

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA

Área de Diagnóstico Fitosanitario Laboratorio de Micología

Protocolo de Diagnóstico:

Colletotrichum kahawae
(CBD, Coffee Berry Disease)

Tecámac, Estado de México, Noviembre 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 *Colletotrichum kahawae*. 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 morfométrica	4
3.1.1. Observación directa	4
3.1.1.1. Interpretación de resultados	5
3.1.2. Incubación en papel secante	5
3.1.2.1. Interpretación de resultados	6
3.1.3. Aislamiento en medios de cultivo	6
3.1.3.1. Interpretación de resultados	7
3.2. Descripción morfométrica	7
3.2.1. Morfología colonial	7
3.2.2. Fase asexual (Anamorfo)	8
3.3. Identificación molecular	8
3.3.1. Extracción de DNA	9
3.3.2. Verificación de la calidad del DNA	10
3.3.3. Amplificación isotérmica LAMP	10
3.3.3.1. Ensayo control endógeno	10
3.3.3.2. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP).....	11
3.3.3.3. Controles para las pruebas moleculares	13
3.3.4. Interpretación de resultados para los ensayos de PCR punto final y LAMP	13
3.4. Identificación del patógeno.....	14
4. REGISTROS	15
5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL.....	15
6. RECONOCIMIENTO	15
7. REFERENCIAS	16
8. ANEXOS	18
8.1. Signos y síntomas	18
8.2. Elaboración de montajes	19
8.2.1. Preparaciones temporales con cubreobjetos.....	19
8.2.2. Preparaciones temporales con cinta adhesiva	19
8.2.3. Preparaciones permanentes	19
8.3. Medios de montaje.....	20
8.4. Medios de cultivo	21
8.5. Corroboración mediante Filogenia Molecular	22
8.5.1. Interpretación de resultados	24

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología colonial de <i>Colletotrichum kahawae</i> subsp <i>kahawae</i> .	7
Figura 2. Características morfológicas de <i>Colletotrichum kahawae</i> .	8
Figura 3. Ensayo de control endógeno con el par de primers ITS-1 e ITS-4.	14
Figura 4. Amplificación isotérmica LAMP.	14
Figura 5. Síntomas de antracnosis en cerezas de café.	18
Figura 6. Alineamiento de secuencias utilizando Nucleotide BLAST.	23
Figura 7. Filogenia molecular de complejo de especies de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .	24

III. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Primers utilizados en el ensayo de PCR punto final para la detección del gen endógeno ribosomal.	11
Cuadro 2. Preparación de la mezcla de reacción para el ensayo de PCR punto final del control endógeno.	11
Cuadro 3. Programa del termociclador para la detección del control endógeno.	11
Cuadro 4. Primers específicos para amplificación isotérmica LAMP.	12
Cuadro 5. Preparación de la mezcla de reacción para la amplificación isotérmica LAMP.	12
Cuadro 6. Programa de amplificación isotérmica LAMP.	12

1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO

Describir los procedimientos para la identificación de *Colletotrichum kahawae* mediante caracterización morfológica y técnicas moleculares.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Información sobre la plaga

La enfermedad del cerezo del café (CBD por las siglas en inglés Coffee Berry Disease), es una antracnosis causada por el patógeno emergente *Colletotrichum kahawae*, que afecta principalmente a las drupas (bellotas) de la especie *Coffea arabica* (Sreenivasaprasad et al., 1993); la cual tiene la particularidad de infectar tanto a las bellotas en estado verde como a las completamente maduras, lo que representa un nicho ecológico previamente no ocupado por otros hongos fitopatógenos que afectan al cultivo de café (Silva et al., 2012).

Colletotrichum kahawae fue propuesto por Waller, Bridge y Hakiza (1993) para referirse a aquellos aislamientos de plantas de café taxonómicamente distintos a *Colletotrichum gloeosporioides* que causaban antracnosis. Posteriormente, Weir, Johnston y Damm (2012) con base en criterios metabólicos y moleculares subdividieron a *C. kahawae* en dos subespecies: *C. kahawae* subsp. *ciggaro* para referirse a todos aquellos aislamientos que pueden utilizar el citrato o tartrato como fuente de carbono, además de poseer un amplio rango de hospedantes sin infectar al café; y *C. kahawae* subsp. *kahawae* para los aislamientos que no pueden utilizar el citrato y tartrato como fuente de carbono, patogénicos únicamente en café y actualmente presentes sólo en África, donde comienzan su desarrollo en época de lluvias (marzo a octubre). *C. kahawae* infecta los frutos jóvenes (cuatro a seis semanas posteriores a la floración), los primeros síntomas detectados son pequeñas manchas o lesiones hundidas de apariencia negra que se expanden y coalescen hasta cubrir completamente el fruto. Las bayas infectadas permanecen unidas a la rama y sirven como fuente de inóculo secundario. La severidad del CBD depende particularmente de la temperatura y humedad; la lluvia es necesaria para dispersar los conidios y la temperatura óptima va de 20 a 22 °C (Mouen et al., 2007).

Desde el primer reporte del CBD por Waller et al., 1993, la enfermedad ha causado severos daños en Kenia, en la actualidad se encuentra distribuida en todas las regiones cafetaleras de África, particularmente las que se encuentran por encima de los 1400 msnm, destruyendo las plantaciones y generando hasta el 80% de pérdidas de campo anualmente (Silva et al., 2012). En México, *C. kahawae* se considera una plaga cuarentenaria no presente en territorio nacional. La importancia del posible riesgo de ingreso del CBD, radica en que existe una superficie sembrada del cultivo del café de más de 722 000 ha, de las cuales se cosechan anualmente 835 000 toneladas de café en cereza, con un valor de producción mayor a los 4 905 millones de pesos (SENASICA, 2018).

2.2 Información taxonómica

Nombre: *Colletotrichum kahawae* Waller & Bridge

Sinónimos: Ninguno reportado

Variantes: *Colletotrichum kahawae* subsp. *kahawae*
Colletotrichum kahawae subsp. *ciggaro*

Nombres comunes: Coffee berry disease (Inglés)
Anthracnose of coffee (Inglés)
Enfermedad de las cerezas del cafeto (Español)
Antracnosis del cafeto (Español)

Posición taxonómica:

