

METODOLOGÍA DE IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS Y/O FÚNGICAS QUE COMPONEN UN PESTICIDA MICROBIANO MEDIANTE TÉCNICAS DE ANÁLISIS MOLECULAR

Tabla de contenidos

1. Ámbito de aplicación	3
2. Fundamento	3
3. Reactivos	3
3.1 PCR convencional:	3
4. Instrumental	3
5. Materiales de referencia	4
6. Procedimiento	4
6.1 Extracción de ADN de un AMCP puro	4
6.2 Extracción de ADN de un AMCP o de una mezcla de AMCP que compongan un PMCP	4
6.3 Cuantificación y determinación de la integridad del ADN extraído	5
6.4 Amplificación de los marcadores moleculares	5
6.5 Purificación y secuenciación de los productos de PCR	5
6.6 Análisis filogenético e identificación	5
6.7 Identificación de AMCP de origen bacteriano	6
6.8 Identificación de AMCP de origen fúngico	8
6.9 Estándares mínimos propuestos para el uso de datos del genoma para la identificación de un AMCP	13
6.10 Análisis del genoma para la identificación de la especie del AMCP	15
6.11 Identificación del AMCP a nivel de cepa	16

Metodología de identificación de las cepas bacterianas y/o fúngicas que componen un pesticida microbiano mediante técnicas de análisis molecular**1. Ámbito de aplicación**

La presente metodología describe los protocolos de estándar internacional para la identificación de agentes microbianos de control de plagas como primer requisito para garantizar la seguridad y reproducibilidad del producto que se empleará en la producción vegetal.

2. Fundamento

En el análisis de secuencias de multilocus (Multilocus sequence análisis, MLSA) se utiliza secuencias parciales de genes que codifican proteínas con funciones conservadas (genes de mantenimiento) para realizar análisis filogenéticos y de identificación de agentes microbianos. Esta técnica presenta una moderada a alta resolución, es fácil de reproducir, requiere de reactivos y equipamiento que están acordes con el nivel de avance tecnológico de nuestra realidad nacional.

Si el AMCP no puede ser identificado por MLSA, se deberá realizar la secuenciación y análisis de su genoma completo.

3. Reactivos**3.1 PCR convencional:**

- a. dNTPs
- b. Taq polimersa platinum o similar
- c. Tampón de Taq polimerasa
- d. Partidores específicos.
- e. Tubos de PCR de 0,2-0,6 mL libres de nucleasas.
- f. Tubos eppendorf de 1,5 mL libres de nucleasas.
- g. Agua libre de nucleasas.
- h. Marcador de peso molecular de 100 pb.
- i. Buffer TAE (Tris- acetato-EDTA).
- j. Fluoróforo comercial para la visualización de ADN.
- k. Agarosa grado biología molecular.

4. Instrumental

- a. Sensor de temperatura que permita verificar la temperatura de las muestras al momento del ingreso, el rango de trabajo debe ser de 0 a 30°C, con una división de 1°C y un error máximo de 0,5°C.
- b. Balanza analítica con una resolución de 0,001 gramo.
- c. Micropipetas de 10, 100 y 1000 µl, o equivalente.
- d. Peachímetro.
- e. Agitador magnético.
- f. Freezer que alcance temperaturas de $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ o menores.
- g. Refrigerador que alcance una temperatura de $6\pm 2^{\circ}\text{C}$.
- h. Conservadora de muestras que alcance una temperatura de $6\pm 2^{\circ}\text{C}$.
- i. Autoclave para esterilización de material.
- j. Cámara de flujo laminar o gabinete de bioseguridad Clase II.
- k. Micro-Centrífuga (hasta 14000 r.p.m.).
- l. Baño de agua termoregulado.

Metodología de identificación de las cepas bacterianas y/o fúngicas que componen un pesticida microbiano mediante técnicas de análisis molecular

- m. Agitador de tubos o Vortex.
- n. Termociclador para PCR convencional o tiempo real.
- o. Fuente de poder (solo PCR convencional).
- p. Cámara de electroforesis
- q. Transiluminador

5. Materiales de referencia

Para el análisis de identificación de un AMCP se debe contar con las secuencias de los marcadores genéticos de cepas de referencia. Las cepas de referencias para las distintas especies de bacterias y hongos se denominan Tipo o ExTipo, respectivamente. Las cepas Tipo se encuentran en la Revista Internacional de Microbiología Sistemática y Evolutiva (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, IJSEM), mientras que las cepas ExTipo se encuentran en la base de datos de Mycobank.

6. Procedimiento

6.1 Extracción de ADN de un AMCP puro

- a. Para identificar un AMCP puro se deberá realizar una extracción de ADN mediante kits comerciales debiéndose seguir las instrucciones del fabricante. También se pueden realizar protocolos de extracción de DNA descritos en la literatura científica, que aseguren una extracción de calidad y confiable.
- b. Tener en consideración que para el empleo de los kits comerciales se requiere nitrógeno líquido para la lisis mecánica del tejido micelial o disruptores celulares (e.g. equipo Mini-BeadBeater o FastPrep®-24 Instrument).

6.2 Extracción de ADN de un AMCP o de una mezcla de AMCP que compongan un PMCP

- a. El análisis debe ser realizado a 5 lotes de producción del PMCP con 5 repeticiones.
- b. Agregar 450 mL de tampón fosfato Butterfield o solución de 0,85% de NaCl a 50 g o 50 mL de PMCP. Esta suspensión corresponde a la dilución 10^{-1}
- c. Homogeneizar en agitador orbital a 200 rpm o Stomacher por 15-20 min.
- d. Realizar diluciones del homogeneizado original con prontitud, utilizando pipetas que entreguen el volumen requerido con precisión. No entregue menos del 10% del volumen total de pipeta. Por ejemplo, no utilizar una pipeta con una capacidad superior a 10 mL para administrar volúmenes de 1 mL; para suministrar volúmenes de 0,1 mL, no utilice pipetas con una capacidad superior a 1,0 mL.
- e. Preparar diluciones decimales de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y otras según corresponda, de homogeneizado de PMCP. Evitar tomar muestras de espuma. Agite todas las diluciones 25 veces en un arco de 30 cm en 7 s o aplicar vortex (1250 a 2500 rpm) por 7s.
- f. Sembrar 100 μ L de las últimas 3 diluciones en la placa con medio sólido. Emplear asa de Drigalsky para esparcir el volumen homogéneamente sobre el medio de cultivo.
- g. Rotular e incubar a la temperatura óptima de crecimiento del AMCP por 18 a 48 h.
- h. En el caso de que el PMCP presente un tipo de AMCP, verificar que en aquellas placas en donde se observe entre 20 a 200 colonias, todas presenten las mismas características morfológicas antes de proseguir. Las características morfológicas en el caso de colonias bacterianas corresponden al tamaño, borde (ej. circular, liso, irregular, lobulado, rizoide, etc) elevación (ej. planas, levantadas, convexas, cóncavas, etc), pigmentación (ej. incolora, pigmentada o pigmento difusible), consistencia (ej. mucoso, seco, filante), características ópticas (ej. opacas, brillantes, translúcidas, opalescentes) y superficie (ej. lisas o rugosa). En el caso de hongos, evaluar adicionalmente la estructura del conidióforo y la conidia y comparar las observaciones

**Metodología de identificación de las cepas bacterianas y/o
fúngicas que componen un pesticida microbiano mediante
técnicas de análisis molecular**

con las características descritas en la literatura de la especie o género del microorganismo fúngico a identificar.

