

**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS – ESPE
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 BIOTECNOLOGA**

**“Estandarización de métodos de diagnóstico de fusariosis causada por
Fusarium oxysporum f. sp. *cubense*-Raza 4 Tropical (Foc R4T) en plantas de
banano”**

Elaborado por
Mónica Alexandra Luna Lazo

Director del proyecto
Ph. D. Francisco Javier Flores Flor

29 de agosto del 2023

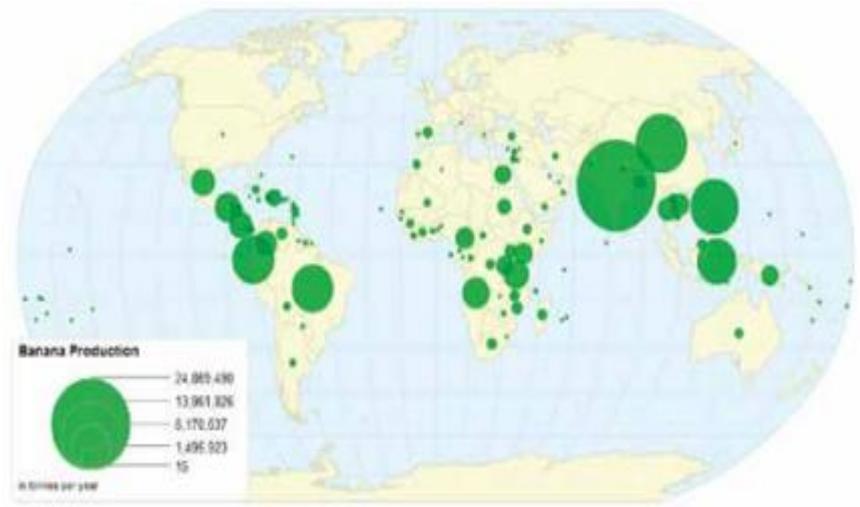


- INTRODUCCIÓN
- OBJETIVOS
- HIPÓTESIS
- METODOLOGÍA
- RESULTADOS Y DISCUSIÓN
- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES
- AGRADECIMIENTOS



Cultivo de banano (*Musa x paradisiaca*)

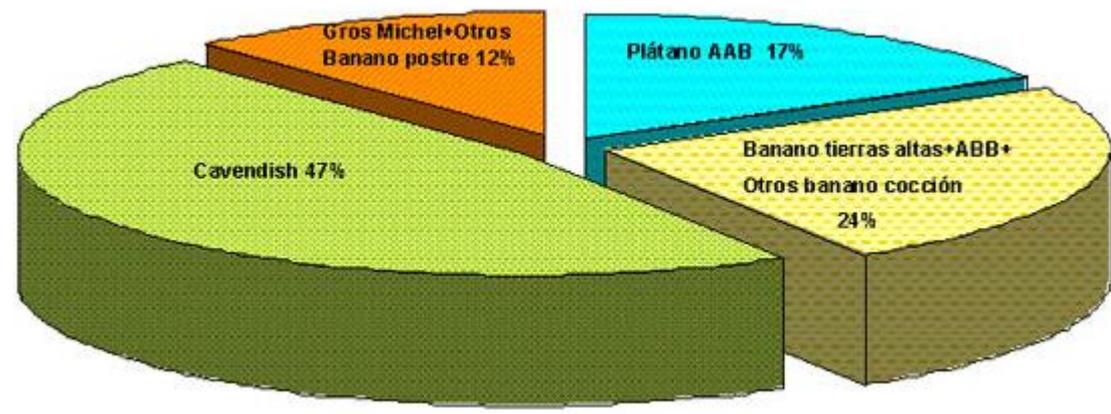
Principales países productores de banano en el mundo en el 2020