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Glomerellales

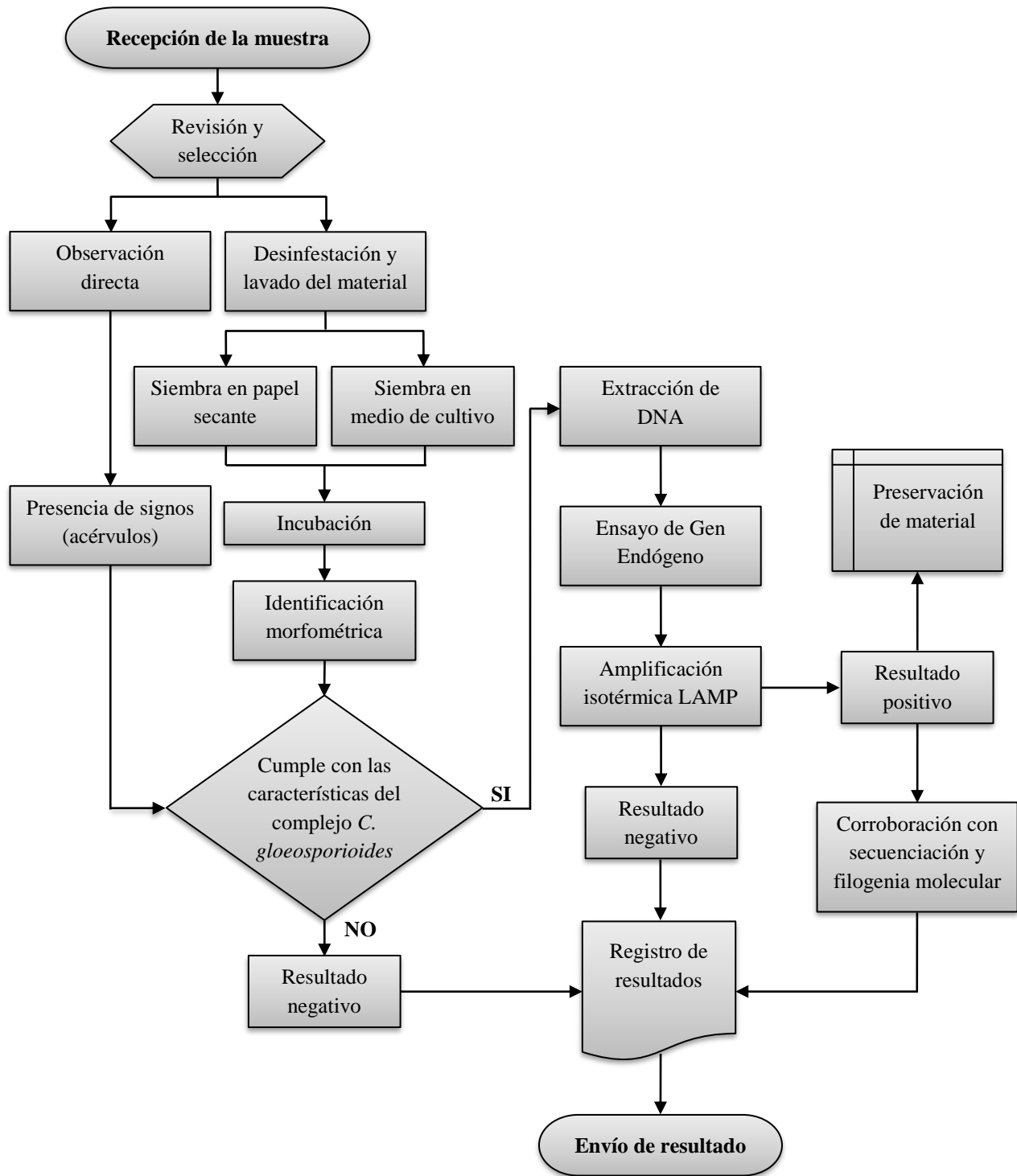
Familia: Glomerellaceae

Género: *Colletotrichum*

Especie: *Colletotrichum kahawae*

(Robert et al., 2013)

2.3 Flujo de trabajo



3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Para determinar la presencia de *Colletotrichum kahawae*, es necesario contar con material vegetal que presente signos y síntomas característicos de la enfermedad (Anexo 8.1).

El tejido vegetal a utilizar en el diagnóstico debe ser principalmente bayas, adicionalmente también pueden ser analizadas las hojas y ramas con síntomas de antracnosis.

Las muestras deben ser enviadas en fresco, es decir, el material vegetal debe venir correctamente envuelto en papel absorbente dentro de bolsas de plástico colocadas en hieleras con geles refrigerantes.

Si la muestra no cumple con las características requeridas o se encuentra en mal estado, se registra el motivo del rechazo: “Material en mal estado” o “No se procesó”.

3.1 Identificación morfométrica

La identificación morfométrica se puede realizar por observación directa, a partir de signos en el tejido vegetal o del crecimiento de las estructuras en papel secante y medio de cultivo.

Dado que *C. kahawae* pertenece al complejo *Colletotrichum gloeosporioides* que incluye 22 especies morfológicamente similares (Weir et al., 2012), la identificación morfométrica de *C. kahawae* siempre debe ser complementada con la identificación molecular.

3.1.1 Observación directa

- 1) Partir de bayas, hojas o ramas con presencia de síntomas y observar la presencia de signos del hongo (acérvulos) con el microscopio estereoscópico. Separar los acérvulos del tejido vegetal con ayuda de un alfiler entomológico o aguja de disección.
- 2) Elaborar montajes temporales o permanentes con las estructuras obtenidas (Anexos 8.2 y 8.3) y observar sus características en el microscopio compuesto.
- 3) Medir al menos 10 estructuras del hongo (acérvulos y conidios) para obtener el intervalo y promedio del ancho y largo de éstos. Comparar las dimensiones obtenidas con la literatura de referencia para definir el género y especie (Apartado 3.2.2).
- 4) A partir de acérvulos, se puede realizar el aislamiento para obtener cultivos puros en medio de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar, Papa Dextrosa Agar) y MEA (Malt Extract Agar, Extracto de Malta Agar) (Anexo 8.4).
- 5) Incubar los aislamientos puros durante 3-5 días a $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3$, al término de este tiempo hacer la caracterización colonial observando el tipo de crecimiento, coloración del micelio y medio de cultivo, además de la formación de estructuras del hongo (acérvulos y conidios) (Apartado 3.2.1).

3.1.1.1 Interpretación de resultados

En caso de que los signos en el tejido vegetal correspondan a acérvulos y la observación de los mismos coincida con la descripción de *C. kahawae*, se debe utilizar otra técnica de diagnóstico como: aislamiento e incubación en medio de cultivo, papel secante o detección por amplificación isotérmica LAMP.

Si no se detecta presencia de estructuras características de *C. kahawae*, se debe reportar el diagnóstico para esta técnica como negativo y verificar el resultado por las técnicas descritas en los apartados 3.1.2 y 3.1.3.

3.1.2 Incubación en papel secante

- 1) A partir de tejido vegetal con signos o síntomas del hongo, obtener fragmentos de aproximadamente 1 cm² de la zona de transición del tejido sano-enfermo, y en condiciones de asepsia desinfectarlos con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 minuto, después enjuagar en 3 ocasiones con agua destilada estéril. Permitir el secado del material vegetal sobre papel absorbente estéril durante aproximadamente de 2 a 3 horas.
- 2) Previamente, armar cámaras húmedas. Colocar en cajas Petri de cristal un círculo de papel filtro Whatman™ del número 4 (puede utilizarse otro tipo de papel filtro o absorbente) y esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 121 °C y 15 libras o durante 2 horas a 160 °C con calor seco. Una vez estériles, frías y bajo condiciones asépticas humedecer el papel filtro con agua destilada estéril (evitar tener exceso de agua).
- 3) Colocar en la cámara húmeda de 5 a 6 fragmentos de material vegetal seco. Incubar durante 3-5 días a 24 °C ± 3, bajo condiciones de 80 % de humedad.
- 4) Observar con el microscopio estereoscópico la presencia de estructuras del hongo, realizar el montaje (Anexo 8.2) para visualizar sus características en el microscopio compuesto y obtener aislamientos puros en medio de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar, Papa Dextrosa Agar) y MEA (Malt Extract Agar, Extracto de Malta Agar) (Anexo 8.4).
- 5) Incubar los aislamientos puros durante 3-5 días a 24 °C ± 3 al término de este tiempo hacer la caracterización colonial observando el tipo de crecimiento, coloración del micelio y medio de cultivo, además de la formación de estructuras del hongo (acérvulos y conidios) (Apartado 3.2.1).
- 6) A partir de las estructuras, obtener montajes temporales o permanentes para su observación con el microscopio compuesto. Medir al menos 10 estructuras del hongo (acérvulos y conidios) para obtener el intervalo y promedio del ancho y largo de éstos. Comparar las dimensiones con la literatura de referencia para definir el género y la especie (Apartado 3.2.2).