- i. En el caso de que sean mezclas de AMCP evaluar las características fenotípicas en placas que presenten entre 20 a 200 colonias y reaislar las colonias que presenten características diferentes para proceder a realizar la extracción de DNA.

6.3 Cuantificación y determinación de la integridad del ADN extraído

- a. Determinar la concentración del ADN mediante cuantificación por espectrofotometría, siguiendo las instrucciones del fabricante. Evaluar la pureza de la extracción de ADN mediante la relación de la medición de la absorbancia a 260/280 nm y 260/230 nm. Un cociente de absorbancia 260/280 nm entre 1,7-2,0 es aceptable, un valor menor a ese intervalo significa que hay proteínas presentes y un valor mayor indica contaminación con RNA. Un cociente de absorbancia de 260/230 nm menor a 2 indica presencia de fenol o cloruro de guanidina en la muestra.
- b. Hacer un gel al 0,8% a 1% de agarosa, cargar 25 a 50 ng de ADN extraído y realizar la electroforesis a 80 V por 30 min, empleando el tampón TAE 1X. Posteriormente, teñir el gel en una solución de bromuro de etidio (5-10 µg/mL) u otro agente intercalante (ej. GelRed®) por 15 a 30 min, para luego fotografiar el gel bajo luz UV y evaluar visualmente la integridad del ADN extraído. Seguir con los siguientes pasos si la integridad del ADN es aceptable.

6.4 Amplificación de los marcadores moleculares

- a. Amplificar en una primera instancia el marcador 16S ARN ribosomal o ITS en el caso de que el AMCP sea bacteria o hongo, respectivamente. En las Tablas 1 a la 10 se detallan los marcadores genéticos de las especies que se emplean frecuentemente en los pesticidas microbianos registrados en Chile y en la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA).
- b. La reacción de amplificación de cada marcador genético deberá constatar con 25 a 50 ng de ADN del AMCP; 2,0 mM de MgCl₂; 0,1-1,0µM de dNTPs; 0.2mM de cada partidor (Tabla 1-10); 1,25 U de Taq polimerasa, tampón para la Taq polimerasa 1 X y agua libre de nucleasas para obtener un volumen final de reacción de 25 a 50 µL.
- c. Llevar a cabo el programa de amplificación que se detalla en la cita de los marcadores genéticos que se describen posteriormente en las Tablas 1-10. Visualizar los resultados de la amplificación por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio u otro agente intercalante, empleando un marcador de peso molecular para determinar el tamaño del amplicón.

6.5 Purificación y secuenciación de los productos de PCR

- a. Cortar la banda del tamaño esperado y purificar el producto de PCR desde el gel. Para ello se puede emplear kits comerciales de purificación o protocolos establecidos en publicaciones de corriente principal.
- b. Enviar a secuenciar el producto purificado a un servicio de secuenciación. Secuenciar ambos sentidos de la cadena de ADN.
- c. Editar y ensamblar las secuencias sentido y antisentido empleando el programa Vector NTI u otro programa afín. Los extremos 5' y 3' "poco claros" deben recortarse. Solo se deben usar secuencias de nucleótidos de alta calidad. En general, las secuencias dirigidas por los partidores durante la amplificación por PCR deben excluirse del análisis porque los partidores pueden causar sesgo en el análisis de la secuencia.

6.6 Análisis filogenético e identificación

- a. El análisis filogenético permitirá determinar con que especie(s) se agrupa el AMCP. Para ello, alinear cada marcador genético del microorganismo que se requiere identificar con

Metodología de identificación de las cepas bacterianas y/o fúngicas que componen un pesticida microbiano mediante técnicas de análisis molecular

las secuencias de los marcadores de las cepas Tipo o ExTipo en el caso de cepas bacterianas y hongos, respectivamente. Las cepas Tipo de las distintas especies bacteriana se indican en la Revista Internacional de Microbiología Sistemática y Evolutiva (IJSEM) y en el caso de los hongos en la base de datos Mycobank. Adicionalmente, emplear para el análisis secuencias de otras cepas del mismo género y/o especies que hayan sido sus secuencias publicadas en revistas indexadas.

- b. Alinear las secuencias por cada marcador empleado un programa de alineamiento múltiple tal como Muscle, ClustalW, MAFFT u otro programa afín. Remover las regiones ambiguas de forma manual o empleando el programa Gblocks.
- c. Concatenar las secuencias alineadas por cada marcador y determinar el mejor modelo de sustitución nucleotídica empleando el software MEGA, JModeltest u otro programa afín. Se recomienda determinar la historia evolutiva mediante el método Máxima Verosimilitud (*Maximum Likelihood*, ML) o por inferencia Bayesiana.
- d. En el caso de emplear el método ML sustentar la hipótesis de las relaciones filogenéticas mediante 1000 réplicas de *Bootstrap*. En el caso de llevar a cabo la inferencia Bayesiana utilizar el análisis de cadenas de Markov Monte Carlo. Para la construcción de cada árbol filogenético emplear un grupo externo. Considerar un valor de Bootstrap $\geq 70\%$ o un soporte Bayesiano $\geq 0,95$ como soporte significativo de rama dependiendo del método de inferencia filogenética escogido.
- e. Adicionalmente, determinar el porcentaje de identidad, cobertura y gaps entre la secuencia del microorganismo que compone el plaguicida microbiano con respecto a las secuencias de la cepa tipo o Extipo con la que se agrupe en el análisis filogenético.