Producción de banano en el Ecuador

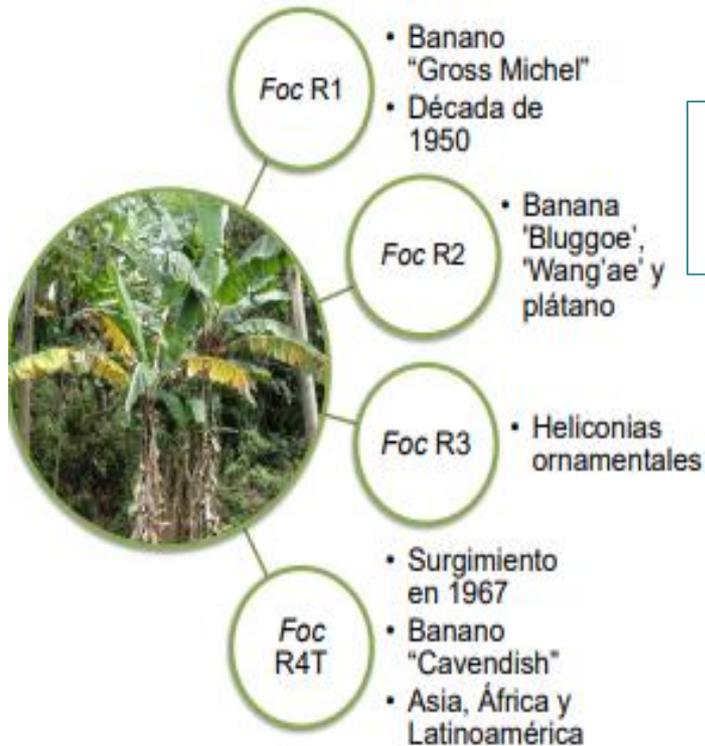


Producción mundial de bananos

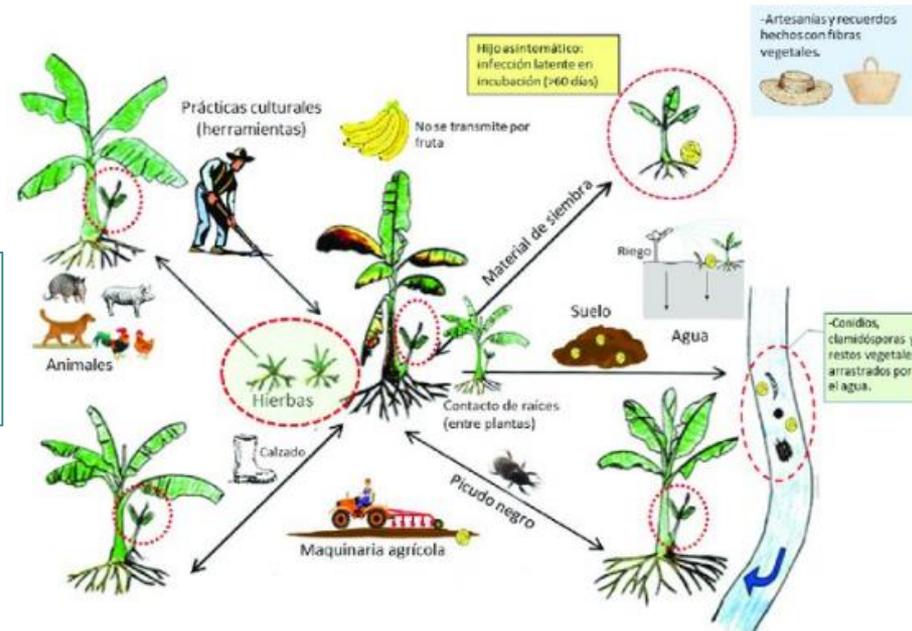


Antecedentes de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Razas de *Fusarium*



Formas de diseminación de *Foc*



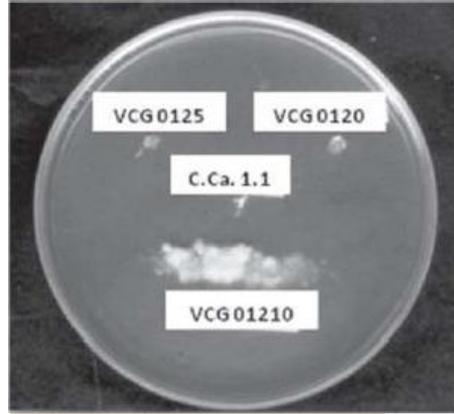
Síntomas externos e internos de fusariosis