3.1.2.1 Interpretación de resultados

Si se obtienen estructuras típicas del hongo sobre el tejido vegetal que correspondan a *C. kahawae*, es necesario confirmar los resultados obtenidos mediante la técnica de aislamiento en medio de cultivo con la detección por amplificación isotérmica LAMP (Apartado 3.3).

Si no se detecta presencia de estructuras características de *C. kahawae*, se debe reportar el diagnóstico para esta técnica como negativo y verificar el resultado por la técnica descrita en el apartado 3.1.3.

3.1.3 Aislamiento en medios de cultivo

- 1) A partir de tejido vegetal con signos o síntomas del hongo, obtener fragmentos de aproximadamente 1 cm² de la zona de transición del tejido sano-enfermo, desinfectarlos y secarlos, de acuerdo con lo descrito en el apartado 3.1.2.
- 2) Sembrar de 5 a 6 fragmentos secos en cajas Petri con medio de cultivo PDA o MEA (Anexo 8.4) e incubar a 25 ± 3 °C durante 3 a 5 días.
- 3) Transcurrido este tiempo, revisar el aislamiento e identificar las colonias típicas del hongo (véase 3.2.1) transferirlas en medio de cultivo PDA para obtener cultivos puros, incubar durante 3-5 días y observar con el microscopio estereoscópico la presencia de estructuras del hongo.
- 4) Adicionalmente, a partir de la germinación de conidios obtener apresorios, luego con un alfiler entomológico tomar conidios de un acérvulo y colocarlos sobre un portaobjetos dentro de una gota de agua destilada estéril. Poner el portaobjetos en una base dentro de una cámara húmeda (ver inciso 2 del Apartado 3.1.2) para evitar el contacto con el papel filtro.
- 5) Incubar a 25 ± 3 °C durante 24 horas, transcurrido este tiempo retirar el portaobjetos de la cámara húmeda, sobreponer a la gota de agua con conidios un cubreobjetos y observar las características de los apresorios bajo el microscopio compuesto (Apartado 3.2).
- 6) Medir al menos 10 estructuras del hongo (conidios y apresorios) para obtener el intervalo y promedio del ancho y largo de éstos. Comparar las dimensiones obtenidas con la literatura de referencia para definir el género y especie del hongo (Apartado 3.2.2).

3.1.3.1 Interpretación de resultados

Para determinar la posible presencia del patógeno se deben obtener en general colonias típicas del complejo de especies de *C. gloeosporioides*. La morfología colonial de *C. kahawae* se describe en el apartado 3.2.1. Toda muestra que se determine como positiva en esta prueba debe analizarse mediante amplificación isotérmica LAMP (Apartado 3.3).

Si no se detecta presencia de colonias y estructuras características de *C. kahawae*, se debe reportar el resultado para esta técnica como negativo, se registran los resultados y se envía al área correspondiente con el dictamen “Negativo a *Colletotrichum kahawae*”, concluyendo el proceso de diagnóstico.

3.2 Descripción morfológica

El CBD presenta únicamente fase asexual (*C. kahawae*); se han encontrado peritecios asociados a bayas infectadas; sin embargo, éstos no han sido infectivos al inocularlos, por lo que actualmente se debate si el CBD presenta fase sexual (Weir et al., 2012). Para fines de diagnóstico la descripción morfológica se basa únicamente en el estado Anamorfo.

3.2.1 Morfología colonial

Los aislamientos de *C. kahawae* subsp. *kahawae* presentan dos tipos de crecimiento, el primero corresponde a la descripción de Waller et al., (1993) (Figura 1a-1b).

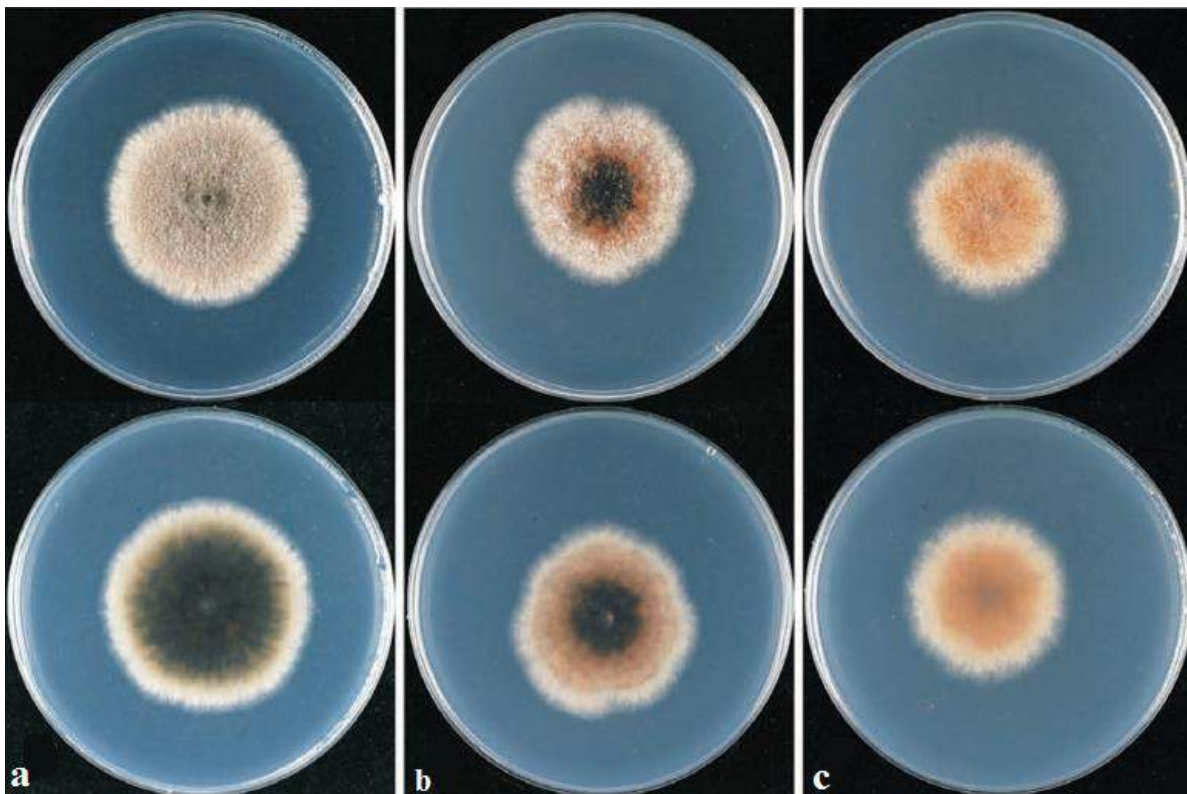


Figura 1. Morfología colonial de *Colletotrichum kahawae* subsp. *kahawae*. Aislamiento en medio de cultivo. a-b) EMA; c) PDA después de 10 días de crecimiento a 18 °C (Créditos: Weir et al., 2012).