6.7 Identificación de AMCP de origen bacteriano

- a. La identificación de los AMCP, en el caso de las bacterias, se debe acoger a la taxonomía y la nomenclatura dada por el Código Internacional de Nomenclatura de Procariontes (*International Code of Nomenclature of Prokaryotes*, ICNP).
- b. Para la identificación de una cepa bacteriana, la primera aproximación es la secuenciación del gen 16S ARNr (~1,6 kb) debido a que su análisis permitirá determinar el género o grupo operacional al que pertenece (Figura 1). La determinación de la identidad nucleotídica de este marcador en el AMCP con respecto a cepas Tipo se puede realizar en la página web de NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica), escogiendo la opción rRNA/ITS databases.
- c. El AMCP puede pertenecer a cualquiera de las especies con las que presente una identidad nucleotídica $\geq 98,6\%$.
- d. Posteriormente se debe realizar un análisis de MLSA, preferentemente, con cinco marcadores genéticos, que permitirán obtener un mayor poder de resolución para determinar la especie del organismo a identificar.
- e. Los marcadores genéticos descritos en la literatura que se emplean ampliamente para el MLSA de AMCP de origen bacteriano son aquellos que codifican las subunidades de enzimas ubicuas, como la subunidad de ADN girasa (*gyrB*), la subunidad de ARN polimerasa (*rpoB*), el factor sigma 70 (sigma D) de ARN polimerasa (*rpoD*), recombinasa A (*recA*), la subunidad de ATP sintasa (*atpD*), factor de iniciación de la traducción IF-2 (*infB*), la chaperonina GroEL (*groEL*) entre otros.
- f. A continuación, se presentan los marcadores genéticos que se emplean para la identificación de las especies bacterianas ampliamente empleadas para el control de plagas (Tabla 1-4). En el caso de que los marcadores y/o partidores de la especie bacteriana del AMCP que se requiera identificar no se presente en este documento, emplear los marcadores que hayan sido validados por la comunidad científica en publicaciones de corriente principal tipo WoS. Junto con ello, presentar las referencias de los manuscritos científicos al Servicio Agrícola Ganadero en el proceso de registro del AMCP. Se recomienda de que el número de marcadores que se analicen sea mayor o igual a 5.

Metodología de identificación de las cepas bacterianas y/o fúngicas que componen un pesticida microbiano mediante técnicas de análisis molecular

Figura 1. Flujo de trabajo para la identificación de un AMCP de origen bacteriano a nivel de especie.

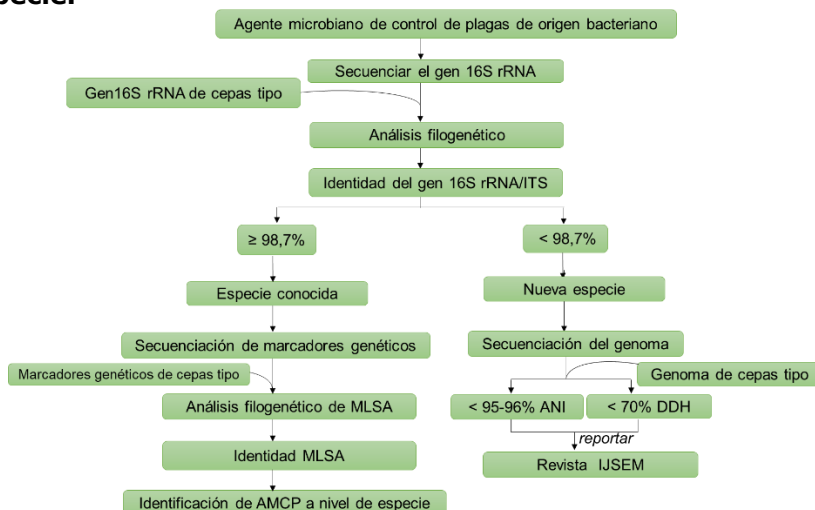


Tabla 1. Marcadores genéticos y partidores empleados en la identificación cepas del género *Bacillus*.

Marcador	Partidor	Secuencia de los partidores
16S RNAr	16S_F 1492_R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ACG GCTACCTTGTTACGACTT
Transportador de glicerol(<i>glpF</i>)	<i>glpF</i> _F <i>glpF</i> _R	WTGACAGCATTTTGGGG* GTAAAATACRCCGCCGA
Dihidroxi-ácido dehidratasa(<i>ilvD</i>)	<i>ilvD</i> _F <i>ilvD</i> _R	ATGAGATATTCGCTGCC CTTCGTTAATGCGTTCTAAAGAG
Fosfotranscetilasa(<i>pta</i>)	<i>pta</i> _F <i>pta</i> _R	ATACATATGAAGGSATGGAAGA TAGCCGATGTTTCCTGCT
Fosforribosil aminoimidazol carboxamida(<i>purH</i>)	<i>purH</i> _F <i>purH</i> _R	TTTGAGAAAAACAATCGCT TCGGCTCCCTTTTCGTCGG
Piruvato carboxilasa(<i>pycA</i>)	<i>pycA</i> _F <i>pycA</i> _R	AAATCAGARGCGAAAGC CCTGAGCGGTAAGCCAT
Factor sigma de la ARN polimerasa (<i>rpoD</i>)	<i>rpoD</i> _F <i>rpoD</i> _R	GCCGAAGAAGAATTTGACCTTAA CGTTTRCTTCTGCTHGGATGTCT
Triosa fosfato isomerase(<i>tpiA</i>)	<i>tpiA</i> _F <i>tpiA</i> _R	TCAGCTTCGTTGAAGAAGTGAAA GGACTCTGCCATATATTCTTTA

*W, A o T

Tabla 2. Marcadores genéticos y partidores para la identificación de cepas del grupo *Bacillus pumillus*.

Marcador	Partidor	Secuencia del partidor
16S RNAr	16S_F 1492_R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ACG GCTACCTTGTTACGACTT
Subunidad β de la girasa (<i>gyrB</i>)	<i>gyrB</i> _F <i>gyrB</i> _R	TTATCTACGACCTTAGACG TAAATTGAAGTCTTCTCCG
Subunidad β de la ARN polimerasa (<i>rpoB</i>)	<i>rpoB</i> _F <i>rpoB</i> _R	GTTGGCTTCATGACTTGGGA ACGTTCCATACCTAACTTTG
Shikimato 5-dihidrogenasa(<i>aroE</i>)	<i>aroE</i> _F <i>aroE</i> _R	CATAGATCAGTGATGTTT TCAATGTGTTCAAAGAAATT
Proteína de reparación del ADN(<i>mutL</i>)	<i>mutL</i> _F	TGAAGTTCCTGCTCTTACT

Metodología de identificación de las cepas bacterianas y/o fúngicas que componen un pesticida microbiano mediante técnicas de análisis molecular

Marcador	Partidor	Secuencia del partidor
Subunidad β de triptófano (<i>trpB</i>)	<i>mutL</i> _R	TATTCAGTTATCCGATGACCT
	<i>trpB</i> _F	ATGTACGCATATCCAAATGA
Fosforribosiltransferasa (<i>pyrE</i>)	<i>trpB</i> _R	GTGGCACTCACATATTGAAC
	<i>pyrE</i> _F	AGACCGTTTCTCCATCCA
Piruvato carboxilasa(<i>pycA</i>)	<i>pyrE</i> _R	CACCTATTACAAATCAAAGC
	<i>pycA</i> _F	GATTTAATGCTTTCATCCTTA
	<i>pycA</i> _R	AATGGACTATTACCTATGC

Tabla 3. Marcadores genéticos y partidores empleados en la identificación cepas *B. thuringiensis*.