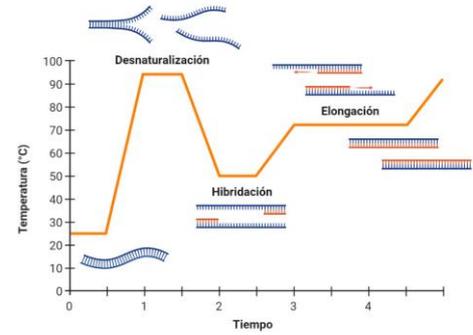
Identificación morfológica

- Sin diferencias entre razas
- Medios utilizados PDA, komada y SNA



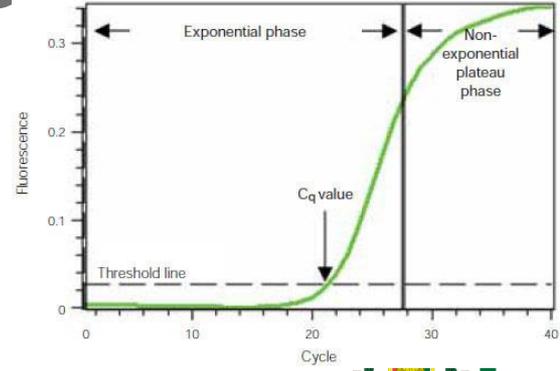
Determinación de grupos de compatibilidad vegetativa (VCG)

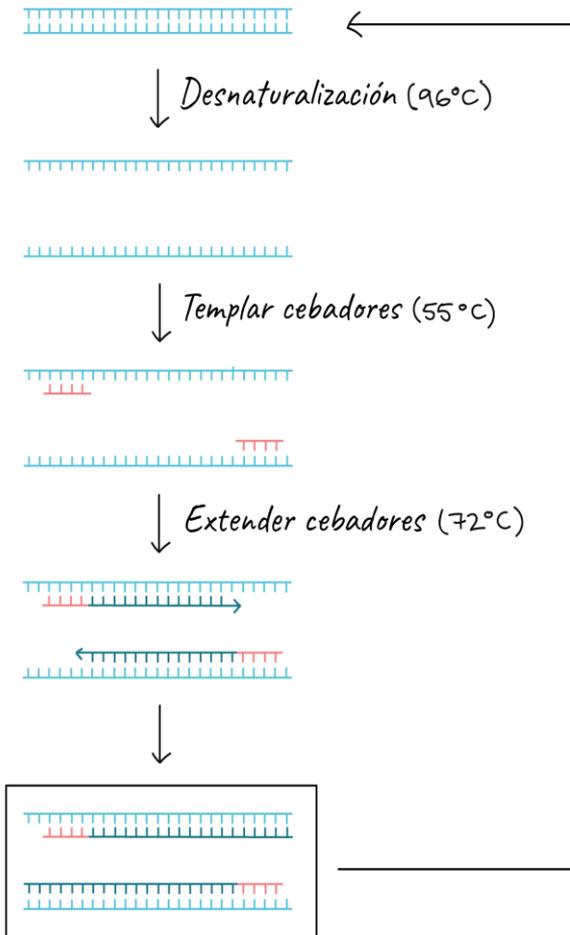
- Clasificación compleja
- Resultados en mínimos 28 días