Las colonias son de color gris a gris oliváceo oscuro, con el fondo al reverso de un verde oscuro, crecimiento de 14 a 28 mm de diámetro en 7 días a 25 °C en MEA, sin formación de acérvulos y con conidios producidos directamente de hifas simples. El segundo tipo reportado por Weir et al., (2012) (Figura 1c): crecimiento de 44 a 50 mm de diámetro en 10 días en PDA a 18 °C, sin pigmentos en el agar y la superficie de la colonia cubierta por numerosos acérvulos y masas de conidios de color naranja.

3.2.2. Fase asexual (Anamorfo)

De acuerdo con la descripción de Waller et al., (1993) para *C. kahawae* en medio MEA al 2%, no se desarrollan acérvulos, los conidios se originan directamente de hifas simples. Conidios delgados, cilíndricos, sin septos, invariablemente gutulados, obtusos en el ápice, de 12.5 – 20 x 4 – 5 μm (Figura 2a). Apresorios moderadamente abundantes, café claro a pálido, circulares a fuertemente irregulares, de 9 – 9.5 x 5.5 – 6.5 μm (Figura 2b-2c). Weir et al., (2012) mencionan características similares en medio de cultivo PDA, con la diferencia de que algunos aislamientos forman numerosos acérvulos y masas de conidios de color naranja.

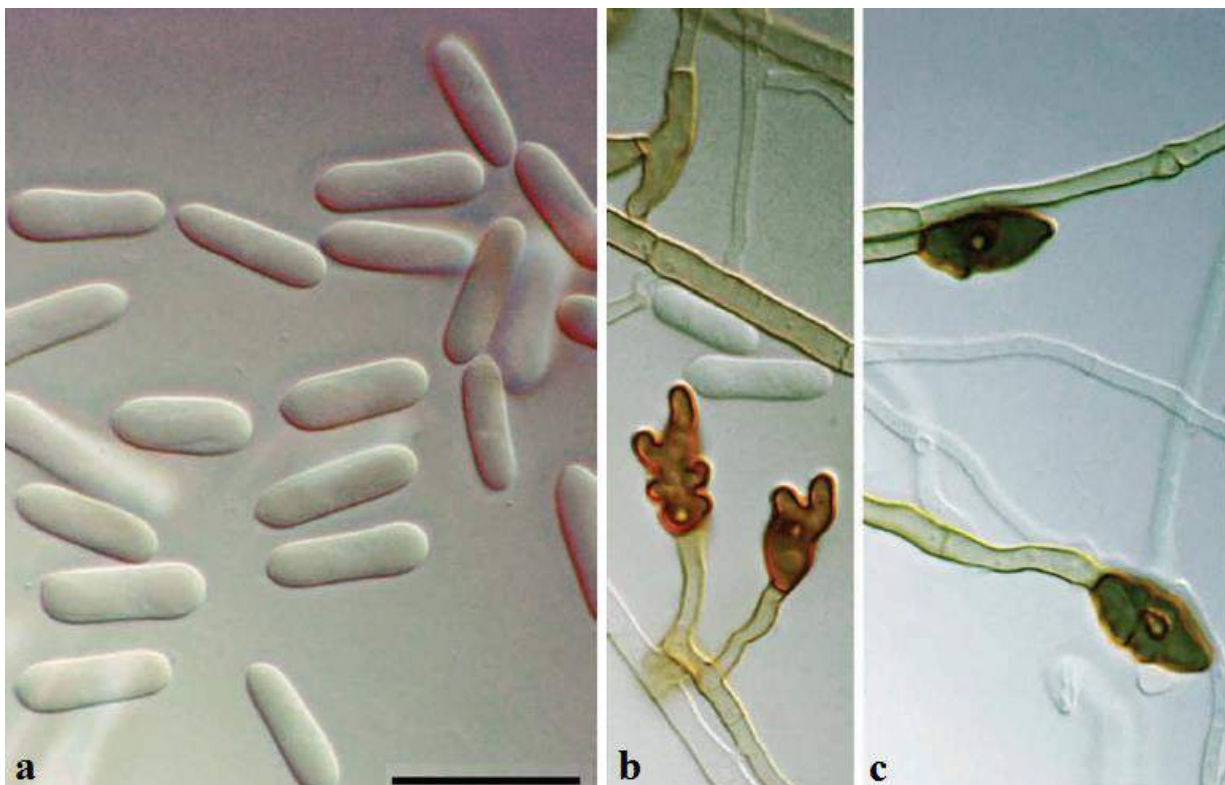


Figura 2. Características morfológicas de *Colletotrichum kahawae*. a) Conidios; b) Apresorios irregulares; c) Apresorios circulares. Escala = 20 μm, válida para a-c (Créditos: Weir et al., 2012).

3.3. Identificación molecular

Para el diagnóstico molecular de *C. kahawae* en la literatura existen reportadas dos técnicas de identificación: PCR tiempo real con sonda TaqMan (Tao et al., 2013a) y amplificación isotérmica LAMP (Tao et al., 2013b).

3.3.1. Extracción de DNA

La extracción se debe realizar a partir de cultivos puros en medio PDA o MEA, previamente caracterizados morfológicamente.

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

Se sugiere usar la metodología propuesta por Cenis (1992) modificada, misma que se describe a continuación:

- 1) En un tubo con perlas de cerámica (Lysing Matrix D 2 mL de MPBio) transferir aproximadamente 0.01 g de micelio de una caja Petri de la muestra de interés.

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

- 2) Agregar 500 μ L de buffer TE 1X, incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, centrifugar 5 minutos a 17 940 g (13 000 rpm), decantar el sobrenadante con una micropipeta.

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

- 3) Adicionar 300 μ L 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 se compone por 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 μ L 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°C durante 10 minutos.
- 5) Centrifugar los tubos durante 10 minutos a 15 290 g (12 000 rpm), transferir 250 μ L del sobrenadante a un tubo de 1.5 mL 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; a continuación, 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 cuidadosamente para 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 papel secante estéril durante 3 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 almacenar 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 intervalo de trabajo del ensayo de PCR y LAMP.

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

3.3.2. Verificación de la calidad del DNA

Al finalizar el proceso 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 $A_{260/280} = 1.8 - 2.0$ y $A_{260/230} = 2.0 - 2.2$. 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 siempre que amplifiquen exitosamente el control endógeno.

3.3.3. Amplificación isotérmica LAMP

3.3.3.1. Ensayo control endógeno

Para verificar la calidad e integridad del DNA extraído, así como evitar falsos negativos, se debe realizar un ensayo de PCR de un control endógeno. Se utilizan los primers ITS-1 e ITS-4 propuestos por White et al. (1990), que reconocen regiones ribosomales conservadas (ITS del rDNA). Lo fundamental a inferir en esta prueba es que el extracto de DNA es amplificable (sin presencia de inhibidores en la reacción). Las secuencias de los primers se observan en el Cuadro 1.