Marcador	Partidor	Secuencia del partidor
16S RNAr	16S_F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
	1492_R	ACG GCTACCTTGTTACGACTT
Transportador de glicerol (<i>glpF</i>)	<i>glpF</i> _F	GCGTTTGTGCTGGTGAAGT
	<i>glpF</i> _R	CTGCAATCGGAAGGAAGAAG
Guanilato kinasa (<i>gmk</i>)	<i>gmk</i> _F	ATTTAAGTGAGGAAGGGTAGG
	<i>gmk</i> _R	GCAATGTTACCAACCACAA
Ácido dihidroxi deshidratasa (<i>ilvD</i>)	<i>ilvD</i> _F	CGGGGCAAACATTAAGAGAA
	<i>ilvD</i> _R	GGTTCTGGTCGTTTCCATTC
Fosfato acetiltransferasa (<i>pta</i>)	<i>pta</i> _F	GCAGAGCGTTTAGCAAAAAGAA
	<i>pta</i> _R	TGCAATGCGAGTTGCTTCTA
Fosforribosilaminoimidazolcarbaxamida (<i>pur</i>)	<i>pur</i> _F	CTGCTGCGAAAATCACAAA
	<i>pur</i> _R	CTCACGATTCGCTGCAATAA
Piruvato carboxilasa (<i>pycA</i>)	<i>pycA</i> _F	GCGTTAGGTGGAAACGAAAG
	<i>pycA</i> _R	CGCGTCCAAGTTTATGGAAT
Triosa fosfato isomerasa (<i>tpi</i>)	_F	GCCCAGTAGCACTTAGCGAC
	_R	CCGAAACCGTCAAGAATGAT

Tabla 4. Marcadores genéticos y partidores empleados en la identificación del grupo *P. fluorescens*.

Marcador	Partidor	Secuencia del partidor
16S RNAr	16S_F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
	1492_R	ACG GCTACCTTGTTACGACTT
Glutaminil-t ARN sintetasa (<i>glnS</i>)	<i>glnS</i> _F	ACCAACCCGGCCAAGAAGACCAGG
	<i>glnS</i> _R	TGCTTGAGCTTGCGCTTG
Subunidad β ADN girasa (<i>gyrB</i>)	<i>gyrB</i> _F	GGTGGTCGATAACTCCATCG
	<i>gyrB</i> _R	CGCTGAGGAATGTTGTTGGT
Isoleucil-t ARN sintetasa(<i>ileS</i>)	<i>ileS</i> _F	TTCCCAATGAARGCCGGCCTGC
	<i>ileS</i> _R	GGGGTGGTGGTCCAGATCAGC
Subunidad D de la NADH dehidrogenasa	<i>nuoD</i> _F	GAAGTCCTGACCTTCCTGC
	<i>nuoD</i> _R	GAAGAACTCGGCCATCATG
Recombinasa A (<i>recA</i>)	<i>recA</i> _F	TGGCTGCGGCCCTGGGTCAGAT
	<i>recA</i> _R	ACCAGGCAGTTGGCGTCTTGAT
Subunidad β de la ARN polimerasa (<i>rpoB</i>)	<i>rpoB</i> _F	TGGCCGGTCGTACGGTAACA
	<i>rpoB</i> _R	CCGAAACGCTGACCACCGAAC
Factor sigma de la ARN polimerasa (<i>rpoD</i>)	<i>rpoD</i> _F	CTGATCCAGGAAGGCAACATCGG
	<i>rpoD</i> _R	ACTCGTCGAGGAAGGAGCG

6.8 Identificación de AMCP de origen fúngico

- a. La identificación de los AMCP, en el caso de los hongos, su nomenclatura y taxonomía está establecida en el Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas (ICN) y se puede encontrar en la base de datos de MycoBank. Los laboratorios

**Metodología de identificación de las cepas bacterianas y/o
fúngicas que componen un pesticida microbiano mediante
técnicas de análisis molecular**

que ofrezcan el servicio de identificación deberán estar actualizando su conocimiento empleando las bases de datos previamente mencionadas.

- b. La primera aproximación molecular para la determinación de la especie fúngica a la que pertenece el AMCP se realiza mediante el análisis región espaciadora transcrita interna del ARNr (ITS) y las subunidades de ribosomales (SSU 18S y SSU 28S). Para el análisis de estos marcadores se recomienda emplear la base de datos curada de GenBank que presenta la secuencia de cepas fúngicas Extipo o de material que ha sido revisado. La evaluación de la identidad nucleotídica de los marcadores ITS, SSU 18S y 28S de los AMCP con las secuencias de las cepas ExTipo de esta base de datos, se puede realizar en la página web de NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica), escogiendo la opción rRNA/ITS databases.
- c. El AMCP puede pertenecer a cualquiera de las especies con las que presente una identidad nucleotídica $\geq 97\%$ (Figura 2).
- d. Posteriormente se debe realizar un análisis de MLSA con cinco marcadores genéticos que permitirán obtener un mayor poder de resolución para determinar la especie del organismo a identificar.
- e. Los marcadores genéticos que se emplean para MLSA de AMCP de origen fúngico son el factor de elongación de la traducción Tef1- α , subunidad larga del ADN polimerasa II (RPB1 y RPB2), β -tubulina (β -tub), Subunidad de la NADH dehidrogenasa (*nad*), subunidad III del citocromo oxidasa (*cox3*), entre otros.

En la Tabla 5 se presentan los marcadores genéticos que se emplean para la identificación taxonómica de cepas fúngicas a nivel de especie. Las Tablas 6-10 indican los marcadores de los de los principales géneros de biocontroladores que se comercializan principalmente.

Metodología de identificación de las cepas bacterianas y/o fúngicas que componen un pesticida microbiano mediante técnicas de análisis molecular

Figura 2. Flujo de trabajo para la identificación de un AMCP de origen fúngico a nivel de especie.

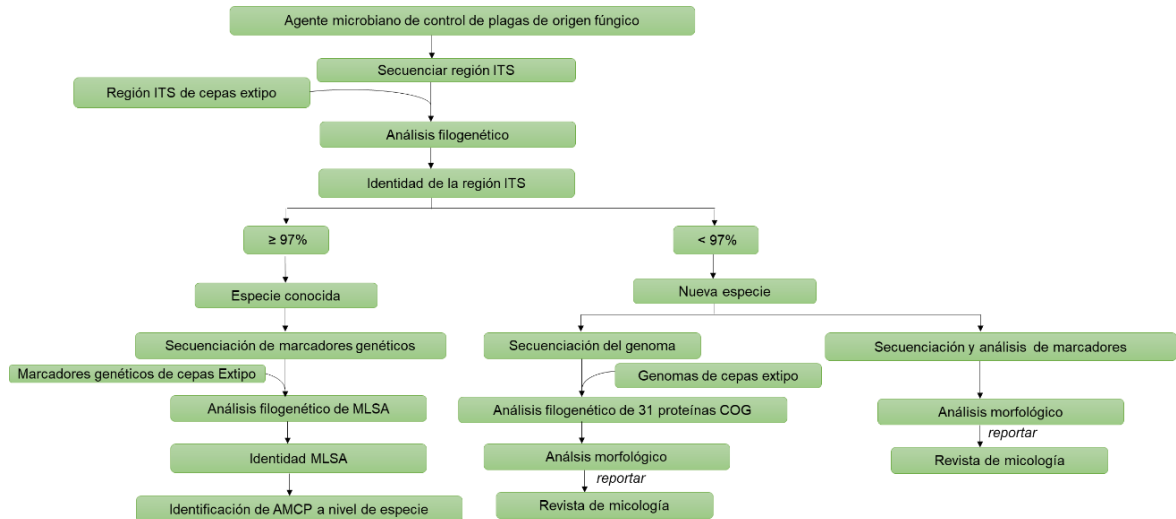


Tabla 5. Marcadores genéricos para cepas fúngicas.

