



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Estandarización de métodos de diagnóstico de fusariosis causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*-Raza 4 Tropical (FocR4T) en plantas de banano.

Luna Lazo, Mónica Alexandra

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Flores Flor, Francisco Javier Ph. D.

29 de agosto del 2023

Tesis Monica Luna.txt

Scan details

Scan time:
August 28th, 2023 at 18:57 UTC

Total Pages:
32

Total Words:
7830

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	2%	153
Minor Changes	0.9%	67
Paraphrased	6.2%	485
Omitted Words	0%	0

AI Content Detection



Text coverage
 AI text
 Human text

Plagiarism Results: (24)

[🌐 Plan de contingencia ante un brote de la raza 4 trop...](https://www.oirsa.org/contenido/biblioteca/plandecontingen...) **1.9%**
<https://www.oirsa.org/contenido/biblioteca/plandecontingen...>

Miguel Ángel Dita Rodríguez
 ORGANISMO INTERNACIONAL REGIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA OIRSA
 Plan de contingencia ante un brote de la raza 4 tropical de Fusarium oxys...

[🌐 Microsoft Word - Plan Fusarium aprobado julio 2020...](https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2021/0...) **1.8%**
<https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2021/0...>

PLAN NACIONAL DE CONTINGENCIA PARA LA PREVENCIÓN, Edición No: 1
 DETECCIÓN Y CONTROL DE Fusarium oxysporum f.sp. cubense Fecha de...

[🌐 202072181721Guia Andina Final.pdf](https://www.comunidadandina.org/staticfiles/202072181721...) **1.3%**
<https://www.comunidadandina.org/staticfiles/202072181721...>

GUÍA ANDINA PARA EL DIAGNÓSTICO DE Fusarium Raza 4 Tropical (R4T)
 Fusarium oxysporum f.sp. cubense (syn. Fusarium odoratissimum) agente...





Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: “Estandarización de métodos de diagnóstico de fusariosis causada por *Fusarium oxysporum* f. *sp.cubense*-Raza 4 Tropical (FocR4T) en plantas de banano.” fue realizado por la señorita **Luna Lazo, Mónica Alexandra**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 27 de octubre del 2023



Firmado electrónicamente por:
FRANCISCO JAVIER
FLORES FLOR

.....
Flores Flor, Francisco Javier PhD

C. C 1713443479



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Luna Lazo, Mónica Alexandra**, con cédula de ciudadanía n°0604195149, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Estandarización de métodos de diagnóstico de fusariosis causada por *Fusarium oxysporum* f. *sp.cubense*-Raza 4 Tropical (FocR4T) en plantas de banano.”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 27 de octubre del 2023

Luna Lazo, Mónica Alexandra

C.C.: 0604195149



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo **Luna Lazo, Mónica Alexandra**, con cédula de ciudadanía n°0604195149, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo integración curricular: **“Estandarización de métodos de diagnóstico de fusariosis causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubeense*-Raza 4 Tropical (FocR4T) en plantas de banano.”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 27 de octubre del 2023

Luna Lazo, Mónica Alexandra

C.C.:0604195149

Dedicatoria

A mis padres Paúl y Mónica quienes creyeron en mí y me apoyaron en cada decisión para seguir mis estudios lejos de ellos, quienes todos los días me enviaban fuerzas, me alentaban a seguir adelante, y que con todo su amor permitieron que nunca me rinda.

A Paulina mi hermana, quien ha sido mi compañera y amiga durante toda mi vida, por su paciencia, cariño y apoyo, sin ella no hubiera logrado ser la persona que hoy en día soy. A mi hermano Cristian que siempre cuidó de mí y supo cómo guiarme.

A mi ángel del cielo Shelly quien fue como una madre para mí, me brindó todo su amor y cariño desde que era niña, supo cuidar y velar por mi bienestar. Este trabajo va dedicado en su memoria y en honor a todo ese apoyo incondicional.

A mis abuelos y tíos que han sido un pilar fundamental en mi vida. A mis amigos quienes fueron como mi familia y estuvieron para mí durante toda esta etapa. Finalmente, dedico mi esfuerzo y dedicación a la Virgen de Agua Santa por guiarme durante todos mis estudios.

Agradecimientos

A mis padres por ser un ejemplo de humildad y perseverancia, por haberme impulsado a seguir mis sueños, por todo su cariño, su paciencia y todas sus enseñanzas.

A mis hermanos, abuelos y tíos por enseñarme a no rendirme y ser una fuente de admiración e inspiración en mi vida. A Yadi que fue mi compañera y amiga desde el comienzo de esta etapa, por siempre cuidar de mi y estar en los buenos y malos momentos de mi vida universitaria.

A mis amigos Jefferson, Kimberly y Nicolás quienes desde el primer momento me brindaron su apoyo y ser incondicionales. A Taty por llenarme de gratas experiencias en estos años de amistad, sobre todo por permitirme compartir con ella y su familia.

A Michelle, Alex y Gabriel quienes fueron como mi familia en este lugar desconocido, con quienes reí, lloré y me aventuré a tener nuevas experiencias, gracias a ellos me sentí como en casa e hicieron que mi vida universitaria este llena de buenos recuerdos, espero poder seguir aventurándonos en esta nueva etapa como profesionales.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE", por abrirme las puertas de sus aulas para convertirme en una profesional, aquí conocí excelentes profesionales que fueron una guía para mi formación académica y quienes forjaron este amor por la Biotecnología.

Al Dr. Francisco Flores por ser un ejemplo de ser humano y profesional, gracias por guiarme y brindarme nuevos conocimientos durante la ejecución de mi proyecto de investigación, por su paciencia y dedicación con todos sus estudiantes.

A los técnicos del Laboratorio IDgen, Francisco, Sofí y Vanesa por orientarme durante todo mi proyecto de investigación, gracias por su paciencia y sus enseñanzas. Gracias infinitas a quienes estuvieron en este largo camino.

Índice de contenido

Resumen	12
Abstract	13
Capítulo I: Introducción	14
Planteamiento del problema	14
Justificación del problema	15
Objetivos	16
Objetivo General	16
Objetivos Específicos.....	16
Hipótesis.....	16
Capítulo II: Marco teórico.....	17
Producción mundial de Banano	17
Marchitez por <i>Fusarium</i>	18
Morfología y anatomía del hongo <i>Fusarium</i>	19
Métodos de diagnóstico.....	20
PCR punto final.....	22
PCR cuantitativa	23
Fluoróforos con afinidad por el ADN.....	24
Sondas específicas para fragmentos del ADN.....	24
Capítulo III: Metodología.....	26
Muestras de ADN	26

	9
Cuantificación del ADN	26
PCR punto final.....	26
Amplificación por PCR punto final	27
PCR cuantitativa	28
Amplificación por PCR cuantitativa	28
Determinación de la eficiencia de la prueba	29
Capítulo IV: Resultados	30
Concentraciones de ADN	30
PCR punto final.....	31
Primer ensayo	31
Segundo ensayo	32
PCR cuantitativa	32
Primer ensayo	32
Segundo ensayo	34
Capítulo V: Discusión.....	37
Capítulo VI: Conclusiones	43
Capítulo VII: Recomendaciones	44
Capítulo VIII: Bibliografía.....	45
Apéndice	49

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Pruebas moleculares para el diagnóstico de Foc R4T</i>	21
Tabla 2. <i>Reactivos de la PCR punto final</i>	27
Tabla 3. <i>Programación del termociclador para los cebadores de Dita et al., 2010</i>	27
Tabla 4. <i>Reactivos de la PCR cuantitativa</i>	28
Tabla 5. <i>Programación del termociclador para los cebadores de Aguayo et al., 2017</i>	29
Tabla 6. <i>Concentración y pureza de las muestras de ADN obtenidas a partir de las diluciones</i>	30
Tabla 7. <i>Valores Ct de las diferentes muestras de ADN por duplicado</i>	33
Tabla 8. <i>Valores Ct de las muestras de ADN que se mezcló con ADN de banano por duplicado</i>	35

Índice de figuras

Figura 1. Amplificación de PCR punto final para el primer ensayo.....	31
Figura 2. Amplificación de PCR punto final del segundo ensayo	32
Figura 3. <i>Amplificación de PCR cuantitativa con sonda TaqMan. Ensayo de estandarización a concentraciones variadas de ADN.....</i>	33
Figura 4. <i>Curva estándar de qPCR construida con diferentes diluciones del ADN de Foc R4T</i>	34
Figura 5. <i>Amplificación de PCR cuantitativa con sonda TaqMan. Ensayo de estandarización a concentraciones variadas de la mezcla de ADN fúngico y de banano</i>	35
Figura 6. <i>Curva estándar de qPCR construida con la mezcla del ADN de Foc R4T y de banano</i>	36

Resumen

El marchitamiento por *Fusarium* ha sido considerado como una de las enfermedades más destructivas del banano a nivel mundial, debido a su rápida capacidad de infección y al ser difícil de controlar. Hasta el momento se ha observado la presencia de cuatro razas de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, de las cuáles solo tres atacan al banano. La raza 1, la raza 2 y actualmente la raza 4 tropical (R4T) que es considerada como el principal problema patológico que enfrenta el cultivo de banano del subgrupo "Cavendish". La presencia de R4T no implica solamente un problema para los países productores de banano también implica un colapso en la seguridad alimentaria. Por lo tanto, se ha visto necesaria la implementación de métodos de diagnósticos que sean rápidos y que su nivel de eficiencia sea alto. Siendo el objetivo de este trabajo estandarizar los métodos de diagnóstico de fusariosis causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*-Raza 4 Tropical (*Foc* R4T) en plantas de banano. A partir del análisis de los protocolos presentados en el Acuerdo Ministerial N° 142 de Agrocalidad, donde se utilizan los primers de Dita et al., 2010 para la PCR punto final y los primers de Aguayo et al., 2017 para la PCR cuantitativa, para esto se plantearon dos ensayos que tuvieron como objetivo determinar la eficiencia de las pruebas moleculares a diferentes concentraciones de ADN y determinar la especificidad de los cebadores para el diagnóstico de *Fusarium*, realizando diferentes diluciones del ADN fúngico, y la dilución del ADN del hongo con el ADN de muestras de banano que se obtuvieron del laboratorio de IDgen. A partir de los resultados obtenidos de la PCR punto final se fijó una nueva programación de amplificación que ayudó a disminuir el tiempo final. Para la interpretación de resultados de la qPCR se determinó el valor de la eficiencia de la prueba para el primer y segundo ensayo dándonos del 100% y un valor mayor al 100% respectivamente, lo que nos indica que existe contaminación, o la muestra de ADN es de baja calidad por lo que se recomienda realizar nuevamente el ensayo.