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

Tipo	Nombre del primer	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Sentido	ITS-1	5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3'	Aprox. 620
Antisentido	ITS-4	5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'	

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 ITS-1	10 µM	0.5 µM	1.25
Primer ITS-4	10 µM	0.5 µM	1.25
Taq DNA Pol	500 U	2.5 U	0.125
DNA	10 – 200 ng/µL	0.8 – 16 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.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	3 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	45 segundos	35
Alineamiento	58 °C	45 segundos	
Extensión	72 °C	45 segundos	
Extensión final	72 °C	10 minutos	1

Al finalizar, los productos de PCR deben correrse durante 1 hora a 100 V en un gel de agarosa ultra pura al 2% en buffer TAE 1X, teñido con 0.6 X de GelRed™ Biotum. Otros métodos adaptables que permita interpretar los resultados también son válidos.

3.3.3.2. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Si el DNA de la muestra amplifica correctamente en el ensayo de control endógeno se puede proceder a la subsecuente amplificación mediante LAMP. Para la detección específica de *C. kahawae*, Tao y colaboradores (2013b) diseñaron una combinación de primers que en conjunto amplifican un fragmento de la región Apn2/ MAT (Cuadro 4).

Cuadro 4. Primers específicos para amplificación isotérmica LAMP (Tao et al., 2013b).

Nombre del primer	Secuencia (5'→3')
CK-F3	5'- CAAGACTTACCTTGCGCCAG -3'
CK-B3	5'- GGCTTGCAGCTTATAATTACAGTTC -3'
CK-FIP	5'- GGTTCGTCAGATCCAGTCATCTCCTTCCACAAACCTTTGTGCGGT-3'
CK-BIP	5'- CGTCTGCTTCGATGGCAACTGCGAATACATGGGTTGTGAAT -3'

1) Preparar la reacción isotérmica LAMP de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 5:

Cuadro 5. Preparación de la mezcla de reacción para la amplificación isotérmica LAMP mediante Bst 2.0 DNA Polymerase Cat# M0537S de New England BioLabs®.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Agua grado biología molecular	-	-	6.5
Isothermal Amplification Buffer	10 X	1 X	2.5
dNTP's	10 mM	1.4 mM	3.5
MgSO ₄	100 mM	6 mM	1.5
Primer CK-F3	10 µM	0.2 µM	0.5
Primer CK-B3	10 µM	0.2 µM	0.5
Primer CK-FIP	10 µM	1.6 µM	4
Primer CK-BIP	10 µM	1.6 µM	4
Bst 2.0	8000 U/mL	0.32 U/µL	1
DNA	5-100 ng/ µL	0.4 – 8 ng/µL	1
		Volumen final	25

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

Cuadro 6. Programa de amplificación isotérmica LAMP.

Etapas	Temperatura	Tiempo
Amplificación isotérmica	65 °C	60 minutos
Inactivación térmica	80 °C	20 minutos

Al finalizar la incubación los productos amplificados con LAMP pueden observarse directamente, para ello agregar a cada tubo 5 µL de una dilución de GelRed™ Biotum 1000 X para obtener una concentración final de 200 X, después observar bajo luz UV.

Los productos de LAMP también pueden visualizarse en un gel de agarosa ultra pura al 2 % en buffer TAE 1X, teñido con 0.6 X de GelRed™ Biotum, programado durante 1 hora a 100 V en cámara de electroforesis. Otros métodos adaptables que permita interpretar los resultados también son válidos.

3.3.3.3. Controles para las pruebas moleculares

Tanto en el ensayo de gen endógeno con PCR punto final, así como la amplificación isotérmica LAMP, es necesario incluir los siguientes controles:

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

Control negativo de matriz: este control corresponde a un extracto de matriz sin el hongo (tejido de café sano). 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/RNA/clona). Descarta falsos positivos y contaminación de la reacción.

3.3.4. Interpretación de resultados para los ensayos de PCR punto final y LAMP

Los resultados son válidos solamente bajo los siguientes criterios:

- En el ensayo de control endógeno, el control positivo (DNA) y cada una de las muestras debe generar una banda de tamaño aproximado de 620 pb (Figura 3).
- El control negativo de reactivos no debe de generar bandas en ningún ensayo de PCR y LAMP, tampoco debe emitir fluorescencia si es visto directamente bajo luz UV.
- El control positivo para el ensayo de amplificación isotérmica LAMP si es visualizado directamente bajo luz UV debe emitir fluorescencia (Figura 4a).
- El control positivo para el ensayo de amplificación isotérmica LAMP si es visualizado en gel de agarosa debe observarse un patrón de múltiples bandas de fragmentos de tamaño variable (Figura 4b).

Se considera como resultado positivo aquellas muestras que emitan fluorescencia o amplifiquen los fragmentos mediante la amplificación isotérmica LAMP.

El resultado es negativo si no hay fluorescencia o amplificación de los fragmentos mediante la amplificación isotérmica LAMP.

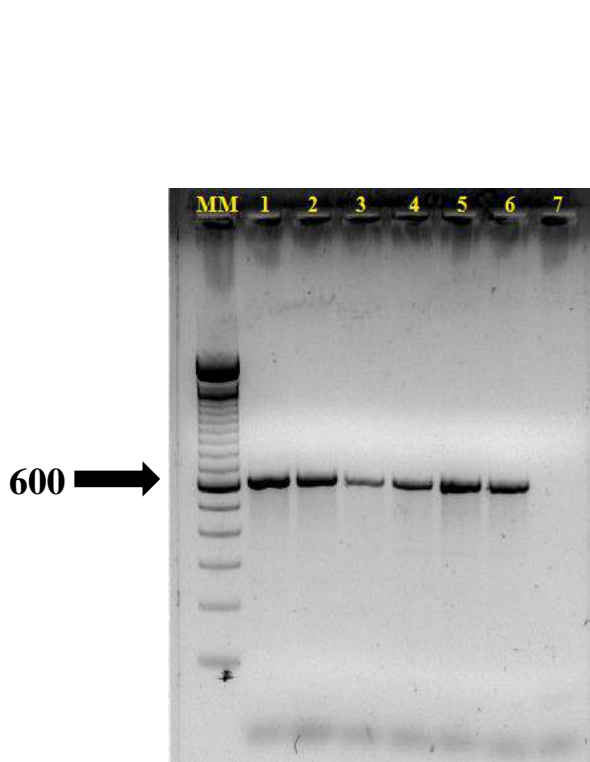


Figura 3. Ensayo de control endógeno con el par de primers ITS-1 e ITS-4. Carril 1-2: control positivo *Colletotrichum*; 3-6: DNA de las muestras; 7: control negativo de reactivos. MM: marcador molecular TrackIt™ 100 pb DNA Ladder de Invitrogen.