Marcador	Partidor	Secuencia del partidor
Región espaciadora transcrita interna del ARNr	ITS1	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
Subunidad pequeña (SSU, 18S) del ARNr	NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC
	NS4	CTTCCGCAATTCCTTTAAG
Subunidad larga (SSU, 28S) del rRNA	LROR	ACCCGCTGAACCTTAAGC
	LR6	CGCCAGTTCTGCTTACC
Factor de la elongación 1-alfa (<i>tef1</i>)	EF1-983F	GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT*
	EF1-2218R	ATGACACCRACRGCRCRGTGTG*
Factor de la elongación 1-alfa (<i>tef1</i>)	EF1-1018F	GAYTTCATCAAGAACATGAT*
	EF1-1620R	GACGTTGAADCCRACRTTGTC*
1º subunidad mayor de la ARN polimerasa II (<i>RPB1</i>)	RPB1af	GARTGYCCDGGDCAYTTYGG*
	RPB1cr	CCNGCDATNTRTRTCCATRTA*
2º subunidad mayor de la ARN polimerasa II (<i>RPB2</i>)	RPB2-5f	GAYGAYMGWGATCAYTTYGG*
	RPB2-7cR	CCCATRGCCTTYTRCCCAT*
Beta-tubulina (<i>tub2/BenA</i>)	Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC
	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC
Mini proteína de mantenimiento cromosómico (MCM7)	Mcm7-709F	ACIMGIGTITCVGAYGTHAARCC*
	Mcm7-1348R	GAYTTDGCIAICICIGRTCWCCCAT*

*R, A o G; Y, C o T; S, G o C; W, A o T; K, G o T; M, A o C; B, C, G, T; D, A o G o T; H, A o C o T; V, A o G.

Tabla 6. Marcadores genéticos y partidores empleados en la identificación de *Beauveria spp.*

Marcador	Partidor	Secuencia del partidor
Espaciador transcrito interno (ITS)	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
Factor de la elongación (EF-1α)	EF1T	ATGGGTAAGGARGACAAGAC
	1567R	ACHGTRCCRATACCACCSATCTT

Metodología de identificación de las cepas bacterianas y/o fúngicas que componen un pesticida microbiano mediante técnicas de análisis molecular

Factor de la elongación (EF-1a/tef)	983F 2218R	GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT ATGACACCRACRGCACRGRGTYTG
Región intergénica bloc (Bloc)	B5.1F B3.1R	CGACCCGGCCAACACTACTTTGA GTCTTCCAGTACCACTACGCC
1° Subunidad mayor de la ARN polimerasa II (RPB1a)	RPB1A RPB1A_VH6 R	GARTGYCCDGGDCAYTTYGG ATGACCCATCATRGAYTCCTTRTG
1° Subunidad mayor de la ARN polimerasa II (RPB1b)	RPB1B_VH6F RPB1B_G2R 7	CAYAAGGARTCYATGATGGGTCAT GTCATYTGDTGDCDGGYTCDC
2° subunidad mayor de la ARN polimerasa II (RPB2a)	fRPB2_5F RPB2A_7cR	GACGAYAGAGAYCAYTTYGG CCCATRGCTTGYTTRCCCAT
2° subunidad mayor de la ARN polimerasa II (RPB2a)	fRPB2-7cF RPB2- 3053bR	ATGGGYAARCAAGCYATGG TGRATYTRTCRTCSACCAT

Tabla 7. Marcadores genéticos y partidores empleados en la identificación de *Lecanicillium spp.*

Marcador	Partidor	Secuencia del partidor
Espaciador transcrito interno (ITS)	ITS1 ITS4	TCCGTAGGTGAACCTGCGG TCCTCCGCTTATTGATATGC
Subunidad pequeña (SSU, 18S) del ARNr	NS1 NS4	GTAGTCATATGCTTGTCTC CTTCCGTCAATTCCTTTAAG
Subunidad larga del ARNr (LSU, 23S)	LSU_F LSU_R	GTTTCCGTAGGTGAACCTGC ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT
Factor de la elongación (EF-1a/tef)	EF1a_F EF1a_R	GCCCCGGCCATCGTGACTTCAT ATGACACCGACAGCGACGGTCTG
1° Subunidad mayor de la ARN polimerasa II (RPB1a)*	CRPB1_F CRPB1A_R	CCWGGYTTYATCAAGAARGT** CAYCCWGGYTTYATCAAGAA**
1° Subunidad mayor de la ARN polimerasa II (RPB1)*	CRPB1A_F RPB1C_R	CAYCCWGGYTTYATCAAGAA** CCNGCDATNTRTRTCCATRTA*
2° subunidad mayor de la ARN polimerasa II (RPB2a)	RPB2-5F RPB2-7R	GACGACCGTGATCACTTTGG CCCATGGCCTGTTTGCCCAT

*Emplear cualquiera de las parejas de partidores para la amplificación del marcador RPB1

** R, A o G; Y, C o T; S, G o C; W, A o T; K, G o T; M, A o C; B, C o G o T; D, A o G o T; H, A o C o T; V, A o G.

Tabla 8. Marcadores genéticos y partidores empleados en la identificación de *Metarhizium spp.*

Partidor	Función	Secuencia del partidor
MzBTigs_1F	PCR	GCCCATAACCCARTTTCTCA
MzBTigs_2F	Secuenciación	ACCCGCCAGGTTYGTAATAAT
MzBTigs_3R	PCR/secuenciación	TTTACTTACGCACTGACCGGT
MzFG543igs_1F	PCR	ATTCATTGAGAACGCTCCAA
MzFG543igs_2F	Secuenciación	TCTCTACAACCGTACCCGACA
MzFG543igs_3F	Secuenciación	GGCCGTTATYACTGGAGAACT
MzFG543igs_4R	PCR/secuenciación	GGTTGCGACTGAGAATCCATG
MzFG546_1F	PCR	GCCCATAACCCARTTTCTCA

