



**AGROCALIDAD**  
AGENCIA DE REGULACIÓN Y  
CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO

INSTRUCTIVO  
**TOMA DE MUESTRA PARA EL  
LABORATORIO DE BIOLOGÍA  
MOLECULAR – DIAGNÓSTICO VEGETAL**

INT/BM /27

Rev. 4

Hoja 1 de 19



**AGROCALIDAD**  
AGENCIA DE REGULACIÓN Y  
CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO

**LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**INSTRUCTIVO INT/BM/27**

**TOMA DE MUESTRA PARA EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA  
MOLECULAR – DIAGNÓSTICO VEGETAL**



**AGROCALIDAD**  
AGENCIA DE REGULACIÓN Y  
CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO

Rev. 4

COPIA CONTROLADA

N°



**AGROCALIDAD**  
AGENCIA DE REGULACIÓN Y  
CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO

**VIGENTE**

ELABORADO	REVISADO	REVISADO	APROBADO
Responsable	Director de Diagnóstico	Responsable Calidad	Coordinador General de Laboratorios
			Fecha: 31 ENE 2018



	INSTRUCTIVO	<b>INT/BM /27</b>
	<b>TOMA DE MUESTRA PARA EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR – DIAGNÓSTICO VEGETAL</b>	Rev. 4
		Hoja 3 de 19

## ÍNDICE

<b>1. OBJETO</b>	<b>4</b>
<b>2. ALCANCE</b>	<b>4</b>
<b>3. REFERENCIAS</b>	<b>4</b>
<b>3.1 Documentos utilizados en la elaboración</b>	<b>4</b>
<b>3.2 Documentos y Registros a utilizar conjuntamente con el INT</b>	<b>4</b>
<b>4. GENERAL</b>	<b>5</b>
<b>4.1 Definiciones</b>	<b>5</b>
<b>4.2 Abreviaturas</b>	<b>5</b>
<b>5. DESCRIPCIÓN GENERAL</b>	<b>5</b>
<b>5.1 Principales enfermedades, pruebas y muestras para laboratorio.</b>	<b>5</b>
<b>5.2 Materiales para toma de muestras</b>	<b>5</b>
<b>5.2.1 Ropa de Protección:</b>	<b>5</b>
<b>5.2.2 Materiales</b>	<b>6</b>
<b>5.2.3 Soluciones de transporte</b>	<b>6</b>
<b>5.3 Procedimiento de toma de muestra</b>	<b>6</b>
<b>5.3.1 Planificación</b>	<b>6</b>
<b>5.3.2 Selección y toma de muestras para Laboratorio de Biología Molecular</b>	<b>6</b>
<b>5.4 Evitar la contaminación de las muestras</b>	<b>8</b>
<b>5.5 Identificación de las muestras</b>	<b>8</b>
<b>5.6 Envío de muestras</b>	<b>8</b>
<b>5.7 Condiciones de Rechazo</b>	<b>9</b>
<b>6. ANEXOS</b>	<b>10</b>

	INSTRUCTIVO	<b>INT/BM /27</b>
	<b>TOMA DE MUESTRA PARA EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR – DIAGNÓSTICO VEGETAL</b>	Rev. 4
		Hoja 4 de 19

## 1. OBJETO

El presente instructivo tiene por objeto establecer las condiciones de toma y envío de muestras para el correspondiente análisis en el laboratorio de Biología Molecular.

## 2. ALCANCE

Este documento será aplicado para diferentes tipos de muestra de materia vegetal, insectos y nematodos, que los clientes internos y externos envían al Laboratorio de Biología Molecular-Área Vegetal de AGROCALIDAD-Tumbaco, para el diagnóstico de los fitopatógenos que requieran ser monitoreados por la autoridad sanitaria.

Los ensayos realizados por el laboratorio servirán como prueba confirmatoria de la presencia o ausencia de un determinado patógeno.

El personal competente estará encargado de las actividades de recolección y toma de muestras en puntos de control (puerto, aeropuerto, localidades, viveros, entre otros, así como también, será responsable de la preservación y envío de muestras de plantas o partes de tejido vegetal (hojas, tallos, frutos, raíz, entre otros), suelos e insectos según los instructivos de muestreo de los laboratorios de Fitopatología, Nematología o Entomología, para luego ser remitidos al Laboratorio de Biología Molecular para análisis confirmatorio por PCR.

## 3. REFERENCIAS

Se utiliza la versión vigente de los siguientes documentos:

### 3.1 Documentos utilizados en la elaboración

- PGC/LA/01 Procedimiento General de Calidad de Gestión de la Documentación.
- DOCE/BM/73 Ley de Sanidad Vegetal y su Reglamento, Republica de Ecuador.
- DOCE/BM/94 FAO. Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias. NIMF No.27 Protocolo de diagnóstico de plagas reglamentadas.
- DOCE/BM/95 FAO. Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias. NIMF n° 11. Análisis de riesgo de plagas para plagas cuarentenarias, incluido el análisis de riesgos ambientales y organismos vivos modificados.
- DOCE/BM/96 FAO. Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias NIMF n° 21. Análisis de riesgo de plagas para plagas no cuarentenarias reglamentadas.
- DOCE/BM/97 FAO. NORMAS INTERNACIONALES PARA MEDIDAS FITOSANITARIAS. NIMF N° 31. Metodologías para muestreo de envíos.

