

**DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL
CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA**

**Área de Diagnóstico Fitosanitario
Laboratorio de Micología**

Protocolo de Diagnóstico:

***Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical
(Marchitez por Foc R4T)**

Tecámac, Estado de México, Julio 2018

SENASICA nos protege a todos

SAGARPA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA,
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,
PESCA Y ALIMENTACIÓN



SENASICA
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD
AGROALIMENTARIA

Aviso

El presente protocolo de diagnóstico fitosanitario fue desarrollado en las instalaciones de la Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), con el objetivo de diagnosticar específicamente la presencia o ausencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Raza 4 Tropical. La metodología descrita, tiene un sustento científico que respalda los resultados obtenidos al aplicarlo. La incorrecta implementación o variaciones en la metodología especificada en este documento de referencia pueden derivar en resultados no esperados, por lo que es responsabilidad del usuario seguir y aplicar el protocolo de forma correcta.

La presente versión podrá ser mejorada y/o actualizada quedando el registro en el historial de cambios.

I. ÍNDICE

1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO	1
2. INTRODUCCIÓN	1
2.1 Información sobre la plaga.....	1
2.2 Información taxonómica	2
2.3 Flujo de trabajo	3
3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN	4
3.1 Identificación morfológica	4
3.1.1 Aislamiento en medio de cultivo	4
3.1.2 Interpretación de resultados	5
3.2 Descripción morfométrica.....	5
3.2.1 Morfología colonial	5
3.2.2 Morfología de las estructuras:.....	5
3.3 Identificación Molecular	6
3.3.1 Extracción de DNA.....	7
3.3.1.1 A partir de cultivos puros	7
3.3.1.2 A partir de tejido vegetal	8
3.3.2 Verificación de la calidad del DNA.....	8
3.3.3 PCR punto final	9
3.3.3.1 Controles para las pruebas moleculares	9
3.3.3.2 Ensayo control endógeno	9
3.3.3.3 Ensayo con primers específicos	10
3.3.4 Interpretación de resultados para los ensayos de PCR punto final	11
3.4 Identificación de la plaga	13
4. REGISTROS.....	13
5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL.....	14
6. RECONOCIMIENTO	14
7. REFERENCIAS	14
8. ANEXOS	16
8.1 Ciclo de la enfermedad	16
8.2 Signos y síntomas	17
8.3 Elaboración de montaje.....	18
8.3.1 Preparaciones temporales con cubreobjetos	18
8.3.2 Preparaciones temporales con cinta adhesiva	18
8.3.3 Preparaciones permanentes.....	18
8.4 Medios de cultivo.....	19
8.5 Obtención de cultivos puros.....	20
8.5.1 Cultivos monospóricos	20
8.5.2 Punta de hifa	20
8.6 Corroboración mediante Filogenia Molecular	20
8.6.1 Interpretación de resultados	24

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de <i>Fusarium oxysporum</i>	6
Figura 2. Amplificación del gen endógeno EF-1 α	12
Figura 3. Amplificación con oligos específicos FocTR4.	12
Figura 4. Ciclo de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> Raza 4 Tropical.....	16
Figura 5. Síntomas externos de la marchitez por <i>Fusarium</i> en banano.....	17
Figura 6. Síntomas internos de la marchitez por <i>Fusarium</i> en banano.	17
Figura 7. Alineamiento de secuencias utilizando Nucleotide BLAST.	22
Figura 8. Alineamiento múltiple de secuencias.....	23
Figura 9. Filogenia molecular.	24

III. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Primers utilizados en el ensayo de PCR punto final para la detección del gen endógeno EF1- α	9
Cuadro 2. Preparación de la mezcla de reacción para el ensayo de PCR punto final del control endógeno	10
Cuadro 3. Programa del termociclador para la detección del control endógeno EF-1 α	10
Cuadro 4. Primers específicos para la detección de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> Raza 4 Tropical	10
Cuadro 5. Preparación de la mezcla de reacción para los primers Foc TR4 Fw/Foc TR4 Rv	11
Cuadro 6. Programa del termociclador para el ensayo con los primers FocTR4-F/FocTR4-Rc	11
Cuadro 7. Primers utilizados en el ensayo de PCR punto final para la detección de la región IGS	20

1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO

Describir la metodología utilizada por el Laboratorio de Micología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria para la detección e identificación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Información sobre la plaga

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical (Foc R4T) es el agente causal de la marchitez en banano y plátano. Es un hongo que habita en el suelo (Anexo 8.1); es muy invasivo ya que se puede dispersar por suelo, material de plantación, corrientes de agua, maquinaria de campo, o cualquier otro evento donde haya contacto con suelo contaminado y permita su movilidad. Su centro de origen se localiza en la región sureste de Asia; donde se ha encontrado mayor diversidad del hongo (Pegg, Moore y Sorensen, 1993; Bentley, Pegg y Dale, 1995). Ataca principalmente a los géneros *Musa* (*Musa* spp., *M. textilis*, *M. acuminata*, *M. balbisiana* (Stover, 1962; CABI, 2007), y tiene como hospedantes alternos a otras especies silvestres (o cultivadas), siendo algunas malezas de los banales como: *Chloris inflata*, *Chloris barbata* (zacate borrego), *Commelina diffusa* (canutillo), *Ensete ventricosum* (ensete), *Euphorbia heterophylla* (leche vana, lechosa, leche de sapo) y *Tridax procumbens* (Wardlaw, 1972; Hennessey et al., 2005; CABI, 2007).

La infección por Foc R4T está restringida al sistema vascular de las raíces y pseudotallo (Figura 4 del Anexo 8.1). La enfermedad se conoce por producir dos tipos de síntomas externos conocido como “síndromes” (Stover, 1962; Pérez, 2009):

- “Síndrome” de hoja amarilla: es el síntoma más común y característico. Inicia con un amarillamiento en la periferia de las hojas más viejas que progresa a las más jóvenes (este síntoma se puede confundir con deficiencia de potasio). Las hojas comienzan gradualmente a colapsar en el peciolo (o en mayor frecuencia, de la base de la nervadura central), quedando una "falda" de hojas muertas alrededor del pseudotallo (Figura 5 a y b del Anexo 8.2).
- “Síndrome” de hoja verde: en contraste con el síntoma anterior, las hojas permanecen verdes hasta que los peciolos se doblan y éstas colapsan. Las hojas más jóvenes son las últimas en ser afectadas, permanecen erectas (dando una apariencia a la planta de estar "erizada") (Figura 5 c y d del Anexo 8.2), como el crecimiento no se detiene, las nuevas hojas de una planta infectada, son más pálidas, su lámina es muy reducida, arrugada y distorsionada. En el pseudotallo aparecen rajaduras longitudinales. En frutos no se observan síntomas.

Los síntomas internos se detectan por la coloración del tejido vascular; que inicia con el amarillamiento en raíces y cormos (Figura 6 a) y van progresando hasta quedar todo coloreado de amarillo, rojo o pardo en el pseudotallo (Figura 6 b y c) (Dita, Echegoyén y Pérez, 2013).