Palabras clave: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical, PCR punto final, qPCR,

ADN fúngico

Abstract

Fusarium wilt has been considered one of the most destructive banana diseases worldwide, due to its rapid infection capacity and being difficult to control. So far, the presence of four breeds of *F. oxysporum* f. sp. *cubense* has been observed, of which only three attack the banana. The race 1, the race 2 and currently the tropical race 4 (R4T) which is considered as the main pathological problem facing the banana cultivation of the “Cavendish” subgroup. The presence of R4T does not only imply a problem for banana producing countries, it also implies a collapse in food security. Therefore, it has been necessary to implement diagnostic methods that are fast and that their level of efficiency is high. Being the objective of this work to standardize the diagnostic methods of fusariosis caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*-Tropical Race 4 (Foc R4T) in banana plants. Based on the analysis of the protocols presented in the Ministerial Agreement N° 142 on Agrocalidad, where the primers of Dita et al., 2010 for the endpoint PCR and primers by Aguayo et al., 2017 for quantitative PCR, for this two assays were proposed that aimed to determine the efficiency of molecular tests at different DNA concentrations and determine the specificity of primers for the diagnosis of Fusarium, performing different dilutions of fungal DNA, and the dilution of the DNA of the fungus with the DNA of banana samples that were obtained from the IDgen laboratory. Based on the results obtained from the endpoint PCR, a new amplification schedule was set that helped to decrease the final time. For the interpretation of the qPCR results, the value of the efficiency of the test was determined for the first and second tests, giving us 100% and a value greater than 100% respectively, which indicates that there is contamination, or the DNA sample is of low quality, so it is recommended to perform the test again.

Keywords: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4, PCR endpoint, qPCR, fungic

DNA

Capítulo I: Introducción

Planteamiento del problema

El banano (*Musa spp.*) es una de las principales frutas que se exportan alrededor del mundo, durante el 2020 se llegó a exportar aproximadamente 120 millones de toneladas, proporcionando una fuente importante de ingresos para los países como Ecuador, Filipinas y Costa Rica (Voora, 2023). En donde el Ecuador se ha posicionado como uno de los países con mayor producción y exportación, llegando a ocupar un 22% del mercado bananero internacional.

En los últimos años la producción mundial del banano ha ido decreciendo debido a la presencia de numerosas plagas, enfermedades y fenómenos meteorológicos. Una de las principales plagas que ha estado amenazando actualmente a la industria bananera es el hongo del suelo *Fusarium* el cual provoca la marchitez de la planta (SIAMAK, 2018). Fusariosis o comúnmente conocida como mal de Panamá, es una enfermedad causada por un hongo patógeno llamado *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (*Foc*), que es altamente virulento que llega a afectar el crecimiento, el desarrollo y el potencial de rendimiento de la planta, debido a su capacidad de sobrevivir en el suelo durante largos periodos de tiempo lo que dificulta su erradicación (Swarupa, 2013).

Hasta la actualidad se han descubierto 4 tipos de razas patógenas de *Foc*. De estas las que son de gran preocupación internacional son la raza 1 que afectó cerca de 100000 hectáreas de banano “Gros Michel” con una pérdida estimada de 2 mil millones de dólares y la raza 4 (*Foc* R4T) que ha ocasionado actualmente pérdidas de más de \$ 388 millones para los países de Indonesia, Taiwán y Malasia, pero se espera que esta cifra ascienda en otros países productores de Cavendish, como China y Filipinas (Bragard, 2021). Desde el 2018 Ecuador es el mayor exportador de banano Cavendish llegando a exportar hasta 6.4 millones de toneladas, por lo que se han propuesto diversas medidas fitosanitarias para evitar la entrada de *Foc* R4T al Ecuador.

Justificación del problema

La primera vez que se evidenció daños en plantaciones de banano por *Fusarium* fue en 1900, afectando principalmente la variedad Gros Michel en América Central que en esa época era responsable de la exportación de banano hacia todo el mundo (Reboucas, 2021). Tras verse afectadas las plantaciones de esta variedad, su producción se eliminó o se tornó más difícil mantenerla, por lo que la industria bananera buscó una nueva variedad que sea inmune a *Foc* raza 1, encontrando esta característica en cultivares de Cavendish y llegando así a ser reemplazadas (Ploetz, 2015).

Durante la década de 1980 se evidenció una nueva raza de *Fusarium* patógeno que afectaba a los cultivares de Cavendish llegando a extenderse rápidamente por Asia, África, Indonesia y América del Sur, que se la nombra raza 4 tropical (Reboucas, 2021). Esta difiere de las demás razas porque es capaz de afectar a una gama más amplia de cultivares de banano y por su capacidad de rápida propagación. En América del Sur ha llegado a propagarse en los países de Colombia y Perú que son fronterizos a Ecuador, por lo que ha alertado a varias empresas bananeras a tomar medidas sanitarias e implementar protocolos para la detección del hongo *Fusarium* ya que sus principales síntomas son el marchitamiento y el amarillamiento de las hojas lo cual puede confundir a los agricultores con hojas viejas, viéndose necesaria la implementación de técnicas de detección temprana de *Foc* R4T (Bragard, 2021).

La implementación de estas medidas de diagnóstico ayudaría a que se lleve un control continuo de las plantaciones de banano para que el agricultor pueda evidenciar rápidamente la presencia del hongo. Algunos países se han enfocado en técnicas de diagnóstico microbiológico, que incluye el aislamiento del patógeno de un cultivo puro y los estudios morfológicos consecuentes, presentando una gran desventaja por ser un proceso laborioso y lento. Por lo tanto, se ha optado por la utilización de pruebas moleculares más específicas y sensibles como la reacción de cadena de la polimerasa que proporciona un análisis rápido de resultados (Stakheev, 2011). AGROCALIDAD en su acuerdo ministerial N° 142 ha presentado protocolos de diagnóstico utilizando la PCR cuantitativa y la PCR en tiempo real,

por lo que durante este estudio se pretende estandarizar estos protocolos en los laboratorios de IDgen y de microbiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE” para mejorar la eficiencia de detección de *Foc R4T*.

Objetivos

Objetivo General

Estandarizar métodos de diagnóstico de fusariosis causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*-Raza 4 Tropical (*Foc R4T*) en plantas de banano

Objetivos Específicos

- Estandarizar un método de diagnóstico basado en PCR punto final para la detección temprana de fusariosis en plantaciones de banano.
- Estandarizar un método de diagnóstico basado en PCR cuantitativo para la detección temprana de fusariosis en plantaciones de banano.

Hipótesis

La PCR punto final y la PCR cuantitativa son métodos moleculares óptimos para la detección de *Foc R4T* a diferentes concentraciones de ADN

Capítulo II: Marco teórico

Producción mundial de Banano

La producción de banano en el mundo genera aproximadamente 44.000 millones de dólares al año en el mercado internacional, llegando a ser uno de los productos más importantes de exportación después del arroz, el maíz y el trigo (WU, 2019). Se conoce que actualmente se cultiva *Musa spp.* en más de 135 países de las regiones tropicales y subtropicales, generando una producción mundial de 153 millones de toneladas, pero solo el 15% de los cultivos corresponde al comercio internacional y el porcentaje restante es destinado al consumo local (Magdama, 2020).

Durante el 2020 la exportación mundial del banano alcanzó un récord de 22,2 millones de toneladas métricas que a comparación del 2019 este aumentó 1,7 %, generando un incremento de la oferta en Ecuador, Costa Rica y Colombia. En el 2021 las exportaciones mundiales dieron un giro sufriendo un descenso del 7%, en donde la disminución estimada de exportaciones para el Ecuador fue del 4% que representa aproximadamente a 6,8 millones de toneladas de banano, esto puede deberse a que la producción agrícola se ha visto afectada por el cambio climático o por la llegada de nuevas enfermedades (Veliz et al., 2022).

En la actualidad en el mundo se cultivan y se consume más de 1000 variedades de banano, de estos el más importante es el subgrupo Cavendish que representa el 47% de la producción total. Al año se produce alrededor de 50000 millones de toneladas de esta variedad ocupando gran parte del mercado europeo y estadounidense, esto se debe a que es más apropiada para el comercio internacional que otras variedades, por sus características y por ser más resistentes a los efectos de los viajes largos (Vaca et al., 2020).

Musa spp. al ser uno de los cultivos con mayor producción mundial ha generado beneficios importantes para los países exportadores más representativos, como es el caso del Ecuador donde su

banano llega a ocupar mercados muy exigentes en términos de calidad, cuyos estándares se lograron cumplir gracias a la utilización y al desarrollo de altos niveles tecnológicos de producción, transporte y distribución. Hasta la actualidad la exportación de banano en el Ecuador es considerado como un eje importante de la economía ecuatoriana, que ha llegado a generar empleo e ingresos e impulsando indirectamente el crecimiento de otras actividades productivas (Vaca et al., 2020).