Metodología de identificación de las cepas bacterianas y/o fúngicas que componen un pesticida microbiano mediante técnicas de análisis molecular

Partidor	Función	Secuencia del partidor
MzFG546_2F	Secuenciación	CGCGAGCTGGAGACGGTTAT
MzFG546_3R	Secuenciación	TTGATGGCSTCGACGACCTG
MzFG546_4R	PCR	CGTCCCGTCGAAATCGCCT
MzIGS2_1F	Secuenciación	TGCAATGGATACACAAGATCTGCTCG
MzIGS2_2F	PCR	CTGCAATGGATACACAAGATCTGCTCG
MzIGS2_3F	Secuenciación	RYGGGTTTCGCTGAATGGA
MzIGS2_3R	PCR	CCAGGCACCTGGGGCTGC
MzIGS2_4R	Secuenciación	AAGRCGGGAAGCATGAAA
MzIGS3_1F	PCR	CGTGGCTCCTGACCATGGTTGC
MzIGS3_2F	Secuenciación	GTGGCTCCTGACCATGGTTGC
MzIGS3_3F	Secuenciación	TGGTRTAACCRGCGAGACA
MZIGS3_3R	Secuenciación	CGGGGGAGCCGACTTGATTT
MzIGS3_4R	PCR	GCGGGGGAGCCGACTTGGA
MzIGS3_5R	Secuenciación	CCGTCCSGCATAGCCYTCA
MzIGS5_1F	PCR	TGCCGGAATCGAGGCATGGAA
MzIGS5_2F	Secuenciación	GGACCCAAGTCCGCAAGACCA
MzIGS5_3F	Secuenciación	AGTTRYCCGSCCTCTCAAC
MzIGS5_3R	Secuenciación	TTTGGCTTCCACGACGGCCT
MzIGS5_4R	PCR	AACGTCGAGGAGCAGTGCCG
MzIGS5_5R	Secuenciación	GGATGCGGRCATGAATCAA
MzIGS7_1F	PCR	GGTCCCGACGCAGATTTTCG
MzIGS7_2F	Secuenciación	CTTGCTCACGCCAATTTCCACCG
MzIGS7_3F	Secuenciación	TAYTCTSARGCGTCATTT
MzIGS7_3R	Secuenciación	CAGGATGCCGAGTCATTCTCG
MzIGS7_4R	PCR	CGCAGCGTCTCGGACCACT
MzIGS7_5R	Secuenciación	AGAAATGACGCYCTSAGA

Tabla 9. Marcadores genéticos y partidores empleados en la identificación de *Purpureocillium* spp.

Marcador	Partidor	Secuencia del partidor
Región espaciadora transcrita interna del ARNr	ITS1	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
Subunidad pequeña (SSU, 18S) del ARNr	NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC
	NS4	CTTCCGTC AATTCCTTTAAG
β -tubulina (β -tub)	Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTC
	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC
Exón del gen EF-1 α (tef1_exon6)	728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG
	EF-2	GGARGTACCAGTSATCATGTT*
1° subunidad mayor de la ARN polimerasa II (RPB1)	RPB1af	GARTGYCCDGGDCAYTTYGG*
	RPB1cr	CCNGCDATNTRTRTCCATRTA*
2° subunidad mayor de la ARN polimerasa II (RPB2)	RPB2-5f	GAYGAYMGWGATCAYTTYGG*
	RPB2-7cR	CCCATRGTGTYTTRCCCAT*

Metodología de identificación de las cepas bacterianas y/o fúngicas que componen un pesticida microbiano mediante técnicas de análisis molecular

Tabla 10. Marcadores genéticos y partidores empleados en la identificación de *Trichoderma* spp.

Marcador	Partidor	Secuencia del partidor
Espaciador transcrito interno (ITS)	ITS1 ITS4	TCCGTAGGTGAACCTGCGG TCCTCCGCTTATTGATATGC
Intrón largo del gen EF-1 α (tef1_int5)	EF1-728F EF1-986R	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG TACTTGAAGGAACCCTTACC
Exón del gen EF-1 α (tef1_exon6)	EF1-983F EF1-2218R	GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT ATGACACCRACRGCRCRGRGTYTG
Intrón pequeño del gen EF-1 α (tef1_int4)	tef1 fw tef1 rw	GTGAGCGTGGTATCACCATCG GCCATCCTTGGAGACCAGC
Subunidad de la ARN polimerasa (RPB2)	fRPB2-5F fRPB2-7cR	GAYGAYMGWGATCAYTTYGG CCCATRGTGTYTRCCCAT

* R, A o G; Y, C o T; S, G o C; W, A o T; K, G o T; M, A o C; B, C o G o T; D, A o G o T; H, A o C o T; V, A o G.

6.9 Estándares mínimos propuestos para el uso de datos del genoma para la identificación de un AMCP

6.9.1 Se debe considerar cuatro niveles de análisis de secuencia nucleotídica para procesar los datos provenientes una plataforma de secuenciación de última generación (*Next Generation Sequencing, NGS*):

- El primer nivel es la generación de lecturas de secuencia denominadas "*reads*" que genera el software del instrumento de secuenciación para convertir las señales de la secuenciación de nucleótidos en base nucleotídicas asociadas a su puntaje de calidad (archivo FASTQ).
- El segundo es el alineamiento de los *reads* y su ensamblaje para dar origen a *contigs* y a *scaffold* (Tabla 11)
- El tercer nivel es la anotación, la integración de datos y la visualización de la secuencia ensamblada (Tabla 12 y 13).
- El cuarto es la integración de los datos obtenidos del procesamiento bioinformático en un consolidado de información que esté disponible para el usuario mediante enlaces y herramientas que le permitan realizar análisis filogenéticos y otros análisis de interés biológico. A continuación, se presentan los programas y las direcciones web que se pueden utilizar para alinear, ensamblar y anotar genomas

Tabla 11. Herramientas de alineamiento y ensamblaje disponible en la web

Programa	Website
MUMmer aligner	Los enlaces de los programas indicados en la presente Tabla estarán disponibles en el sitio web del SAG, www.sag.gob.cl .
BBmap	
Bowtie aligner	
Anytag aligner	
Allpaths-LG	
assembler	
Celera assembler	
Velvet assembler	
SPAdes assembler	
Galaxy tools	
Genomic tools	
BaseSpace Illumina	
Torrent Suite	
Software	

Tabla 12. Servidores web de anotación de procariontes

Programa	Sitio web
PATRIC	Los enlaces de los programas indicados en la presente Tabla estarán disponibles en el sitio web del SAG, www.sag.gob.cl .
RAST	
Mreps	
MicroScope	
NCBI pipeline_prok	

Tabla 13. Servidores web de anotación de eucariontes

Programa	Sitio web
NCBI pipeline	Los enlaces de los programas indicados en la presente Tabla estarán disponibles en el sitio web del SAG, www.sag.gob.cl .
RepeatMasker	
Censor / WindowMasker	
BUSCO	
PASA	
MAKER	
Babelomics	

6.9.2 Se recomiendan tener en consideración la siguiente información para la identificación taxonómica de un AMCP mediante el análisis de su genoma:

- Plataforma de secuenciación y métodos de ensamblaje. Se recomienda registrar el instrumento de secuenciación, los reactivos de la biblioteca y el método empleado en el ensamblaje del genoma.
- Tamaño del genoma. El tamaño del genoma se define como la suma de la longitud de todos los contigs. Si la secuencia del genoma no está completamente determinada, este valor representa solo una aproximación.
- % G+C. La primera metodología genotípica empleada de manera sistemática para estudios taxonómicos o de identificación fue la determinación del contenido de los nucleótidos guanina y citosina (G+C). Hoy en día es relativamente simple estimar la composición de un genoma completo y se ha observado que, en casi todos los casos, la diferencia de contenido G+C entre cepas no excede el 1%; los valores superiores al 1% son indicativos de diferentes especies.