2.2 Información taxonómica

Nombre científico: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E. F. Smith) W.C. Snyder y H. N. Hansen, 1940

Sinónimos: *Fusarium cubense* E.F. Sm., 1910

Fusarium oxysporum var. *cubense* (E.F. Sm.) Wollenw, 1935

Nombres comunes: Marchitez de los bananos y plátanos (español)

Mal de Panamá (español)

Fusarium wilt of banana (inglés)

Panama disease of banana (inglés)

Fusarium vascular wilt of banana and abaca (inglés)

Banana wilt (inglés)

Posición taxonómica:

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Hypocreomycetidae

Orden: Hypocreales

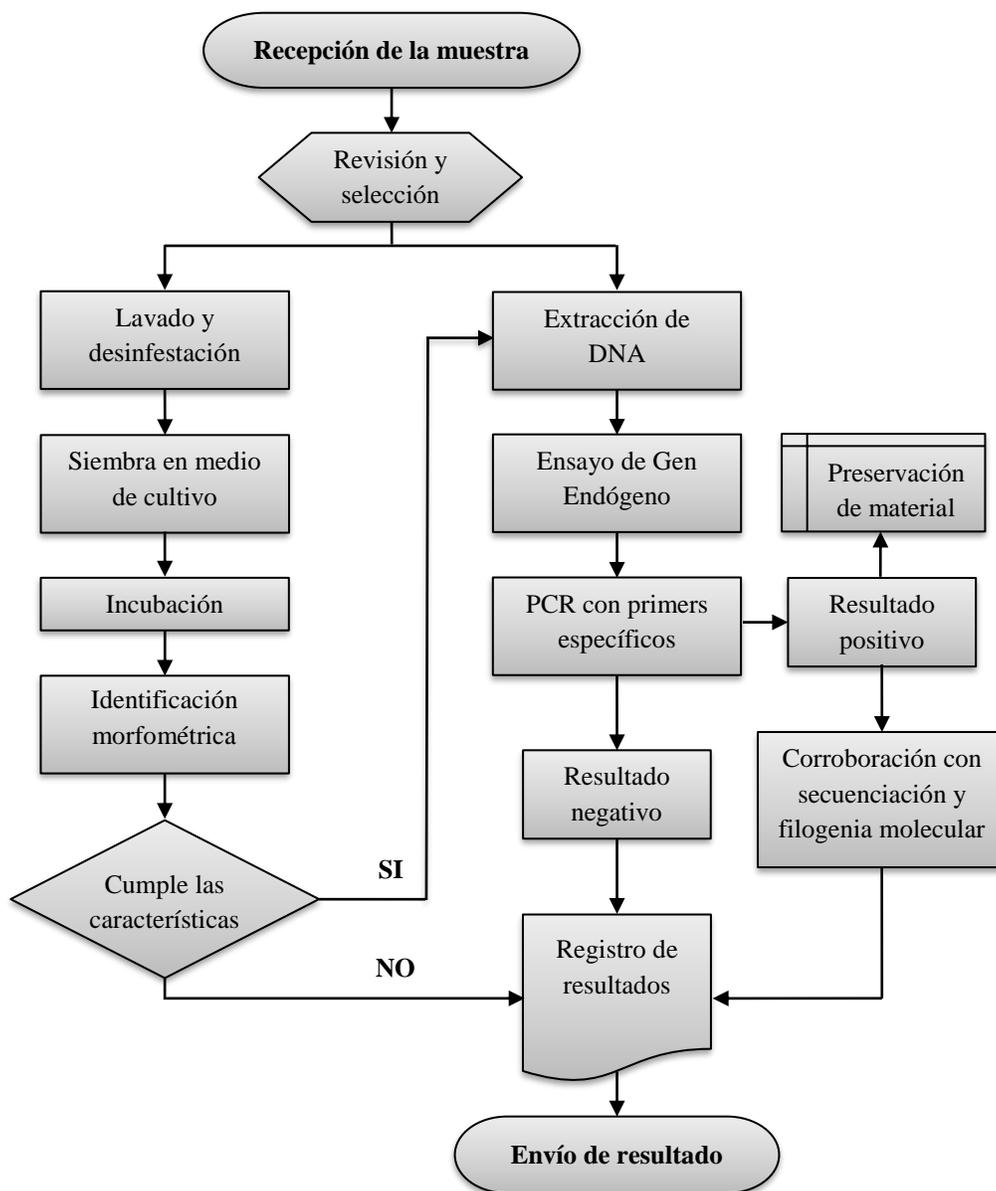
Familia: Nectriaceae

Género: *Fusarium*

Especie: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

(Robert, Stegehuis y Stalpers, 2005)

2.3 Flujo de trabajo



3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Para determinar la presencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical, es necesario contar con haces vasculares, que presente síntomas característicos (Anexo 8.2). Los haces vasculares deben de ser diseccionados de pseudotallos afectados por necrosis interna (indicativo de la presencia del patógeno), sin descomposición avanzada.

Si la muestra no cumple con las características requeridas; no es óptima para el diagnóstico.

3.1 Identificación morfológica

3.1.1 Aislamiento en medio de cultivo

- 1) Cortar secciones de 3–6 cm de largo de haces vasculares, y eliminar el tejido externo.
- 2) Desinfectar los trozos seleccionados con hipoclorito al 1% y realizar 3 lavados continuos con agua destilada estéril.
- 3) Colocar el tejido sobre papel secante hasta que quede completamente seco.
- 4) Posteriormente, sembrar los trozos de haces vasculares en placas de medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar, Potato Dextrose Agar) adicionado con ácido láctico, para la elaboración de medios de cultivo ver Anexo 8.4.
- 5) Incubar $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3$, durante 3-5 días hasta observar crecimiento micelial.
- 6) Si se obtuvo crecimiento adecuado, pasar un fragmento del micelio a una placa con medio de cultivo PDA y otra con SNA (Agar especial pobre en nutrientes, Agar Spezieller Nährstoffarmer) para su purificación (Anexo 8.5).
- 7) Una vez purificada la colonia, realizar cultivos monospóricos (Anexo 8.5.1).
- 8) Realizar montajes en portaobjetos (Anexo 8.3) y observar las características morfológicas de sus estructuras con microscopio compuesto

Nota: el medio de cultivo PDA es útil para la caracterización colonial, mientras que el SNA es apropiado para producir microconidios, macroconidios y clamidosporas de forma estable.

3.1.2 Interpretación de resultados

Para determinar la presencia del patógeno en el aislamiento en medio de cultivo, se debe observar crecimiento micelial a colonias típicas y estructuras con las características de la especie *Fusarium oxysporum* (3.2):

- La identificación morfológica no permite distinguir entre formas especiales ni razas, solo es posible identificar a nivel especie, por lo que si se observan estructuras indicativas de *Fusarium oxysporum*, se procede a la utilización de técnicas moleculares, para la identificación correspondiente de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical.

En caso de no obtener crecimiento micelial o que las estructuras no correspondan a *Fusarium oxysporum* el resultado será negativo.

3.2 Descripción morfométrica

3.2.1 Morfología colonial

- Poseen una morfología variable. El micelio puede ser vellosos, disperso o abundante, de color blanco, con tonos variables de salmón a violeta pálido (Figura 1 e).
- Pueden producir esclerocios de color negro a violeta.
- Usualmente produce pigmentos de color violeta pálido a rojo oscuro en el medio de cultivo.
- En cultivos viejos, puede producir esporodoquios de color naranja (Figura 1 f).

3.2.2 Morfología de las estructuras:

- Los macroconidios tienen forma de hoz a casi rectos, paredes delgadas, con 3-5 septos. Miden entre 27-55 μm de largo y 3.3-5.5 μm de ancho. La célula apical es usualmente delgada o en forma de gancho (Figura 1 a).
- Los microconidios usualmente no tienen septos, miden entre 6-16 μm de largo y 2.4-3.5 μm de ancho. Pueden ser ovalados, elípticos o reniformes, y se forman abundantemente en falsas cabezuelas en monofialides cortas (Figura 1 b y c).
- Las clamidosporas miden de 7-11 μm de diámetro. Se forman de manera abundante en hifas o en conidios, de manera aislada o en cadenas (comúnmente en pares) (Figura 1 d)