En Ecuador las exportaciones de banano y petróleo ocupan los primeros lugares en la generación de divisas para el país. Actualmente la exportación de banano aporta el 2% del PIB total y el 35% del PIB agrícola (Vaca et al., 2020). Los cultivares de banano se encuentran mayormente en el Guayas, Los Ríos y el Oro, las mismas que abarcan el 41%, 34% y 16% de los productores, respectivamente; lo que representa un 92% de la producción nacional de banano en estas provincias. Pero, durante las últimas estimaciones se ha visto que, en la provincia de El Oro, en donde hay una mayor presencia de pequeños productores ha ido perdiendo peso. En el país el 78% de los productores de banano del país son de pequeñas empresas, y al sumar con las empresas medianas se alcanza un 95,6%, por lo que representa un papel importante en el ámbito de la economía familiar y la Economía Popular y Solidaria (EPS), llegando a generar fuentes estables y transitorias de trabajo, reduciendo la pobreza rural (Macaroff, 2022).

Marchitez por *Fusarium*

Marchitez por *Fusarium* o también conocido como mal de Panamá es una de las enfermedades más destructivas que ha causado diversas limitaciones para la producción de banano, tanto para la exportación como para los mercados nacionales. Esta enfermedad es causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, quien fue el causante de la desaparición de Gros Michel a mediados del siglo XX (Magdama, 2020). Se cree que este agente pudo haber surgido en el sudeste asiático y en Australia llegando a extenderse rápidamente en África Occidental, el Caribe y América Tropical, provocando la extinción de aproximadamente 40000 hectáreas de Gros Michel, posterior a este suceso surgió la

transición de esta variedad al subgrupo Cavendish, que en la actualidad es la variedad más cultivada en el mundo (Ismaila et al., 2023).

Esta enfermedad es considerada como una de las más destructivas que afectan a los cultivos de banano, por su rápida dispersión y por su tiempo de permanencia en el suelo, debido a que este hongo produce estructuras de resistencia llamadas clamidosporas, que permiten su supervivencia en el suelo durante un largo tiempo. El hongo llega a infectar primero a las raíces del banano y coloniza el sistema vascular de la planta, dificultando el transporte de agua y nutrientes a las partes aéreas, por lo que sus principales síntomas externos son el amarillamiento y marchitamiento de las hojas más viejas y luego de las más jóvenes, mientras que sus internos son la decoloración, oscurecimiento y necrosis (Reboucas, 2021).

Foc se ha dividido en 4 razas basándose en el nivel de patogenicidad hacia diferentes cultivos de banano. *Foc1* está presente en los cultivos de todo el mundo y es patógena para Gros Michel (AAA), Fenjiao (ABB), Longyajiao (AAB) y Silk (AAB), fue la causante de grandes pérdidas del mercado mundial bananero. *Foc2* se evidenció principalmente en América Central infectando a la variedad Chato (ABB), Bluggoe (ABB) y a otros cultivares estrechamente relacionados. *Foc3* causa la enfermedad solo en *Heliconia* spp. y *Foc4* que tiene la capacidad de dañar a casi todos los cultivares de banano. Actualmente debido a su rápida propagación ya se encuentra en Australia, África, Sudamérica y partes de Asia. A *Foc4* se le ha subdividido en función a su presencia en diferentes regiones en raza subtropical 4 (SR4) y raza tropical 4 (R4T), de la cuales R4T presenta un fuerte efecto patógeno en los cultivares Cavendish (AAA), lo que le convierte en la amenaza más grave para la producción mundial de banano (WU, 2019).

Morfología y anatomía del hongo *Fusarium*

El hongo *Fusarium* es un complejo de especies fúngicas anamórficas, filamentosas y morfológicamente indiferenciadas que son saprófitos, antagonistas y patógenos no solo de plantas

también de animales y humanos. *Foc* produce macroconidias, microconidias en los esporoquios y clamidosporas que se forman abundantemente en hifas o conidios y son los que se encargan de su reproducción y dispersión (Pérez & Dita, 2014). Las clamidosporas son las responsables de que el hongo sea resistente a la desecación, sea resiliente en condiciones ambientales desfavorables y pueda sobrevivir en el suelo por más de 20 años, incluso estas siguen produciéndose constantemente una vez invadido el huésped o también puede permanecer como parásito de malezas (Dita et al., 2018).

En cuanto a su reproducción se conoce que *F. oxysporum* f. sp. *cubense* no tiene un ciclo sexual conocido debido a un desequilibrio gamético, por lo que se cree que se reproduce de manera clonal, aunque no se ha podido corroborar que estrictamente se reproducen de manera (Ploetz, 2015). Hasta la actualidad se conoce que *Foc* tiene un estado reproductivo asexual (anamorfo), y sin estado sexual (teleomorfo), aunque en algunos aislamientos se ha demostrado la presencia de genes idiomórficos *Mat 1* y *Mat 2*, por lo que se cree que la especie en algún momento de la historia evolutiva pudo tener una reproducción sexual.

Métodos de diagnóstico

Al ser *Fusarium* un hongo patógeno altamente reproducible y causante de pérdidas de cultivos de banano es indispensable que existan diversas estrategias de control para evitar su propagación. Hasta la fecha se han implementado algunas medidas fitosanitarias adecuadas y protocolos de detección temprana del patógeno en las plantas, suelo y agua (Thangavelu et al., 2022).

El método tradicional de identificación de *Foc* se basa en la sintomatología, la morfología del cultivo y de los caracteres del micelio y las esporas, para el estudio de su morfología se ha utilizado principalmente medios de cultivo como PDA (Papa Dextrosa Agar), medio Komada y medio de cultivo SNA (Agar Spezieller Nährstoffarmer), los cuales conllevan a un tiempo de detección mucho más largo. Por lo que se ha recurrido al desarrollo de técnicas moleculares que son fundamentales para una

detección temprana. De las cuales la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es de las más efectivas y rápidas, como es la PCR convencional, PCR cuantitativa (qPCR), amplificación isotérmica mediada por bucle fluorescente en tiempo real (LAMP), y la más reciente técnica que es la secuenciación de matrices de diversidad (DArTseq) que incorpora una tecnología de genotipado (Thangavelu et al., 2022).

Estos métodos se basan principalmente en genes y regiones genómicas centrales que se describirán a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1.

Pruebas moleculares para el diagnóstico de Foc R4T

Técnica	Autor	Secuencias	Región objetivo	Fragmentos esperados (pb)
PCR tiempo real	Aguayo et al., 2017	FWB-TR4 F 5'-CGGTCTCGGCCAAATCTGATT-3'	Gen hipotético (W2987)	180 pb
		FWB-TR4 R 5'-ACGACTTATCTAGCGGTTGATGTG-3'		
PCR convencional	Dita et al., 2010	Foc TR4-F 5'-CACGTTTAAGGTGCCATGAGAG-3'	Inter-genic Spacer (IGS) and Internal Transcribed Spacer (ITS) del operon ribosomal	463 pb
		Foc TR4-R 5'-GCCAGGACTGCCTCGTG A-3'		
PCR convencional	Li et al., 2013	W2987-F 5'-TGCCGAGAACCACTGACAA-3'	Gen hipotético	452 pb
		W2987-R 5'-GCCGATGTCTTCGTCAGGTA-3'		
PCR-RFLP	Carvalhais et al., 2019	SIX1a_266_F GTGACCAGAACTTGCCACA	Gen SIX 1a	266
		SIX1a_266_R CTTTGATAAGCACCATCAA		
		Cebador interno directo FIP 5'-ATTCAAGCCGGATTGACGGAT TGGATATGTAGAGAATGTG GTG G-3'		

Técnica	Autor		Secuencias	Región objetivo	Fragmentos esperados (pb)
LAMP	Zhang et al., 2013	Cebador interno	5'- CCAGAGTCGGGTCTAGG GTAG -AGGCGATTGAAGTTG	Región Intergénica Espaciadora (IGS)	N.A
		inverso BIP	ACTAC-3'		
		Cebador externo	FocTR4-F: 5'- CACGTTTAAGGTGCCATG AGA G; FocTR4-R: 5'- CGCACGCCAGGACTGCCTCGT GA -3'		

PCR punto final

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es el método más utilizado para la amplificación del ADN, tanto como técnica analítica como de diagnóstico, debido a que genera rápidamente un gran número de copias de la secuencia de ADN diana. El perfeccionamiento de esta técnica ha permitido la detección de fragmentos de ADN en muestras en las que la cantidad o la calidad de ADN sean demasiado bajas para poder utilizar otro tipo de análisis molecular, siendo posible la detección de muestras de ADN que se han llegado a degradar por envejecimiento o un mal tratamiento de procesamiento (Marmiroli & Maestri, 2007).

La técnica de PCR aprovecha el mecanismo de replicación in vivo del ADN para replicar un fragmento específico. Los componentes necesarios para la PCR son los cebadores que consisten en dos oligonucleótidos sintéticos, con extremos de fragmento diana complementarios, la ADN polimerasa y los desoxirribonucleótidos (Marmiroli & Maestri, 2007). El procedimiento de esta técnica consiste en 3 pasos: desnaturalización, ciclos de hibridación y extensión o elongación final.

Este método molecular ha permitido la detección rápida de patógenos como *Fusarium*. A comparación de los métodos convencionales, La PCR nos ofrece una alta sensibilidad y especificidad de

detección, lo que le hace más confiable y rápida. También nos sirve como una herramienta para el monitoreo de *Foc* en el tejido vegetal (Chang et al., 2022).