### 3.2 Documentos y Registros a utilizar conjuntamente con el INT

- PGT/LA/06. Recepción, ingreso y entrega de muestras.
- INT/BM/23 Instructivo de Tratamiento y eliminación de desechos.
- INT/FP/01 Instructivo de toma de muestra para el Laboratorio de Fitopatología.
- INT/E/07 Instructivo de muestreo para el laboratorio de Entomología.
- INT/N/07 Instructivo de toma de muestra del laboratorio de Nematología.
- PGC/LA/03-FO02 Orden de trabajo Laboratorio de Biología Molecular – Diagnóstico Vegetal.

	INSTRUCTIVO	INT/BM /27
	<b>TOMA DE MUESTRA PARA EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR – DIAGNÓSTICO VEGETAL</b>	Rev. 4
		Hoja 5 de 19

## 4. GENERAL

### 4.1 Definiciones

- **Muestreo:** Procedimiento mediante el cual se recolecta muestras representativas de una especie o especies para realizar un análisis.
- **Muestra:** individuo o grupo de individuos extraídos de una población mediante un procedimiento de muestreo. En Entomología, se aplica también a la parte de un individuo que es representativa de una especie y sirve para realizar su identificación taxonómica.
- **Plaga:** Cualquier especie, raza o biotipo vegetal o animal o agente patógeno dañino para las plantas o productos vegetales (NIMF N°5).
- **Material Vegetal:** Cualquier parte de una planta (semilla, raíz, tallos, hojas, flores, frutos, etc.) o la planta en sí.
- **Insectos:** Los insectos son una clase de animales invertebrados del filo de los artrópodos, caracterizados por presentar un par de antenas, tres pares de patas y dos pares de alas.
- **Nematodos:** También conocidos como nematodos, nematodes y nematelmintos, son un filo de vermes pseudocelomados con más de 25.000 especies registradas.

### 4.2 Abreviaturas

RT: Responsable Técnico

NA: No aplica

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con retro transcripción.

NIMF: Normas Internacionales para medidas Fitosanitarias.

## 5. DESCRIPCIÓN GENERAL

El presente instructivo expone en líneas generales los diferentes procedimientos, técnicas y métodos para toma, transporte, conservación y envío de muestras al Laboratorio de Biología Molecular de AGROCALIDAD en Tumbaco, garantizando que lleguen a su destino en condiciones óptimas para su análisis.

El presente instructivo se aplicará a todas las muestras que lleguen al Laboratorio de Biología Molecular de AGROCALIDAD.

### 5.1 Principales enfermedades, pruebas y muestras para laboratorio.

En el Anexo 1 se describen el tipo de muestras que se deben obtener según el diagnóstico a realizarse, dependiendo del fitopatógeno a diagnosticar.

### 5.2 Materiales para toma de muestras

#### 5.2.1 Ropa de Protección:

- Mascarilla cubre bocas
- Guantes de látex o nitrilo.

	INSTRUCTIVO	INT/BM /27
	<b>TOMA DE MUESTRA PARA EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR – DIAGNÓSTICO VEGETAL</b>	Rev. 4
		Hoja 6 de 19

**NOTA:** Manipular todo el material biológico como si fuera capaz de transmitir la enfermedad.

### 5.2.2 Materiales

- Fundas de papel
- Papel toalla.
- Frasco con alcohol antiséptico.
- Etanol al 95% o al 75%.
- Tijeras de podar estériles
- Pinzas limpias
- Tubos de 1.5 o 2 mL
- Hipoclorito de sodio al 5%.
- Fundas plásticas herméticas para colocar muestras colectadas
- Cinta de embalaje.
- Geles para mantener las muestras en cadena de frío a 4°C.
- Cajas térmicas de espuma de tamaño adecuado.
- GPS
- Etiquetas.
- Marcadores indelebles.

### 5.2.3 Soluciones de transporte

Las muestras de insectos serán las únicas conservadas en un medio líquido, el cual será Etanol al 95% o al 75%.

Para cualquier consulta comunicarse con el laboratorio de Biología Molecular de AGROCALIDAD-Tumbaco para recibir instrucciones o explicación.

## 5.3 Procedimiento de toma de muestra

### 5.3.1 Planificación

Se debe planificar la ruta de muestreo, haciendo un diagrama del campo y de las rutas de inspección que se seguirán. Esto difiere y se ajusta según el patógeno que se pretende muestrear, sea este un insecto, nematodo, hongo, bacteria o virus.

La realización del muestreo dependerá del tipo de muestra, para lo cual existe acciones previas que se encuentran detallados en los instructivos de toma de muestra de los laboratorios de Fitopatología, Nematología y Entomología. A continuación se presentan algunas directrices generales.

### 5.3.2 Selección y toma de muestras para Laboratorio de Biología Molecular

#### Diagnóstico de Virus, Bacterias y Hongos

Se deberá identificar plantas que presenten síntomas característicos de la enfermedad en estadios iniciales, medios y avanzados, pero se tomarán tan solo aquellas partes de la planta que presenten síntomas iniciales y medios, para lo cual se deberá seguir los siguientes pasos:

	INSTRUCTIVO	INT/BM /27
	<b>TOMA DE MUESTRA PARA EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR – DIAGNÓSTICO VEGETAL</b>	Rev. 4
		Hoja 7 de 19