**Metodología de identificación de las cepas bacterianas y/o
fúngicas que componen un pesticida microbiano mediante
técnicas de análisis molecular**

- d. El número de contigs y N50. Un proceso de ensamblaje del genoma da como resultado contigs de varias longitudes. Es una práctica general excluir contigs muy cortos del ensamblaje final. Debido a que no existe un estándar claro sobre cómo seleccionar los contigs, el número de contigs no puede ser un buen indicador de la calidad de la secuencia del genoma. En cambio, se puede usar N50, que se sabe que proporciona una mejor evaluación del ensamblaje final. Si las longitudes de los contigs se suman de mayor a menor, el N50 se define como la longitud del contig más corto que acumulativamente muestra el 50% o más del tamaño del genoma.
- e. Profundidad de la secuenciación. Este valor generalmente se expresa como "X" (por ejemplo, 40,5X significa que cada base en el ensamblaje final se leyó en 40,5 veces en promedio). Esta estadística se puede medir para todas las plataformas de secuenciación de ADN con un software de ensamblaje genómico adecuado. Es difícil recomendar un valor único para todas las plataformas NGS debido a que tienen diferente precisión y longitudes de lectura. Teóricamente, cuantas más lecturas de secuencia se generen, mejor será la calidad del ensamblaje. Se recomienda una profundidad de 50X para las plataformas NGS disponibles actualmente (Illumina, Ion Torrent y Pacific Biosciences). No todas las herramientas de los softwares de ensamblaje proporcionan el valor de profundidades de secuencia del genoma resultante. En tales casos, se puede usar un software de mapeo de lectura corta, como BMap (Tabla 11), que mapea todas las lecturas cortas filtradas por calidad al ensamblaje final para estimar con precisión la profundidad de cobertura de la secuencia.
- f. Autenticidad del genoma ensamblado. Para verificar la autenticidad del ensamblaje del genoma final, se debe comparar la secuencia ARNr 16S (AMCP bacteriano) o ITS (AMCP fúngico) que se extrajo del ensamblaje del genoma con la secuenciación mediante el método Sanger. Alternativamente, las secuencias de genes que codifican proteínas se pueden usar para verificar la autenticidad del genoma secuenciado.

6.10 Análisis del genoma para la identificación de la especie del AMCP

- a. Para determinar si un AMCP de origen bacteriano pertenece a una especie conocida se debe calcular la relación entre las secuencias del genoma del AMCP y la cepa tipo de una especie. Los análisis *in silico* de identidad de nucleótidos promedio (ANI) y de hibridación ADN-ADN. (DDH) se han utilizado ampliamente para determinar si dos cepas pertenecen a una misma especie, siendo el límite de ANI y DDH propuesto, por la comunidad científica internacional, de $\geq 95 \sim 96\%$ y $\geq 70\%$, respectivamente. Adicionalmente, el parámetro de ANI también se emplea para determinar si 2 microorganismos fúngicos pertenecen a una misma especie. A pesar de que se ha realizado un esfuerzo considerable en la secuenciación de genomas de cepas tipo, menos del 50% de las especies con nombres válidamente publicados están representadas por el genoma secuenciado de sus cepas tipo. En la Tabla 14 se presentan los softwares disponibles de forma online para la determinación de ANI y DDH.
- b. Adicionalmente, tanto para la identificación de AMCP bacterianos como fúngico se recomienda realizar el análisis filogenético descrito por Cicarelli et al. (2006). Este análisis se realiza en base a la concatenación de 31 proteínas ribosomales presentes en los 3 dominios de la vida. Los genes que codifican estas proteínas no están sujetas a transferencia horizontal y presentan una alta resolución en los diferentes niveles taxonómicos.

Tabla 14. Servicios web y herramientas de software para fines taxonómicos

Algoritmo	Función	URL/Referencia
OrthoANI	Calculador de ANI	
OrthoANI with Genome-to-Genome	Calculador de ANI Calculador de distancia	Los enlaces de los servicios web y herramientas de software indicados en la presente Tabla estarán disponibles en el sitio web del SAG, www.sag.gob.cl .
ANI calculator	Calculador de ANI	
JSpecies	Calculador de ANI	
JSpeciesWS	Calculador de ANI	
CheckM	Chequeo de contaminación	

6.11

Identificación del AMCP a nivel de cepa

Se proponen dos herramientas para la detección del AMCP a nivel de cepa. Las directrices para su implementación en la detección del AMCP se describen a continuación:

6.11.1 Fundamento técnico de SCAR

- a. Esta técnica permite amplificar regiones del genoma de forma aleatoria. La amplificación se producirá si los partidores están situados entre si a una distancia entre 200 a 2000 pb.
- b. Para la obtención de un marcador SCAR primero se tiene que desarrollar la técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Los RAPDs se obtienen mediante amplificación por PCR de ADN genómico empleando partidores con secuencia azarosa de 10 nucleótidos de longitud.
- c. Se divide en cinco etapas principalmente: i) reacción de PCR, ii) electroforesis y visualización de la amplificación, iii) selección de la banda de ADN para su clonamiento y secuenciación, iv) evaluación de la homología de la secuencia de ADN con secuencias de cepas de las bases de datos de NCBI, v) síntesis y validación experimental de partidores para el SCAR.
- d. Al comparar el patrón de fragmentos amplificados de ADN genómico de varias cepas mediante la técnica de RAPD se podrá observar uno o más fragmentos presentes en la cepa de interés y no en las otras cepas. Estos fragmentos pueden ser clonados, secuenciados y transformados en marcadores específicos que se pueden amplificar por PCR.
- e. El marcador resultante del procedimiento previamente descrito se denomina SCAR. Adicionalmente, la secuencia de nucleótidos del SCAR se analiza para corroborar de que esta no presenta homología significativa con secuencias de otras cepas presentes en las bases de datos de NCBI (Figura 3).