PCR cuantitativa

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) o también conocida como PCR en tiempo real, es una técnica basada en la PCR convencional que es utilizada para amplificar y cuantificar simultáneamente un ADN diana. Esta a diferencia de la PCR convencional que se basa en el análisis en el punto final del amplicón, nos permite la cuantificación del producto a medida que el proceso tiene lugar en tiempo real, llevando la cuantificación y el análisis de la PCR durante la amplificación (Singh & Roy-Chowdhuri, 2016).

Para la reacción de qPCR la concentración inicial de molde es la que suele determinar el número de ciclos necesarios antes de que aumente la fluorescencia. La amplificación por qPCR se divide en tres fases la primera es la exponencial inicial la cual no es observable, ya que las concentraciones están por debajo del límite de detección, después sigue una fase de crecimiento y finalmente una fase de meseta. Las ventajas de esta técnica es la excelente sensibilidad, con un gran rango dinámico de precisión 5-10%, mientras que la especificidad va a depender de la calidad de PCR y del método de detección (Singh & Roy-Chowdhuri, 2016).

Esta técnica funciona durante la amplificación con cebadores de oligonucleótidos específicos a la diana, con una sonda de oligonucleótidos fluorogénicos con un agente informador y extintor que están unidos, y que se hibridan con el producto amplificado entre los amplímeros. Esta reacción utiliza la actividad exonucleasa 5' de la ADN polimerasa para escindir el colorante informador de la sonda y así de como resultados una mayor fluorescencia cuando el objetivo este presente (Lovatt, 2002). Los fluoróforos que se utilizan para la amplificación del ADN durante la qPCR pueden ser de dos tipos:

Fluoróforos con afinidad por el ADN

Estos fluoróforos tienen la capacidad de emitir fluorescencia al momento en que se unen al ADN. Por ejemplo, el SYBR Green tiene la capacidad de unirse al surco menor del ADN, entonces mientras más ADN haya en el tubo de reacción, la unión al ADN será mayor, al igual que la señal de fluorescencia, por lo que el uso de este fluoróforo presenta una gran desventaja debido a que la señal emitida no va a ser específica, ya que este agente se va a unir a cualquier amplicón del ADN (Aguilera et al., 2014).

Sondas específicas para fragmentos del ADN

Son sistemas de detección específicos y se dividen en tres tipos: sondas de hidrólisis, sondas de hibridación y sondas de horquillas. Todas estas consisten en la transferencia de energía entre dos fluoróforos: un donador y un aceptor, los cuales emiten fluorescencia a diferente longitud de onda (Aguilera et al., 2014).

Estas sondas permiten cuantificar con precisión la cantidad de ADN o ARN extraído de una amplia variedad de muestras por ejemplo de tejidos animales, productos finales, banco de células, resultados de cromatografía o muestras vegetales. En los últimos años la qPCR se ha convertido en una valiosa herramienta molecular para cuantificar organismos de muestras ambientales directamente a partir de extractos de ADN ya sea de tejido vegetal o del propio organismo (Prévost et al., 2011).

La técnica de qPCR ha brindado grandes beneficios para las empresas dedicadas a la producción de alimentos, proporcionando grandes ventajas para la detección y cuantificación de ADN de hongos u otros microorganismos. La técnica de PCR en tiempo real ha sido descrita para la identificación de varias especies de *Fusarium*, incluyendo *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* y *F. poae*, siendo de gran interés para la identificación temprana del hongo *Fusarium* y así poder llevar un control fitosanitario (Russell, 2006).

Se han desarrollado numerosos protocolos para la detección y cuantificación de *Fusarium* en material vegetal y muestras de suelo, siendo una técnica precisa y eficaz para la detección de este patógeno aún en plantas que no presentan síntomas de la infección (Russell, 2006).

Capítulo III: Metodología

Muestras de ADN

Se utilizó una alícuota de ADN de tejido vegetal positivo para *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4 obtenida de la estación experimental tropical Pichilingue con una concentración de 5 ng/ μ L. También se utilizó una alícuota de ADN del hongo *Foc* R4T obtenida del laboratorio de diagnóstico molecular IDgen con una concentración 100 ng/ μ L. Para la estandarización de los protocolos de PCR se realizó dos tratamientos, en el primer tratamiento se realizó diluciones seriadas del ADN fúngico para alcanzar concentraciones de 50, 25, 12.5 y 6.25 ng/ μ L. En el segundo tratamiento se mezcló al ADN de tejido vegetal con ADN de banano del subgrupo Cavendish obtenido del laboratorio de IDgen y se realizó lo mismo con el ADN fúngico, al igual que el anterior tratamiento se realizó diluciones para alcanzar las mismas concentraciones.

Cuantificación del ADN

La cuantificación de las muestras de ADN obtenidas a partir de los dos tratamientos se realizó mediante espectrofotometría, para esto se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop 2000 de la marca Thermo Scientific.

Se blanqueó el espectrofotómetro utilizando agua libre de nucleasas y posterior a esto se realizó la medición de cada una de las muestras de ADN en las unidades de (ng/ μ L) y también se evaluó la calidad de estas mediante las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230.

PCR punto final

Se realizó el Master Mix de la PCR con los componentes descritos en la Tabla 2, el total de muestras a amplificar fue de 6 por cada tratamiento, por lo que la cantidad de cada uno de los componentes de la PCR se ajustó para un volumen total 72 μ L. Posteriormente se dispersó 12 μ L del

Master Mix en tubos de PCR de 0,2 mL, finalmente se colocó 1 µL de ADN en cada uno de los tubos y los negativos que para el primer ensayo fue agua y para el segundo ensayo ADN de banano.

Tabla 2.

Reactivos de la PCR punto final

Reactivo	Volumen µL (1x)	Volumen µL (6x)
BlasTaq™ 2X PCR MasterMix	6,25	37,5
Foc-TR4 F	0,5	3
Foc-TR4 R	0,5	3
Agua libre de nucleasas	4,75	28,5
ADN	1	-
Total	13	72

Amplificación por PCR punto final

Se obtuvo los amplicones de interés mediante la reacción en cadena de la polimerasa, utilizando los cebadores propuestos por Dita et al., 2010 que son Foc-TR4 F: 5'-CACGTTTAAGGTGCCATG AGAG-3', Foc-TR4 R: 5'-GCCAGGACTGCCTCGTGA-3' que generan amplicones de 463 pb, a las condiciones de termociclador indicadas en la Tabla 2.

Tabla 3.

Programación del termociclador para los cebadores de Dita et al., 2010

Región Blanco	Desnaturalizac ión inicial		Desnaturalizaci ón		Annealing		Extensión		Extensión final	
	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)
IGS e ITS	95	3 :00	95	0:15	64	0:15	72	0:15	72	0:30

Nota: Estandarizado internamente en el Laboratorio IDgen de Dita et al., 2010

Al finalizar, los productos de PCR se corrieron durante 30 min a 300 V en un gel de agarosa ultrapura al 1% en buffer TBE 1X, con el colorante bromuro de etidio, que nos permitió interpretar los resultados.

PCR cuantitativa

Se realizó el Master Mix de la qPCR con los componentes descritos en la Tabla 4. Para cada ensayo se realizó un duplicado para cada muestra. Para la normalización del volumen por errores de pipeteo se aumentó el 10% de cada uno de los componentes dando un volumen total de 229,9 μ L. A la mezcla se añade el colorante de referencia ROX que es utilizado para el control de carga y la normalización del volumen, por 50 μ L de volumen total se añade 1 μ L de ROX, para el total de la muestra se añadió 4,6 μ L, dándonos un total de 234,5 μ L. Finalmente se dispersó 21,3 μ L del MasterMix en tubos de PCR de 0,2 mL y se añadió 1 μ L de ADN a cada uno de los tubos.

Tabla 4.

Reactivos de la PCR cuantitativa

Reactivo	Volumen μ L (1x)	Volumen μ L (11x)	Volumen μ L (10%)
Probe 2x qPCR MasterMix	10	110	121
FWB-TR4 F	0,8	8,8	9,68
FWB-TR4 R	0,8	8,8	9,68
Sonda FWB-TR4	0,4	4,4	4,84
Agua libre de nucleasas	7	77	84,7
ADN	1	-	-
Total	20	242,2	229,9

Amplificación por PCR cuantitativa

Los amplicones de interés se obtuvieron mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, utilizando los cebadores propuestos por Aguayo et al., 2017 que son FWB-TR4 F: 5'-CGGTCTCGGCCAAATCTGATT-3', FWB-TR4 R: 5'-ACGACTTATCTAGCGGTTGATGTG-3' que generan amplicones de 180 pb, a las condiciones de termociclador indicadas en la Tabla 5.

Tabla 5.

Programación del termociclador para los cebadores de Aguayo et al., 2017

Región Blanco	Desnaturalizac ión inicial		Desnaturalizaci ón		Annealing		Extensión	
	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)
Gen hipotético (W2987)	95	5 :00	95	0:15	60	0:20	72	0:30

Determinación de la eficiencia de la prueba

La eficiencia de la prueba se determinó realizando la curva estándar a partir de los valores Ct obtenidos de los duplicados frente al logaritmo de la concentración de las muestras. A partir de la ecuación obtenida de la linealización se calcula la eficiencia de la reacción con la Ecuación 1.

$$Eficiencia = (10^{-1/k} - 1) \times 100\% \quad (1)$$

Donde:

k: es la pendiente de la ecuación

Capítulo IV: Resultados

Concentraciones de ADN

En la Tabla 6 se observa las concentraciones de las diluciones seriadas que se realizó para cada ensayo y las relaciones 260/280 y 260/230, las cuales representa la medida de pureza del ADN. La relación 260/280 para los dos ensayos da un promedio 1,56 que es menor al límite aceptable para poder tener muestras de ADN con una pureza óptima. Mientras que los promedios de la relación 260/230 del primer y segundo ensayo fueron de 1,19 y 1,15 respectivamente, los cuáles se encuentran debajo del rango aceptable. Esto puede deberse a que al momento de diluir el ADN se contamina con diversas sustancias o también pudo verse afectado por la calidad del ADN de banano que se utilizó.