- Planificar la ruta de muestreo, haciendo un diagrama del campo y de las rutas de inspección que se seguirán con la información provista en el informe técnico del evento sospechoso desarrollado.
- Aprovisionar todo el material necesario para llevar a cabo la toma de muestra y material adicional para cualquier eventualidad que se pueda presentar.
- Identificar las plantas de las que se tomará la muestra, basándose en la sintomatología de cada enfermedad.
- El personal de muestreo deberá contar con la debida instrucción para llevar a cabo las tareas de contingencia ante la sospecha de plaga cuarentenaria.
- La falta de confirmación del diagnóstico no será obstáculo para que con base en el diagnóstico preliminar en campo, se implementen acciones pertinentes de contención y erradicación de la plaga, establecimiento de área o áreas bajo cuarentena y restricción de las vías de dispersión.
- Almacenar contra muestra de campo y eliminar el material sospechoso aledaño que no fue muestreado (toda planta reportada capaz de albergar al patógeno) en condiciones adecuadas.
- Antes y después del muestreo, desinfectar las herramientas con hipoclorito 5% y alcohol 75% (cuchillo, navajas, tijeras de podar u otros objetos) desechar guantes (previamente desinfectados) y otros materiales descartables en forma segura para su destrucción.
- Preparar la zona en el campo para la toma de muestras, adecuando un lugar estratégico del predio a muestrear.
- Identificar la parte afectada de cada una de la o de las plantas a muestrear.
- Envolver la muestra en papel toalla y depositar en una funda de papel, llenar y colocar la etiqueta correspondiente.
- Guardar la muestra en una caja térmica “cooler” para que se mantenga la cadena de frío entre 4 -8°C.
- Para el envío al laboratorio asegurarse de colocar suficientes geles refrigerantes para la conservación de la muestra, sobre todo en trayectos largos.
- Tener cuidado de no maltratar las muestras durante el envío, asegurándose de disponer correctamente las muestras al interior de la caja térmica.

Referirse al instructivo de toma de muestra para el Laboratorio de Fitopatología INT/FP/01 para instrucciones complementarias de toma de muestra según, el fitopatógeno a muestrear.

### **Diagnóstico de Insectos**

Las muestras colectadas deben ser conservadas en alcohol al 75% y enviadas en un periodo máximo de 24 horas.

Revisar el instructivo de toma de muestra para el Laboratorio de Entomología INT/E/07 para instrucciones de toma de muestra.

	INSTRUCTIVO	<b>INT/BM /27</b>
	<b>TOMA DE MUESTRA PARA EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR – DIAGNÓSTICO VEGETAL</b>	Rev. 4
		Hoja 8 de 19

### **Diagnóstico de Nematodos**

Los nematodos filiformes, hembras globosas o masas de huevos deben ser colocados en tubos de 1.5 o 2 mL con alcohol absoluto (2ul) para ser recibidos en el laboratorio. Para el envío de muestras de nematodos es necesario que estos se encuentren recientemente aislados, un tiempo máximo de 1 día y conservados a 0°C a 8°C.

En el caso de nematodos filiformes se debe realizar entre 2 a 3 cortes del espécimen con ayuda del bisturí.

Revisar el instructivo del laboratorio de Nematología INT/N/07 para instrucciones de toma de muestra de nematodos.

### **Diagnóstico de Organismos genéticamente modificados**

El envío de muestras para identificación de organismos genéticamente modificados, se debe enviar por lo menos 1 kg y máximo 3 kg. La muestra debe ser homogénea y representativa del lote muestreado.

#### **5.4 Evitar la contaminación de las muestras**

A causa de la sensibilidad de la prueba usada en el laboratorio, se deben tomar precauciones especiales para evitar amplificaciones de falsos positivos por lo que se recomienda seguir los siguientes pasos como precaución:

- Utilizar guantes desechables sin talco (que no hayan sido utilizados antes).
- Cambiar los guantes entre muestras y cada vez que se sospeche que pudo haber contaminación.
- Desinfectar las herramientas de muestreo.
- Usar preferentemente material de plástico descartable y estéril.

#### **5.5 Identificación de las muestras**

- Las muestras que ingresan al Laboratorio de Biología Molecular serán codificadas según el procedimiento PGT/LA/06.
- Todas las muestras estarán acompañadas de una orden de trabajo, el memorando y en el caso de cliente externo la factura. La información general que contendrá dicha orden para asegurar la trazabilidad, ver Anexo 2 (Orden de trabajo- PGC/LA/03-FO02). El formulario deberá disponer de firmas y datos solicitados.
- Cada recipiente, tubo, envase, funda, empaque (estéril o limpio de acuerdo a los requerimientos) que contenga una muestra e ingrese al laboratorio deberá estar adecuadamente identificado y almacenado.

#### **5.6 Envío de muestras**

Todas las muestras deberán ser enviadas lo más pronto posible al Laboratorio de Biología Molecular sin romper la cadena de frío y en el plazo más corto posible a partir de su toma.

	INSTRUCTIVO	<b>INT/BM /27</b>
	<b>TOMA DE MUESTRA PARA EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR – DIAGNÓSTICO VEGETAL</b>	Rev. 4
		Hoja 9 de 19

### 5.7 Condiciones de Rechazo

El laboratorio de Biología Molecular rechazará muestras maltratadas, mal empacadas o incorrectamente identificadas, con información incompleta o sin documentación, sin consideración alguna. Además de muestras que no correspondan al sitio propio donde se aloja el patógeno que se desea analizar, muestras contaminadas entre sí antes y durante el envío, solo serán consideradas las muestras perfectamente selladas.

Las muestras que sean rechazadas serán eliminadas siguiendo el INT/BM/23 Instructivo de Tratamiento y eliminación de desechos por tratarse de material con sospecha de estar infectado.

Finalmente, queda a criterio del RT del laboratorio de Biología Molecular la aceptación o el rechazo de la muestra en circunstancias no contempladas en este instructivo.