Identificación molecular

- Secuenciación
- PCR: PCR punto final, qPCR, PCR-RFLP
- LAMP

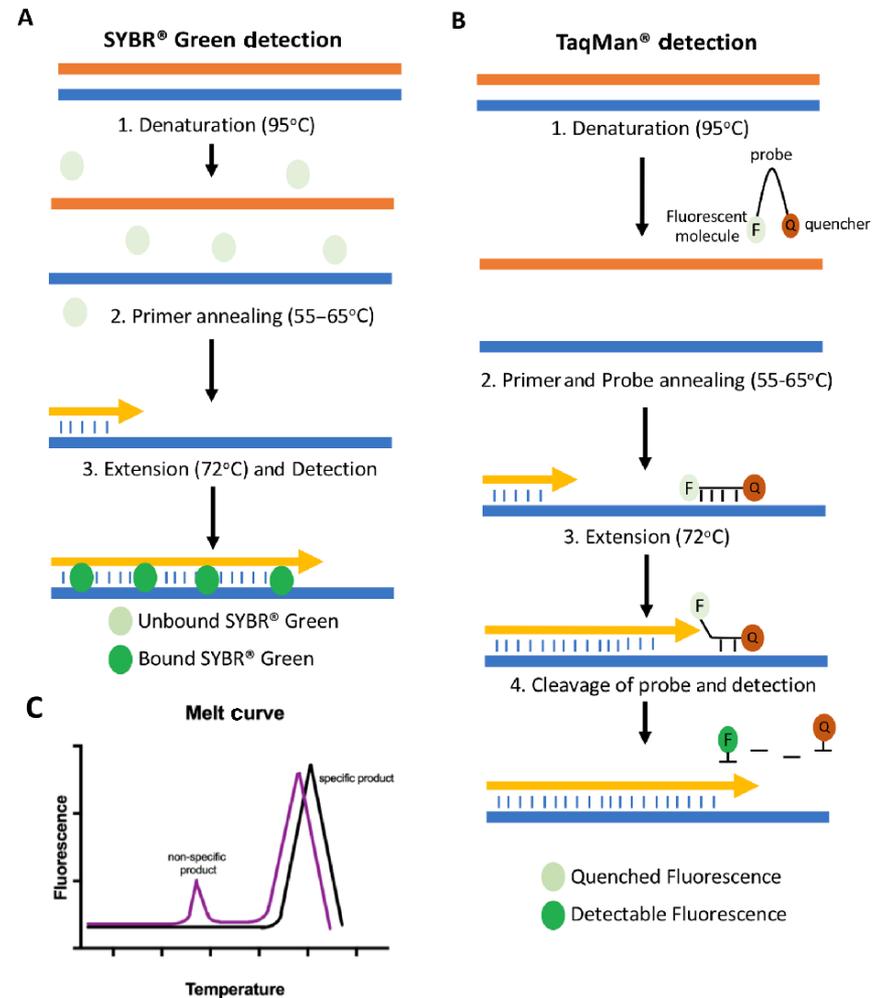




Repetir
25-35 X

Resultado después de un ciclo
de moléculas de ADN duplicado

PCR cuantitativa



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.

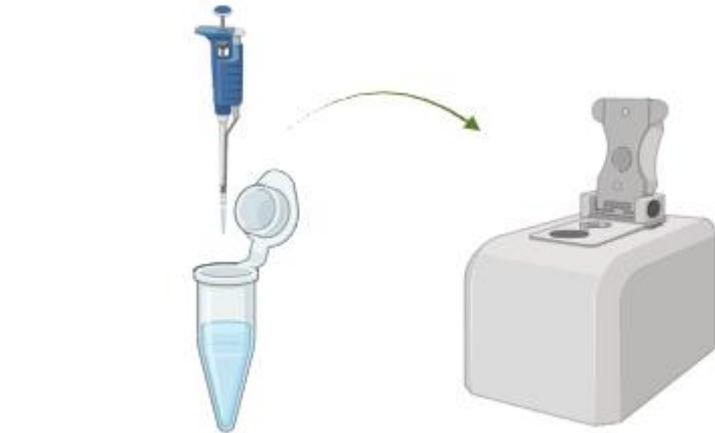


La PCR punto final y la PCR cuantitativa son métodos moleculares óptimos para la detección de *Foc* R4T a diferentes concentraciones de ADN