Tabla 6.

Concentración y pureza de las muestras de ADN obtenidas a partir de las diluciones

Muestra de ADN	Concentración (ng/μL)	260/280	260/230
ADN de <i>Foc</i> R4T	100	1,94	1,53
FOC_D1	50,7	1,93	1,26
FOC_D2	25,4	1,76	1,15
FOC_D3	12,5	1,37	1,16
FOC_D4	6,4	1,33	1,17
FOC_P	5	1,42	1,23
ADN de <i>Foc</i> R4T+ ADN banano	216,2	1,88	1,7
FOC_B1	50,3	1,51	1,54
FOC_B2	25,2	1,88	1,50
FOC_B3	12,2	1,62	1,26
FOC_B4	6.1	1,35	0.98
ADN de tejido vegetal + ADN de banano	186	1,88	0,54
FOCP_B5	5.3	1,48	0,49

PCR punto final

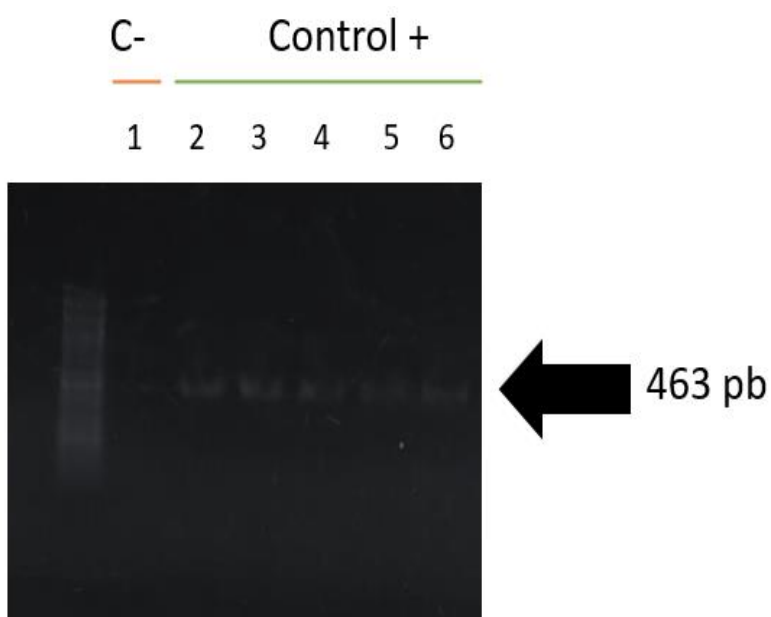
La PCR convencional se utilizó para calcular el límite de detección (LOD) de *Foc R4T* a diferentes concentraciones de ADN. El límite de detección es la mínima cantidad de concentración de ADN que pudo ser detectada en los diferentes ensayos. En el Acuerdo Ministerial N° 142 de Agrocalidad no se especifica cuál es el LOD, pero durante este trabajo se pudo determinar

Primer ensayo

Se visualizó el producto de la PCR mediante una electroforesis. Para saber su tamaño se utilizó el marcador molecular de Opti DNA Marker 100 pb. Como se puede observar en la Figura 1. el primer pocillo que corresponde al control negativo no se observa ninguna banda, mientras que en los pocillos del 2 al 6 que corresponde a los controles positivos a diferentes concentraciones se observa la presencia de bandas. La banda del pocillo 5 correspondiente a la muestra FOC_D4 no es muy clara, esto puede deberse a diversos factores que influyen durante la realización de la PCR.

Figura 1.

Amplificación de PCR punto final para el primer ensayo

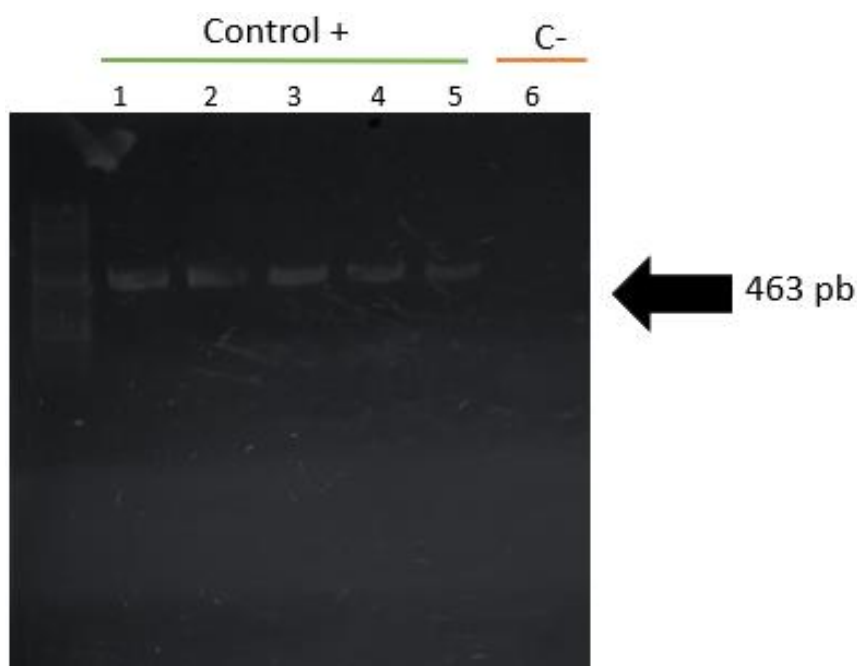


Segundo ensayo

En la Figura 2. Se puede observar 5 bandas bien marcadas de un tamaño aproximado a 463 pb correspondientes a las diluciones de la mezcla del ADN fúngico con la de banano del subgrupo Canvendish. En el sexto pocillo se encuentra el control negativo, que es el resultado de la amplificación del ADN de banano, el cuál no muestra la presencia de bandas; lo que nos ayuda a confirmar la especificidad de los primers Foc-TR4 F/R para unirse solamente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 4 tropical y no a otro sitio del genoma del banano.

Figura 2.

Amplificación de PCR punto final del segundo ensayo



PCR cuantitativa

Primer ensayo

En el Acuerdo Ministerial N° 142 de Agrocalidad nos dice que las muestras se consideran positivas si presentan una curva de forma sigmoidea y valores de Ct \leq 35. Mientras que el control

negativo no debe presentar amplificación y su Ct debe ser igual a cero. Como se observa en la Figura 3 la amplificación de las muestras presenta curvas de forma sigmoidea con valores de $Ct \leq 35$ los cuáles fueron enlistados en la Tabla 7 donde NTC es la muestra de control negativo. A partir de estos datos se graficó la curva estándar mostrada en la Figura 4. Donde se obtuvo una pendiente (k) de -3.2979. Por lo tanto, al reemplazar este dato en la Ecuación 1. la eficiencia del primer ensayo de qPCR es del 100%

Figura 3.

Amplificación de PCR cuantitativa con sonda TaqMan. Ensayo de estandarización a concentraciones variadas de ADN

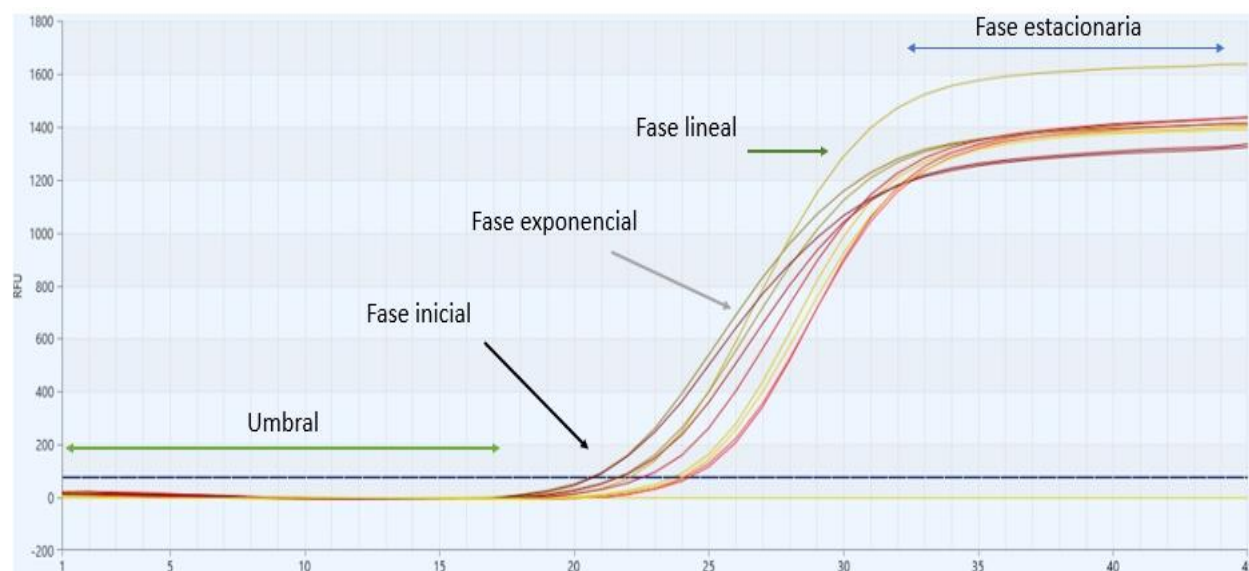


Tabla 7.