	INSTRUCTIVO	INT/BM /27
	<b>“DE TOMA DE MUESTRA PARA EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR – DIAGNÓSTICO VEGETAL”</b>	Rev. 4
		Hoja 10 de 19

## 6. Anexos

### Anexo 1. Principales enfermedades, pruebas y muestras para laboratorio de Biología Molecular área Vegetal

ENFERMEDAD	ETIOLOGÍA	PRINCIPALES SINTOMAS	PRUEBAS DIAGNÓSTICAS	CANTIDAD	MUESTRA	ENVASE DE TRANSPORTE
Banana Bract Mosaic Virus (BBrMV)	Familia: <i>Potyviridae</i> Género: Potyvirus	El mosaico de color café rojiza oscuro en las brácteas de las inflorescencia. Estrías cloróticas fusiformes (color verdeo café rojizo) que corren paralelas a las venas o lesiones fusiformes en los peciolos.	PCR convencional	200g	Hojas jóvenes y brácteas	Fundas de papel dentro de fundas plásticas conservadas a 4°C
Banana Streak Virus	Familia: <i>Caulimoviridae</i> Género: Badnavirus	Variando de moteado discreto hasta necrosis letal, presencia de líneas continuas y discontinuas cloróticas o rayas amarillas, que van desde el nervio central hacia el margen de la hoja. Los síntomas pueden observarse concentrados o esporádicos.	PCR convencional	200g	Hojas	Fundas de papel dentro de fundas plásticas conservadas a 4°C
<i>Ralstonia solanacearum</i> y <i>Ralstonia solanacearum</i> raza 2	Agente causal: <i>Ralstonia solanacearum</i> Familia:	Marchitez de la planta, hasta su muerte. Amarillamiento de la primera hoja hacia hojas de mayor edad. Las hojas más viejas presentan bordes amarillos con márgenes oscuros. Puntos oscuros en el interior de los nervios centrales (necrosis). Haces vasculares con coloración café clara a café oscura. Los cormos presentan bandas de color marrón o negro. Las brácteas se marchitan, oscurecen y necrosan. Deformación y pudrición del fruto (ennegrece, seca y desprende). Madurez prematura del fruto con grietas irregular y necrosis en la cáscara.	PCR convencional	500g a 1kg	Frutos, raquis, pseudotallo y rizoma, el pseudotallo preferentemente de la zona más baja de la planta y que no presente demasiada descomposición	Fundas de papel dentro de fundas plásticas conservadas a 4°C

Huanglongbing (HLB)	Agente causal: <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> y <i>Ca. L. americanus</i>	Moteado asimétrico de las hojas, amarillamiento y engrosamiento de nervadura.	PCR tiempo real	50 -60 especímenes	Psílidos	Crioviales con etanol al 75% o 95%
				50 hojas con sintomatología	Material vegetal	Fundas de papel dentro de fundas plásticas conservadas a 4°C
Fusariosis o Marchitez	Familia: <i>Nectriaceae</i> Género: <i>Fusarium</i> Agente causal: <i>Fusarium oxysporum</i>	Aparición de síntomas de amarillamiento y marchitamiento de hojas, necrosis en tallo y raíces.	PCR convencional	200mg	Aislados monospórico	Aislado monospórico entregado por el Laboratorio de Fitopatología
				500 g	Pseudotallo	Fundas de papel dentro de fundas plásticas conservadas a 4°C
Fusariosis o Marchitez	Familia: <i>Nectriaceae</i> Género: <i>Fusarium</i> Agente causal: <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 4 tropical	Aparición de síntomas de amarillamiento y marchitamiento de hojas, necrosis interna en tallo y raíces.	PCR convencional	200mg	Aislados monospórico	Aislado monospórico entregado por el Laboratorio de Fitopatología
				500 g	Pseudotallo	Fundas de papel dentro de fundas plásticas conservadas a 4°C
<i>Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV)</i>	Agente causal: <i>Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV)</i>	Entre los síntomas se puede señalar: los árboles afectados florecen exageradamente y fuera de estación, los frutos son pequeños y numerosos, pérdida de brillo intenso de las hojas, clorosis en nervaduras y variadas clorosis muy parecidas a carencias nutricionales, defoliación y decadencia general de la planta.	RT-PCR convencional	Para árboles adultos implica 5 brotes jóvenes o 10 hojas, o 5 flores recolectados alrededor de la copa de cada árbol.	Material vegetal	Fundas de papel dentro de fundas plásticas conservadas a 4°C

				Para plantas de vivero se deberá tomar 2 brotes jóvenes o 4 hojas.		
<i>Papaya Ring Spot Virus (PRSV)</i>	Agente causal: <i>Papaya Ring Spot Virus (PRSV)</i>	Los síntomas en papaya se presentan como mosaico prominente, clorosis en la lámina de la hoja, goteo aceitoso sobre los peciolo y la parte superior del tronco. Los síntomas graves a menudo incluyen una distorsión de las hojas jóvenes que también resultan en el desarrollo de una apariencia reducida que se asemeja a daños de ácaros. Los árboles que están infectados en una etapa joven quedan enanos y no producirán. Los frutos de los árboles infectados pueden tener protuberancias similares a las observadas en la fruta de las plantas con deficiencia de boro y con frecuencia tienen manchas anulares.	RT-PCR convencional	10 a 15 hojas o con presencia de síntomas característicos	Material vegetal	Fundas de papel dentro de fundas plásticas conservadas a 4°C
<i>Lancha o Tinzón tardío</i>	Familia: Pythiaceae Género: <i>Phytophthora</i> Agente causal: <i>Phytophthora Infestans</i>	En el haz de las hojas manchas grandes de color negro de aspecto grasiento y posterior desecamiento. En envés se encuentran fructificaciones de tipo fúngica en forma de vellosidades blanquecinas. En peciolo aparecen manchas grandes que se vuelven quebradizas. En los frutos hay manchas grandes de color grisáceo y de textura lisa que se tornan de color marrón y de aspecto rugoso.	PCR convencional	500 g	Hojas/Tallos con signos y sintomáticas	Fundas de papel dentro de fundas plásticas conservadas a 4°C
Fusariosis o Marchitez	Familia: <i>Nectriaceae</i> Género: <i>Fusarium</i> Agente causal: <i>Fusarium solani</i>	Aparición de síntomas de marchitamiento de la parte aérea, necrosis del tallo y raíces.	PCR convencional	200-500mg	Aislados monospórico u hojas con sintomatología	Caja Petri y Fundas de papel dentro de fundas plásticas conservadas a 4°C
				500 gr	Tallos y raíces sintomáticos	Fundas de papel dentro de fundas plásticas conservadas