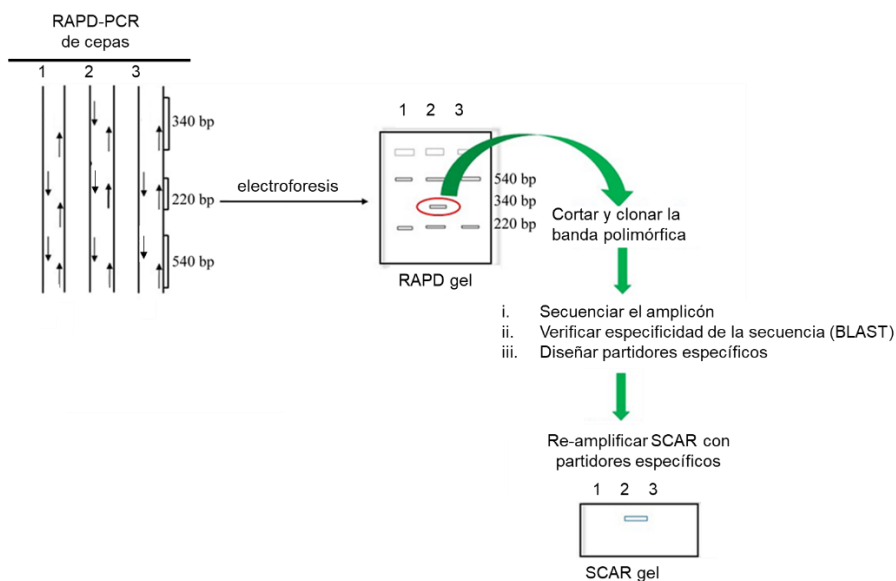
6.11.2 Protocolo de la técnica de SCAR

- a. Realizar la reacción de PCR se realiza de acuerdo a las condiciones descritas en la sección 6.4, empleando partidores para RAPD comerciales.
- b. Llevar a cabo el siguiente perfil térmico: desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min, seguido de 45 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94°C por 10 s, temperatura de hibridación de 45°C durante 20s y una extensión a 72 °C por 70s) y una extensión final a 72 °C por 5 min.

Metodología de identificación de las cepas bacterianas y/o fúngicas que componen un pesticida microbiano mediante técnicas de análisis molecular

- c. Cargar el producto de PCR en un gel de 2% de agarosa y 0,25 X de tampón NEB (10X NEB, Tris 1M, EDTA 10 mM, acetato de sodio 0,12 M, pH 8,1). Realizar la electroforesis a 130-140V por 3 h, empleado tampón NEB al 0,25X. Posteriormente, teñir el gel en una solución de bromuro de etidio (5-10 µg/mL) u otro agente intercalante por 15 a 30 min, para luego visualizar el gel en luz UV y determinar la banda RAPD de interés para proceder a recortarla con bisturí. El ADN de la banda se debe eluir utilizando métodos descritos en la literatura o comerciales. Luego de ello, el fragmento de ADN se puede secuenciar directamente o clonar en un sistema de clonamiento para su posterior secuenciación.
- d. Analizar la secuencia de nucleótidos del SCAR para corroborar que ésta no presente homología significativa con secuencias de otras cepas presentes en las bases de datos NCBI. Posteriormente, a partir de la secuencia del SCAR se diseñan nuevos partidores de 20-23 bases que contienen el partidor original en el extremo 5´.
- e. Validar experimentalmente el marcador mediante la amplificación por PCR y un perfil térmico: desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94°C por 20 s, temperatura de hibridación del partidor durante 20s y una extensión a 72 °C por un tiempo determinado que depende de cada marcador individualmente y que se suele calcular como 1 min por kb de ADN a amplificar) y una extensión final a 72 °C por 5 min.

Figura 3. Esquema del flujo de trabajo para el diseño de marcadores



6.11.3 Diseño de marcadores utilizando datos de NGS para la identificación específica de la cepa de AMCP

- a. Para llevar a cabo la identificación específica de la cepa del AMCP se propone seguir la estrategia planteada por Hernández *et al.* (2020).
- b. En este trabajo se emplea la plataforma web Galaxy Australia, para el preprocesamiento de los datos obtenidos de los genomas secuenciados de cepas bacterianas.

**Metodología de identificación de las cepas bacterianas y/o
fúngicas que componen un pesticida microbiano mediante
técnicas de análisis molecular**

- c. La primera etapa consta del empleo de las herramientas FastQ groomer que convierte los archivos FastQ (provenientes de las plataformas de secuenciación) al formato FastQ Sanger. Este último formato es compatible con las herramientas del software Galaxy.
- d. Luego de la conversión de archivos se procede a determinar la calidad de las lecturas de secuenciación mediante la herramienta FastQ y descartar aquellas de baja calidad empleado la herramienta TrimGalore.
- e. Posteriormente, se evalúa nuevamente la calidad, para continuar con el alineamiento de las lecturas con el genoma de la cepa tipo de la especie del microorganismo que se está secuenciando su genoma. Para ello se emplea la herramienta Bowtie2 y se seleccionan todas las lecturas que no se alinean o mapean con el genoma de la cepa tipo para ensamblarlas con la herramienta SPAdes.
- f. Se filtran los contigs por debajo de un límite de longitud (200 pb). Posteriormente, se determinan los ORF presentes en los contigs utilizando la herramienta getorf EMBOSS y se tabulan los datos en formato FASTA para realizar un megablast con la base de datos de todos los genomas bacterianos depositados en NCBI para encontrar y descartar todos los ORF que presentan homologías con los de las bases de datos.
- g. Finalmente, se seleccionan todos los ORF que no presenten homología para realizar el diseño de partidos con el programa BatchPrimer3. Para luego, evaluar la especificidad de las parejas de partidores candidatos mediante PrimerBLAST.
- h. En este análisis se seleccionan aquellas secuencias que no alinean con las secuencias bacterianas de base de datos de NCBI. Finalmente, se diseñan oligonucleótidos internos utilizando Primer3Plus configurando las propiedades de oligo para que sirvan como sonda de hidrólisis en los ensayos de qPCR.
- i. En la Figura 4 se presenta un esquema del procedimiento descrito por Hernandez *et al.*, 2020. Se recomienda leer el archivo suplementario del artículo Hernández *et al.* que explica con detalle cada paso del protocolo que se emplea para la selección de partidores específicos de detección y cuantificación de cepas.

Metodología de identificación de las cepas bacterianas y/o fúngicas que componen un pesticida microbiano mediante técnicas de análisis molecular

Figura 4. Esquema del flujo de trabajo para el diseño de marcadores específicos para la identificación de una cepa de AMCP. Los recuadros de color verde indican que los procesos se ejecutan en el software Galaxy, y las líneas negras indican que los procesos se ejecutan utilizando herramientas en línea. Las flechas indican la dirección del flujo de trabajo y las líneas discontinuas indican procesos que requieren un conjunto de datos por segunda vez.

