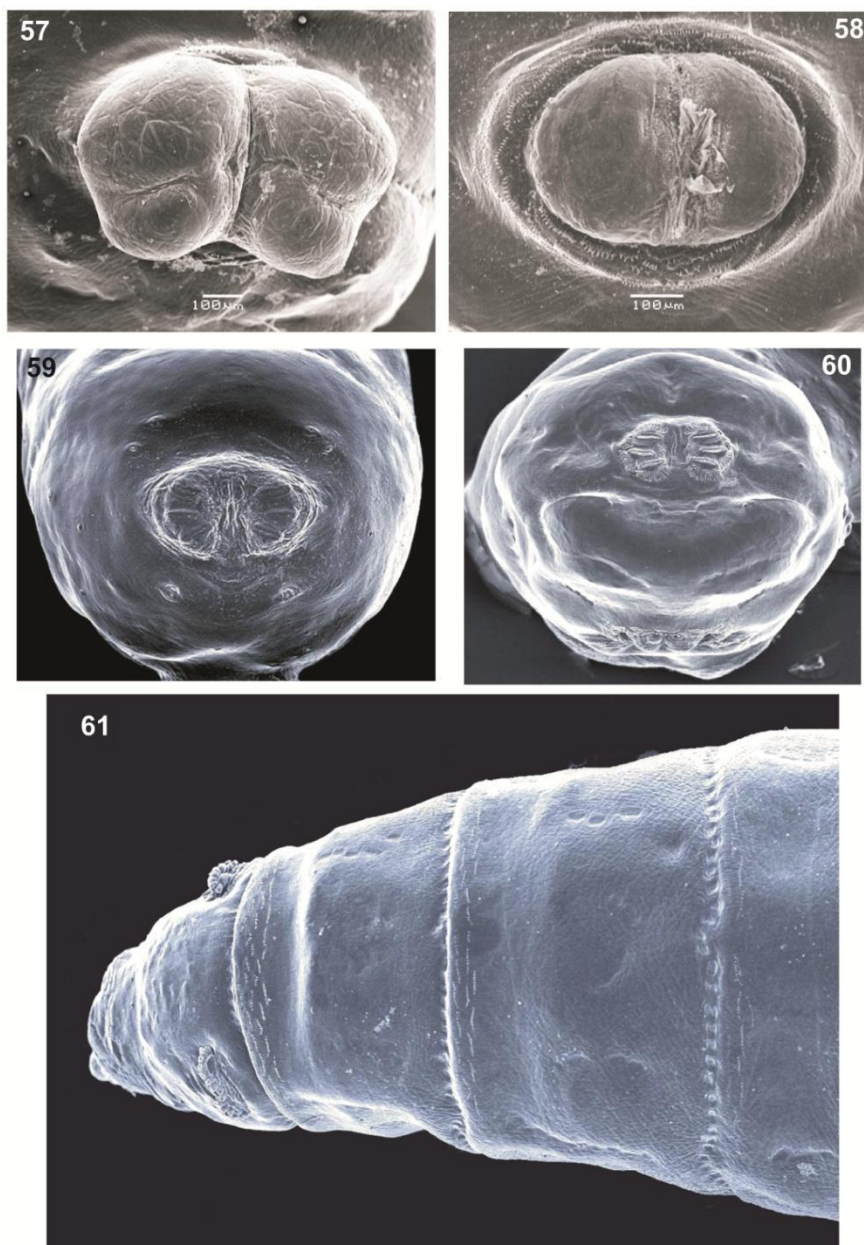
Figuras 45-50. 45, 47, 48) Segmento cefálico del tercer estadio larvario. 46, 49, 50) Placas espiraculares del segmento caudal. 45) *Rhagoletis* sp. 46) *Anastrepha fraterculus*. 47) *Rhagoletis brncici*. 48) *Ceratitis capitata*. 49) *Toxotrypana* sp. 50) *Anastrepha obliqua*. Ac: complejo antenomaxilar; At: diente apical de la mandíbula; Lb: labio; Or: carinas bucales; Ort: dientes orales; Po: órgano preoral; Prt: dientes preorales; sl: aberturas espiraculares. Procesos espiraculares (= cepillos espiraculares): SP-I dorsal, SP-II y SP-III centrales, SP-IV posterior.

Fuente: Figuras 45 y 47–50 adaptadas de Frías et al. (2006); Figura 46 adaptada de Hernández-Ortiz et al. (2010).



Figuras 51-56. Espiráculos anteriores del primer segmento torácico en el tercer estadio larvario: **51)** *Anastrepha ludens*; **52)** *Anastrepha fraterculus*; **53)** *Toxotrypana curvicauda*; **54)** *Rhagoletis conversa*; **55)** *Ceratitis capitata*; y **56)** *Bactrocera cucurbitae*.

Fuente: Figuras 52-55 adaptadas de Frías et al. (2006); figuras 51 y 56 adaptadas de Hernández-Ortiz et al. (2010).



Figuras 57-61. 57) Lóbulos anales bífidos, *Anastrepha striata*; 58) lóbulos anales enteros, *Anastrepha obliqua*; 59) ausencia de tubérculos caudales, *Anastrepha suspensa*; 60) presencia de tubérculos caudales, *Bactrocera carambolae*; 61) *Anastrepha striata*: vista dorsal del tercer estadio larvario en la que se muestran las filas de espínulas dorsales.

Microfotografías por gentileza de G. Steck.

Historia de la publicación

Esta no es una parte oficial de la norma

2014-03: En la primera reunión de la CMF de 2006 se añadió el tema al programa de trabajo (Género *Anastrepha*, 2004-015).

2008-06: Primer proyecto presentado en la reunión del GTPD.

2013-04: Consulta de expertos.

2013-06: Proyecto presentado en la reunión del GTPD.

2014-05: El CN aprobó presentar el texto para consulta a los miembros (2014_eSC_May_12).

2014-07: Consulta a los miembros.

2015-03: Aprobado por el GTPD y remitido al CN para que apruebe su adopción (2015_eTPDP_Apr_02).

2015-06: Aprobación por el CN para el período de notificación del PD (2015_eSC_Nov_05).

2015-08: El CN aprobó el PD en nombre de la CMF (no se recibieron objeciones formales).

NIMF 27. Anexo 9. Género *Anastrepha* Schiner (2015). Roma, CIPF, FAO.

Última modificación de la historia de la publicación: 2016-01.