 <b>AGROCALIDAD</b> AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO	INSTRUCTIVO	<b>INT/BM /27</b>
	<b>“DE TOMA DE MUESTRA PARA EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR – DIAGNÓSTICO VEGETAL”</b>	Rev. 4
		Hoja 13 de 19

						a 4°C
Nemátodo nodulador de la raíz <i>Meloidogyne hapla, incognita</i>	<i>Meloidogyne hapla e incognita</i>	Observación de nódulos en las raíces de las plantas afectadas. Se produce la obstrucción de vasos impidiendo el paso de agua y nutrientes, provocando un escaso desarrollo de la planta.	PCR convencional	5 a 10 especímenes	Ejemplares en estadio larvario J2, adultos o hembras globosas maduras en estado fecundativo	Tubos eppendorf de 1ml con etanol al 70 o 99% con los respectivos ejemplares entregados por el Laboratorio de Nematología
Nemátodo nodulador de la raíz <i>Nacobbus aberrans</i>	<i>Nacobbus aberrans</i>	Observación de nódulos en forma de rosario en las raíces de las plantas afectadas. Se produce la obstrucción de vasos impidiendo el paso de agua y nutrientes, provocando un escaso desarrollo de la planta.	PCR convencional	5 a 10 especímenes	Ejemplares en estadio larvario J2, adultos o hembras globosas en estado fecundativo	Tubos eppendorf de 1ml con etanol al 70 o 99%, con los respectivos ejemplares entregados por el Laboratorio de Nematología
Cancro cítrico	Agente causal: <i>Xanthomonas citri</i> subps. <i>citri</i>	Síntomas de la hoja: lesiones pequeñas en forma de ampolla levantada. Cuando las lesiones de la hoja son jóvenes, el halo amarillo es más prominente. A medida que las lesiones envejecen, éstas se vuelven bronceadas de un color marrón y el margen empapado de agua luce rodeado por un anillo o halo amarillo. El centro de la lesión se levanta y es de consistencia similar al corcho. Normalmente, las lesiones son visibles en ambos lados de la hoja. En la fruta: las lesiones jóvenes son elevadas similares a una ampolla, bronceadas y pueden estar rodeadas de un halo amarillo en función de la madurez del fruto. Con el envejecimiento de las lesiones, éstas se vuelven de un marrón oscuro a negro con un hundimiento de marrón a negro, centros con aspecto de corcho y pueden tener un halo amarillo. Las lesiones viejas suelen tener una apariencia gris. Generalmente las lesiones son circulares y varían en	PCR convencional	10 a 15 hojas o varios frutos	Con presencia de síntomas característicos	Fundas de papel dentro de fundas plásticas conservadas a 4°C

 <b>AGROCALIDAD</b> AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO	INSTRUCTIVO	<b>INT/BM /27</b>
	<b>“DE TOMA DE MUESTRA PARA EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR – DIAGNÓSTICO VEGETAL”</b>	Rev. 4
		Hoja 14 de 19

		tamaño. Las lesiones causan manchas y la caída prematura del fruto.				
Virosis en papa	Agente causal: <i>PVX</i>	Encrespamiento y necrosis además de mosaico	PCR tiempo real	10 a 15 hojas	Con presencia de síntomas característicos	Fundas de papel dentro de fundas plásticas conservadas a 4°C
Virosis en papa	Agente causal: <i>PVY</i>	Rugosidad, aglomeración, retorcimiento de hojas, doblez hacia abajo del margen de los folíolos, enanismo, necrosis de las nervaduras de los folíolos, manchas necróticas, necrosis de las hojas y rayado en el tallo.	PCR convencional	10 a 15 hojas	Con presencia de síntomas característicos	Fundas de papel dentro de fundas plásticas conservadas a 4°C
Añublo bacterial de la panícula y síntomas de blanqueo en arroz	Agente causal: <i>Buekholderia glumae</i> y <i>Burkholderia gladioli</i>	Presencia de panículas café o decoloradas debido a un proceso de clorosis. Las ramas y panículas se mantienen verdes al inicio, sin lesiones ni presencia de decoloración, y las flores afectadas detienen el crecimiento o son abortadas por la planta. Cuando la enfermedad es severa, las plantas permanecen erguidas y la panícula se mantiene vertical, debido a la ausencia de ganancia de peso. Así, el estado más crítico de la enfermedad se presenta en el momento que emerge la panícula y el efecto más claro es la esterilidad de los granos y su decoloración.	MULTIPLEX-PCR convencional	Pellet	Aislado bacteriano	Tubo 1.5 a 2mL
				5 a 10	Panículas con sintomatología característica	Fundas de papel dentro de fundas plásticas conservadas a 4°C
Thrips	Familia: <i>Thripidae</i> Género: Thrips Agente causal: <i>Thrips palmi</i>	Observación de manchas plateadas o bronceadas, en las hojas, a lo largo de las venas y sobre los frutos. Las hojas y retoños terminales se atrofian y los frutos presentan una consistencia rugosa y son deformes. Retardo del crecimiento de la planta, deformación y caída de frutos.	PCR tiempo real	5 a 10 especímenes	Ejemplares en estadio larvario o adultos	Microtubos de 1.5-2 ml con etanol al 75 o 99%, etiquetado con los respectivos ejemplares.