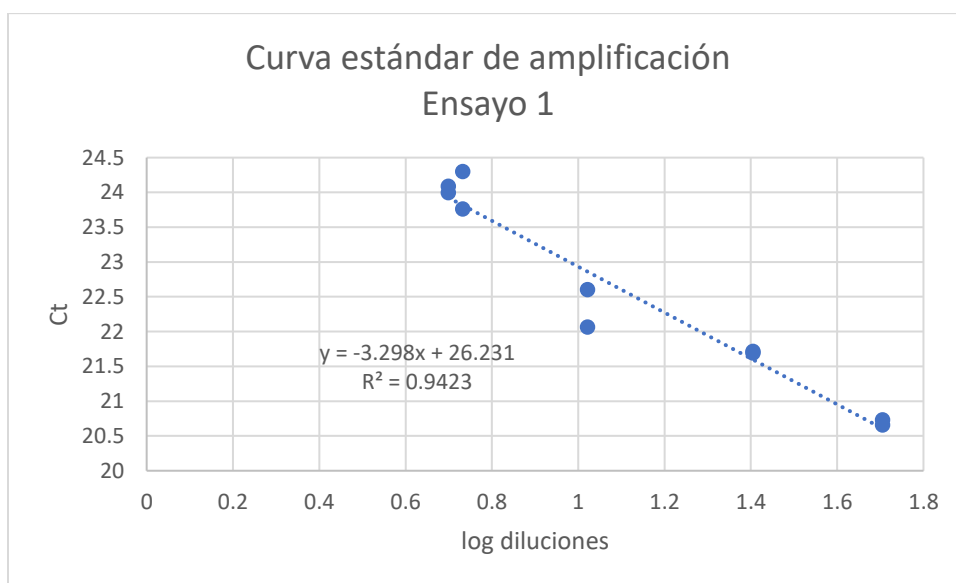
Valores Ct de las diferentes muestras de ADN por duplicado

Muestra	Ct	Ct del duplicado
FOC_D1 (50,7)	20.73	20.66
FOC_D2 (25,4)	21.69	21.71

Muestra	Ct	Ct del duplicado
FOC_D3 (12,5)	22.60	22.06
FOC_D4 (6,4)	24.30	23.76
FOC_P (5)	24.09	23.99
NTC	N/A	-

Figura 4.

Curva estándar de qPCR construida con diferentes diluciones del ADN de Foc R4T



Segundo ensayo

La prueba de qPCR utilizando una mezcla de ADN de banano con ADN fúngico nos muestra diferentes curvas de forma sigmoidea, que es la principal característica de la presencia de *Foc R4T* y también $Ct \leq 35$. Como se observa en la Figura 5, la amplificación de las muestras presenta curvas de forma sigmoidea con valores de $Ct \leq 35$ los cuáles fueron enlistados en la Tabla 8, donde NTC es la muestra de control negativo que tiene ADN de banano esto con la finalidad de comprobar que no exista

falsos positivos y conocer la especificidad de los cebadores para unirse solamente a *Foc R4T*. Como se observa en la Tabla 8. el control negativo presenta datos de amplificación, esto puede deberse a diversos factores como contaminación o de la especificidad de los cebadores. A partir de los datos obtenidos se graficó la curva estándar mostrada en la Figura 6. Donde se obtuvo una pendiente (k) de -1.9885. Por lo tanto, al reemplazar este dato en la Ecuación 1. la eficiencia del segundo ensayo de qPCR es mayor al 100%

Figura 5.

Amplificación de PCR cuantitativa con sonda TaqMan. Ensayo de estandarización a concentraciones variadas de la mezcla de ADN fúngico y de banano

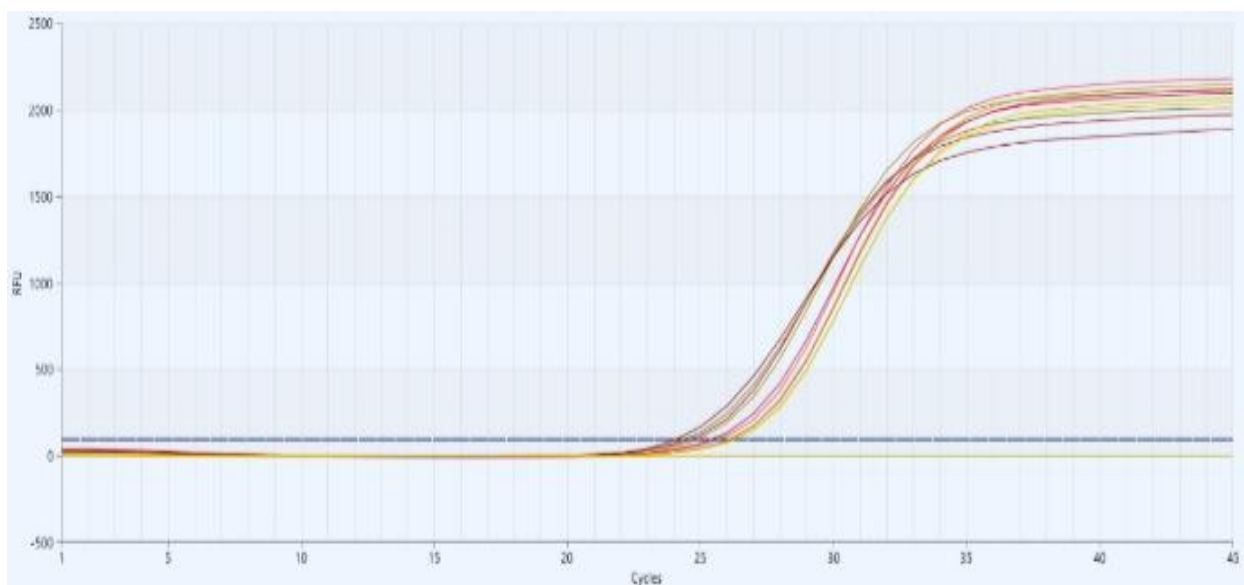


Tabla 8.

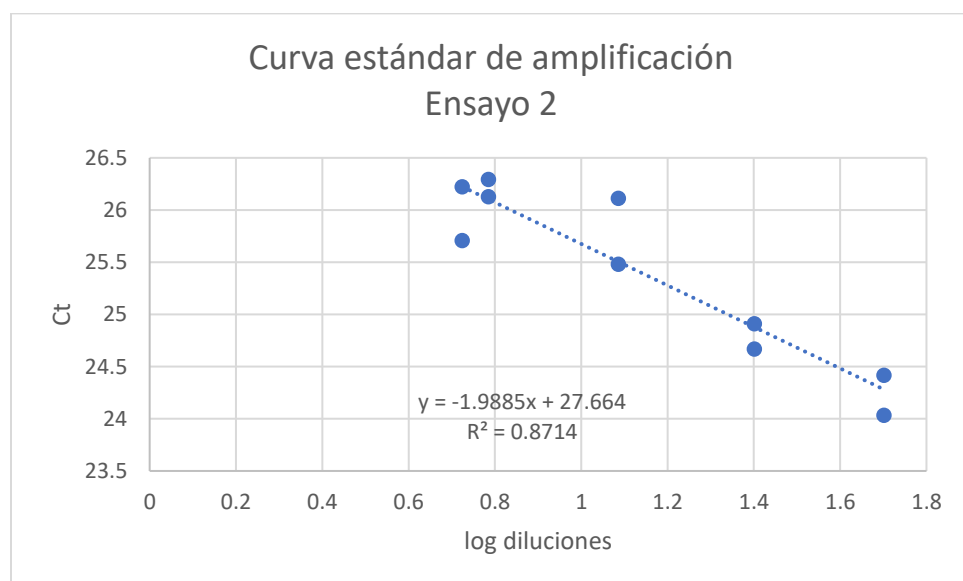
Valores Ct de las muestras de ADN que se mezcló con ADN de banano por duplicado

Muestra	Ct	Ct del duplicado
FOCP_B5 (5,3)	25.70	26.22
FOC_B1 (50,3)	24.03	24.41

Muestra	Ct	Ct del duplicado
FOC_B2 (25,2)	24.66	24.91
FOC_B3 (12.2)	25.48	26.11
FOC_B4 (6.1)	26.12	26.29
NTC	27.70	28.05

Figura 6.

Curva estándar de qPCR construida con la mezcla del ADN de Foc R4T y de banano



Capítulo V: Discusión

La mayor parte de cultivos de banano es del subgrupo Cavendish el cual representa un 40% total de producción de banano en el mundo. Estos cultivos se han visto afectados por el hongo *Foc* R4T, que representa un grave riesgo para la seguridad alimentaria y para el nivel económico de países que se dedican a la exportación de banano (Aguayo et al., 2017). Por ejemplo, se conoce que en el Ecuador la exportación bananera representa el 2% del PIB general, siendo el eje central para la actividad económica, brindando mayores ingresos y proporcionando un mayor número de fuentes de trabajo (Ministerio de comercio exterior, 2017). Por lo que la llegada de *Foc* al país provocaría un declive para la economía.

Debido a que *Foc* es un patógeno que tiene la capacidad de llegar a propagarse rápidamente, su tiempo de permanencia es de hasta 30 años y es difícil de prevenir (Ploetz, 2015). La Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y los centros de investigación han solicitado a los países establecer medidas en contra de *Foc* R4T, principalmente a los países que aún no se han visto afectados por la llegada de esta enfermedad (Aguayo et al., 2017). Como medidas de prevención se han desarrollado métodos de detección rápidos y confiables para confirmar la presencia de este patógeno y así poder actuar rápidamente contra su erradicación.

En Ecuador el Ministerio de Agricultura y Ganadería ha presentado un plan de contingencia para la prevención, detección y control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Raza 4 tropical, donde da a conocer medidas fitosanitarias y protocolos de diagnóstico que ayuden al manejo de esta enfermedad. Para la identificación de esta plaga el acuerdo presenta protocolos de diagnóstico mediante PCR convencional y PCR en tiempo real. Durante este estudio se estandarizó los protocolos de Aguayo et al., 2017 y de Dita et al., 2010.