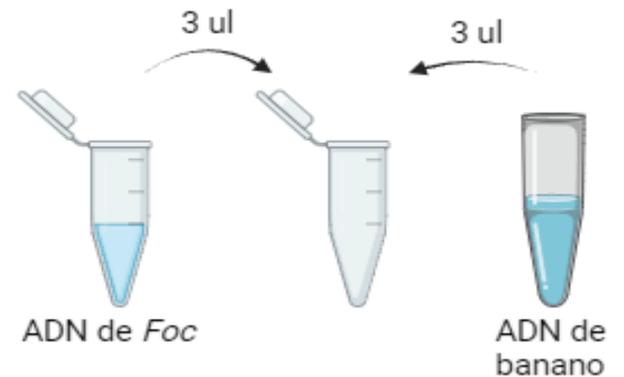


Primer ensayo se realizaron diluciones seriadas a partir del ADN de *Foc* R4T



Se midió la concentración y la calidad de las muestras de ADN

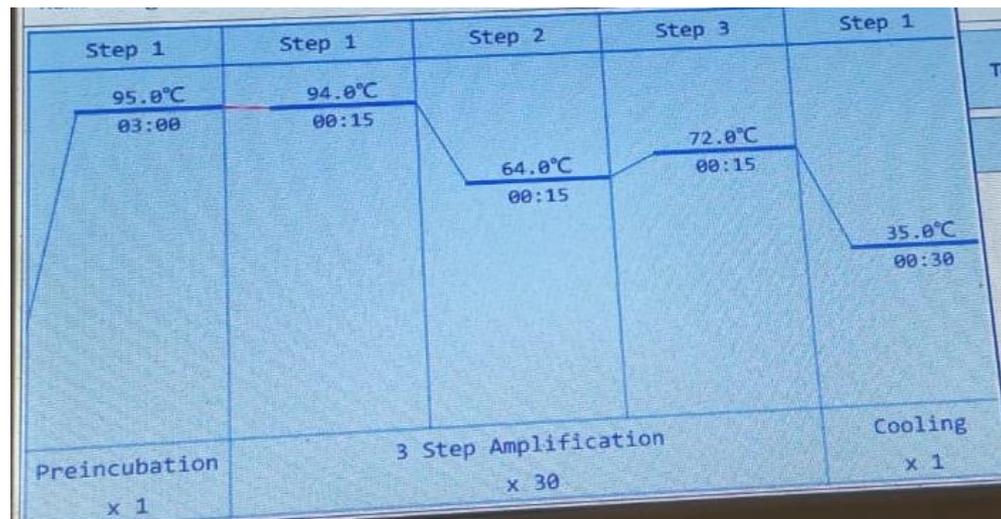
Segundo ensayo se mezcló el ADN de *Foc* con el de banano y posterior se realizaron las diluciones



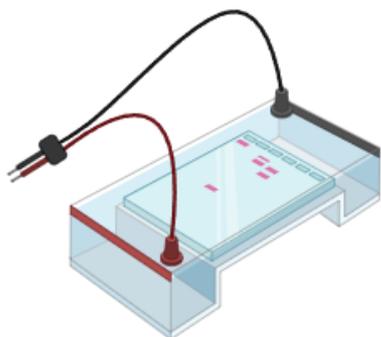
Reactivos de la PCR punto final utilizando los primers de Dita et al., 2010

Reactivo	Volumen μL (1x)
<u>BlasTag™ 2X PCR MasterMix</u>	6,25
Foc-TR4 F	0,5
Foc-TR4 R	0,5
Agua libre de nucleasas	4,75
ADN	1
Total	13

Preparación de las muestras para la PCR



Electroforesis de los amplicones



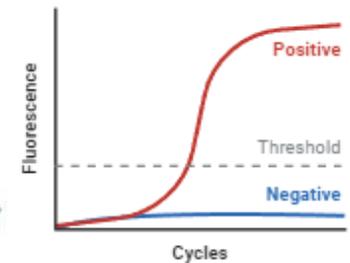
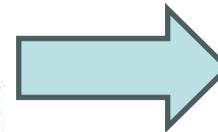
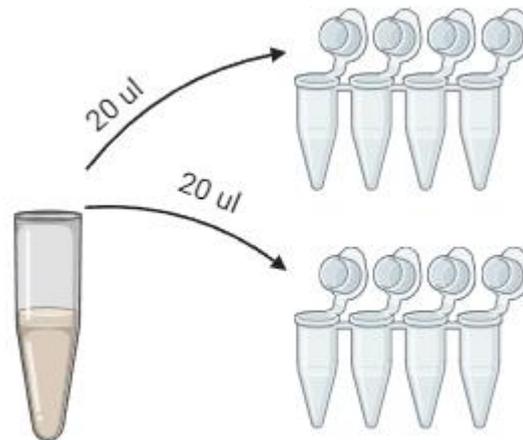
PCR cuantitativa

Componentes del Master Mix para qPCR utilizando los primers y la sonda de Aguayo et al., 2017

Reactivo	Volumen μL (1x)
Probe 2x qPCR <u>MasterMix</u>	10
FWB-TR4 F	0,8
FWB-TR4 R	0,8
Sonda FWB-TR4	0,4
Agua libre de nucleasas	7
ADN	1
Total	20