Thrips	Familia: <i>Thripidae</i> Género: Thrips Agente causal: <i>Frankliniella occidentalis</i>	Observación de manchas plateadas o bronceadas, en la epidermis de hojas y frutos en que más tarde se necrosan. Las hojas se muestran arrugadas y con manchas cloróticas. También destaca la formación de agallas, punteaduras o abultamientos.	PCR tiempo real	5 a 10 especímenes	Ejemplares en estadio larvario o adultos	Microtubos de 1.5-2 ml con etanol al 75 o 99%, etiquetado con los respectivos ejemplares.
<i>Fusarium solani</i>	Familia <i>Euphorbiaceae</i>	Putrefacción de las raíces, es un hongo saprofito, lo que significa que puede colonizar tejido de la planta que esté muriendo o que ya esté muerto.	PCR convencional	200mg Aislados monospórico	Hojas con sintomatología y aislados monospóricos	Fundas de papel dentro de fundas plásticas conservadas y caja petri para aislado
<i>Microcyclus ulei</i>	Familia <i>Mycosphaerellaceae</i>	El hongo ascomycete <i>Microcyclus ulei</i> es el agente causal del SALB que es una de las enfermedades más importantes del árbol de caucho.	PCR convencional	200gramos a 1 Kg de granos de cacao	Granos	Fundas de papel
Cucumber mosaic virus CMV	Familia <i>Bromoviridae</i>	Enanismo, amarillamiento, mosaico, deformación y reducción del limbo foliar (hojas filiformes). Además se observa necrosis en hojas, pecíolos y tallos, pudiendo llegar a causar la muerte de la planta.	PCR convencional	200g hojas	Hojas con sintomatología	Fundas de papel dentro de fundas plásticas
Complejo viral de las rosas: Arabis Mosaic Virus (ArMV), Apple Mosaic Virus (ApMV), Strawberry latent ringspot.	Strawberry latent ringspot. Familia Nepovirus, Apple Mosaic Virus (ApMV): familia <i>Bromoviridae</i> Arabid Mosaic Virus (ArMV): Familia <i>Comoviridae</i>	Sintomatología asociada al complejo viral de rosas.	PCR convencional	200g hojas	Hojas con sintomatología	Fundas de papel dentro de fundas plásticas

 <b>AGROCALIDAD</b> AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO	INSTRUCTIVO	<b>INT/BM /27</b>
	<b>“DE TOMA DE MUESTRA PARA EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA          MOLECULAR – DIAGNÓSTICO VEGETAL”</b>	Rev. 4
		Hoja 16 de 19

Tomato Spotted Wilt Virus	Familia: <i>Bunyaviridae</i>	Aparición de pequeñas manchas anilladas en las hojas superiores que rápidamente se vuelven homogéneas y de color bronceado. Las hojas se abarquillan hacia abajo y aparecen estrías oscuras en peciolo y tallos.	PCR convencional	200g hojas	Hojas con sintomatología	Fundas de papel dentro de fundas plásticas
Sunblotch	Familia: <i>Avsunviroidae</i>	Se caracteriza por dejar manchas o decoloraciones — rojizas o amarillas— en depresiones de la superficie del fruto	PCR convencional	200g hojas y fruto con sintomatología	Hojas con sintomatología	Fundas de papel dentro de fundas plásticas
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Familia <i>Phyllachoraceae</i>	Los síntomas de la antracnosis de los cítricos incluyen muerte de las ramitas, la caída prematura de las hojas y manchas oscuras en la fruta y descomposición de frutas en poscosecha.	PCR convencional	200g hojas	Hojas con sintomatología	Fundas de papel dentro de fundas plásticas
<i>Alternaria alternata</i>	Familia: <i>Pleosporaceae</i>	Manchas en hojas	PCR convencional	Pellet	Aislado monosporico	Fundas de papel dentro de fundas plásticas
Potyvirus	Familia: <i>Potyviridae</i>	Síntomas Virales en general en las plantas.	PCR convencional	200g hojas	Hojas con sintomatología	Fundas de papel dentro de fundas plásticas
OGM	No Aplica	Muestras para identificar en el constructo S35 y TNOs y para eventos específicos MON 810 y Soya RR	PCR en tiempo real	1 Kg	Granos soya o maíz	Fundas de papel dentro de fundas plásticas

 <b>AGROCALIDAD</b> AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO	INSTRUCTIVO	INT/BM /27
	<b>“DE TOMA DE MUESTRA PARA EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR – DIAGNÓSTICO VEGETAL”</b>	Rev. 4
		Hoja 17 de 19

**Anexo 2. Orden de Trabajo:** La orden de trabajo vigente se encuentra disponible en el área de recaudación de la Coordinación General de Laboratorios y es llenada por el personal de la Coordinación en el momento en el que el cliente presenta el comprobante de pago y entrega la muestra al Recaudador.