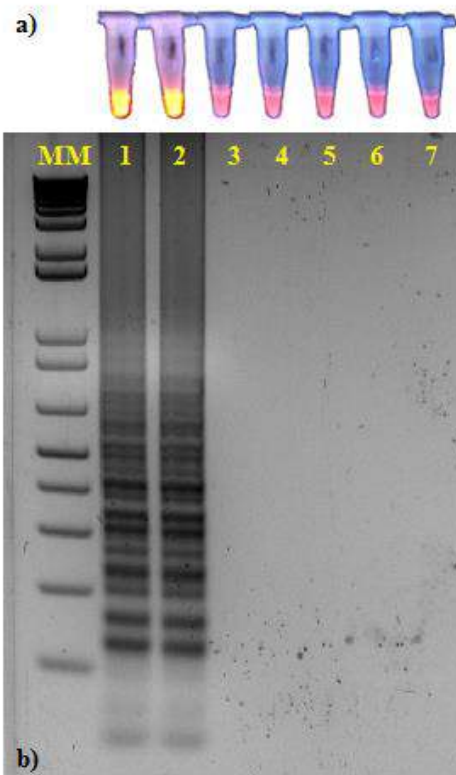


Figura 4. Amplificación isotérmica LAMP. a) Productos visualizados directamente bajo luz UV; b) Productos visualizados en gel de agarosa 2 %. 1-2: Control positivo de *Colletotrichum kahawae*. 3-6: DNA de las muestras. 7: Control negativo de reactivos. MM: marcador molecular TrackIt™ 1Kb

3.4. Identificación del patógeno

Para reportar una identificación positiva de *C. kahawae* 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 LAMP.

Como prueba de corroboración, se debe de secuenciar el fragmento obtenido en el ensayo de PCR punto final con los primers ITS-1/ITS-4, a partir del extracto de DNA de cultivos puros.

Los casos en los que se debe de corroborar por secuenciación son:

- Detecciones en zonas reconocidas como libres del patógeno.
- Primeras detecciones en nuevos hospedantes.

- Cuando se necesite un sustento fitosanitario de mayor relevancia para la movilización de tejido vegetal.

Los datos de secuenciación se deben de enviar al Laboratorio de Micología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) para su análisis. En el Anexo 8.5 se detalla la metodología para el análisis empleado por el Laboratorio de Micología del CNRF. En estos casos, se considera aceptada la identificación después de realizar el análisis de secuencias.

4. REGISTROS

Almacenar los registros y evidencias del proceso de diagnóstico de *Colletotrichum kahawae*.

- 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:

- Colocar la cubierta del fruto con signos del hongo en viales de 2 mL y conservarlos en congelación a -20 °C. La parte carnosa del fruto se debe inactivar y desechar.
- Conservar montajes permanentes, donde se encuentren estructuras distintivas del hongo como evidencia de la identificación morfométrica.
- Conservar el aislamiento puro mediante técnicas de preservación que garanticen la viabilidad del hongo, evitar transferencias continuas del aislamiento.
- Contar con evidencia fotográfica de los signos y síntomas, aislamientos y estructuras del hongo.
- Resguardar los resultados de las pruebas moleculares (fotografía del gel y secuencias).
- Mantener el DNA obtenido en congelación a -20 °C (de ser posible a -70 °C).

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 Zárate).

Agradecimiento a quienes participaron en elaboración y revisión de las versiones anteriores del Protocolo (Israel David Rivas Avilés y José Gustavo Torres Martínez).

7. REFERENCIAS

- Benson, A. D., Mark, C. K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, J. D., Ostell, J. and Sayers, W. E. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research*. 41: 36-42.
- CIRAD. Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement. (2010). Coffee berry disease: rain, public enemy no. 1. Recuperado el 23 de noviembre 2018 de: <https://www.cirad.fr/en/news/all-news-items/articles/2010/science/coffee-berry-disease>
- Cenis, L. J. (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*. 20: 2380.
- Mouen, Bedimo, J. A., Bieysse, D., Cilas, C. and Nottéghem, J. L. (2007). Spatio-temporal dynamics of arabica coffee berry disease caused by *Colletotrichum kahawae* on a plot scale. *Plant Disease*. 91: 1229-1236.
- SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (2018). Antracnosis del café (*Colletotrichum kahawae*). Ficha técnica No. 42. Dirección General de Sanidad Vegetal. Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. Ciudad de México. Recuperado de: <http://sinavef.senasica.gob.mx/SIRVEF/RoyaCafeto.aspx>
- Silva, D. N., Talhinas, P., Cai, L., Manuel, L., Gichuru, E. K., Loureiro, A., Várzea, V., Paulo, O. S., and Batista, D. (2012). Host-jump drives rapid and recent ecological speciation of the emergent fungal pathogen *Colletotrichum kahawae*. *Molecular Ecology*. 21 (11): 2655-2670.
- Sreenivasaprasad, S., Brown, E. and Averil, Mills P. R. (1993). Coffee berry disease pathogen in Africa: genetic structure and relationship to the group species *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycological Research*. 97 (8): 995-1000.
- Tao, G., Hyde, D. K. and Cai, L. (2013a). Species-specific real-time PCR detection of *Colletotrichum kahawae*. *Journal of Applied Microbiology*. 114: 828-835.
- Tao, G. and Cai, L. (2013b). Molecular diagnosis of *Colletotrichum kahawae* by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Journal of Plant Pathology*. 95: 519-524.
- Robert, V., Duong V., Amor, A. B. H., van de Wiele, N., Brouwer, C., Jabas, B., Soke, S., Dridi, A., Triki, M., Daoud, S. B., Chouchen, O., Vaas, L., de Cock, A., Stalpers, J. A., Stalpers, D., Verkley, G. J. M., Groenewald, M., dos Santos, F. B., Stegehuis, G., Li, W., Wu, L., Zhang, R., Ma, J., Zhou, M., Gorjón, S. P., Eurwilaichitr, L., Ingsriswang, S., Hansen, K., Schoch, C., Robbertse, B., Irinyi, L., Meyer, W., Cardinali, G., Hawksworth, D. L.,

- Taylor, J. W. and Crous, P. W. (2013). MycoBank gearing up for new horizons. *IMA Fungus*. 4 (2): 371–379.
- Waller, M. J., Bridge, P. D., Black, R., and Hakiza, G. (1993). Characterization of the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae*. *Mycological Research*. 97 (8): 989-994.
- Weir, B. S., Johnston, P. R. and Damm U. (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology*. 73: 115–180.
- White, J. T., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic Press. 315-322.

Forma recomendada de citar:

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2018). Protocolo de Diagnóstico: *Colletotrichum kahawae* (CBD, Coffee Berry Disease) [Versión 1.0]. Tecámac, México: Autor.

8. ANEXOS

8.1. Signos y síntomas



Figura 5. Síntomas de antracnosis en cerezas de café (Créditos: CIRAD, 2010).