Región	Desnaturalizac		Desnaturalizació		<u>Annealing</u>		Extensión	
	ión inicial	n	n	n	n	n	n	n
	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)
Blanco								
Gen hipotético (W2987)	95	5:00	95	0:15	60	0:20	72	0:30

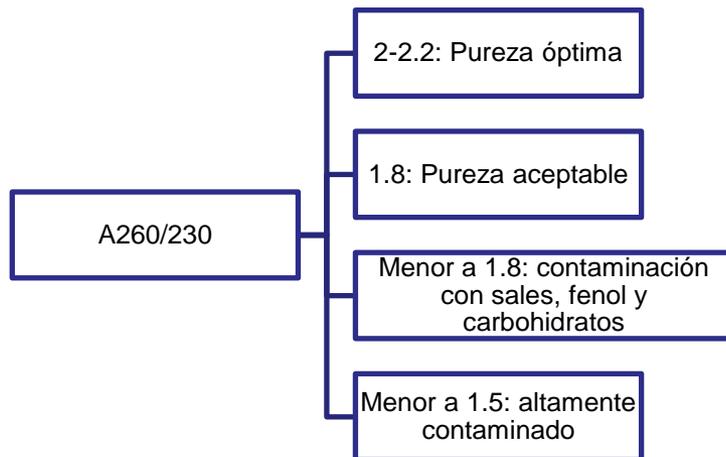
Para la qPCR se realizó un duplicado para cada muestra de ADN



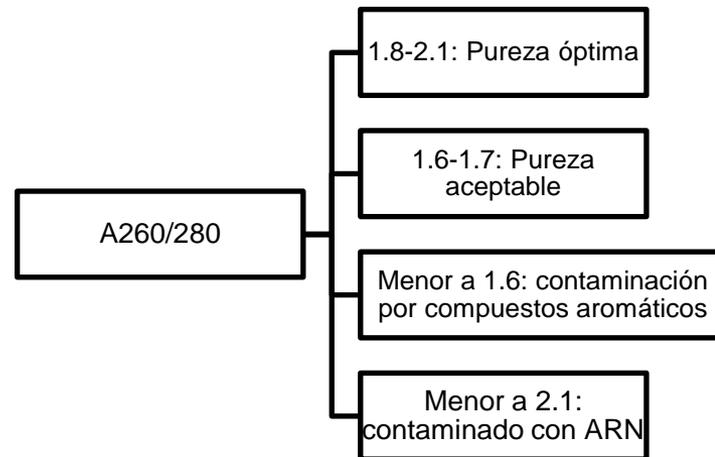
Concentraciones de ADN

Concentraciones y purezas de las muestras de ADN del primer ensayo

CONCENTRACIÓN DE ADN	260/280	260/230
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



RESULTADOS Y DISCUSIÓN



CONCENTRACIÓN DE ADN	260/280	260/230
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
FOC_BP (5.3)	1.48	0.49

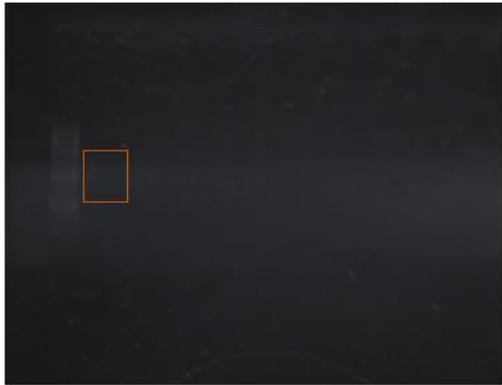
Concentraciones y purezas de las muestras de ADN del segundo ensayo



PRIMER ENSAYO

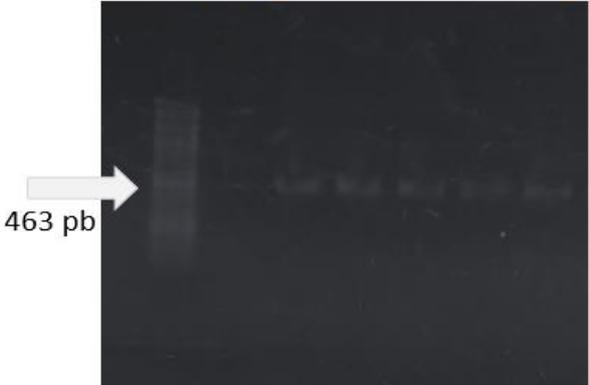
1 Electroforesis de la amplificación con el protocolo de AGROCALIDAD