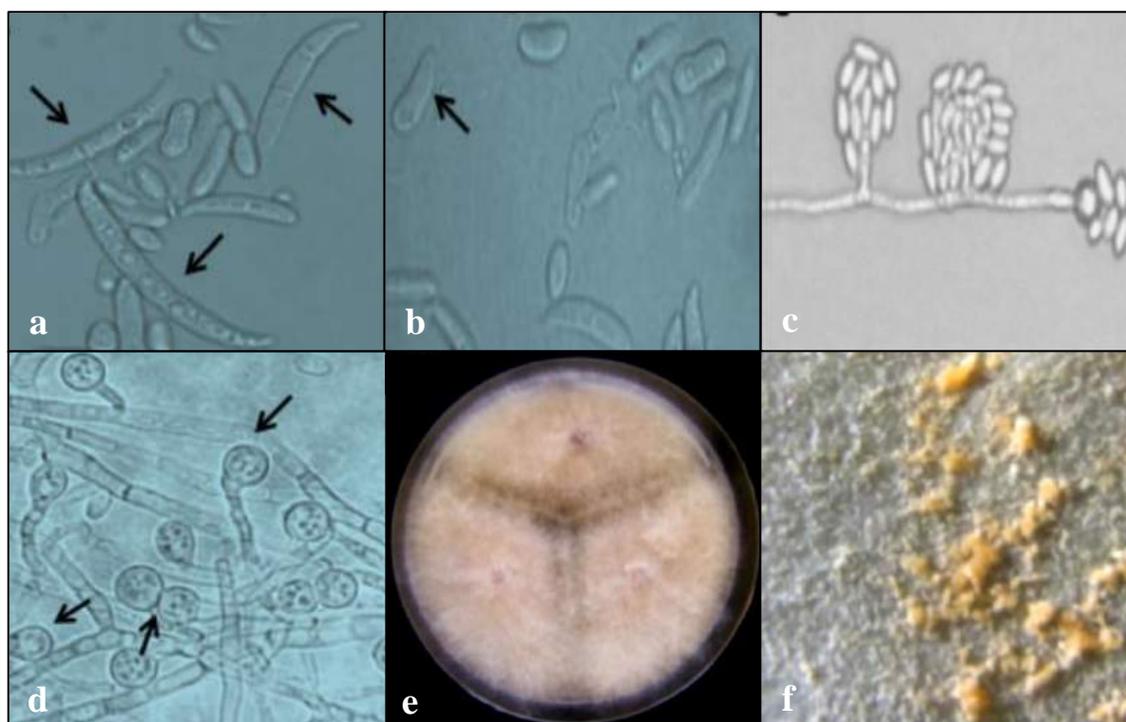


Figura 1. Estructuras de *Fusarium oxysporum*. a) Macroconidios; b) Microconidios; c) Monofialides cortas y microconidios agrupados en falsas cabezas; d) Clamidosporas; e) Crecimiento en medio de cultivo PDA; f) Esporodocios de color naranja formados en la superficie medio de cultivo PDA. (Créditos: Dita et al., 2013).

3.3 Identificación Molecular

La base del diagnóstico molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Raza 4 Tropical son métodos que utilizan la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction). Esta técnica permite la detección y amplificación de regiones de DNA específicas del hongo. Se debe considerar que este método molecular puede detectar y diferenciar a Foc R4T VCG01213/16 de entre otros 19 grupos de compatibilidad vegetativa (VCG's) que afectan también al banano. El protocolo está basado en lo propuesto por Dita et al. (2013).

Nota: para la estandarización de este protocolo se utilizaron diversos reactivos y equipos, estos se pueden remplazar por otras marcas siempre y cuando sean homólogos y cumplan con la misma función.

3.3.1 Extracción de DNA

3.3.1.1 A partir de cultivos puros

La extracción se debe realizar a partir de cultivos puros, preferentemente cultivos monospóricos en medio PDA (Anexo 8.5.1), caracterizados previamente de manera morfológica como *Fusarium oxysporum*, se sugiere el método de extracción propuesto por Cenís (1992).

Nota: cualquier kit comercial de extracción de DNA puede resultar óptimo para tal fin, para ello es importante obtener una buena calidad, cantidad e integridad del DNA.

La metodología propuesta por Cenís (1992) modificada, se describe a continuación:

- 1) En un tubo con perlas de cerámica (MagNA Lyser Green Beads 03358941001 de Roche) transferir micelio del cultivo puro sin tomar medio de cultivo.

Nota: para facilitar la obtención de sobrenadante, previamente sustraer del tubo un poco menos de la mitad de las perlas de cerámica, o la otra opción es duplicar los volúmenes de los reactivos que se mencionan a continuación:

- 2) Agregar 500 μL de buffer TE 1X, incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, centrifugar 5 minutos a 17 940 g, decantar el sobrenadante con una micropipeta.

Nota: evitar decantar el buffer TE mediante inversión del tubo, ya que las perlas de cerámica y micelio se perderían también.

- 3) Adicionar 300 μL de buffer de extracción y macerar el micelio hasta que quede pulverizado mediante un disruptor de tejidos durante 10 minutos (Minibeadbeater-96 Cat. No. 1001 de Biospect Products o equipos con características similares).

Nota: el buffer de extracción consiste en 200 mM Tris-HCL pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA (Ácido Etilendiaminotetraacético) y 0.5% SDS (Dodecil Sulfato de Sodio).

- 4) Adicionar 150 μL de acetato de sodio 3 M pH 5.2, invertir suavemente dos a tres veces el tubo y posteriormente colocar los tubos en refrigeración a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos.

- 5) Centrifugar los tubos durante 10 minutos a 15 290 g, transferir 250 μL del sobrenadante a un tubo de 1.5 mL nuevo y estéril (evitar la resuspensión del sedimento).

- 6) Agregar 250 μL de isopropanol frío (almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), invertir suavemente dos a tres veces el tubo y dejar reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos; posteriormente centrifugar 10 minutos a 15 290 g.

Nota: al final del proceso puede ser o no visible la pastilla de DNA.

- 7) Decantar el isopropanol por inversión cuidando de no perder la pastilla. Agregar 500 μL de etanol al 70% y centrifugar durante 2 minutos a 15 290 g. Repetir el lavado con etanol al 70% una vez más. Secar la pastilla por inversión en una sanita estéril durante 2 horas o hasta que no se observen gotas en la pared del tubo.
- 8) Resuspender el DNA en 50 μL de agua grado biología molecular o buffer TE 1X y guardar la muestra en refrigeración a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. La cantidad de DNA obtenida por este método debe ser la suficiente para cubrir el rango de trabajo del ensayo de PCR.

3.3.1.2 A partir de tejido vegetal

La extracción de DNA también puede realizarse directamente de los haces vasculares. Sin embargo, debe enfatizarse que la extracción de DNA debe realizarse principalmente de cultivos monospóricos caracterizados previamente de manera morfológica como *Fusarium oxysporum*. En general, para la extracción de DNA a partir de tejido vegetal, se sugiere el uso del kit comercial Concert™ Plant RNA Reagent.

Nota: los pasos de extracción son los indicados por el fabricante. Se puede prescindir de una centrifuga refrigerada y se debe evitar el uso de la DNAsa; el kit prioriza la extracción de RNA digiriendo el DNA, y lo que se requiere es el DNA.

3.3.2 Verificación de la calidad del DNA

Al finalizar el proceso de extracción es importante verificar la calidad y cantidad del DNA obtenido; para ello se puede utilizar un espectrofotómetro modelo NanoDrop 2000c de Thermo Scientific™ (seguir las instrucciones del manual del fabricante para su uso) u otro equipo con la misma funcionalidad. La calidad óptima del DNA está dada por la absorbancia $A_{260/280} = 1.8\text{--}2.0$ y $A_{260/230} = 2.0\text{--}2.2$. Para corroborar que el DNA obtenido es apto para ser amplificado debe realizarse un ensayo de control endógeno, evitando así falsos negativos. En la práctica, absorbancias fuera de los intervalos óptimos son permitidos solamente cuando amplifiquen exitosamente el control endógeno.

3.3.3 PCR punto final

3.3.3.1 Controles para las pruebas moleculares

En todos los ensayos de PCR punto final descritos en este protocolo, es necesario incluir los siguientes controles:

Control positivo: provee un patrón de referencia con la cual comparar los resultados positivos en las muestras. Puede ser DNA genómico o el fragmento clonado del hongo, el cual debe estar corroborado mediante secuenciación.