 <b>AGROCALIDAD</b> AGENCIA ECUATORIANA DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGRO	<b>LABORATORIOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR</b> <b>ORDEN DE TRABAJO DIAGNÓSTICO VEGETAL</b> No. secuencial: BM-15-DSL-0015	PGC/LA/03-FO02 Rev. 4 Hoja 1 de 1																								
	Fecha de Recepción: 10/01/2015      No. de Factura/Memorando: 0045-M      Por USD \$ : 0,00																									
	<b>DATOS DEL CLIENTE</b>																									
PERSONA O EMPRESA SOLICITANTE: Laboratorio de Fitosanología, AGROCALIDAD - Tulcan.      Externo <input type="checkbox"/> Interno <input checked="" type="checkbox"/> PERSONA DE CONTACTO: Lic. Sabrina Méndez DIRECCIÓN: Av. Interoceánica Km. 14.5 s/ Eloy Alfaro, Guayaquil, MAGAR. PROVINCIA: Pichincha      CANTÓN: Píshincha      TELEFONO: 07-277-844      CORREO ELECTRÓNICO: www.agrocalidad.gov.ec																										
<b>DATOS DE LA MUESTRA</b>																										
<b>TIPO DE MUESTRA:</b> <b>VEGETAL:</b> Hojas <input type="checkbox"/> Semillas <input type="checkbox"/> Tallo <input type="checkbox"/> Ramas <input type="checkbox"/> Frutos <input type="checkbox"/> Brotes <input type="checkbox"/> Tubérculos <input type="checkbox"/> Bulbos <input type="checkbox"/> Cormos <input type="checkbox"/> Planta <input type="checkbox"/> Raíz <input type="checkbox"/> Plantula <input type="checkbox"/> Granos <input type="checkbox"/> Flores <input type="checkbox"/> Otros Propagativos <input type="checkbox"/> <b>ENTOMOLÓGICA:</b> Adulto <input type="checkbox"/> Larva <input type="checkbox"/> Ova <input type="checkbox"/> <b>NEMATOLÓGICA:</b> Especímenes <input type="checkbox"/> <b> AISLADO:</b> Bacteriano <input type="checkbox"/> Fungio <input type="checkbox"/> Otro..... <b>CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA:</b> Natural <input type="checkbox"/> Refrigerada <input type="checkbox"/> Envase apropiado <input type="checkbox"/> Etiquetado <input type="checkbox"/> Cantidad Adecuada: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> PAÍS: Ecuador      PROVINCIA: Pichincha      CANTÓN: Píshincha      PARROQUIA: La Morita DESTINO: .....      ORIGEN: .....      PERMISO FITOSANITARIO N°: .....      LOTE: .....      N° DE CAJA: ..... <b>ACTIVIDAD DE ORIGEN:</b> Material propagativo <input type="checkbox"/> Vigilancia Fitosanitaria <input type="checkbox"/> Cuarentena <input type="checkbox"/> Acceso a Mercados Internacionales <input type="checkbox"/> Otro..... <input type="checkbox"/> Programas Específicos <input type="checkbox"/> CULTIVO: Babaco      ÁREA DE CULTIVO: 0,1 ha      VARIEDAD: XXXX      EDAD: 1 año      ESTADO FENOLÓGICO: Fructificación RESPONSABLE TOMA DE MUESTRA: Edwin Sánchez      FECHA DE TOMA DE MUESTRA: 14/12/2014      FECHA DE ENVÍO DE MUESTRA: 19/12/2014 COORDENADAS: X: 730153      Y: 977236      Altitud: 2219 msnm																										
<b>TIPOS DE ANÁLISIS</b>																										
<table border="1"> <thead> <tr> <th>CÓDIGO DE MUESTRA LABORATORIO <sup>1</sup></th> <th>IDENTIFICACIÓN DE CAMPO DE LA MUESTRA</th> <th>PRE- DIAGNÓSTICO</th> <th>ANÁLISIS SOLICITADO <sup>2</sup></th> <th>MÉTODO <sup>3</sup></th> <th>DESCRIPCIÓN SINTOMAS / DAÑOS</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>BM-15-001</td> <td>FP-141706</td> <td>Ralstonia solanacearum</td> <td>PCR Convencional</td> <td>PEE/BM/11</td> <td>Planta clorótica y defoliación de la parte superior.</td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>	CÓDIGO DE MUESTRA LABORATORIO <sup>1</sup>	IDENTIFICACIÓN DE CAMPO DE LA MUESTRA	PRE- DIAGNÓSTICO	ANÁLISIS SOLICITADO <sup>2</sup>	MÉTODO <sup>3</sup>	DESCRIPCIÓN SINTOMAS / DAÑOS	BM-15-001	FP-141706	Ralstonia solanacearum	PCR Convencional	PEE/BM/11	Planta clorótica y defoliación de la parte superior.														
CÓDIGO DE MUESTRA LABORATORIO <sup>1</sup>	IDENTIFICACIÓN DE CAMPO DE LA MUESTRA	PRE- DIAGNÓSTICO	ANÁLISIS SOLICITADO <sup>2</sup>	MÉTODO <sup>3</sup>	DESCRIPCIÓN SINTOMAS / DAÑOS																					
BM-15-001	FP-141706	Ralstonia solanacearum	PCR Convencional	PEE/BM/11	Planta clorótica y defoliación de la parte superior.																					
<sup>1</sup> Espacio de uso exclusivo para Personal del Laboratorio. <sup>2</sup> Análisis solicitado: Análisis PCR <sup>3</sup> Mezcla: Observar en la parte posterior de la orden de trabajo donde se indica el método de ensayo a utilizar según el análisis. Si el método de ensayo no consta en la tabla correspondiente, detallar en la casilla de observaciones.																										
<b>PARA USO EXCLUSIVO DEL LABORATORIO (Área Técnica del laboratorio)</b>																										
<table border="1"> <thead> <tr> <th>MUESTRA(S) ACEPTADA(S) (SINO)</th> <th>NÚMERO DE MUESTRAS RECEPTADAS</th> <th>PLAZO DE ENTREGA DE LOS RESULTADOS (DÍAS)</th> <th>CAPACIDAD Y RECURSOS DISPONIBLES (SINO)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>	MUESTRA(S) ACEPTADA(S) (SINO)	NÚMERO DE MUESTRAS RECEPTADAS	PLAZO DE ENTREGA DE LOS RESULTADOS (DÍAS)	CAPACIDAD Y RECURSOS DISPONIBLES (SINO)																						
MUESTRA(S) ACEPTADA(S) (SINO)	NÚMERO DE MUESTRAS RECEPTADAS	PLAZO DE ENTREGA DE LOS RESULTADOS (DÍAS)	CAPACIDAD Y RECURSOS DISPONIBLES (SINO)																							
<b>Observaciones:</b> - ..... ..... <table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; text-align: center;"><b>Recibido por:</b></td> <td style="width: 50%; text-align: center;"><b>Entregado por:</b></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Firma: _____ Nombre: -</td> <td style="text-align: center;">Firma cliente: _____ Nombre: Lic. Sabrina Méndez CI: 1718365800</td> </tr> </table>			<b>Recibido por:</b>	<b>Entregado por:</b>	Firma: _____ Nombre: -	Firma cliente: _____ Nombre: Lic. Sabrina Méndez CI: 1718365800																				
<b>Recibido por:</b>	<b>Entregado por:</b>																									
Firma: _____ Nombre: -	Firma cliente: _____ Nombre: Lic. Sabrina Méndez CI: 1718365800																									
Los resultados de los análisis solicitados podrán ser usados por la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro, AGROCALIDAD, en caso de que se ponga en riesgo el estatus fitosanitario, zootanitario o de inocuidad de los alimentos.																										