Dita et al., 2010 diseñó un conjunto de cebadores FocTR4-F/FocTR4-R para la detección específica de R4T, que genera un fragmento de 463 pares de bases (pb). Las condiciones de amplificación descritas por el autor fueron de 95°C durante 5 minutos y 30 ciclos de 95°C por 1 min, 60 °C por 1min y 72°C por 1 min, seguido de un tiempo de extensión final de 10 min a 72 °C. A partir de esta programación se realizó el primer ensayo que consistió en la amplificación de ADN del micelio del hongo diluido a diferentes concentraciones, siendo la concentración más baja 5 ng/μl. Para visualizar el producto de la PCR se corrió una electroforesis en gel de agarosa, donde se cargó cada una de las muestras y también un marcador molecular el cual nos ayudó a saber el tamaño de nuestro amplicón. Al visualizar el producto de la electroforesis no se logró observar bandas (*Ver apéndice 1*), esto puede deberse a numerosos factores que hicieron que la reacción no sea realmente específica o que su eficiencia no sea la adecuada. Entre los factores que pueden influir en el resultado de la PCR es el diseño de los cebadores, la calidad y la concentración de ADN, la cantidad de ADN polimerasa y el programa de amplificación (Méndez & Pérez, 2004).

Como sabemos la PCR es una técnica de síntesis de ADN in vitro que utiliza una enzima Taq ADN polimerasa para poder amplificar un segmento de ADN a una velocidad exponencial, por lo que la temperatura y el tiempo de extensión deben ser las óptimas para que la polimerasa se pueda unir al complejo híbrido cebador-ADN y se pueda ensamblar una nueva cadena (Jalali et al., 2017). Durante este estudio se utilizó un ADN polimerasa BlasTaq que tiene tasas de extensión rápidas por lo que, al seguir los tiempos de programación del protocolo presentado por Agrocalidad, provocó que no se logren observar la presencia de bandas. A partir de este análisis se redujeron los tiempos de amplificación en relación con el protocolo diseñado para este tipo de polimerasa, lo que redujo significativamente el tiempo final de amplificación siendo beneficioso para la obtención de resultados en un menor tiempo.

Al realizar nuevamente la amplificación de las muestras del primer ensayo con la programación que se muestra en la Tabla 3. Se logró observar finalmente la presencia de bandas de 463 pb como se

muestra en la *Figura 1*. Las bandas que se encuentran en los pocillos 5 y 6 corresponden a las concentraciones de 5,4 y 5 ng/ μ l respectivamente, estas a diferencia de las demás bandas no se encuentran muy marcadas, por lo que para mejorar la eficiencia se realizó la amplificación de estas muestras aumentando la temperatura de annealing en una escala de 2°C a un rango de 60 -66 °C, llegando a obtener mejores resultados a una temperatura de annealing de 64 °C (*Ver apéndice 2*).

En el segundo ensayo el ADN de *Foc* primero se diluyó en ADN de banano del subgrupo Cavendish, con la finalidad de conocer la eficacia de los cebadores propuestos por Dita et al, 2010 para la detección específica de R4T y así descartar que al usar estos cebadores puedan dar falsos positivos, por lo que en este ensayo se utilizó como control negativo el ADN de banano. A partir de esta primera disolución se llevó a las concentraciones descritas en la Tabla 6. y se siguió la programación descrita en la Tabla 3. Dándonos como resultado 5 bandas bien marcadas correspondientes a un fragmento de 463 pb y el negativo no presento banda como se observa en la Figura 2, esto nos confirma la especificidad de los cebadores FocTR4 al no unirse a ninguna región diferente a la de IGS del genoma del banano. Para comprobar la especificidad de los cebadores para unirse a *Foc* se analizó de manera *in silico* en primer blast (*Ver apéndice 3*).

Agrocalidad en su acuerdo ministerial para el diagnóstico de *Foc* R4T utiliza los cebadores y la sonda diseñada en Aguayo et al., 2017, donde se desarrolló una prueba de PCR en tiempo real específica para *fusarium*, donde propone un diseño experimental que ayuda a minimizar los recursos y el tiempo de respuesta para determinar la presencia de este hongo en plantas de banano. Los cebadores diseñados en esta investigación son los FWB-TR4 F/R al igual que la sonda, los cuales llegan a amplificar una región de 180 pb. Las condiciones de amplificación descritas en el acuerdo ministerial son 95 °C durante 10 min durante la desnaturalización inicial, seguido de 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 10 seg, 60 °C durante 40 seg y un tiempo de extensión de 10 seg a 40°C (AGROCALIDAD, 2020).

A diferencia del protocolo presentado por Aguayo que utiliza un ciclado de qPCR en dos pasos, Agrocalidad lo realiza en tres pasos.

Como se había mencionado anteriormente la extensión depende principalmente de la polimerasa que se este utilizando, en este estudio se empleó una Taq ADN polimerasa Hot Start la cuál necesita un tiempo y una temperatura de 30 seg y 72 °C para que esta pueda ensamblar las nuevas cadenas. Por lo que la programación utilizada durante la amplificación por qPCR para los diferentes ensayos es la descrita en la Tabla 5.

Para el análisis de resultados debemos tener en cuenta que la amplificación por la PCR se divide en cuatro fases que son la inicial, exponencial, lineal y la estacionaria. Esto es importante para conocer en cuál de estas comienza la amplificación. En la Figura 3 se observa que en la fase exponencial comienza a darse la amplificación, esto se debe a que aquí los reactivos de la reacción se encuentran de forma abundante y existe un incremento en la señal del fluoróforo reportero, incrementando el amplicón (Aguilera et al., 2014). En esta fase también se presentan las curvas de amplificación y el Ct (cycle threshold). El Ct equivale al número de ciclos necesarios para que cada curva alcance un umbral en la señal de fluorescencia y viene relacionado a la cantidad de ADN que se está evaluando, es decir mientras mayor sea la cantidad de ADN, menor es el número de ciclos (Aguilera et al., 2014).

En el Acuerdo Ministerial N° 142 de Agrocalidad nos dice que los resultados se aceptarán cuando el control positivo de *Foc* R4T presente una curva de amplificación de forma sigmoidea con valores de Ct ≤ 35 . Sin embargo, de acuerdo (SENASICA, 2022) dice que serán positivas las muestras que tengan Ct < 27 y curva de forma sigmoidea será considerados como positivos. A partir de estos enunciados y al análisis de los datos obtenidos de la qPCR del primer ensayo, que nos muestra un rango de Ct entre 20-24, se comprueba la presencia de *Foc* en las diferentes muestras. Además, para calcular la eficiencia del ensayo se realizó una curva estándar de amplificación con los Ct obtenidos y el logaritmo en base 10 de la

concentración de cada una de las muestras utilizadas. La pendiente de la curva estándar determina el porcentaje de eficiencia de la prueba. Por ejemplo, una pendiente de -3,32 indica el 100% de la eficiencia de la reacción de PCR, y al tener una pendiente más negativa que -3,32 nos da una eficiencia de reacción menor al 100%, mientras que si se obtiene una pendiente más positiva la eficiencia va a hacer mayor al 100% lo que nos indica que existe problemas (Pinilla et al., 2008)

Como se observa en la Figura 4 que corresponde a la curva de estandarización del primer ensayo, a partir de la regresión lineal nos da una pendiente de -3,29 por lo que al reemplazarla en la Ecuación 1 nos da un porcentaje de eficiencia del 101%, la cuál se encuentra dentro del rango de aceptación que es del 90-110% (Pinilla et al., 2008)

Los datos obtenidos a partir de la qPCR del segundo ensayo nos muestran la presencia de curvas sigmoides como se puede observar en la Figura 6., con valores de Ct que se encuentran dentro de los rangos de $Ct \leq 35$ o $Ct < 27$ como se observa en la Tabla 8, por lo que a simple vista se puede determinar que el ensayo 2 tiene un nivel de eficiencia del 100%. Para comprobar esta predicción calculamos la eficiencia de amplificación de la misma forma que en el ensayo anterior. En la Figura 6 se muestra la curva estándar del segundo ensayo y a partir de su regresión lineal nos dio una pendiente de -1,98 la cuál nos da un porcentaje de eficiencia del 200%. Esto puede deberse a muchos factores que llegan a influir en la eficiencia de la PCR como son la calidad de muestra, el rendimiento del Master Mix, los primers, la sonda, agentes inhibidores como la hemoglobina, heparina, entre otros (Pinilla et al., 2008).

Las calidades de las muestras de los ADN utilizados en el segundo ensayo se pueden observar en la Tabla 6 donde la relación 260/280 tiene una media de 1,56, el cual se encuentra fuera del rango de 1,8-2, por lo que al tener una relación menor a 1,8 nos indica la presencia de proteína u otros contaminantes (Mendoza et al., 2010). Mientras que la relación 260/230 de este ensayo tiene un promedio de 1,15 al ser menor de 1,5 nos indica la presencia de sales caotrópicas, fenoles o

carbohidratos (Márquez & Barrio, 2020). Esto puede deberse a que el ADN de banano utilizado tenía niveles bajos de pureza, lo que afectó la calidad de la muestra de ADN del hongo. Además de que a partir de esta primera mezcla se realizaron otras diluciones para llegar a las concentraciones deseadas, lo que provocó también la disminución de la calidad de las muestras de ADN, por lo que estas moléculas pudieron interferir al momento de la amplificación.

También hay que recalcar que al realizar este ensayo nos arrojó un valor de Ct 27,7 para el control negativo observar la Tabla 8, por lo que se usó la herramienta primer blast para conocer si los primers FWB-TR4 se unen únicamente a la región del gen hipotético (W2987) o también llegan a unirse a una región del genoma de banano (*Ver apéndice 4*). Aquí se observó que el porcentaje de afinidad de los primers para unirse a una región del genoma del banano era bajo (*Ver apéndice 4*). Como otra medida que se tomó para conocer porque el ADN de banano llegó a amplificarse se mandó a secuenciar el amplicón, dándonos como resultado secuencias crudas con porcentajes de calidad bajos del 0-0,9%, estas secuencias se ensamblaron (*Ver apéndice 5*) y posteriormente se llevó la secuencia al Blast para determinar que organismo posee una secuencia homóloga a la obtenida, pero no se obtuvieron resultados esto puede estar relacionado con la calidad de las secuencias crudas.

Capítulo VI: Conclusiones

El protocolo utilizado para la estandarización de la PCR punto final en los dos ensayos nos dio resultados favorables, en donde se observaron bandas definidas y del tamaño del fragmento a amplificar que es de 463 pb, además que el tiempo final de amplificación fue menor al expuesto por Agrocalidad. Por lo que se evidencia una especificidad del 100% y se podría utilizar para investigaciones futuras en la detección de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4.

Durante el primer ensayo se estandarizó la técnica de PCR cuantitativa (qPCR) empleando diferentes concentraciones de ADN de *Foc* R4T. Los resultados obtenidos a partir de la curva estándar de amplificación demostraron una especificidad del 100%, por tal motivo el protocolo desarrollado durante esta investigación puede ser utilizado para la detección de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4.

La PCR cuantitativa del segundo ensayo donde se empleó diferentes concentraciones de ADN de *Foc* R4T mezclado con ADN de banano, tuvo un porcentaje de eficiencia del 200%, además de que se llegó a amplificar el control negativo, por tal motivo se realizó la secuenciación del amplicón resultante con el ADN de banano para determinar a que parte del genoma de este se unen los cebadores FWB-TR4 F/R, por lo que al blastear la secuencia del ensamble tampoco se pudo conocer el factor que puede estar interviniendo en la eficiencia de la qPCR. Llegando a concluir que se necesitarían otros estudios para determinar los factores que pueden estar alterando la amplificación de la qPCR.

Capítulo VII: Recomendaciones

Se recomienda al momento de realizar las alícuotas de los cebadores, se utilicen puntas con filtro para así evitar la contaminación de estos con algún microorganismo exógeno.

Para realizar las diluciones y preparar las mezclas de reacción es recomendable realizarlo en la cámara de flujo laminar, con micropipetas calibradas y limpias para prevenir la contaminación de las muestras.

De igual manera para realizar las diluciones y preparar la mezcla de reacción se recomienda utilizar alícuotas de agua libre de nucleasas que no hayan sido preservadas durante mucho tiempo, para así evitar que la calidad de las diluciones de ADN no sea deficiente.

Es importante que al momento de preparar las muestras que serán llevadas a amplificar se incluya un negativo esto con la finalidad de descartar falsos positivos.

Se recomienda que antes de utilizar la sonda o colorante para la preparación del Master Mix de la qPCR se mantenga en un lugar oscuro debido a que son fotosensibles.

Capítulo VIII: Bibliografía

- AGROCALIDAD. (2020). Acuerdo Ministerial N° 142. *PLAN NACIONAL DE CONTINGENCIA PARA LA PREVENCIÓN, DETECCIÓN Y CONTROL DE Fusarium oxysporum f.sp. cubense Raza 4 Tropical (Foc R4T)*, (págs. 30-34). Quito.
- Aguayo, J., Mostert, D., Fourrier, C., Cerf-Wendling, I., Hostachy, B., Viljoen, A., & Loos, R. (2017). Desarrollo de un ensayo en tiempo real basado en sonda de hidrólisis para la detección de cepas tropicales de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense 4*. *PLOS ONE*.
- Aguilera, P., Ruiz, M., & Rocha, M. (2014). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. Instituto Nacional de Ecología.
- Aguilera, P., Ruiz, M., Rocha, M., Pineda, B., & Chánez, M. (2014). *PCR en tiempo real*. Instituto nacional de ecología.
- Bragard, P. B.-C. (2021). Pest categorisation of *Fusarium oxysporum f. sp. cubense Tropical Race 4*. *European Food Safety Authority*. doi://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7092
- Chang, T., Huang, L., Jua, Y., Bin, Z., Tsai, S., & Ling, Y. (2022). Rapid Detection of *Fusarium oxysporum* Using Insulated Isothermal PCR and a Rapid, Simple DNA Preparation Protocol. *Molecular Sciences*.
- Dita, M., Barquero, M., Diablos, D., Mizubuti, E., & Staver, C. (2018). *Fusarium wilt of Banana: Current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management*. *Frontiers in Plant Science*.
- Dita, M., Waalwijk, C., Buddenhagen, I., Souza, M., & Kema, G. (2010). Un diagnóstico molecular para la raza tropical 4 del patógeno de la marchitez por *Fusarium* del banano. *Patología de planta*.

- Fonseca, D., Mateus, H., & Contreras, N. (2010). *Prácticas de Laboratorio de Biología Molecular: su aplicación en genética básica*. Bogotá: 2010.
- Ismaila, A., Ahmad, K., Siddique, Y., Abdul, M., Bashir, A., Abdullahi, A., . . . Akmar, S. (2023). Fusarium wilt of banana; Current update and sustainable disease control using classical and essential oils approaches. *Horticultural Plant*.
- Lovatt, A. (2022). Applicationes of cuantitative PCR in the biosafety and genetic stability assessmente of biotechnology products. *Molecular Biotechnology*.
- Macaroff, S. H. (2022). ESTADO DEL BANANO EN ECUADOR: acumulación, desigualdad y derechos laborales. *Friedrich-Ebert-Stiftung (FES) Ecuador*. doi:<https://library.fes.de/pdf-files/bueros/quito/19562-20220927.pdf>
- Magdama, L. M.-M.-G. (2020). Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, the Fusarium Wilt Pathogen of Banana, in Ecuador. *Plants*. doi:[//doi.org/10.3390/plants9091133](https://doi.org/10.3390/plants9091133)
- Marmioli, N. &. (2007). Polymerase chain reaction (PCR). *Food Toxicants Analysis*. doi:[10.1016/b978-044452843-8/50007-9](https://doi.org/10.1016/b978-044452843-8/50007-9), 147-187.
- Márquez, M., & Barrio, P. (2020). *Genética Forense* . Argentina: Díaz de Santos.
- Méndez, S. P. (2004). La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
- Paterson, R. R. (2006). Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. *Process Biochemistry*. doi:[10.1016/j.procbio.2006.02.01](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.02.01), 1467-1474.

- Pérez, L., & Dita, M. (2014). Fusarium wilt of banana or Panama disease by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense: A review on History, symptoms, biology, epidemiology and management. *Food and Agriculture organization of the United Nations*, 6-23.
- Pinilla, B., Cubillos, K., & Rodríguez, M. (2008). Bodas de plata de la reacción en cadena de la polimeras (PCR). *Nova*, 101-212.
- Ploetz, R. (2007). La marchitez por *Fusarium* del plátano es causada por varios patógenos denominados *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *APS Publications*.
- Ploetz, R. (2015). Fusarium Wilt of Banana. *APS publications*. doi:doi.org/10.1094/PHYTO-04-15-0101-RVW
- Prévost, N., Christe, R., Dequiedt, S., Mougel, C., Lelievre, M., Jolivet, C., . . . Ranjar, L. (2011). Validation and application of a PCR primer set to quantify fungal communities in the soil environment by real-time quantitative PCR. *PLoS One*.
- Reboucas, A. d.-S. (2021). Pre-selection of banana somaclones resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, subtropical race 4. *Crop Protection*. doi:doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105692
- SENASICA. (2022). *Protocolo de diagnóstico: Fusarium oxysporum f. sp. cubense Raza 4 Tropical*. México: Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria.
- SIAMAK, S. Z. (2018). Control y resistencia al marchitamiento por *Fusarium* del banano (*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense), en el contexto del desarrollo de bananos resistentes al marchitamiento dentro de sistemas de producción sostenibles. *Horticultural Plant Journal*. doi:https://doi.org/10.1016/j.hpj.2018.08.001
- Singh, C., & Roy-Chowdhuri, S. (2016). Quantitative Real-Time PCR: Recent Advances. *Methods in Molecular Biology*. doi:10.1007/978-1-4939-3360-0_15, 161-176.

Stakheev, D. R. (2011). PCR detection of *Fusarium* fungi with similar profiles of the produced mycotoxins. *Food Control*. doi://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.028.

Swarupa, K. R. (2013). Characterization of tolerance to *Fusarium oxysporum* f.sp., cubense infection in banana using suppression subtractive hybridization and gene expression analysis. *Physiological and Molecular Plant Pathology*,. doi:https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2013.02.003.

Thangavelu, R., Edwinraj, E., Gopi, M., Pushpakanth, P., Sharmila, K., Prabakaran, M., . . . Uma, S. (2022). Developmente of PCR-Based Race-Specific Markers for Differentiation of Indian *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense, the Causal Agent of Fusarium Wilt in Banana. *Fungi*.

Vaca, E. &. (2020). Analysis of the chain of the banana industry of Ecuador and the European market. *Applied Studies in Agribusiness and Commerce*. doi:10.19041/APSTRACT/2020/1-2/7

Veliz, L. S. (2022). The Environmental Profile of Ecuadorian Export Banana: A Life Cycle Assessment. *Foods*. doi:doi.org/10.3390/foods11203288

Voorra, S. B. (2023). Banana prices and sustainability. *Global Market Report*.

WU, W.-z. C.-r.-z.-h. (2019). Isolation and identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense in Fujian Province, China. *Journal of Integrative Agriculture*. doi:doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62149-5

Apéndice