8.2. Elaboración de montajes

8.2.1. Preparaciones temporales con cubreobjetos

- 1) Partir de tejido vegetal con signos del hongo, o de cultivos puros, colocar el tejido vegetal o estructuras en un portaobjeto o caja Petri de cristal, sobre la platina del microscopio estereoscópico para observar a detalle el área a seccionar o montar en laminillas.
- 2) Realizar cortes de material vegetal con estructuras de hongos, con navaja de bisturí o con navaja de afeitar, de un grosor menor a 0.5 mm o lo suficientemente delgado para dejar pasar la luz a través del tejido; también se puede tomar un fragmento de micelio o estructuras del hongo, a partir del tejido vegetal o cultivo del hongo, utilizando un alfiler entomológico o una aguja de disección.
- 3) Colocar los cortes o estructuras del hongo sobre un portaobjetos con la ayuda de una aguja de disección o de un alfiler entomológico. Adicionar una gota de medio de montaje (Anexo 8.3), hidratar completamente el tejido y evitar formación de burbujas de aire.
- 4) Cubrir la gota con un cubreobjetos y presionar ligeramente para que se distribuya la gota, cuidando que no se pierda el espécimen. Calentar por segundos para eliminar burbujas de aire. Observar el espécimen con microscopio compuesto. En caso de que no se aprecien las estructuras, debe realizarse otra preparación.

8.2.2. Preparaciones temporales con cinta adhesiva

- 1) Colocar en un portaobjetos una gota de medio de montaje (Anexo 8.3).
- 2) Con un pedazo de cinta adhesiva transparente tocar con delicadeza y en forma superficial el área del tejido vegetal, o del medio de cultivo, con crecimiento de hongos para obtener las estructuras del mismo.
- 3) Pegar la cinta sobre el portaobjetos cuidando que las estructuras queden dentro de la gota.
- 4) Observar con un microscopio compuesto.

8.2.3. Preparaciones permanentes

- 1) Colocar una gota de medio de montaje (Anexo 8.3) sobre un portaobjetos.
- 2) Adicionar las estructuras del hongo dentro de la gota con ayuda de una aguja de disección o de un alfiler entomológico. Eliminar la formación de burbujas con una aguja o calentar el portaobjetos.
- 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 sólida e inmediatamente colocarlo alrededor de 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 con microscopio compuesto.

8.3. Medios de montaje

Lactofenol

Fenol (cristales)	20 g
Ácido láctico	20 mL
Glicerina	40 mL
Agua destilada	20 mL
Azul de Nilo	0.1- 0.5 g

Agregar los cristales de fenol y el agua a un recipiente, calentar ligeramente para disolver los cristales, adicionar la glicerina y el ácido láctico, colocar una cantidad mínima de colorante y agitar hasta que se diluya, agregar colorante hasta obtener la coloración deseada.

Nota: este medio de montaje actúa como solución fijadora y restaura la turgencia del material seco. Es excelente medio para montajes temporales y permanentes.

Agua- glicerina

Glicerina	50 mL
Agua destilada	50 mL

Consiste en mezclar 50 partes de agua destilada y 50 partes de glicerina. Se puede adicionar algún colorante como azul de Nilo.

Nota: se utiliza en montajes temporales y permanentes.

Ácido láctico

Ácido láctico
Agua destilada

Se recomienda utilizar en una concentración de 45%. Se puede adicionar algún colorante.

Hidróxido de potasio (KOH)

Hidróxido de potasio	40 g
Creatina	0.3 g
Agua destilada	100 mL

Disolver en 75 mL de agua el KOH, agregar la creatina y aforar a 100 mL.

Nota: este medio restaura la turgencia del material seco, útil cuando se requiere aclarar el material montado.

8.4. Medios de cultivo

A continuación, se señalan los medios de cultivo que de acuerdo con Waller, Bridge y Hakiza (1993) y Weir et al., (2012) han permitido un óptimo desarrollo *in vitro* de *C. kahawae*.

Papa Dextrosa Agar- fuerza mediana (1/2 PDA)

Papa Dextrosa Agar	9.8 g
Bacto Agar (agarosa granulada)	3.5 g
Agua destilada	500 mL

Procedimiento: Mezclar los ingredientes en un matraz Erlenmeyer con 1 L y disolver con agitador magnético. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos, vaciar en cajas Petri y dejar solidificar.

Extracto de Malta Agar (Malt Extrac Agar =MEA)

Extracto de malta Agar	16.8 g
Agua destilada	500 mL

Procedimiento: Mezclar los ingredientes en un matraz Erlenmeyer de 1 L, esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos vaciar en cajas Petri y dejar solidificar.

También se obtienen resultados adecuados con los tres medios preparados como se describe a continuación:

Papa Dextrosa Agar (Potato Dextrose Agar= PDA)

Papa pelada y partida en cubos pequeños	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 meter a autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Filtrar el agua de cocción y aforar a 500 mL. Agregar el agar y dextrosa, disolver con agitador magnético. Nuevamente colocarlo en autoclave a 121 °C por 20 minutos. Dejar enfriar, vaciar en cajas Petri y dejar solidificar.

Extracto de Malta Agar (Malt Extract Agar =MEA)

Extracto de malta	9.0 g
Agar	10.0 g
Agua destilada	500 mL

Procedimiento: Mezclar los ingredientes en un matraz Erlenmeyer de 1 L y esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Vaciar en cajas Petri y dejar solidificar.

8.5. Corroboración mediante Filogenia Molecular

Para la secuenciación y análisis filogenético se debe utilizar la región ITS del rDNA; de acuerdo a Weir et al., (2012) el análisis de esta región es suficiente para separar a las dos subespecies del resto de especies que conforman el complejo de *C. gloeosporioides*. El Laboratorio de Micología del CNRF se basa en el análisis filogenético de la región ITS del rDNA amplificado con los primers ITS-1/ITS-4 del Apartado 3.3.3.1.

- 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 ingresar 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>). Insertar por separado ambas secuencias y realizar el alineamiento con los parámetros predeterminados.

Nota: el ensayo de control endógeno amplifica una región de aproximadamente 620 pb para el género *Colletotrichum*. La secuencia mínima para realizar el análisis filogenético es la región de 320 pb de la secuencia de referencia JX010233 que comprende del nucleótido en la posición 114 a 433.

- 3) Una vez realizado el alineamiento (Figura 6) revisar cuidadosamente las especies que aparecen en la parte superior de la tabla, 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); verificar también quien depositó las secuencias. Es importante mencionar que en esta base de datos existen muchas secuencias que han sido incorrectamente identificadas, por lo que el resultado obtenido (aún con 100% de cobertura e identidad) en ocasiones no resulta totalmente concluyente.

Debido a que *C. kahawae* pertenece al complejo de *C. gloeosporoides* que incluye 22 especies, es necesario realizar un análisis filogenético con secuencias bien caracterizadas para determinar con un 100% de exactitud la identidad de *C. kahawae*.

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.