**AGROCALIDAD**  
AGENCIA DE REGULACIÓN Y  
CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO

## INSTRUCTIVO

### “DE TOMA DE MUESTRA PARA EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR – DIAGNÓSTICO VEGETAL”

INT/BM /27

Rev. 4

Hoja 18 de 19

TIPO DE ANÁLISIS	PARÁMETRO	MÉTODO
DIAGNÓSTICO <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense, Raza tropical 4 (FOC RT4) , PCR	<i>Fusarium</i> Raza Tropical 4	PEE/BM/02
DIAGNÓSTICO POTYVIRUS, PCR	POTYVIRUS	PEE/BM/07
DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DEL MOSAICO DE BRACTEAS DE BANANO (BBMV), PCR	VIRUS DEL MOSAICO DE BRACTEAS DE BANANO	PEE/BM/10
DIAGNÓSTICO DE <i>Ralstonia solanacearum</i> , PCR	<i>Ralstonia solanacearum</i>	PEE/BM/11
DIAGNÓSTICO DE <i>Fusarium oxysporum</i> , PCR	<i>Fusarium oxysporum</i>	PEE/BM/12
DIAGNÓSTICO VIRUS ESTRIADO DEL BANANO (BSV), PCR	BSV	PEE/BM/13
DIAGNÓSTICO DE <i>Nacobbus aberrans</i> , PCR	<i>Nacobbus aberrans</i>	PEE/BM/14
DETECCIÓN DE TRANSGÉNICOS, PCR	Evento específico Mon 810 y Soya RR (40-3-2) y screening (35S y TNOS)	PEE/BM/15
DIAGNÓSTICO DE <i>Phytophthora infestans</i> , PCR	<i>Phytophthora infestans</i>	PEE/BM/16
DIAGNÓSTICO DE <i>Xantomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> tipo A, PCR	<i>Xantomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> tipo A	PEE/BM/17
DIAGNÓSTICO DE Thrips ( <i>Frankliniella occidentalis</i> ), PCR	( <i>Frankliniella occidentalis</i> )	PEE/BM/18
DIAGNÓSTICO VIRUS PVX, PCR	VIRUS PVX	PEE/BM/24
DIAGNÓSTICO VIRUS PVY, PCR	VIRUS PVY	PEE/BM/25
DIAGNÓSTICO VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS, PCR	VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS	PEE/BM/26
DIAGNÓSTICO Papaya ringspot virus, PCR	Papaya ringspot virus	PEE/BM/27
DIAGNÓSTICO DE <i>Fusarium solani</i> , PCR	<i>Fusarium solani</i> ,	PEE/BM/28
DIAGNÓSTICO DE Thrips <i>palmi</i> , PCR	<i>Thrips palmi</i>	PEE/BM/29
DIAGNÓSTICO DE <i>Meloidogyne hapla</i> , PCR	<i>Meloidogyne hapla</i>	PEE/BM/32

Los resultados de los análisis solicitados podrán ser usados por la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro, AGROCALIDAD, en caso de que se ponga en riesgo el estatus fitosanitario, zoonosanitario o de inocuidad de los alimentos.

	<b>INSTRUCTIVO</b>  <b>“DE TOMA DE MUESTRA PARA EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR – DIAGNÓSTICO VEGETAL”</b>	<b>INT/BM /27</b>
		Rev. 4
		Hoja 19 de 19

**Anexo 3.** Ejemplo de etiqueta a usarse en el envío de muestras (opcional)

LABORATORIO: _____		
<b>IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA:</b>		
<b>PROVINCIA:</b>	<b>CANTÓN:</b>	<b>PARROQUIA:</b>
<b>DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA:</b>		
<b>FECHA DE TOMA DE MUESTRA:</b>		
<b>FECHA DE ENVÍO:</b>		
<b>TOMA DE MUESTRA REALIZADA POR:</b>		
<b>OBSERVACIONES:</b>		