Control positivo C-



Electroforesis de la amplificación con un menor tiempo de extensión

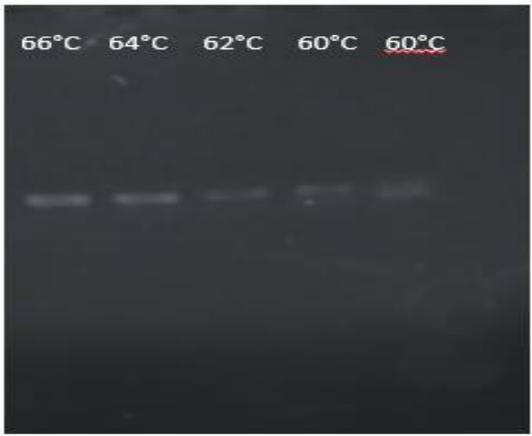
C- Control positivo



2

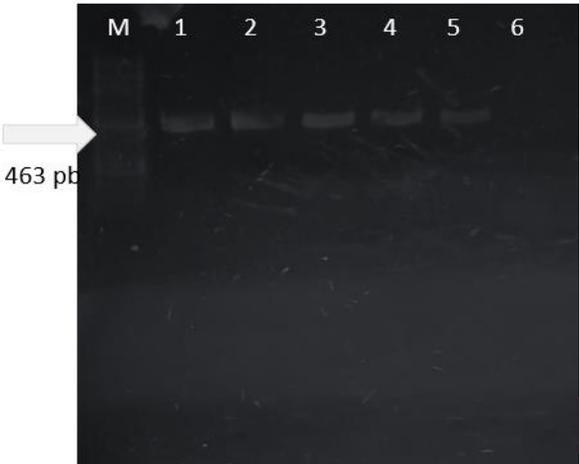
SEGUNDO ENSAYO

3 Escala de temperaturas de annealing



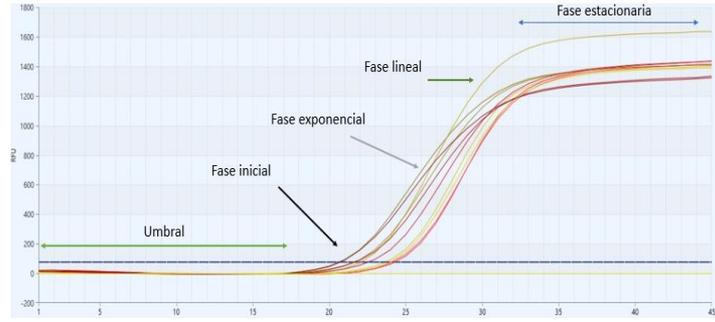
Electroforesis con el nuevo programa de amplificación