Sequences producing significant alignments:

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

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Colletotrichum sp. isolate V2_T13 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal transc	708	708	100%	0.0	100%	MH934991.1
<input type="checkbox"/>	Colletotrichum coffeanum strain CBS 396.67 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene, comple	708	708	100%	0.0	100%	MH859004.1
<input type="checkbox"/>	Colletotrichum kahawae subsp. cigarro strain CBS 237.49 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA	708	708	100%	0.0	100%	MH856507.1
<input type="checkbox"/>	Colletotrichum gloeosporioides strain CBS 152.26 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene, ci	708	708	100%	0.0	100%	MH854871.1
<input type="checkbox"/>	Colletotrichum sp. LD1683 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed s	708	708	100%	0.0	100%	MG242009.1
<input type="checkbox"/>	Colletotrichum sp. LD1680 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed s	708	708	100%	0.0	100%	MG242008.1
<input type="checkbox"/>	Colletotrichum cordylinicola strain vc30 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S	708	708	100%	0.0	100%	MF540886.1
<input type="checkbox"/>	Colletotrichum kahawae strain PL12-1A 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosom	708	708	100%	0.0	100%	MF422167.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured Colletotrichum clone DA_F_861_2010 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene an	708	708	100%	0.0	100%	KJ606326.1
<input type="checkbox"/>	Colletotrichum kahawae isolate AGAp49 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal	708	708	100%	0.0	100%	KY576256.1
<input type="checkbox"/>	Colletotrichum kahawae isolate AGAp33 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal	708	708	100%	0.0	100%	KY576243.1
<input type="checkbox"/>	Colletotrichum kahawae isolate AGAp32 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal	708	708	100%	0.0	100%	KY576242.1
<input type="checkbox"/>	Colletotrichum kahawae isolate AGAp31 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal	708	708	100%	0.0	100%	KY576241.1
<input type="checkbox"/>	Colletotrichum kahawae isolate AGAp20 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal	708	708	100%	0.0	100%	KY576230.1
<input type="checkbox"/>	Colletotrichum kahawae isolate AGAp11 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal	708	708	100%	0.0	100%	KY576221.1
<input type="checkbox"/>	Colletotrichum kahawae isolate AGAp7 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal tr	708	708	100%	0.0	100%	KY576219.1
<input type="checkbox"/>	Colletotrichum kahawae isolate AGAp6 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal tr	708	708	100%	0.0	100%	KY576218.1
<input type="checkbox"/>	Colletotrichum kahawae isolate LB internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal tran	708	708	100%	0.0	100%	MG641893.1
<input type="checkbox"/>	Colletotrichum fructicola isolate L48 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal tran	708	708	100%	0.0	100%	MG641892.1
<input type="checkbox"/>	Colletotrichum sp. isolate 2016-1-3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S rib	708	708	100%	0.0	100%	MG589852.1
<input type="checkbox"/>	Colletotrichum helleniense CBS 142418 ITS region, from TYPE material	708	708	100%	0.0	100%	NR_152310.1

Figura 6. Alineamiento de secuencias utilizando Nucleotide BLAST.

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 Weir et al., (2012) para la región ITS rDNA; a ellas agregar nuestras secuencias de la muestra de interés.

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 secuencias consenso (primer sentido y antisentido). 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 ML).

Nota: las secuencias de referencia para *Colletotrichum kahawae* subsp. *kahawae* son JX010232 y JX010233.

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.

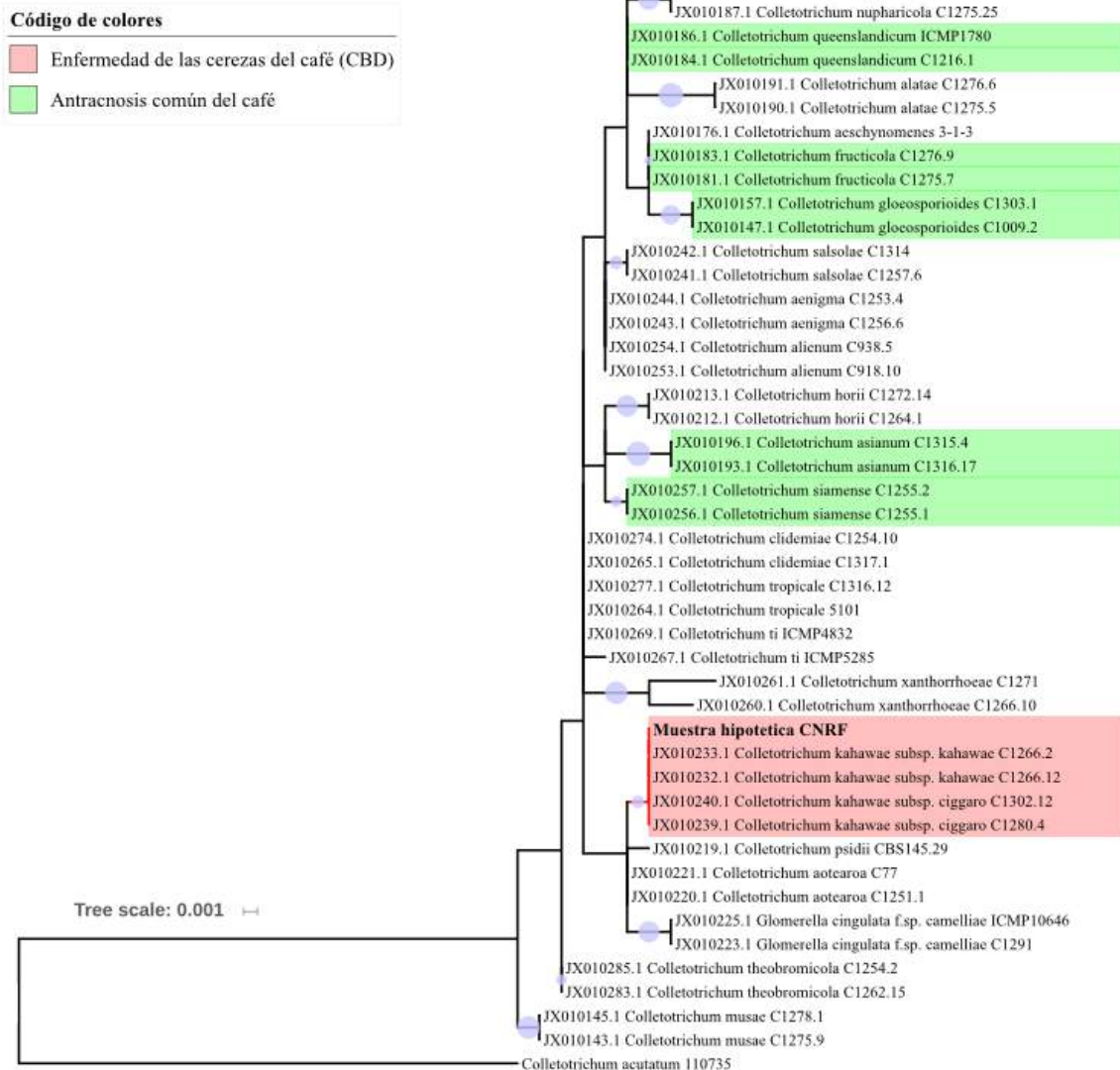


Figura 7. Filogenia molecular de complejo de especies de *Colletotrichum gloeosporioides*. Inferida de una porción de la región ITS rDNA mediante el Modelo de Máxima Verosimilitud (Maximum likelihood) con 1000 réplicas soporte (Bootstrap) incluyendo secuencias de 22 especies más la muestra hipotética aislamiento CNRF. Se utilizó a *C. acutatum* como nodo raíz externo al grupo.

Finalmente, para ejemplificar, la secuencia de una muestra hipotética fue analizada mediante el método de Máxima Verosimilitud (Maximum likelihood), quedando agrupada en el mismo clado con las secuencias de referencia de *C. kahawae* (Figura 7).

8.5.1. 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 JX010232 y JX010233.

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 con el cual se agrupe la secuencia de la muestra y debe registrarse en el resultado final.