Control negativo de matriz: este control corresponde a un extracto de matriz sin el hongo (haces vasculares). Asegura que no exista reacción cruzada con la matriz o contaminación durante la extracción. Aplica solamente cuando la extracción se realice a partir de tejido vegetal.

Control negativo de reactivos: es la mezcla de reacción sin molde (DNA o clona). Descarta falsos positivos y contaminación de la reacción.

3.3.3.2 Ensayo control endógeno

Para verificar la integridad y calidad del DNA extraído y evitar falso negativos se debe realizar un ensayo de PCR de un control endógeno. Se utilizan los primers EF-1 y EF-2 propuestos por O'Donnell et al. (1998), que reconocen una región del gen factor de elongación 1 alfa (EF-1 α). Las secuencias de los primers se observan en el Cuadro 1.

Es importante saber que el tamaño y el número de bandas obtenidos por PCR punto final, en el ensayo de control endógeno es variable, debido a que el par de primers EF-1/EF-2 son universales y amplifican a la mayoría de hongos; por lo que la extracción de tejido vegetal puede amplificar dos o más bandas. Lo fundamental a inferir es que el extracto de DNA sea amplificable.

Cuadro 1. Primers utilizados en el ensayo de PCR punto final para la detección del gen endógeno EF1- α .

Tipo	Nombre del primer	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Sentido	EF-1	5'- ATGGGTAAGGARGACAAGAC -3'	Aprox. 750
Antisentido	EF-2	5'- GGARGTACCAGTSATCATGTT -3'	

R= G o A; S= G o C

- 1) Preparar la reacción de PCR punto final de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Preparación de la mezcla de reacción para el ensayo de PCR punto final del control endógeno.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer PCR	10 X	1 X	2.5
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5
Primer EF-1	10 µM	0.5 µM	1.25
Primer EF-2	10 µM	0.5 µM	1.25
Taq DNA Pol	500 U	2.5 U	0.125
DNA	25–500 ng/µL	2–40 ng/µL	2.0
Agua grado biología molecular	-	-	16.625
		Volumen final	25

2) A continuación, programar el termociclador de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 3:

Cuadro 3. Programa del termociclador para la detección del control endógeno EF-1α.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	5 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	45 segundos	35
Alineamiento	50 °C	45 segundos	
Extensión	72 °C	1 minuto	
Extensión final	72 °C	5 minutos	1

Al finalizar los productos de PCR deben correrse 1 hora 100 V en un gel de agarosa ultra pura al 2% en buffer TAE 1X, teñido con 0.6X de GelRed™ Biotum, u otro método adaptable que permita interpretar los resultados.

3.3.3.3 Ensayo con primers específicos

Si la muestra amplifica correctamente en el ensayo de control endógeno se puede proceder a los subsecuentes ensayos de PCR punto final. Para la detección de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical (VCG01213/16) mediante la técnica de PCR punto final, Dita et al., (2010) han diseñado un par de primers basados en la región IGS del rDNA que amplifican un fragmento de 463 pb únicamente para Foc R4T (Cuadro 4).

Cuadro 4. Primers específicos para la detección de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical.

Tipo	Nombre del primer	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Sentido	FocTR4-F	5'- CACGTTTAAGGTGCCATGAGAG -3'	463
Antisentido	FocTR4-Rc	5'- GCCAGGACTGCCTCGTGA - 3'	

- 1) Preparar la reacción de PCR punto final para el par de primers FocTR4-F/FocTR4-Rc de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 5:

Cuadro 5. Preparación de la mezcla de reacción para los primers Foc TR4 Fw/Foc TR4 Rv.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer PCR	10 X	1 X	2.5
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5
FocTR4-F	10 µM	0.5 µM	1.25
FocTR4-Rc	10 µM	0.5 µM	1.25
Taq DNA Pol	500 U	2.5 U	0.125
DNA	25–500 ng/µL	2–40 ng/µL	2.0
Agua grado biología molecular	-	-	16.625
		Volumen final	25

- 2) A continuación, programar el termociclador de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 6:

Cuadro 6. Programa del termociclador para el ensayo con los primers FocTR4-F/FocTR4-Rc.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	5 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	1 minuto	30
Alineamiento	60 °C	1 minuto	
Extensión	72 °C	3 minutos	
Extensión final	72 °C	10 minutos	1

3.3.4 Interpretación de resultados para los ensayos de PCR punto final

Los resultados son válidos solamente bajo los siguientes criterios:

- En el ensayo de control endógeno, el control positivo (aplica si es DNA) y cada una de las muestras debe de generar una banda de tamaño de aproximadamente 750 pb (Figura 2).
- El control negativo de reactivos no debe de generar bandas en ningún ensayo de PCR (Figura 2 y 3).
- El control positivo para el ensayo de PCR con el par de primers FocTR4-F/FocTR4-Rc debe de generar una banda de tamaño de 463 pb (Figura 3).

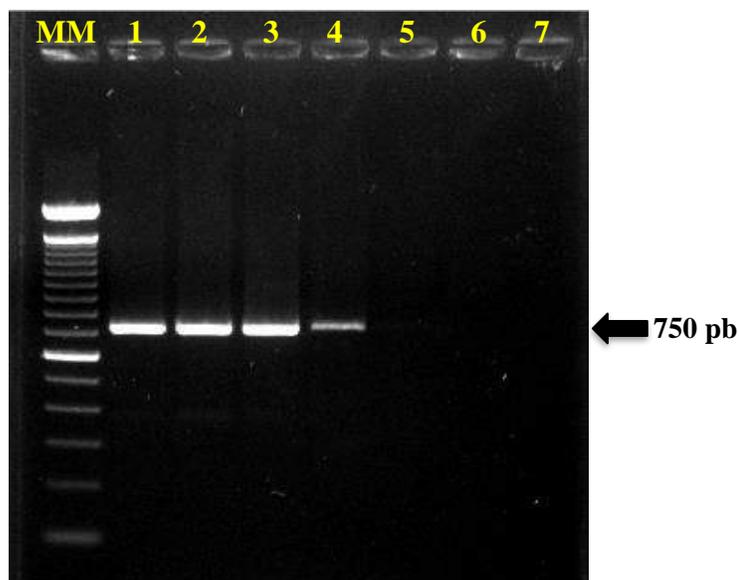


Figura 2. Amplificación del gen endógeno EF-1 α . 1-2: control positivo; 3-4: muestras; 5-7: control negativo. MM: marcador molecular TrackIt™ 100 pb DNA Ladder de Invitrogen.

Se considera como resultado positivo aquellas muestras que amplifiquen el fragmento de 463 pb con los primers FocTR4-F/FocTR4-Rc.

El resultado es negativo si en las muestras no hay amplificación del fragmento de 463 pb con los primers FocTR4-F/FocTR4-Rc.

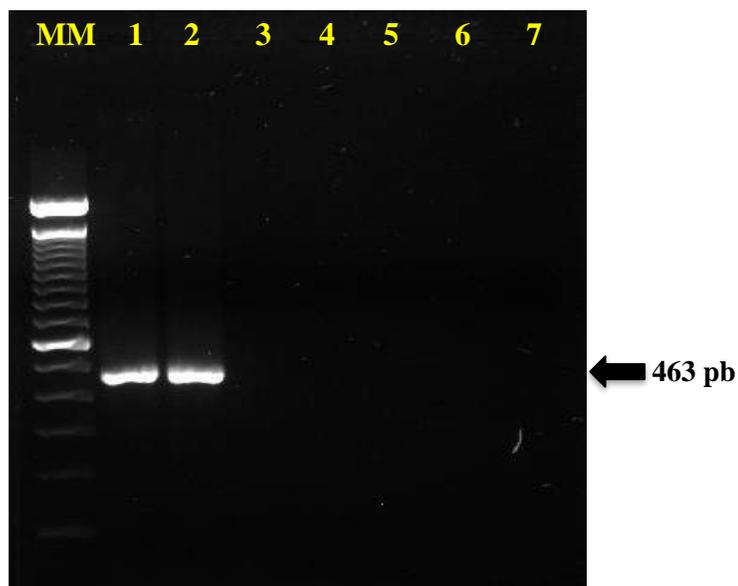


Figura 3. Amplificación con oligos específicos FocTR4. 1-2: control positivo; 3-4: muestras; 5-7: control negativo. MM: marcador molecular TrackIt™ 100 pb DNA Ladder de Invitrogen.

3.4 Identificación de la plaga

Para reportar una identificación positiva de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical, es necesario la detección en conjunto de las siguientes pruebas: aislamiento y caracterización de la colonia, caracterización morfológica de las estructuras distintivas del hongo, y la amplificación positiva del ensayo de PCR punto final (utilizando los pares de primers específicos FocTR4-F/FocTR4-Rc).

Como prueba de corroboración para muestras positivas, se debe de secuenciar la región espaciadora intergenica (IGS) del DNA ribosomal (rDNA) con los primers PNFo y PN22 diseñados por Edel, Steinberg y Avelange (1995); más detalles ver Anexo 8.6. Los casos en los que se debe de corroborar por secuenciación son:

- Detecciones en zonas reconocidas como libres del patógeno.
- Cuando se necesite un sustento fitosanitario de mayor relevancia para la movilidad de tejido vegetal.

Para corroboración los datos de secuenciación se deben de enviar al Laboratorio de Micología del CNRF para su análisis. En estos casos, se considera aceptada la identificación después de realizar el análisis de secuencias.

En el Anexo 8.6 se detalla la metodología para el análisis de secuencias empleado por el Laboratorio de Micología del CNRF.

4. REGISTROS

Almacenar los registros y evidencias del proceso de diagnóstico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical.

Mantener el material vegetal que no fue utilizado en el diagnóstico en su empaque original, bajo refrigeración a 4 °C, durante al menos 1 mes posterior al diagnóstico.

En caso de obtener un resultado negativo: inactivar y desechar el material vegetal.

En caso de obtener un resultado positivo, conservar:

- Evidencia fotográfica de los signos y síntomas, aislamientos y de las estructuras del hongo.
- Montajes permanentes, donde se encuentren las estructuras distintivas del hongo, como evidencia de la identificación morfométrica.
- El DNA obtenido en congelación a -20°C (de ser posible a -70°C).
- El registro de los resultados de las pruebas moleculares (fotografía del gel y formatos de secuencias).
- Conservar el aislamiento puro, no realizar transferencias continuas del aislamiento, para ello se pueden utilizar técnicas de preservación que garanticen la viabilidad del hongo.

5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL

Correo: lab.micologia@senasica.gob.mx

Teléfono: 01 (52) 55 5905 1000, **Ext.** 51424, 51409 y 51373

6. RECONOCIMIENTO

Este protocolo fue elaborado por el Laboratorio de Micología (Lervin Hernández Ramos, Magnolia Moreno Velázquez y Nayeli Carrillo Ortiz), revisado por el Departamento de Fitopatología (María del Rocío Hernández Hernández) y editado por el Grupo DiaFi (Ana Karen Preuss Ángeles y Ariana Guadalupe Robles Zárata).

Agradecimiento a quienes participaron en elaboración y revisión de las versiones anteriores del Protocolo: Grisel Negrete Fernández, Israel David Rivas Avilés, José Gustavo Torres Martínez y Monserrat Valdés García.

7. REFERENCIAS

- Benson, A. D., Mark, C. K. C., Karsch M. I., Lipman, J. D., Ostell, J., Sayers, W. E. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research* 41: 36-42.
- Bentley, S., Pegg, K. G., Dale, J. L., (1995). Genetic variation among a world-wide collection of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* analysed by RAPD-PCR fingerprinting. *Mycological Research*, 99(11):1378-1384; 27.
- CABI (CAB International). (2007). *Crop Protection Compendium*. Wallingford, UK. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/24621>
- Cenis, L. J. (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, 20: 2380.
- Dita, M. A., Waalwijk, C., Buddenhang, I. W., Souza, M. T., Kemab, G. H. J. (2010). A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana *Fusarium* wilt pathogen. *Plant Pathology* 59: 348–357.
- Dita, M., Echegoyén, P., Pérez, L. F. (2013). Plan de contingencia ante un brote de la raza 4 tropical de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en un país de la región del OIRSA. Organismo Internacional Regional de Sanidad. Agropecuaria – OIRSA. San Salvador, El Salvador.
- Edel, V., Steinberg, C., Avelange, I., Laguerre, G. and Alabouvette, C. (1995). Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains: *Phytopathology*. 85:579–585.
- Fourie, G., Steenkamp, E. T., Gordon, T. R., Viljoen, A. (2009). Evolutionary relationships among the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Vegetative Compatibility Groups. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (14): 4770–4781.

- Hennessy, C.; Walduck, G.; Daly, A.; Padovan, A. (2005). Weed hosts of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 in northern Australia. *Australasian Plant Pathology*. 34: 115-117.
- Morales, R. I., Yañez, M. M., Silva, R. H., García, D. G., Guzmán, P. D. (2007). Biodiversity of *Fusarium* species in México associated with ear rot in maize, and their identification using a phylogenetic approach. *Mycopathologia* 163:31-39.
- O'Donnell, K., Kistler, C., Cigelnik, E., Ploetz, C. R. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95: 2044-2049.
- Pegg, K. G., Moore, N. Y., Sorensen, S. (1993). *Fusarium* wilt in the Asian-Pacific region. In: Valmayor, R. V., Hwang, S. C., Ploetz, R., Lee, S. W., Roa, N. V., eds *Proceedings: International Symposium on Recent Developments in Banana Cultivation Technology* Los Baños, Laguna, Philippines: INIBAP/ASPNET, 225-269.
- Pérez, V. L.; Batlle, V. A.; Chacón, B. J., Montenegro, M. V. (2009). Reacción de clones naturales e híbridos de la FHIA de bananos y plátanos a las poblaciones de Cuba de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* agente causal de la marchitez por *Fusarium* o mal de Panamá: *Fitosanidad* 13 (4): 237-242.
- Robert, V., Stegehuis, G., Stalpers, J. (2005). The MycoBank engine and related databases. Recuperado de: <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000067&Rec=10816&Fields=All>
- Stover, R. H. (1962). *Fusarium* wilt (Panama disease) of bananas and other *Musa* species. Kew, UK. Commonwealth *Mycological Institute*. 177.
- Stover, R. H. (1972). *Banana, plantain and abaca diseases*. Surrey, UK. CMI. 316.
- Wardlaw, C. W. (1972). *Banana diseases: including Planta in and Abaca*. London, UK. Longman.

Forma recomendada de citar:

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2018). Protocolo de Diagnóstico: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical (Marchitez por Foc R4T) [Versión 1.0]. Tecámac, México: Autor.

8. ANEXOS

8.1 Ciclo de la enfermedad

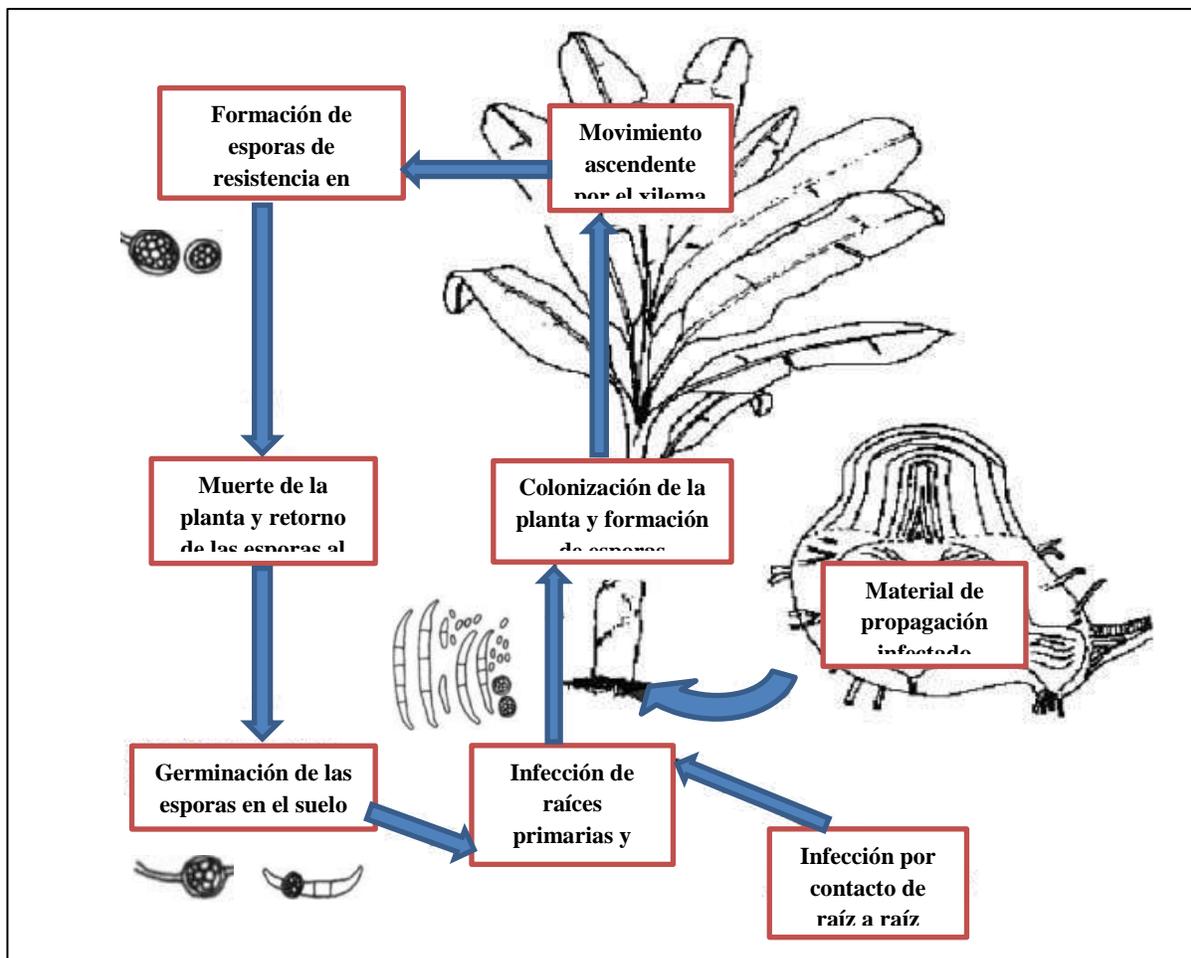


Figura 4. Ciclo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical. Agente causal de la enfermedad Mal de Panamá en banano.

8.2 Signos y síntomas



Figura 5. Síntomas externos de la marchitez por *Fusarium* en banano. a) Clorosis generalizada en las hojas “síndrome de la hoja amarilla”; b) Rajaduras en la base del pseudotallo; c) Planta con “síndrome de la hoja verde”; d) Quiebre de las hojas en la base del pecíolo (Créditos: Dita et al., 2013).



Figura 6. Síntomas internos de la marchitez por *Fusarium* en banano. a) Corte transversal en el cormo (rizoma) mostrando necrosis de los tejidos; b) Corte transversal del pseudotallo mostrando necrosis avanzada del tejido vascular; c) Corte longitudinal del pseudotallo mostrando necrosis a lo largo de los haces vasculares (Créditos: Dita et al., 2013).

8.3 Elaboración de montaje

8.3.1 Preparaciones temporales con cubreobjetos

- 1) Observar el crecimiento micelial y de esporodoquios de un cultivo puro con microscopio estereoscópico.
- 2) Tomar un fragmento micelio y esporodoquios con un alfiler entomológico del número 2 o una aguja de disección.
- 3) Adicionar en un portaobjetos una gota de medio de montaje (lactofenol o glicerina con azul de Nilo) y sobre esta gota, colocar el micelio o esporodoquios y dejar hidratar completamente las estructuras para evitar la formación de burbujas de aire.
- 4) Cubrir la gota con un cubreobjetos y presionar ligeramente para distribuir el medio de montaje.
- 5) Calentar por 5 segundos para eliminar burbujas de aire. Observar las estructuras con microscopio compuesto.
- 6) En caso de que no se aprecien las estructuras, deberá realizarse otra preparación.

8.3.2 Preparaciones temporales con cinta adhesiva

- 1) Colocar en un portaobjetos una gota de medio de montaje con colorante.
- 2) Con un pedazo de cinta adhesiva transparente tocar con delicadeza y en forma superficial el medio de cultivo para obtener las estructuras del hongo.
- 3) Pegar la cinta sobre el portaobjetos cuidando que las estructuras queden dentro de la gota de medio de montaje.
- 4) Observar con microscopio compuesto para identificar las estructuras.

8.3.3 Preparaciones permanentes

- 1) Colocar una gota de medio de montaje con colorante (lactofenol, ácido láctico o glicerina) con el fin de hidratar el micelio.
- 2) Adicionar las estructuras sobre la gota con ayuda de una aguja de disección o de un alfiler entomológico del número 2. Eliminar la formación de burbujas con una aguja o calentar el portaobjetos (sin sobrecalentar) en un mechero.
- 3) Con ayuda de un sacabocados, formar un anillo de parafina alrededor de la gota. Para esto, calentar el extremo del sacabocados en un mechero e introducirlo en parafina e inmediatamente colocarlo en perímetro a la gota.

Nota: el diámetro del sacabocados debe ser mayor al de la gota.

- 4) Colocar un cubreobjetos sobre el anillo de parafina y calentar hasta que el anillo se derrita, cuidando que no queden burbujas de aire en la gota ni en la parafina.
- 5) Dejar enfriar y observar en microscopio compuesto.

8.4 Medios de cultivo

PDA (Papa Dextrosa Agar) con ácido láctico

Papa	100 g
Dextrosa	7.5 g
Agar nutritivo	9.0 g
Agua destilada	500 mL

Procedimiento: colocar los trozos de papa en un matraz Erlenmeyer con el agua y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Filtrar el agua de cocción y aforar a 500 mL. Agregar la dextrosa y el agar, disolver con agitador magnético. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 20 minutos.

Dejar enfriar, adicionar 1.5 mL de ácido láctico al 10%, vaciar en cajas Petri y dejar solidificar.

SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar, Agar especial pobre en nutrientes)

KH ₂ PO ₄	1 g
KNO ₃	1 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.5 g
KCl	0.5 g
Glucosa	0.2 g
Sacarosa	0.2 g
Agua destilada	1 L

Procedimiento: en un matraz Erlenmeyer adicionar el agua y los ingredientes, mantener en agitador magnético hasta que se disuelvan los ingredientes y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Dejar enfriar y vaciar en cajas Petri y dejar solidificar.

AA (Agua agar)

Agar nutritivo	20 g
Agua destilada	1000 mL

Procedimiento: mezclar el agar en 800 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer aforar a 1000 mL, esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos, dejar enfriar, vaciar en cajas Petri y dejar solidificar.

8.5 Obtención de cultivos puros

8.5.1 Cultivos monospóricos

A continuación, se describe una modificación de la técnica descrita por Morales, et al., (2007) para la obtención de cultivos monospóricos:

- 1) Tomar con alfiler entomológico o aguja de disección macroconidios a partir de esporodoquios, o de micelio.
- 2) Posteriormente introducirlos en un vial con 1 mL de agua destilada estéril para preparar una suspensión.
- 3) Mezclar por inversión o vórtex para homogeneizar.
- 4) Verter sobre una caja con medio de cultivo agua agar (AA) (Anexo 7.4.3), distribuir los macroconidios en la superficie del medio con un movimiento oscilatorio y permitir su sedimentación durante 10 segundos, decantar el agua sobre papel absorbente estéril.
- 5) Incubar a 25 °C durante 1 a 2 horas para permitir su germinación.
- 6) Observar con microscopio estereoscópico la germinación de los macroconidios, tomar un conidio con un bloque el bloque medio de cultivo al que se adhirió conteniendo un solo macroconidio germinado y transferirlo a una caja Petri con el medio de cultivo PDA.

8.5.2 Punta de hifa

Obtener cultivos puros a partir de crecimiento micelial, utilizando la técnica de punta de hifa:

- 1) Observar con microscopio estereoscópico el crecimiento del hongo y localizar una hifa cuya extremidad se encuentre libre y no entrelazada con otras hifas.
- 2) Con un alfiler entomológico o aguja de disección, separar y cortar el extremo de la hifa.
- 3) Transferirla a una caja con el medio de cultivo PDA.
- 4) Incubar a 25 °C hasta obtener el crecimiento del cultivo puro.

8.6 Corroboración mediante Filogenia Molecular

Para la secuenciación y análisis filogenético se debe utilizar la región espaciadora intergenica (IGS) del DNA ribosomal (rDNA); de acuerdo a Dita et al., (2010) la región IGS tiene una alta frecuencia de SNP's (Single Nucleotide Polymorphism) que pueden ser utilizados como marcador molecular para el diagnóstico de FOC R4T. El Laboratorio de Micología del CNRF se basa en el análisis filogenético de la región IGS del rDNA amplificado con los primers PNFo y PN22 (Cuadro 7) diseñados por Edel et al., (1995).

Cuadro 7. Primers utilizados en el ensayo de PCR punto final para la detección de la región IGS.

Tipo	Nombre del primer	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Sentido	PNFo	5'- CCCGCCTGGCTGCGTCCGACTC -3'	≈ 1700
Antisentido	PN22	5'- CAAGCATATGACTACTGGC - 3'	

La mezcla de reacción se hace de acuerdo al Cuadro 2 (sustituyendo los primers EF-1 y EF-2 por PNFo y PN22). La amplificación se programa con 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 50 °C por 45 segundos y 72 °C por 90 segundos; precedido por un paso de desnaturalización inicial de 94 °C por 2 minutos y una extensión final de 72 °C por 5 minutos (Fourie et al., 2009). Los productos de PCR deben correrse 1 hora 100 V en un gel de agarosa ultra pura al 2% en buffer TAE 1X, teñido con 0.6X de GelRed™ Biotum, al finalizar verificar la presencia de un fragmento de aproximadamente 1700 pb.

- 1) Los productos de PCR deberán ser enviados a secuenciar, siguiendo las especificaciones para el envío de muestras de la institución a la que se solicite el servicio.
- 2) Una vez obtenidas las secuencias ingrese a la herramienta de alineamiento Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Inserte la secuencia de interés y realice el alineamiento con los parámetros preestablecidos.

Nota: el ensayo con los primers PNFo y PN22 amplifican una región de aproximadamente 1700 pb para *Fusarium oxysporum*. Dentro de ésta región hibridan los primers FocTR4-F y FocTR4-Rcorto; los cuales mediante un SNP's en el extremo 3' permiten la identificación del patógeno. La secuencia mínima para realizar el análisis filogenético es la región de 463 pb, flanqueada por FocTR4-F y FocTR4-Rcorto.

- 3) Una vez realizado el alineamiento (Figura 7) verificar que las especies que aparezcan correspondan a la región IGS de *Fusarium oxysporum*, revisar el porcentaje de cobertura e identidad (los porcentajes siempre deberán tender hacia el 100%), verificar el valor de E, el cual, representa el valor estadístico generado por BLAST a partir del alineamiento al azar de la secuencia de interés en la base de datos, dicho valor siempre deberá tender a cero (Benson et al., 2013).

Nota: en la base de datos del NCBI existen muchas secuencias que han sido incorrectamente identificadas, por lo que el resultado obtenido aquí no resulta totalmente concluyente; del mismo modo, el alineamiento de una secuencia puede dar 100% de cobertura e identidad con distintas *forma specialis* de *Fusarium oxysporum*

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. sp. cumini partial 18S rRNA gene for 18S ribosomal RNA, strain F11	815	815	100%	0.0	100%	LT841208.1
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. cubense voucher BRIP 62353a 28S ribosomal RNA gene and 28S-18S	815	815	100%	0.0	100%	KX101211.1
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. cubense voucher BRIP 62347a 28S ribosomal RNA gene and 28S-18S	815	815	100%	0.0	100%	KX101210.1
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum isolate MIAE00799 28S ribosomal RNA gene and 28S-18S ribosomal RN	815	815	100%	0.0	100%	KX759110.1
<input type="checkbox"/> TPA: Fusarium oxysporum f. sp. cubense race 4 strain B2 rDNA repeat region	815	815	100%	0.0	100%	LT571434.1
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum strain S1A1 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	815	815	100%	0.0	100%	KJ159632.1
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum strain S9A2 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	815	815	100%	0.0	100%	KJ159622.1
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum strain S2B1 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	815	815	100%	0.0	100%	KJ159621.1
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum strain S8B2 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	815	815	100%	0.0	100%	KJ159619.1
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum strain S3B1 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	815	815	100%	0.0	100%	KJ159615.1
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum strain S7A1 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	815	815	100%	0.0	100%	KJ159614.1
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum strain S1B2 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	815	815	100%	0.0	100%	KJ159610.1
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum strain B2A1 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	815	815	100%	0.0	100%	KJ159608.1
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum isolate MIAE01700 28S ribosomal RNA gene, partial sequence: 28S-18S	815	815	100%	0.0	100%	KU129006.1
<input type="checkbox"/> Fusarium oxysporum f. sp. cyclaminis isolate MIAE01686 28S ribosomal RNA gene and 28S-18S	815	815	100%	0.0	100%	KU128991.1

Figura 7. Alineamiento de secuencias utilizando Nucleotide BLAST. Muestra sospechoso a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical.

4) Dado que en grupos de especies con un alto grado de parentesco molecular la diferenciación entre especies, formas especiales o razas reside en un número limitado de inserciones y deleciones (INDELS) y polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's), es conveniente realizar filogenia molecular para determinar con exactitud la identidad de las muestras de interés. La reconstrucción filogenética debe partir de secuencias bien caracterizadas de especies tipo y procedentes de una fuente fiable, se recomienda utilizar las secuencias de referencia publicadas por Fourie et al., (2009); a ellas agregar nuestras secuencias de la muestra de interés.

Nota: las secuencias de referencia para *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical son FJ664978, FJ664979, FJ664984 y FJ664985.

5) El alineamiento múltiple de secuencias y la posterior construcción de árboles filogenéticos se realizan con los Softwares BioEdit Sequence Alignment Editor v7.2.5 y MEGA7 (otros softwares pueden ser utilizados para el mismo propósito). En el alineamiento múltiple de secuencias incluir tanto la secuencia del primer forward como del primer reverse en su inverso complementario. Utilizar el algoritmo ClustalW para el alineamiento de todas las secuencias. Para la reconstrucción filogenética es recomendable utilizar un método que

esté basado en distancias génicas (Neighbor-joining NJ) y otro que esté basado en métodos probabilísticos (Maximum likelihood o inferencia Bayesiana).

- 6) El árbol filogenético obtenido aquí puede ser confirmado mediante el análisis de los INDELS y SNP's observados directamente en el alineamiento múltiple de secuencias (Figura 8). Para ejemplificar, las secuencias de la muestra de interés fueron analizadas mediante el método de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood), quedando agrupadas en el Clado IV junto con las secuencias de referencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* Raza 1 VCG O120, descartando la presencia de la Raza 4 Tropical (Figura 9).

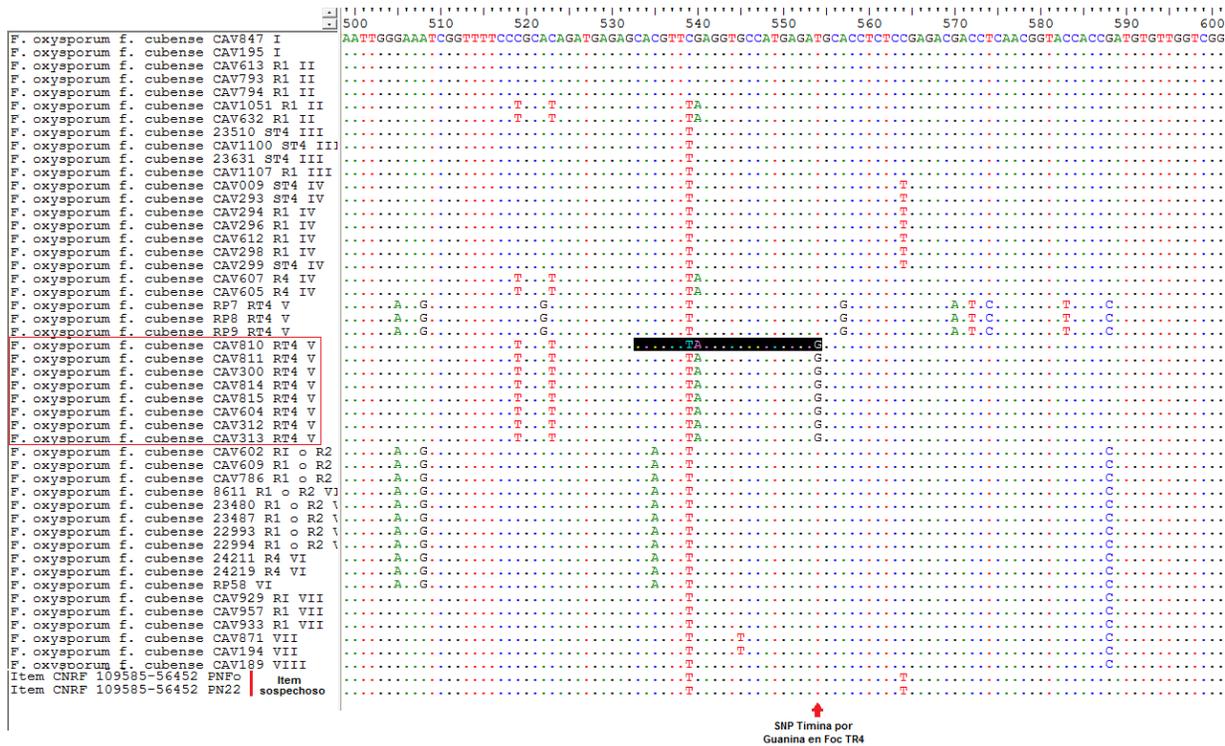


Figura 8. Alineamiento múltiple de secuencias. Se utilizaron las secuencias de la región IGS del rDNA de 46 variantes de Raza 1, Raza 2 y Raza 4 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense*, más la muestra denominada CNRF 109585-56452. Obsérvese en una región parcial de 100pb los SNP's característicos de Foc RT4. Los nucleótidos marcados en negro corresponden al primer FocTR4-F.

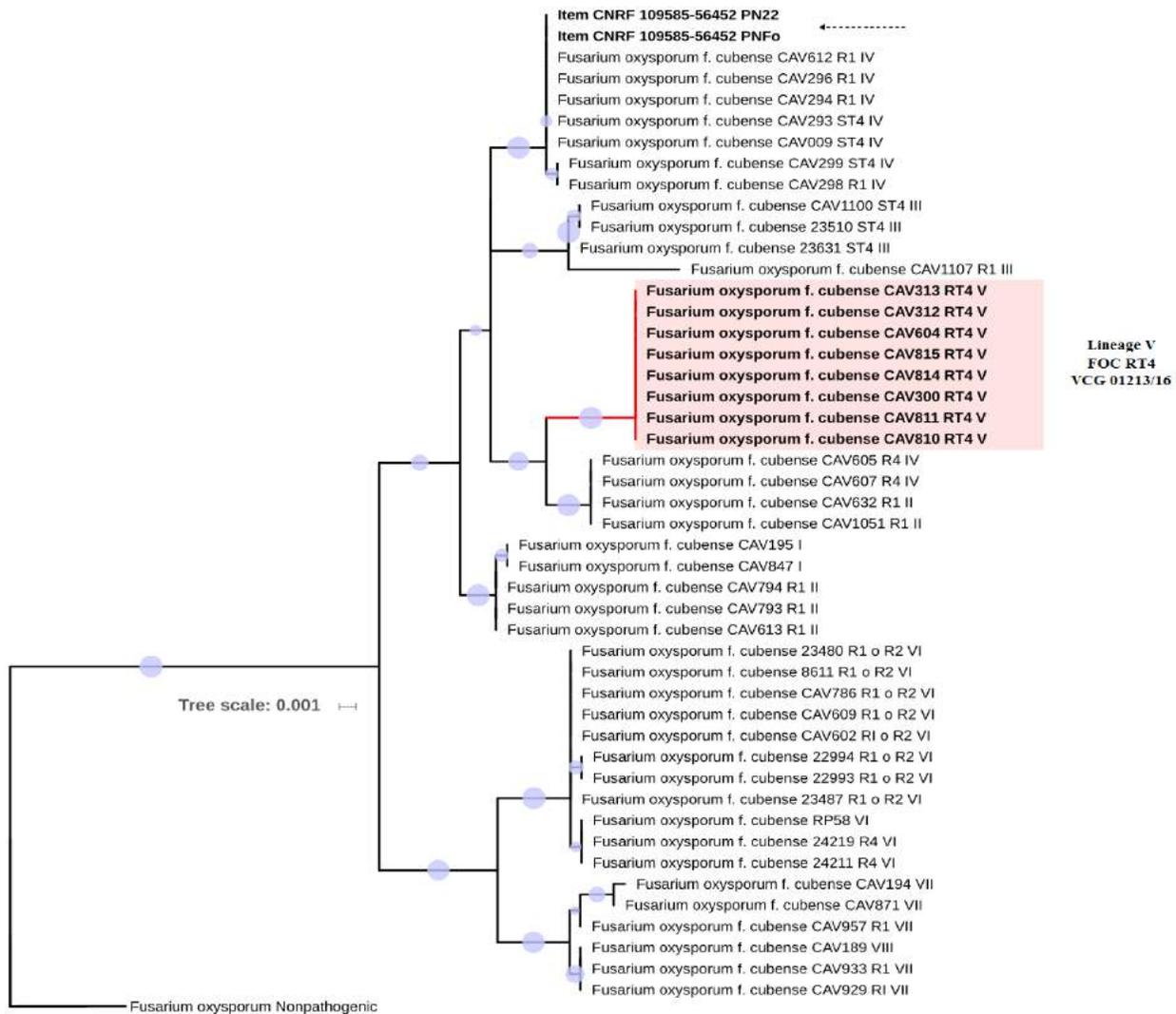


Figura 9. Filogenia molecular. Inferida de una porción de la región IGS del rDNA mediante el modelo Maximum Likelihood con 1000 réplicas Bootstrap incluyendo 46 secuencias de variantes de Raza 1, Raza 2 y Raza 4 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, más la muestra denominada CNRF 109585-56452.

8.6.1 Interpretación de resultados

El resultado es positivo cuando la secuencia de la muestra quede agrupada exactamente en el mismo clado que las secuencias de referencia FJ664978, FJ664979, FJ664984 y FJ664985.

El resultado es negativo cuando las secuencias de la muestra queden agrupadas en un clado distinto a las de las secuencias de referencia. En este caso la identidad del organismo es establecida en base al clado que se agrupe la secuencia de la muestra y debe registrarse en el resultado final.