4



PRIMER ENSAYO

Curvas de amplificación

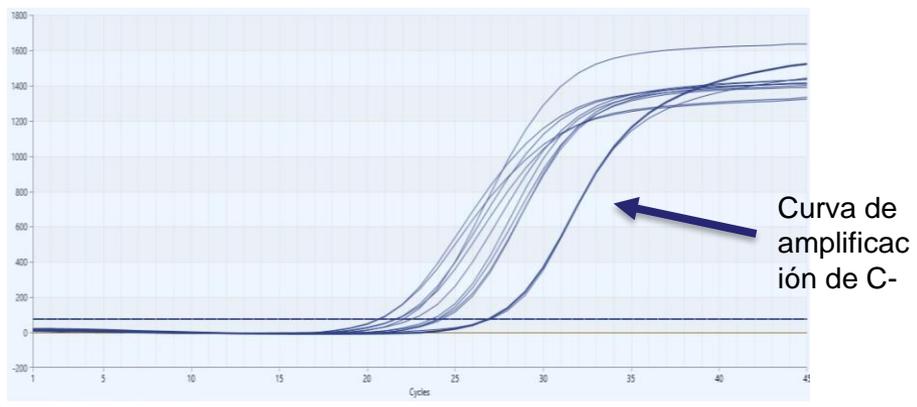


Valores Ct obtenidos de la amplificación por qPCR

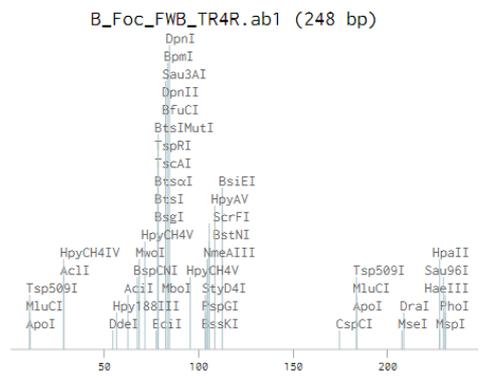
Concentración	Promedio de Ct
50.7	20.69
25.4	21.7
12.5	22.33
6.4	24.03
5	24.04

SEGUNDO ENSAYO

Curvas de amplificación



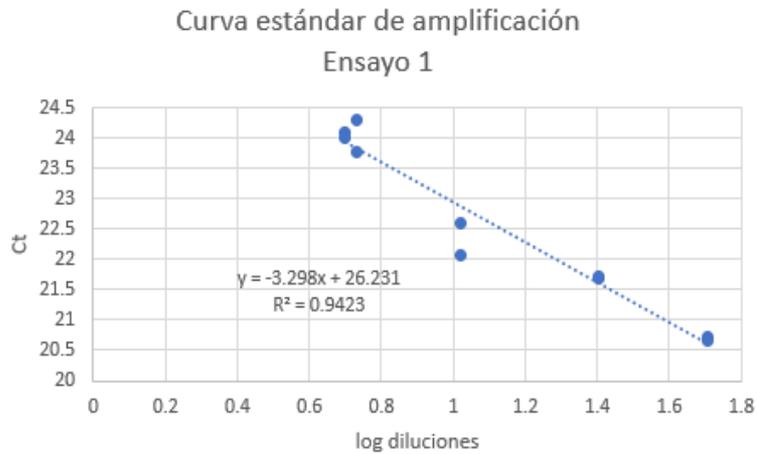
Valores Ct obtenidos



Concentración	Promedio de Ct
50.3	25.96
25.2	24.22
12.2	24.78
6.1	25.79
5.3	26.20
NTC	27.87

Cálculo de la eficiencia

Se graficaron las curvas estándar para los dos ensayos



El porcentaje de eficiencia para el primer ensayo fue del 100%

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

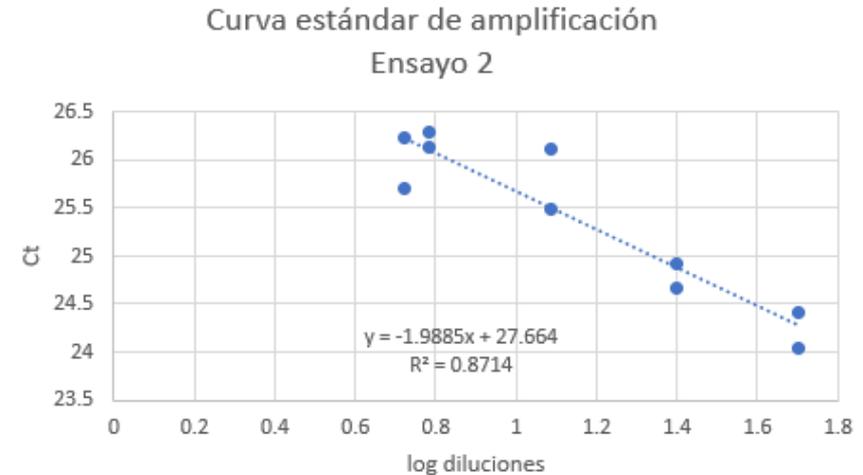
La eficiencia de la qPCR se calculó con la ecuación:

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

Donde:

k: es la pendiente de la ecuación

El porcentaje de eficiencia para el segundo ensayo fue del 200%





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.

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%



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, indicándonos altos niveles de contaminación los cuales interfirieron durante la amplificación





Se recomienda que 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

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



AGRADECIMIENTOS



Francisco Flores, PhD
Tutor del proyecto
Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE”

Francisco Garrido, Ing.
Vanessa Gaona, Ing.
Sofía Garrido, Ing.
IDgen- Quito, Ecuador

FAMILIA Y AMIGOS



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA