



**Desarrollo de un nanosensor para la detección del agente causal de la marchitez
(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical) en plantas de banano (*Musa x
paradisiaca*).**

Córdova Pogo, Marco Alberto

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

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

Flores Flor, Francisco Javier PhD

23 de Agosto de 2022

COPYLEAKS

MCordova Biotec ESPE tesis.txt

Scanned on: 16:42 August 14, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	157
Words with Minor Changes	1
Paraphrased Words	539
Omitted Words	0



Financiado electrónicamente por:
**FRANCISCO
JAVIER FLORES
FLOR**



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Desarrollo de un nanosensor para la detección del agente causal de la marchitez (*Fusarium oxysporum f. sp. cubense* raza 4 tropical) en plantas de banano (*Musa x paradisiaca*)”** fue realizado por el señor **Córdova Pogo, Marco Alberto**, 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 analizada 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, 15 de agosto de 2022



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, **Córdova Pogo, Marco Alberto**, con cédula de ciudadanía n°1727214270, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Desarrollo de un nanosensor para la detección del agente causal de la marchitez (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical) en plantas de banano (*Musa x paradisiaca*)”** 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, 17 de agosto de 2022

Córdova Pogo, Marco Alberto

C. C. 1727214270



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, Córdova Pogo, Marco Alberto, con cédula de ciudadanía n°1727214270, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: “Desarrollo de un nanosensor para la detección del agente causal de la marchitez (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical) en plantas de banano (*Musa x paradisiaca*)” en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 17 de agosto de 2022

Córdova Pogo, Marco Alberto

C. C. 1727214270

Dedicatoria

A Yaneth, mi madre, mi apoyo y consejo. Siempre presente para mí, pese a la distancia. No sería la persona que soy actualmente sin tu guía incansable.

A Marco, mi padre, quien me enseñó que un gesto y las acciones, expresan más que mil palabras. Este trabajo es una pequeña retribución al esfuerzo de mis padres.

A mis abuelitos, Miguel, Rosa, Mark y Bélgica. Gracias por su constante preocupación y apoyo. A Miguel, quien siempre se mostró presto a ayudarme en cualquier idea que se me ocurría. A Rosa, quien siempre mostraba curiosidad por lo que aprendía y cualquier cosa relacionada con la biología me lo consultaba porque le recordaba a mí. A Bélgica y Mark, quienes cultivaron en mí la pasión por las ciencias biológicas.

A Lorena, mi cómplice en esta etapa universitaria. Gracias por demostrar cuanto crees en mí.

A Marco del futuro, espero que la pasión por la ciencia que tienes actualmente solo se haya incrementado. Recuerda todo el esfuerzo y dedicación que has puesto en este trabajo, continúa así.

Agradecimientos

A Francisco Flores, un ejemplo de humildad y un faro de conocimiento, que con su luz ha sabido guiarme a lo largo de la carrera. Gracias por su apoyo constante en cada proyecto y por permitirme desarrollar esta investigación en IDgen.

A los técnicos de laboratorio de IDgen, Francisco y Vanesa. Gracias por estar siempre prestos a ayudar y enseñar.

A Tefa, infinitas gracias por el apoyo emocional y académico que representas. Gracias por caminar conmigo en esta etapa, empujarme cuando es necesario y tratar de enseñarme a pensar antes de actuar (sigo trabajando en ello).

A mis hermanos, Andrea, Tatiana, Mark y Dereck. Gracias por su amor y apoyo incondicional.

A Ramiro, Alicia, Luis, Lorena y David, mi otra familia. Muchas gracias por recibirme con los brazos abiertos y estar siempre prestos a ayudarme.

A mi equipo dinamita: Joss y Sofi, mil gracias por su ayuda y amistad a lo largo de la carrera.

Índice de contenido

—	
Carátula	1
Resultado del análisis de Copyleaks.....	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos	7
Índice de contenido.....	8
Listado de tablas.....	11
Listado de figuras.....	12
Resumen	14
Palabras clave:.....	14
Abstract.....	15
Key words:	15
Capítulo 1: Introducción	16
Planteamiento del problema	16
Justificación del problema	17
Objetivos	18

Objetivo general.....	18
Objetivos específicos	18
Hipótesis	18
Capítulo 2: Marco Teórico.....	19
Producción de banano en el mundo	19
Producción de banano en Ecuador.....	19
Enfermedades del banano.....	21
Moko y Bugtok.....	21
Pudrición húmeda del pseudotallo y el rizoma.	21
Racimo del banano (BBTD)	22
Mosaico de las brácteas	22
Manchas foliares.....	22
Mal de panamá o marchitez del banano	23
Antecedentes destructivos del <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	23
Variedades genéticas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	24
Métodos de diagnóstico de <i>Fusarium</i>	25
Sintomatología.....	25
Morfología.....	26
Determinación de VCG	27
Pruebas moleculares	28

Los nanosensores	30
Aplicaciones de los nanosensores.....	31
Los nanosensores en la agricultura	32
Capítulo 3: Metodología	33
Determinación de secuencias a incluir en el control positivo sintético (CPS)	33
Diseño del CPS	33
Cálculo de porcentaje de GC y temperatura de fusión (melting)	34
Preparación de Células Competentes	35
Transformación por shock térmico y selección de colonias	35
Extracción de ADN	36
Selección de cebadores específicos a usar en el nanosensor	37
Identificación molecular de los microorganismos controles.....	38
Funcionalización de nanopartículas.....	41
Diseño experimental.....	41
Hipótesis del Diseño experimental:.....	43
Factor: Organismo	43
Factor: Tiempo.....	43
Factor: Cantidad de ADN	43
Ensayo de hibridación con nanopartículas	44
Determinación de especificidad y sensibilidad de la prueba	44

Capítulo 4: Resultados.....	46
Determinación de secuencias a incluir en el control positivo sintético (CPS).....	46
Diseño del CPS.....	48
Cálculo del porcentaje de GC y temperatura de fusión (melting) del plásmico CPS pMG-Amp	50
Obtención del CPS.....	50
Identificación de microorganismos control negativo.....	51
Selección de cebadores específicos a usar en el nanosensor.....	53
Resultados del diseño experimental.....	54
Capítulo 5: Discusión.....	64
Capítulo 6: Conclusiones.....	70
Capítulo 7: Recomendaciones.....	71
Referencias.....	72
Apéndices.....	82

Listado de tablas

Tabla 1: Pruebas moleculares basadas en ADN para identificar <i>Foc R4T</i>	28
Tabla 2: Programación del termociclador para verificación y prueba de los cebadores de Aguayo et al., 2017.....	37

Tabla 3: Programación del termociclador para verificación y prueba de los cebadores de Li et al., 2013.....	37
Tabla 4: Condiciones de PCR para los cebadores de identificación de <i>Foc R1</i>	39
Tabla 5: Diseño experimental.....	42
Tabla 6: Identificación de los microorganismos control negativo	52
Tabla 7: ANOVA de tres vías: Organismo, Tiempo y Cantidad de ADN.....	54
Tabla 8: ANOVAs en los tiempos: 10, 20 y 30 min.....	55
Tabla 9: Resultados de sensibilidad y especificidad de la prueba en la primera repetición .	57
Tabla 10. Cálculo del cutoff de absorbancia.....	58
Tabla 11: ANOVA dos vía: Organismo y Cantidad de ADN.....	60
Tabla 12: ANOVAs del factor cantidad de ADN, separando los organismos CPS y <i>Foc R1</i> .	61
Tabla 13: ANOVA de tres vías: Repetición, Organismo y Cantidad de ADN	61
Tabla 14: Sensibilidad y especificidad de la prueba para las 2 repeticiones.....	63

Listado de figuras

Figura 1 Morfología macro y microscópica de <i>Fusarium oxysporum</i>	26
Figura 2 Análisis in silico de los cebadores propuestos por Aguayo et al., 2017.	46
Figura 3 Análisis in silico de los cebadores propuestos por Dita et al., 2010.	47
Figura 4 Análisis in silico de los cebadores propuestos por Li et al., 2013	47

Figura 5 Mapa del plásmido CPS pMG-Amp.....	48
Figura 6 Análisis de secuencias complementarias a los cebadores	49
Figura 7 PCR in silico de los cebadores evaluados.....	50
Figura 8 Resultados del cálculo de porcentaje de GC y temperatura de fusión.....	50
Figura 9 Obtención del control positivo sintético (CPS).....	51
Figura 10 Electroforesis de las PCR con los cebadores específicos para <i>Foc R1</i>	52
Figura 11 Selección por PCR y qPCR de cebadores a utilizar en el nanosensor.	53
Figura 12 Prueba Kruskal Wallis para los resultados de la primera repetición	55
Figura 13 Prueba de Duncan para los resultados a 20 min.	56
Figura 14 Gráficas de dispersión de puntos para resultados de la primera repetición	56
Figura 15 Escala de color de los ensayos cualitativos.....	58
Figura 16 Resultados de la segunda repetición, primera replica.....	59
Figura 17 Gráfico de dispersión de puntos para la absorbancia.....	60
Figura 18 Prueba de Duncan de la absorbancia en la segunda repetición	60
Figura 19 Resultados del análisis de las dos repeticiones.	62

Resumen

La enfermedad de la marchitez del banano (*Musa x paradisiaca*) es causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), cuya raza 1 en la década de 1960 devastó completamente la variedad de banano "Gros Michel". En las décadas recientes ha surgido el *Foc* raza 4 tropical (*Foc* R4T) capaz de infectar a la variedad de banano "Cavendish" que se cultiva actualmente en Ecuador, aunque este patógeno no se encuentra en el país, ya está presente en Perú y Colombia. Los nanosensores son dispositivos capaces de detectar la presencia de biomoléculas, por lo que se utilizan para detectar patógenos. El objetivo del presente trabajo de Integración Curricular es desarrollar un nanosensor para la detección del agente causal de la marchitez (*Foc* R4T) en plantas de banano. A partir del análisis *in silico* en Primer-BLAST y con el análisis *in vitro* mediante PCR y qPCR se seleccionaron los cebadores FWB-TR4 F/R/P. A continuación, se sintetizaron y funcionalizaron las nanopartículas con el cebador reverso FWB-TR4 R: 5'-ACGACTTATCTAGCGGTTGATGTG -3'. En la primera repetición (cualitativa) del experimento se fijó el tiempo de evaluación de la prueba en 20 minutos y se fijó el límite de absorbancia a 525nm (cutoff) en 0.100. Los resultados de la segunda repetición (cuantitativa) se unieron con la primera y se determinó un valor de sensibilidad de 100% y especificidad de 70% usando una cantidad de ADN de 100 ng.

Palabras clave: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical, *Musa x paradisiaca*, nanosensor

Abstract

Banana (*Musa x paradisiaca*) wilt disease is caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), whose race 1 completely devastated the "Gros Michel" banana variety in the 1960s. In recent decades, the *Foc* tropical race 4 (*Foc* R4T) has emerged, capable of infecting the "Cavendish" banana variety that is currently grown in Ecuador, although this pathogen is not found in the country, it is already present in Peru and Colombia. Nanosensors are devices capable of detecting the presence of biomolecules, which is why they are used to detect pathogens. The objective of this Integración Curricular work is to develop a nanosensor for the detection of the causal agent of wilting (*Foc* R4T) in banana plants. From the *in-silico* analysis in Primer-BLAST and the *in vitro* analysis by PCR and qPCR, the primers FWB-TR4 F/R/P were selected. Then, the nanoparticles were synthesized and functionalized with the reverse primer FWB-TR4 R: 5'-ACGACTTATCTAGCGGTTGATGTG -3'. In the first repetition (qualitative) of the experiment, the evaluation time of the test was set at 20 minutes and the absorbance limit at 525nm (cutoff) was set at 0.100. The results of the second (quantitative) replicate were merged with the first one, we determined a sensitivity of 100% and specificity of 70% using a quantity of DNA of 100 ng.

Key words: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4, *Musa x paradisiaca*, nanosensor

Capítulo 1: Introducción

Planteamiento del problema

Para Ecuador, el sector agropecuario representa el 8% del PIB y genera el 29,74% del empleo total (Banco Mundial, 2021). El banano (*Musa x paradisiaca*) es uno de los productos agrícolas de mayor importancia nacional, porque Ecuador constituye el principal exportador a nivel mundial, como se demostró en 2020, cuando el banano ecuatoriano abarcó el 22% del mercado internacional (Vaca, Gaibor & Kovács, 2020). Normalmente, el banano se reproduce de forma vegetativa, debido a que esta práctica promueve la conservación de las características genéticas de la planta madre (Tumuhimbise & Talengera, 2018). Sin embargo, la reproducción vegetativa resulta en plantas hijas sin variabilidad genética, por lo que terminan siendo vulnerables al ataque de patógenos y no pueden defenderse de forma natural, pues si una planta es afectada, todas resultan contaminadas (Tumuhimbise & Talengera, 2018).

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* es un hongo capaz de producir marchitez en el banano dando como resultado importantes pérdidas económicas (Dita et al., 2018), y a mediados del siglo XX *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 devastó por completo cultivos de banana variedad "Gros Michel" (Ploetz, et al. 2015a). Más recientemente se ha reportado a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 (*Foc* R4) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical (*Foc* R4T) caracterizado por su patogenicidad (Cheng et al., 2019), sumado a que el banano Cavandish, el más cultivado en la actualidad, no posee resistencia natural a este hongo por lo que el patógeno puede acabar con estos cultivos (Ploetz, et al. 2015a), sin embargo, ya se están realizando investigaciones para encontrar genes de resistencia a *Foc* TR4 y potenciar la propagación de estas plantas resistentes (Wang, et al. 2012).

Justificación del problema

En la década de 1950, *Foc R1* destruyó casi 100.000 hectáreas de plantaciones de banano 'Gros Michel' en América Central y del Sur, con una pérdida estimada de más de 2 000 millones de USD (Ploetz, 2015). En la actualidad las pérdidas económicas se han conseguido reducir usando la variedad Cavendish resistente a *Foc R1*, pero con el surgimiento de *Foc R4T* se prevén grandes pérdidas en los países que más producen Cavendish, como China, Filipinas y Ecuador (Ploetz, 2015).

Foc R4T podría ingresar al país pues ya está en Latinoamérica desde 2019, cuando se detectó en la región nororiental de La Guajira, en Colombia (Sushma, 2020), mientras que en abril de 2021 Perú confirmó su presencia en Piura (Exportación de banano, 2021), ambos países son fronterizos a Ecuador, por lo que es indispensable aumentar los esfuerzos para la detección temprana y erradicación en caso de que ingrese al país. Este proyecto de tesis, contribuye en los esfuerzos para desarrollar herramientas de detección eficiente para frenar el avance de *Foc R4T*.

Los nanosensores son herramientas novedosas que permiten la detección de patógenos y moléculas determinadas, por lo que tienen diversas aplicaciones en alimentación, medicina, medio ambiente, agricultura, etc. Específicamente en la agricultura se usan para identificar metales pesados, contaminantes, microorganismos patógenos, además del control de temperatura, humedad y trazabilidad (Johnson, Sajeev & Nair, 2021). El presente proyecto busca desarrollar un nanosensor que detecte a *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 4 tropical (*Foc R4T*) en plantas de banano (*Musa x paradisiaca*).

Objetivos

Objetivo general

Desarrollar un nanosensor para la detección del agente causal de la marchitez (*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 4 tropical) en plantas de banano (*Musa x paradisiaca*).

Objetivos específicos

- Obtener un control positivo sintético de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 4 tropical (*Foc* R4T).
- Sintetizar nanopartículas de oro funcionalizadas con aptámeros específicos para *Foc* R4T.
- Estandarizar el método de detección de *Foc* R4T con nanopartículas funcionalizadas.

Hipótesis

El desarrollo del nanosensor funcionalizado con un oligonucleótido específico detecta en forma estadísticamente significativa a *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 4 tropical.

Capítulo 2: Marco Teórico

Producción de banano en el mundo

El banano (*Musa* spp.) es cultivado en alrededor de 135 países donde cuentan con regiones tropicales y subtropicales, por lo que se considera uno de los cultivos más importantes en todo el mundo (Brown et al., 2017). El género *Musa*, al que pertenecen los plátanos y bananos, son el cuarto cultivo más importante en el mundo, superados solo por el arroz, trigo y maíz (Jones, 2000). Las cifras muestran una producción mundial de 153 millones de toneladas en 2017 (FAOSTAT, s.f.), de las cuales, el 15% se destina a comercio internacional, mientras que el restante 85% se consume de forma local (Ploetz et al., 2015b).

El banano es un producto muy apetecido por su valor alimenticio, ya que es una fuente importante de carbohidratos, fibra, vitaminas y minerales (Pareek, 2016), sirviendo como alimento para más de 500 millones de personas (Aurore et al., 2009). Para algunos países africanos como: Uganda, Ruanda y Camerún, el consumo anual de bananas es capaz de superar los 200 kg per cápita (FAO, s.f.). A nivel mundial, solo 3 de los 50 subgrupos de banano reconocidos representan el 75% de la producción en la actualidad (Lescot, 2017), estos son los cultivos de banano AAA Cavendish, el subgrupo de plátanos AAB y los bananos ABB East African Highland (Janick, 2003). Por lo tanto, el banano es una fuente alimenticia y económica de gran importancia a nivel mundial.

Producción de banano en Ecuador

Los países latinoamericanos son los principales exportadores de fruta fresca para Estados Unidos y Europa (Manzo-Sánchez et al., 2014). De los tres cultivares más importantes

del mundo: banano AAA Cavendish, el subgrupo de plátanos AAB y los bananos ABB East African Highland (Janick, 2003) el Ecuador se centra en la producción de banano Cavendish (Ministerio de Comercio Exterior, 2017)

Para Ecuador, los bananos y plátanos son los productos no petroleros de mayor importancia económica después del camarón y son exportados a 43 mercados alrededor del mundo, por lo que se calcula que Ecuador contribuye con alrededor del 30% de los bananos consumidos a nivel mundial (Agrocalidad, 2020) y aproximadamente 2.5 millones de ecuatorianos dependen directa o indirectamente de esta actividad, lo que representa el 6% de la población nacional. La exportación de banano constituye el 2% del PIB general del país, y a su vez, el 35% del PIB agrícola (Ministerio de Comercio Exterior, 2017).

La mayoría de los productores de banano se concentran en las provincias de El Oro, Guayas y Los Ríos, estas provincias cuentan respectivamente, con el 41%, 34% y 16% de los productores. En la provincia de El Oro es donde se encuentran principalmente los pequeños productores, mientras que en Guayas y Los Ríos se ubican los grandes productores. De acuerdo con los datos del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), en el país existen alrededor de 162.236 hectáreas sembradas de banano y los productores suman un total de 4.473. El 78% de los productores de banano son pequeñas empresas (≤ 30 hectáreas), y si a ellos se suma los medianos productores ($>30, \leq 100$ hectáreas) se alcanza el 95.6%, es decir que solo el 4.4% de los productores son grandes empresas, por lo que la mayoría de la producción de banano gira entorno a un ámbito de economía familiar y la Economía Popular y Solidaria, contribuyendo a la reducción de la pobreza rural (Ministerio de Comercio Exterior, 2017).

Enfermedades del banano

Moko y Bugtok

Estas enfermedades son causadas por la bacteria *Ralstonia solanacearum*, es considerado uno de los fitopatógenos más dañinos e importantes a nivel mundial puesto que se propaga principalmente por insectos, acción mecánica con objetos contaminados o contacto con raíces infectadas (Blomme et al., 2017). Los síntomas inician principalmente a las hojas, mismas que se marchitan gradualmente conforme avanza la enfermedad, puesto que la bacteria utiliza los haces vasculares para multiplicarse, dispersarse y a la larga termina bloqueándolos (Senasica, 2019). Tiene presencia en 20 países latinoamericanos incluyendo Ecuador (CAB International, 2014). La diferencia entre el Moko y el Bugtok está en los síntomas que causan dependiendo del tipo de banano al que atacan (Molina, 1999).

Pudrición húmeda del pseudotallo y el rizoma.

Esta enfermedad es causada por la bacteria *Dickeya paradisiaca*, misma que provoca la pudrición del tejido interno de la raíz, pseudotallo y base de la hoja cuyos signos se muestran con áreas acuosas de color café o amarillo (Aguilar et al., 2021). Esta bacteria tiene la capacidad de sobrevivir por largos periodos de tiempo tanto en el suelo como en los desechos vegetales, por lo cual puede generar infecciones latentes (Ramírez et al., 2014). El primer reporte fue en Colombia y se encuentra ampliamente distribuida en plátano y banano de 11 países en el continente americano incluyendo Ecuador (Blomme et al., 2017).

Racimo del banano (BBTD)

Es una enfermedad vírica causada por el virus del racimo del banano (BBTV) también conocido como el virus del Bunchy top, se transmite por la acción de pulgones (Manzo et al., 2014). Se caracteriza por que sus síntomas aparecen como un estriado y punteado de color verde oscuro en hojas y peciolos, con el avance de la enfermedad se desarrolla una clorosis marginal, atrofia severa, rayas cloróticas, además de que los racimos no se desarrollan y los frutos no son de buena calidad (Kolombia et al., 2021).

Mosaico de las brácteas

Esta enfermedad es causada por el virus del mosaico de las brácteas del banano (BBrMV) del género Potyvirus. Este virus puede infectar a la planta en cualquier estado de desarrollo y partes de la planta, se pueden observar como puntos o estrías amarillentas en los peciolos, el síntoma más distintivo es la aparición de un mosaico en las brácteas florales y en ocasiones en los frutos (Manzo et al., 2014). La detección de esta enfermedad es limitada y se creía que solo se encontraba en países productores asiáticos, sin embargo existen reportes de su distribución en países como Colombia y Ecuador (Quito et al., 2013).

Manchas foliares

Las manchas foliares en el banano son causadas por especies del género *Mycosphaerella*, estos hongos afectan principalmente a las hojas provocando tres principales enfermedades: sigatoka negra, sigatoka amarilla y mancha foliar eumusae atribuidas a la acción de *Mycosphaerella fijiensis*, *Mycosphaerella musicola* y *Mycosphaerella eumusae* respectivamente (Manzo et al., 2014), estas enfermedades que tienen un impacto importante sobre el rendimiento, capacidad fotosintética, maduración prematura, calidad y cantidad de los

frutos (Churchill, 2011; Alankonya et al., 2017). Estas afecciones se tratan usualmente con fungicidas, sin embargo, si no existe un diagnóstico adecuado, se puede dar paso al desarrollo de cepas resistentes a fungicidas.

Mal de panamá o marchitez del banano

El mal de panamá o enfermedad de Panamá es una enfermedad fúngica causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), existen 4 razas: raza 1 afecta a ciertos cultivares de banano, la raza 2 afecta a cultivares de plátano, la raza 3 a heliconias ornamentales y la raza 4 a todos los cultivares de banano (Martínez et al., 2020), actualmente no se han desarrollado variedades resistentes a esta última raza. Este hongo ataca principalmente a raíces secundarias, terciarias o heridas, el hongo avanza hacia la zona vascular de las raíces, obstruye los vasos xilemáticos por lo cual interfiere en la absorción de nutrientes y transporte de agua (Guo et al., 2015). El patógeno se disemina por el material de propagación, además de que puede encontrarse en el suelo, agua, implementos agrícolas y demás (Ploetz, 2015). Los países productores de banano se encuentran en alerta, vigilancia y monitoreo de esta enfermedad a través del control y monitoreo de las formas de transmisión (Manzo et al., 2014; Martínez et al., 2020).

Antecedentes destructivos del *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

El primer reporte de *Foc* en la historia se realizó en 1874 y se localizó en Australia, en donde apareció *Foc* R1 y posteriormente, en 1890 se reportó en el continente americano (Molina et al., 2009). Con su llegada a América y posterior dispersión en el mundo, pasaron 69 años, es decir, en 1959 el mercado internacional del banano sucumbió ante la raza 1, ya que en ese entonces se cultivaba ampliamente el banano 'Gros Michel', y surgió la variedad

Cavendish que era resistente a este patógeno (Martínez-Solórzano et al., 2020). Se calcula que en la década de 1950 *Foc* R1 generó pérdidas que oscilan los 2000 millones de USD debido a que arrasó con alrededor de 100 mil hectáreas de plantaciones de banano 'Gros Michel' ubicadas en América Central y del Sur (Ploetz, 2015).

Sin embargo, *Foc* R1 no es el único patógeno *Foc* que ataca al banano, pues el a partir de ello se han identificado nuevas razas, entre ellas *Foc* R2, que ataca a cultivares de banana 'Bluggoe' (genoma ABB) y 'Wang'ae' según un estudio realizado en Kenia (Kung'u & Jeffries, 2001). Por otro lado, *Foc* R3 ataca únicamente a plantas *Heliconia* spp., pero no ataca al banano (CABI, 2021).

Desde que la industria bananera dio una vuelta hacia los cultivos de Cavendish (1959), transcurrieron ocho años hasta que una nueva raza fue capaz de atacarlo (*Foc* R4), que se reportó por primera vez en 1967, lo que coincide con el criterio de Dita, et al. (2018) que mencionan que los cultivares resistentes son efectivos por menos de diez años. *Foc* R4 surgió en Asia y en 2013 se reportó su presencia fuera del continente (Martínez-Solórzano et al., 2020) y a partir de entonces ha empezado a dispersarse en diferentes latitudes, incluyendo Latinoamérica pues en 2019 llegó a Colombia (Sushma, 2020) y actualmentne se encuentra también en la frontera sur de Ecuador, en Perú, donde se reportó su presencia en 2021 (Exportación de banano, 2021).

Variedades genéticas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

La delimitación de las razas y cepas de *Foc* es confusa e imprecisa (Mostert et al., 2017). La confusión es tal que algunos estudios basados en ADN han demostrado que las razas de *Foc* no cuentan con un ancestro común y no están relacionadas genéticamente

(O'Donnell et al., 1998; Fourie et al., 2009). La propuesta actual consiste en reconocer varios linajes independientes que tienen una estructura poblacional clonal (O'Donnell et al., 1998), y otra forma de evaluar y clasificar la diversidad genética de *Foc* es mediante los grupos de compatibilidad vegetativa (VCGs) los cuales están alineados con los linajes clonales, existiendo un total de 24 VCG (Ordoñez et al., 2015). *Foc* raza 4 tropical (R4T) ésta compuesta por los VCG-01213/16 (Magdama et al., 2019). Esta raza se encuentra principalmente distribuída en la parte sur de Asia, actualmente se encuentra al sur de África, en Oriente Medio y el Latinoamérica en Perú y Colombia (Dita et al., 2018; Ploetz et al., 2015a; Sushma, 2020; Exportación de banano, 2021). Se cree que las epidemias de *Foc* R4T están causadas por un mismo clon (Ordoñez et al., 2015), sin embargo también existen investigaciones que señalan que algunas de las epidemias son causadas por hongos con variación de secuencia dentro de VCG 01213/16 (Zheng et al., 2018). Incluso se han detectado VCGs distintas a las VCG 01213/16 que causan marchitez por *Fusarium* en Cavendish, como es el caso se la VCG-0121 que puede causar la enfermedad bajo condiciones tropicales (Groenewald et al., 2006).

Métodos de diagnóstico de *Fusarium*

Sintomatología

El reconocimiento de los síntomas del marchitamiento por *Fusarium*, es una técnica tradicional y utilizada comúnmente, entre los síntomas más usuales se encuentra el marchitamiento y amarillamiento de las hojas, mientras que el pseudotallo presenta decoloración marrón rojiza (Jones, 2018). Sin embargo, este tipo de diagnóstico es insuficiente para distinguir entre VCGs y esperar a que los síntomas aparezcan puede resultar contraproducente y demasiado tarde para llegar a frenar la propagación porque el patógeno

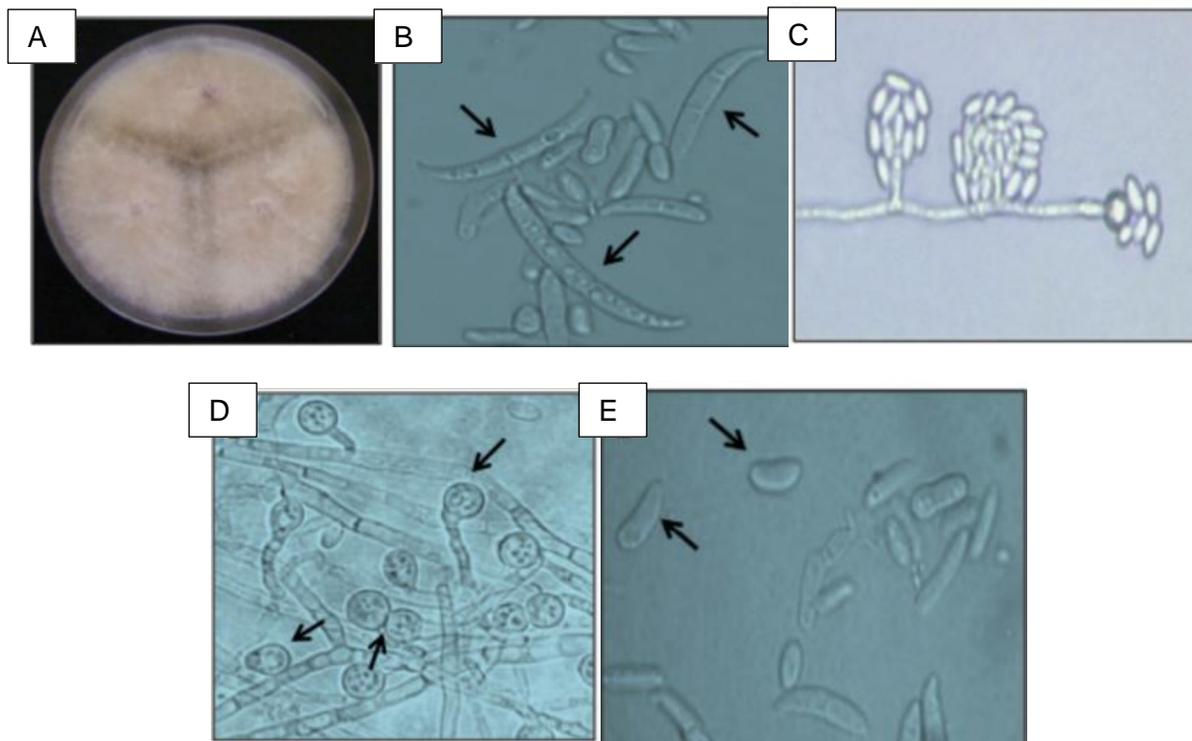
tiene un largo período de incubación (Magdama et al., 2019), demorando incluso varias semanas lo que puede permitir que el patógeno se disperse a otras áreas, e incluso *Foc* puede permanecer como un hongo endófito en plantas asintomáticas (Gordon, 2017). Es por ello, que se requiere de pruebas moleculares para una detección temprana de la enfermedad.

Morfología

De acuerdo con Dita et al., 2013, la morfología de los cultivos de *Fusarium oxysporum* es cambiante en medio PDA, presenta un micelio velloso, abundante o disperso, su color es principalmente blanco, pero puede variar desde el color rojo a violeta en el agar (Figura 1A). A nivel microscópico, se puede observar que los macroconidios miden entre 30-80 μm de largo y su célula apical generalmente es delgada o tiene forma de gancho (Figura 1B). Por su parte, los microconidios forman cabezuelas (Figura 1C) y se ubican sobre monofialides cortas (Figura 1D). Las clamidosporas miden entre 6 y 20 μm de diámetro, se encuentran de forma aisladas o agrupadas formando hifas y conidios (Figura 1D). Los microconitios tienen una longitud de 5 - 16 x 2.4 - 3.5 μm (Figura 1E).

Figura 1

Morfología macro y microscópica de Fusarium oxysporum



Nota: a) Morfología macroscópica de las colonias en PDA; b) Macroconidios; c) Microconidios formando falsas cabezas; d) Monofiálides y clanidosporas; e) Microconidios. Tomado de *Plan de contingencia ante un brote de la raza 4 tropical de Fusarium oxysporum f.sp. cubense* (p. 60), por Dita et al., 2013. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria.

Determinación de VCG

Foc R4T comprende los grupos de cepas VCG-01213/16 y para determinar de cuál VCG se trata, se usa variaciones del método inicialmente descrito por Puhalla (1985), este método se basa en la generación de los denominados mutantes nit, que son hongos que han sido adaptados a metabolizar eficientemente el nitrato, un bloque de 1mm^3 de colonias de este *Foc* luego se siembra rodeado de máximo 5 bloques de otros hongos, si se muestra un crecimiento abundante entre el bloque central y alguno de los exteriores, entonces no son

genéticamente compatibles. Para que un *Foc* se considere dentro de la misma VCG debe mostrar un crecimiento delgado.

Pruebas moleculares

Entre las pruebas moleculares basadas en ADN que se realizan en la actualidad, predominan los procedimientos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con diversas variaciones, como PCR de punto final, qPCR con sonda TaqMan, qPCR con SYBR green, PCR-RFLP; otro procedimiento también disponible es la Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP); algunos cebadores usados en estos procesos se pueden observar en la tabla 1.

Tabla 1

Pruebas moleculares basadas en ADN para identificar Foc R4T.

Técnica	Autor	Cebadores	Región objetivo	Longitud (pb)
PCR punto final	Dita et al., 2013	<i>Foc</i> TR4 F: 5'CACGTTTAAGGTGCCATGAG AG 3' <hr/> <i>Foc</i> TR4 R: 5'GCCAGGACTGCCTCGTGA 3'	Inter-genic Spacer (IGS) e Internal Trascribed Spacer (ITS) del operón ribosomal	463
PCR punto final	Li et al., 2013	W2987 F: 5'- TGCCGAGAACCACTGACAA-3' <hr/> W2987 R: 5'- GCCGATGTCTTCGTCAGGTA-3'	Gen hipotético	452
qPCR (sonda TaqMan)	Aguayo et al., 2017	FWBTR4 F: 5'- CGGTCTCGGCCAAATCTGATT - 3' <hr/> FWBTR4 R: 5'- ACGACTTATCTAGCGGTTGAT GTG - 3'	Gen hipotético (W2987)	179

		FWBTR4 P (sonda): 5'- ACCCTTCAACTCCACTC GATCGCA - 3'		
qPCR (SYBR Green)	Kit comercial de Clear@Detect ions: R4T DNA identification by Real-Time PCR	N.A.	Región Intergénica Espaciadora (IGS)	N.A.
qPCR (SYBR Green)	Matthews et al., 2020	RT_13.16_F2.5: 5'- GAATATAAAGAGGAAGTAGCC G- 3'	Región no codificante	157
		RT_13.16_R2.5: 5'- CCTCGCTGAATTATATCTAAAC C - 3'		
PCR- RFLP	Carvalhais et al., 2019	SIX1a_266_F: GTGACCAGAACTTGCCCA CA	gen SIX1a	266 (digestión con: HpyAV, 124 bp/142 bp)
		SIX1a_266_2_R: CTTTGATAAGCACCATCAA		
LAMP	Peng et al., 2014	Cebador interno directo FIP: 5'- GAGCCGCGGTGGCTCAATACG ATACCTGTGAAGTCGC-3'	Secuencia marcadora de ADN polimórfico	N.A.
		Cebador interno inverso BIP: 5'- CGCTGGCTTCCGAACTTGAC AAGAACACCAGAAGC-3'		
		Cebadores externos: F3 5'- CGAATGGCAAGAGTCTGTT-3'; B3 5'- TGTTCTGCCAGTTTGACG-3'		
LAMP	Zhang et al., 2013	Cebador interno directo FIP: 5'- ATTCAAGCCGGATTGACGGAT T- GGATATGTAGAGAATGTGGTG G-3'	Región Intergénica Espaciadora (IGS)	N.A.
		Cebador interno inverso BIP: 5'- CCAGAGTCGGGTCTAGGGTAG -AGGCGATTGAAGTTGACTAC- 3'		

		Cebadores externos: FocTR4-F: 5'- CACGTTTAAGGTGCCATGAGA G; FocTR4-R: 5'- CGCACGCCAGGACTGCCTCGT GA -3'		
LAMP	Ordoñez et al., 2013	SeqA_FIP: 5'- TGGGAGGAAGAACTTTCTAGT ATGAGAAAGGATAAGGGATGT AATGTTG-3' SeqA_BIP: 5'- TTGCTCAATTCCTTGTGTTTC GCAGGATTCACGATAGTAGAG TT -3' cebadores externos: SeqA_F3: 5'- AATAGTAAAGATGCTGAACTTC T -3'; SeqA_B3: 5'- ACTCTTGTGAGAGGTCGA -3'	SeqA: secuencia TR4-única	N.A.

Los nanosensores

Se denomina nanosensor a los dispositivos de nanoescala que permiten identificar moléculas, componentes biológicos o sustancias ambientales. Los nanosensores se caracterizan por su especificidad, rentabilidad, practicidad y sensibilidad, que son mayores en comparación a sus análogos de macroescala. En la actualidad, estos dispositivos permiten obtener datos cuantitativos o semicuantitativos lo que permite un mejor manejo de la información obtenida, gracias a que en su estructura cuentan con componentes biológicos de reconocimiento capaces de enlazarse y producir una señal determinada. En función del método de transducción de señal, los nanosensores se clasifican en: ópticos, electroquímicos, piezoeléctricos, piroeléctricos, electrónicos y gravimétricos (Damborský et al., 2016). De acuerdo con Sharma et al. (2021), la operación típica de un dispositivo nanosensor contiene tres componentes básicos:

1. Muestra preparada: consiste en una suspensión homogénea o heterogénea, que se encuentra en estado gaseoso, líquido o sólido, en dicha suspensión está presente el analito al que se dirige el nanosensor.
2. Agente de reconocimiento: las moléculas o elementos específicos del analito son reconocidos por anticuerpos, oligonucleótidos, aptámeros o enzimas catalíticas que tienen una elevada afinidad, especificidad y sensibilidad para los analitos en estudio.
3. Transducción de señales: La unión del analito con el agente de reconocimiento, produce una señal de reconocimiento que puede ser cuantificada para analizar los datos.

Aplicaciones de los nanosensores

De forma general, se puede identificar 6 áreas de aplicación de los nanosensores: en primer lugar, en salud, los nanosensores pueden utilizarse para realizar un diagnóstico rápido y eficaz de enfermedades, detección de drogas, patógenos dentro del organismo e investigación médica en general. En el ámbito de la seguridad y defensa, los nanosensores se pueden utilizar para detectar explosivos y potenciales armas químicas y biológicas. En medio ambiente, los nanosensores se usan para el monitoreo de contaminación en aire, agua y suelo y detección de gases traza en el ambiente (Kumar, 2018). En alimentación e industria, se utilizan en el control de calidad de productos para detectar patógenos o gases tóxicos. En microelectrónica, permiten la caracterización de dispositivos de nanoescala. En nanotecnología, los nanosensores se usan para caracterizar nanomateriales y nanoestructuras (Bogue, 2008).

Los nanosensores en la agricultura

Los nanosensores actualmente son herramientas pioneras en el monitoreo de las condiciones del suelo y de las plantas cultivadas, e incluso posteriormente en la cadena de producción, los nanosensores se utilizan para detectar residuos de patógenos y toxinas como pesticidas, medicamentos veterinarios y herbicidas, que pueden continuar presentes en los alimentos procesados (Abdel-Aziz & Heikal, 2021). Se considera que la nanotecnología, con los nanosensores, está aportando una de las herramientas más prometedoras para la agricultura, debido a que permite realizar un monitoreo en tiempo real, e incluso realizar predicciones del movimiento de contaminantes y patógenos en el ambiente (Chen & Yada, 2011), lo que potencialmente, permitiría mejorar el rendimiento de los cultivos, transformando la agricultura convencional, en agricultura de precisión (Chhipa & Joshi, 2016).

Entre las aplicaciones específicas de los nanosensores en la agricultura se pueden mencionar: el monitoreo de las condiciones del suelo, como humedad y pH; detección de pesticidas, insecticidas, herbicidas, fertilizantes, antibióticos, patógenos y metales pesados; monitoreo de fitohormonas relacionadas con el crecimiento de cultivos; detección de contaminantes en alimentos procesados y en condiciones de granja; nanosensores y sistemas inteligentes de transporte de recursos agrícolas, como agua, nutrientes y compuestos químicos; monitoreo en tiempo real del cambio de condiciones (Omanović-Miklićanin & Maksimović, 2016).

Capítulo 3: Metodología

Determinación de secuencias a incluir en el control positivo sintético (CPS)

A partir de una investigación bibliográfica, se seleccionaron los cebadores a ser utilizados para la detección de *Foc R4T*. Las secuencias complementarias de éstos cebadores, junto con las de otros patógenos de interés para el laboratorio IDgen, fueron integradas en un plásmido sintetizado para ser usado como control positivo (Anexo 1).

Para *Foc R4T* se seleccionaron los cebadores basándose en los protocolos de diagnóstico descritos en el Acuerdo Ministerial 142 del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, que establece el Plan Nacional de contingencia para la prevención, detección y control de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* Raza 4 Tropical (*Foc R4T*). En este documento se establecen 3 pares de cebadores que se pueden utilizar para la detección molecular, éstos surgen de las investigaciones de: Aguayo et al., 2017 (FWB-TR4 F: 5'-CGGTCTCGGCCAAATCTGATT-3', FWB-TR4 R: 5'-ACGACTTATCTAGCGGTTGATGTG-3'); Dita et al., 2010 (Foc TR4-F: 5'-CACGTTTAAGGTGCCATGAGAG-3', Foc TR4-R: 5'-GCCAGGACTGCCTCGTGA-3'); y Li et al., 2013 (W2987-F: 5'-TGCCGAGAACCACTGACAA-3', W2987-R: 5'-GCCGATGTCTTCGTCAGGTA-3'). De los tres pares de cebadores se seleccionaron dos utilizando la herramienta en línea Primer Blast para verificar la especificidad de los cebadores *in silico*, eligiendo a los de Aguayo et al., 2017 y Li et al., 2013.

Diseño del CPS

Para el diseño de la secuencia que contendrá los cebadores de identificación se usó la herramienta en línea: Benchling. Se tomó una secuencia no codificante originaria de *Mus*

musculus, con una longitud de 800pb y para propósito de esta investigación, se usó como base para insertar los demás cebadores de forma que se ubiquen a la misma distancia que lo harían en el patógeno original, pero sin contener sus genes como tal, concordando con el método descrito por Caasi et al., 2013. Los cebadores de Aguayo et al., 2017 generan un amplicón de 179 pb y los de Li et al., 2013 uno de 452 pb, según el autor, y 491 según la herramienta Primer Blast. Los cebadores descritos por Aguayo et al., 2017 son utilizados para una qPCR, por lo que fue necesario incluir una región interna para la unión de la sonda FWB-TR4 P (5'- ACCCTTCAACTCCACTC GATCGCA - 3'), además, la técnica descrita por los autores mencionan el uso de un control interno, para verificar que se trata de un hongo, por lo que usan cebadores dirigidos al gen 18s ribosomal: 18S uni F (5'- GCAAGGCTGAACTTAAAGGAA - 3'), 18S uni R: 5'- CCACCACCCATAGAATCAAGA - 3') y la sonda 18S uni P (5'- ACGGAAGGGCACCAC CAGGAGT - 3')

La secuencia de los cebadores forward y la sonda se mantuvieron tal y como se describen según sus autores, mientras que para los cebadores reverse se utilizó la secuencia de su complemento reverso para asegurar que se unirán correctamente durante el proceso de PCR y qPCR.

Cálculo de porcentaje de GC y temperatura de fusión (melting)

En el programa Serial Cloner y Benchling se introdujo la secuencia del plásmido completo y la secuencia diseñada y se verificó que el porcentaje de GC se encuentre entre un rango de 63 a 38% que es el porcentaje que presentan los hongos de acuerdo con Testa et al., 2016. En el mismo programa, se verificó que la temperatura de fusión (T_m) se encuentre bajo los 95°C, que es la temperatura a la que se realiza la desnaturalización del DNA.

Preparación de Células Competentes

Primero se puso en un bloque frío, tubos Eppendorf nuevos de 1.5 mL durante 10 min, y transferir a los tubos 1.5 mL de cultivo bacteriano de *Escherichia coli* enfriado previamente a -4°C y regresar el cultivo a esa temperatura una vez transferido. Se precipitó las células por centrifugación a 13000 g por 30 segundos y se removió el sobrenadante sin perturbar el pellet usando una pipeta de 100 µL. Luego se resuspendió el pellet con 1 mL de solución de CCMB80 cuidando de no pipetear sobre el sedimento celular y se incubó a -20°C por 10 min para luego centrifugar a 13000 g por 30 segundos. Después se removió el sobrenadante sin perturbar el pellet como se hizo anteriormente. El pellet se resuspendió en 200 µL de CCMB80 frío y se mantiene las células en este bloque frío hasta su uso.

Transformación por shock térmico y selección de colonias

Antes de iniciar se enfría los tubos Eppendorf nuevos por 5 min en el bloque frío. Se transfirió 50 µL de células competentes en los tubos y se añadió 2 µL de ADN plasmídico por cada reacción de transformación (50 µL) y en el control negativo se añadió 2 µL de agua DEPC. Se incubó a -20°C por 30 min, poniendo primero los tubos en el bloque frío y luego en el congelador. Luego se puso los tubos en baño María previamente calentado a 42°C por 30 segundos, lo que genera un shock térmico, y se incubó nuevamente a -20°C por 5 min. Después se añadió a cada tubo, 950 µL de medio SOC a temperatura ambiente y se incubó a 37°C por 90 min con agitación constante de 250 rpm, seguido, se centrifugó a 6800 g por 3 minutos, descartando 900 µL del sobrenadante, cuidando de no perturbar el pellet. A continuación, se resuspendió el pellet en los 100 µL restantes, se sembró este volumen en cajas petri con LB que contenía kanamicina, y se dejó incubar las células transformadas a 37°C

por 20 horas. Para verificar que las colonias transformadas contenían las secuencias de interés, se realizó una PCR colony de 3 de las colonias elegidas al azar.

Extracción de ADN

El ADN se extrajo con base en protocolo propuesto por Berrendero et al., 2008. En un tubo Eppendorf de 1.5 mL con 3 perlas de vidrio, se colocó 500 μ L de buffer de extracción (2,5% p/v CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris HCl pH 8) y 2 μ L de β -mercaptoetanol. Luego, se colocó 100 μ L de agua destilada estéril sobre el micelio del hongo y con ayuda de un bisturí se raspó la superficie de la caja para extraer el micelio y se colocó en el tubo Eppendorf. Con ayuda del vortex, se agitó y maceró vigorosamente la muestra durante alrededor de 2 minutos dos veces, hasta que el buffer cambie de color indicando que se pulverizó el tejido. Luego se incubó en baño maría a 60°C durante 30 min y se añadió cloroformo congelado. A continuación, se mezcló usando el vortex y se dejó reposar unos minutos para después centrifugar a 14 500 g por 10 min. Se recuperaron cuidadosamente 400 μ L de sobrenadante que se pusieron en un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril, para agregar un volumen igual (400 μ L) de etanol absoluto frío, además de 150 μ L de acetato de sodio 3 M y 300 μ L de etanol 70% filtrado, y se dejó precipitar toda la noche a -20°C. Los procedimientos del primer día se realizaron en mechero, mientras que los del segundo día, se hacen en cámara. Al día siguiente se centrifugó a 14 500 g por 17 min y se descartó el sobrenadante, el pellet resultante se lavó 2 veces con 200 μ L de etanol 70% que se descartaron por inversión y se dejó secar en la cámara de flujo laminar por 20 min. Luego, se agregó 25 μ L de agua DEPC y 1 μ L de RNasa y se incubó por 30 min a 37°C. Finalmente, se tomó 2 μ L de ADN y midió su concentración usando un Nanodrop, para luego almacenar el ADN a -20°C.

Selección de cebadores específicos a usar en el nanosensor

Para seleccionar el cebador para funcionalizar las nanopartículas se realizaron PCR que tenían por objetivo determinar la especificidad de los cebadores, probando con ADN del CPS, como control positivo, y *Foc R1*, *Fusarium equiseti* como controles negativos. Los cebadores que se probaron fueron los de Aguayo et al., 2017 (FWB-TR4 F: 5'-CGGTCTCGGCCAAATCTGATT-3', FWB-TR4 R: 5'-ACGACTTATCTAGCGGTTGATGTG-3'); y Li et al., 2013 (W2987-F: 5'-TGCCGAGAACCACTGACAA-3', W2987-R: 5'-GCCGATGTCTTCGTCAGGTA-3'). Para verificar el funcionamiento del CPS se realizó una qPCR de los cebadores de Aguayo et al., 2017 a las condiciones de termociclador mostradas en la tabla 1, y una PCR de punto final para los cebadores de Li et al., 2013, a las condiciones mostradas en la tabla 2.

Tabla 2

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

Región blanco	Desnaturalización inicial		Desnaturalización		Captación de fluorescencia		Extensión final	
	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T(°C)	t(min)
Gen hipotético (W2987)	95	10:00	95	00:10	60	0:40	40	0:10
18S ribosomal (control interno)	95	10:00	95	00:10	60	0:40	40	0:10

Tabla 3

Programación del termociclador para verificación y prueba de los cebadores de Li et al., 2013.

Región blanco	Desnaturalización inicial		Desnaturalización		Annealing		Extensión		Extensión final	
	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T(°C)	t(min)	T(°C)	t(min)	T(C)	t(min)
Gen hipotético W2987 de <i>Foc</i> R4T	95	3:00	95	0:40	55	0:40	72	1:00	72	10:00

Los criterios bajo los que se seleccionaron los cebadores finales fueron: especificidad de los cebadores, respaldo bibliográfico de su uso y concordancia de los datos bibliográficos y la prueba *in silico* usando Primer Blast. Los oligos tiolados basados en los cebadores de Aguayo et al., 2017 se mandaron a sintetizar en Macrogen en Corea.

Identificación molecular de los microorganismos controles

Se utilizaron muestras de patógenos del banano y del género *Fusarium* identificados previamente por la Escuela Politécnica del Litoral (ESPOL) por secuenciación de la región ITS (espaciador transcrito interno), estas muestras fueron: EC40, una cepa patógena, y CAV0, un hongo endófito. Se usó además una cepa catalogada como FocR1 por el grupo iGEM Ecuador. Los patógenos se sembraron inicialmente en medio PDB (Potato dextrose broth) suplementado con ampicilina (250 mg/L), y luego en medio PDA (Potato dextrose agar) que también tenía ampicilina en la misma concentración. Adicionalmente, se usó un control de un patógeno que no infecta al banano y que fue identificado por el laboratorio IDgen como: *Fusarium equiseti*, mediante la secuenciación de la región EF1 α (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha) y se sembró con el mismo proceso descrito anteriormente para los patógenos del banano.

Para la identificación de los patógenos del banano se hizo una PCR dirigida a la región EF1 α con los cebadores: EF1/EF2 descritos por Yang et al., 2020. La temperatura de annealing de los cebadores se ajustó a 59°C para mejorar la especificidad y se realizaron un total de 40 ciclos. Para *Fusarium equiseti* se usó una temperatura de annealing de 57°C y 35 ciclos. La integridad y calidad de los amplicones se verificó por electroforesis y enviaron a secuenciar por método Sanger en Macrogen Inc., Corea. Las secuencias obtenidas se limpiaron para eliminar los segmentos de mala calidad, y se alineó la secuencia forward y reverso para obtener una secuencia consenso que se ingresó en el programa en línea Blast de NCBI para hacer una búsqueda de homólogos.

Para asegurar que los microorganismos control eran *Foc R1*, se usó los cebadores W1805 F/R de Wu et al., 2019; FocR1 F/R de Thangavelu, et al., 2022; y PAL/PAR de Yang et al., 2020. Las condiciones de las PCR se muestran en la tabla 3. Cada PCR se realizó con 30 ciclos de extensión.

Tabla 4

Condiciones de PCR para los cebadores de identificación de Foc R1.

Autores	Desnaturalización inicial		Desnaturalización		Annealing		Extensión		Extensión final	
	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T(°C)	t(min)	T(°C)	t(min)	T(C)	t(min)
Wu et al., 2019	95	3:00	95	0:40	63	0:30	72	0:30	72	5:00
Thangavelu, et al., 2022	95	3:00	95	0:40	62	0:30	72	0:30	72	5:00
Yang et al., 2020	95	3:00	95	0:40	69	0:30	72	0:45	72	5:00

Preparación de nanopartículas

Siguiendo el protocolo descrito por Hill & Mirkin (2006), primero se preparó agua regia, que contiene 20 mL de 1N y 4.04 mL de HNO_3 (68% V/V). Para preparar 50 mL de HAuCl_4 (1 mM), se disolvió 0.017g de HAuCl_4 en 50 mL de agua ultra pura, esta solución se puso en la plancha de calentamiento para que hierva con agitación vigorosa. Luego, cuando la solución estaba bullendo, se agregó 5 mL de la solución citrato de sodio (38.8 mM). La solución contenía 0.05 g de citrato de sodio en 5 mL de agua ultra pura. Al agregar el citrato de sodio al HAuCl_4 existirán 4 etapas de cambio de color, pasando desde un amarillo inicial, a transparente, luego negro y finalmente rojo, llegado a este punto, se apaga la plancha de calor y se mantiene la agitación mientras se enfría la solución resultante que contiene las nanopartículas. Para verificar su presencia, se usó el Nanodrop, obteniendo un espectro de absorción a 525 nm, que corresponde a la longitud de absorción de las nanopartículas (NPs).

Reducción de oligonucleótidos tiolados

Se inicia resuspendiendo los oligonucleótidos en 220 μL de agua DEPC, y se tomaron 20 μL del oligonucleótido (equivalentes a 2 nmol). A continuación, se pone 100 μL de TCEP (PM: 286.65 g/mol) 10 nM disuelto en TE y se agita a temperatura ambiente por 60 min. Pasada la agitación se agregó 75 μL de Acetato de sodio 3M y 1 mL de etanol absoluto, luego se mezcló en el vortex y dejó incubar a -20°C por 20 min. Después se centrifugó a 13600 xg por 5 min, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet. Finalmente, se agregaron 500 μL de nanopartículas de oro y se agitaron en oscuridad durante 8 h (Hill & Mirkin, 2006).

Funcionalización de nanopartículas

De acuerdo con el protocolo descrito por Hill & Mirkin, (2006), primero es necesario hacer los buffers de ajuste de fosfatos, SDS 10% p/v y buffer de salado. Para preparar 50 mL de buffer de ajuste de fosfatos se agregó 0.331 g de K_2HPO_4 y 0.424 g de KH_2PO_4 , y se ajustó el pH a 7. Para el SDS 10% p/v, se puso 5 g de SDS en 45 mL de agua ultrapura, obteniendo un volumen total de 50 mL. En el caso del buffer de salado (2M), para preparar 10 mL, se puso 1.169 g de NaCl en 10 mL de PBS.

Para el proceso de funcionalización como tal, se agregó 49.5 μ L de buffer de ajuste de fosfatos y 0.5 μ L de agua DEPC a 500 μ L de nanopartículas de oro con los oligonucleótidos reducidos (2 nmol), obteniendo un volumen total de 550 μ L. Luego se puso 5.6 μ L de SDS 10% p/v y 4.4 μ L de agua DEPC, obteniendo 560 μ L en total, se agitó la mezcla por 30 min y agregó 10 μ L de agua DEPC y 5 μ L de buffer de salado cada 8 horas, un total de 6 veces (Hill & Mirkin, 2006).

Diseño experimental

Los experimentos se dividieron en dos repeticiones, en ambas existieron dos factores en estudio: la cantidad de ADN, ubicando 4 niveles: 12.5, 25, 50 y 100 ng, y el organismo: Control positivos sintético (CPS) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (*Foc* R1). La concentración de nanopartículas se considera estándar y dada por el método de síntesis de nanopartículas, siendo necesario verificar únicamente que sean detectables en el espectro de 525 nm usando un Nanodrop. Se establecieron los volúmenes de reacción como: 1 μ L de volumen de ADN en 25 μ L de volumen de nanopartículas (Tabla 3).

Tabla 5*Diseño experimental*

Volumen de PBS (μL)	9
Volumen de DNA (μL)	1
Volumen de NP (μL)	25
	12.5
Niveles de DNA (aproximados) (ng)	25
	50
	100
	10
Niveles de Tiempo (min)	20
	30
Organismos	<i>Foc R1</i>
	CPS

Durante la primera repetición se realizó un enmascaramiento con el fin de ser lo más objetivo posible ya que esta repetición se hizo de forma cualitativa a partir de una escala de coloración que determina hasta qué punto de coloración se considera un resultado positivo y negativo, y a partir de esa escala se determinó el cutoff de la prueba usando mediciones en el Nanodrop y un promedio de las medidas. La escala de coloración se hizo usando muestras blanco, es decir, muestras que en lugar de ADN contenían únicamente agua; el blanco también se usó en cada repetición y en cada una de las 5 réplicas que existió por repetición (Moirangthem et al., 2013). En la primera repetición se tomó en consideración un tercer factor, el tiempo: 10, 20 y 30 min, con el objetivo de encontrar el tiempo propicio para evaluar los resultados, ya que en bibliografía existen valores diferentes y no existe un consenso al respecto.

El valor de cutoff determinado en la primera repetición se usó en la segunda para evaluar de forma objetiva usando el Nanodrop. En función del valor de absorbancia medido se determinó si un resultado era negativo o positivo, catalogándose como positivo siempre que su valor sea mayor o igual al cutoff.

Hipótesis del Diseño experimental:

Factor: Organismo

Hipótesis nula: El organismo de la muestra utilizada: Control positivo sintético o *Foc R1*, no determinan que el resultado de la prueba de nanosensor sea positivo o negativo.

Hipótesis alternativa: En función del organismo utilizado, el resultado de la prueba de nanosensor es positivo o negativo.

Factor: Tiempo

Hipótesis nula: El resultado de la prueba de nanosensor no depende del tiempo en el que se haga la medida.

Hipótesis alternativa: El resultado de la prueba de nanosensor depende del tiempo en el que se haga la medida.

Factor: Cantidad de ADN

Hipótesis nula: La cantidad de ADN usada en la prueba de nanosensor no influye en los resultados obtenidos.

Hipótesis alternativa: El resultado de la prueba de nanosensor depende de la cantidad de ADN que se use.

Ensayo de hibridación con nanopartículas

Se usó el protocolo propuesto por Sattarahmady et al., 2015 que mencionan que en un tubo de PCR se debe colocar 1 μL de ADN del control positivo sintético y de *Foc R1*, el volumen añadido posee la cantidad de ácidos nucleicos evaluados, en este caso: 12.5, 25, 50 y 100 ng. Se añade 9 μL de PBS (pH 5) y se llevó el tubo al termociclador para realizar la desnaturalización del ADN a 96°C durante 5 min, inmediatamente, sin sacar los tubos del termociclador para evitar que se reduzca la temperatura, se añadió 25 μL de NP funcionalizadas y se incubaron por 10 min a 57°C. La temperatura de annealing se determinó usando TmCalculator (<https://tmcaculator.neb.com/>) y se verificó mediante PCR de punto final. El resultado se observó añadiendo 13 μL de HCl 0.1N y se determinó el resultado de forma colorimétrica luego de 15 minutos.

Determinación de especificidad y sensibilidad de la prueba

La sensibilidad y especificidad de la prueba se calcularon usando las ecuaciones 1 y 2 respectivamente y se compararon con el método gold standard para la detección de *Foc R4T*: la qPCR, descrita por Aguayo et al., 2017. De esta forma se obtuvo valores de sensibilidad y especificidad para cada nivel de concentración de ADN.

$$\text{Sensibilidad} = \left[\frac{TP}{TP+FN} \right] * 100\% \quad (1)$$

$$\text{Especificidad} = \left[\frac{TN}{TN+FP} \right] * 100\% \quad (2)$$

Donde:

TP: Verdadero positivo

TN: Verdadero negativo

Con fin de obtener un resultado más fidedigno, se estableció un intervalo de confianza de acuerdo a la variación entre los niveles de ADN utilizado. Finalmente, los resultados de la prueba se muestran según la ecuación 3.

$$IdC = \bar{x} \pm Z_{\alpha/2} \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Donde:

\bar{x} : valor medio de la sensibilidad y especificidad.

Z: coeficiente de confianza

α : nivel de confianza

σ : desviación estándar

n : tamaño muestral

Capítulo 4: Resultados

Determinación de secuencias a incluir en el control positivo sintético (CPS)

Usando la herramienta primer blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) se analizó *in silico* la especificidad de los cebadores de Aguayo et al., 2017 (FWB-TR4 F: 5'-CGGTCTCGGCCAAATCTGATT-3', FWB-TR4 R: 5'-ACGACTTATCTAGCGGTTGATGTG-3'); Dita et al., 2010 (Foc TR4-F: 5'-CACGTTTAAGGTGCCATGAGAG-3', Foc TR4-R: 5'-GCCAGGACTGCCTCGTGA-3'); y Li et al., 2013 (W2987-F: 5'-TGCCGAGAACCACTGACAA-3', W2987-R: 5'-GCCGATGTCTTCGTCAGGTA-3'). Los cebadores propuestos por Dita et al., 2010 se unen a *Fusarium verticillioides*, *Fusarium solani* y a las variedades de *Fusarium oxysporum* en general (Figura 3). Los cebadores propuestos por Li et al., 2013 se unen solo a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical (*Fusarium odoratissimum*), sin embargo puede crear dos productos de PCR, uno de 491 pb, que es el reportado por los autores, y otro de 105 pb (Figura 4). Los cebadores de Aguayo et al., 2017 muestran un solo producto de PCR exclusivo para *Foc* R4T (Figura 2). Debido a la falta de especificidad de los cebadores de Dita et al., 2010 se descartaron y se continuó solo con los de Li et al., 2013 y Aguayo et al., 2017.

Figura 2

Análisis in silico de los cebadores propuestos por Aguayo et al., 2017.

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	CGGTCTCGGCCAAATCTGATT	21	60.74	52.38	7.00
Reverse primer	ACGACTTATCTAGCGGTTGATGTG	24	60.73	45.83	6.00

Products on target templates

>NW_022158688.1 *Fusarium odoratissimum* NRRL 54006 unplaced genomic scaffold supercont1.2, whole genome shotgun sequence

product length = 179

```

Forward primer 1      CGGTCTCGGCCAAATCTGATT  21
Template       387345  ..... 387325

Reverse primer 1      ACGACTTATCTAGCGGTTGATGTG  24
Template       387167  ..... 387190

```

Figura 3

Análisis in silico de los cebadores propuestos por Dita et al., 2010.

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	CACGTTTAAGGTGCCATGAGAG	22	59.58	50.00	7.00
Reverse primer	GCCAGGACTGCCTCGTGA	18	61.70	66.67	4.00

Products on target templates

>XM_018901510.1 *Fusarium verticillioides* 7600 DNA repair protein rhp54 (FVEG_12162), mRNA

product length = 433

Reverse primer	1	GCCAGGACTGCCTCGTGA	18
Template	2615	...CC..A.....	2598

Reverse primer	1	GCCAGGACTGCCTCGTGA	18
Template	2183	AGA.....T.....T	2200

>XM_046269719.1 *Fusarium solani* uncharacterized protein (B0J15DRAFT_282310), mRNA

product length = 66

Reverse primer	1	GCCAGGACTGCCTCGTGA	18
Template	1646	TGT..C.....C	1629

Reverse primer	1	GCCAGGACTGCCTCGTGA	18
Template	1581	C...TCC.....	1598

>XM_031172275.1 *Fusarium oxysporum* NRRL 32931 uncharacterized protein (FOYG_00035), mRNA

product length = 1968

Reverse primer	1	GCCAGGACTGCCTCGTGA	18
Template	2069	T.GTC.C.....	2052

Reverse primer	1	GCCAGGACTGCCTCGTGA	18
Template	102	CA.GA....C.....	119

Figura 4

Análisis in silico de los cebadores propuestos por Li et al., 2013.

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	TGCCGAGAACCACTGACAA	19	59.17	52.63	3.00
Reverse primer	GCCGATGTCTTCGTCAGGTA	20	59.55	55.00	5.00

Products on target templates

>NW_022158688.1 *Fusarium odoratissimum* NRRL 54006 unplaced genomic scaffold supercont1.2, whole genome shotgun sequence

product length = 491

Forward primer	1	TGCCGAGAACCACTGACAA	19
Template	387594	387576

Reverse primer	1	GCCGATGTCTTCGTCAGGTA	20
Template	387104	387123

>NW_022158895.1 *Fusarium odoratissimum* NRRL 54006 unplaced genomic scaffold supercont1.209, whole genome shotgun sequence

product length = 105

Forward primer	1	TGCCGAGAACCACTGACAA	19
Template	329	..GAT....G.....C.	347

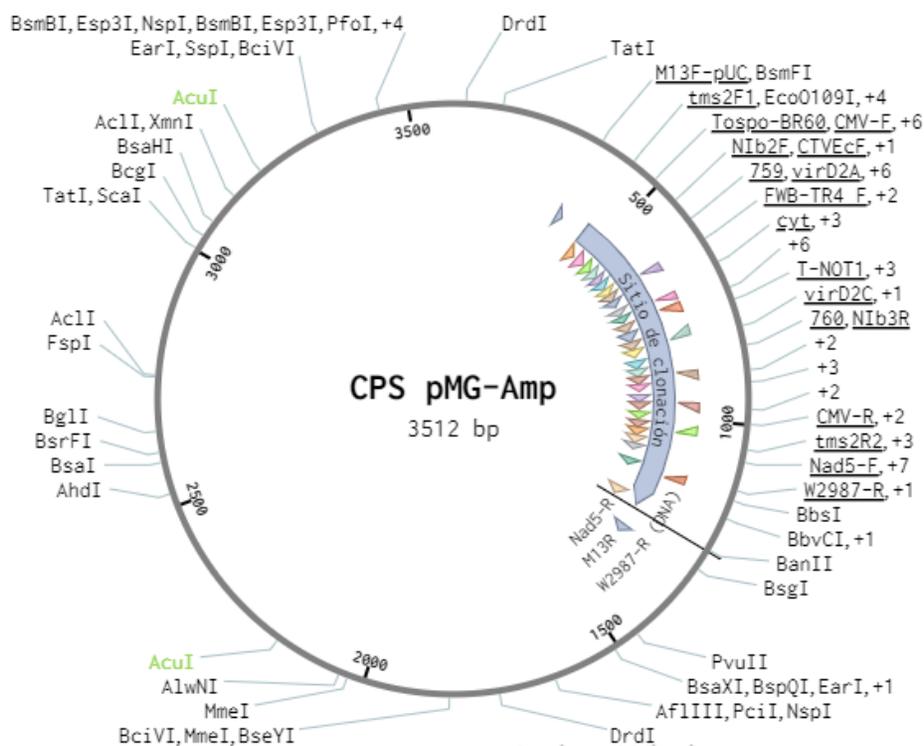
Reverse primer	1	GCCGATGTCTTCGTCAGGTA	20
Template	433	..A.G..G.....C.	414

Diseño del CPS

Identificadas las regiones de reconocimiento para los cebadores mostrados en el Anexo 1 se diseñó el plásmido para el CPS y se introdujo estas secuencias en el backbone pMG-Amp de MacroGen. El mapa del plásmido resultante se muestra en la figura 5. En el plásmido se incluyeron los sitios de reconocimiento para los cebadores de Aguayo et al., 2017, lo que incluye los cebadores de control interno: 18s uni, que se usan para determinar hongos en general, y los cebadores FWB TR4 que se usan para detectar específicamente a *Foc R4T* mediante qPCR, por lo que además de los cebadores delanteros y reversos, se incluye una sonda TaqMan. También se incluyó los cebadores de Li et al., 2013 que también se usan para identificar a *Foc R4T* mediante PCR de punto final.

Figura 5

Mapa del plásmido CPS pMG-Amp



Para verificar que los cebadores no se unirán en otras regiones del mismo plásmido se usó la herramienta “Check Specificity” de Benchling, que busca en la secuencia regiones complementarias a los cebadores y que puede generar más de un amplicón. En este análisis se estableció que no existan más de 3 desajustes (mismatches) con una temperatura de fusión (melting) sobre 48°C y bajo 100°C. El resultado se muestra en la figura 6 y se observa que efectivamente, los cebadores se unen solo en un solo sitio (el diseñado inicialmente).

Figura 6

Análisis de secuencias complementarias a los cebadores.

Primers Search Results Sort by Name ▾

<input type="checkbox"/>	Primer	Nucleotide Type	Position	T _m	Bases ⓘ
<input type="checkbox"/>	18S uni F	DNA	+ / 906	53.6°C	5' GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAA 3'
<input type="checkbox"/>	18S uni R	DNA	- / 1014	53.3°C	5' CCACCACCCATAGAATCAAGA 3'
<input type="checkbox"/>	18s uni P	DNA	+ / 981	63.9°C	5' ACTCCTGGTGGTGCCTTCCGT 3'
<input type="checkbox"/>	FWB-TR4 F	DNA	+ / 643	57.0°C	5' CGGTCTCGGCCAAATCTGATT 3'
<input type="checkbox"/>	FWB-TR4 R	DNA	- / 779	56.7°C	5' ACGACTTATCTAGCGGTTGATG TG 3'
<input type="checkbox"/>	Sonda FWB-TR4 P	DNA	+ / 747	61.8°C	5' TGCGATCGAGTGGAGTTGAAGG GT 3'
<input type="checkbox"/>	W2987-F	DNA	+ / 716	55.7°C	5' TGCCGAGAACCACTGACAA 3'
<input type="checkbox"/>	W2987-R	DNA	- / 1130	56.0°C	5' GCCGATGTCTTCGTCAGGTA 3'

Finalmente se realizó PCR *in silico* con los cebadores delanteros y reversos para verificar la longitud de los amplicones y la especificidad de unión. Los resultados se muestran en la figura 7.

Figura 7

PCR in silico de los cebadores evaluados.

Primer	Position	Product Size
W2987-F	+ / 716	452
W2987-R	- / 1130	
FWB-TR4 F	+ / 643	180
FWB-TR4 R	- / 779	
18S uni F	+ / 906	150
18S uni R	- / 1014	

Cálculo del porcentaje de GC y temperatura de fusión (melting) del plásmido CPS pMG-Amp

El porcentaje de GC del plásmido CPS pMG-Amp es de 50.1% y su temperatura de fusión (Melting Temp o Tm) es de 80.3°C, verificado en Serial Cloner y Benchling (Figura 8).

Figura 8

Resultados del cálculo de porcentaje de GC y temperatura de fusión.

A	LENGTH 3512 GC 50.09% MELTING TEMP 80.3 °C
B	Selected DNA Tm: 80,3 A: 880 C: 873 G: 886 T: 873 %GC: 50,1%

Nota: a) Resultados usando Benching. b) Resultados usando Serial Cloner.

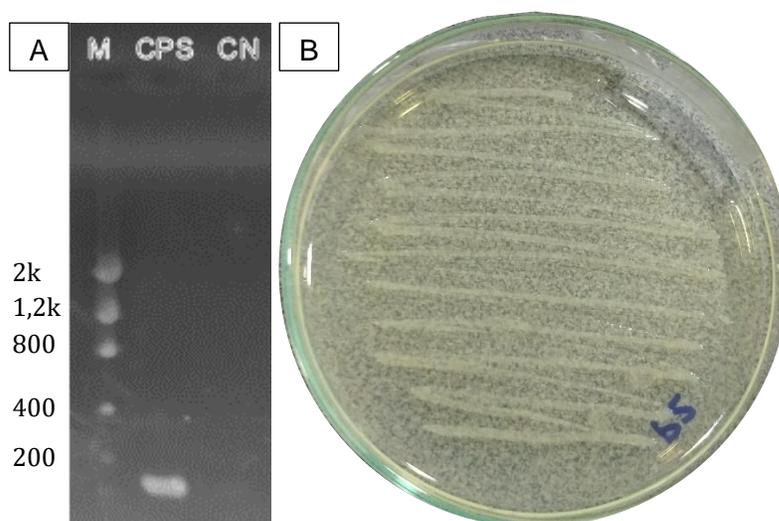
Obtención del CPS

Una vez realizado el protocolo de transformación las células transformadas se sembraron en agar LB con 200 mg/L de ampicilina, y se observó que en todas las cajas existió crecimiento, a excepción de la caja de control negativo. Para verificar que las células estaban correctamente transformadas, se realizó una PCR colony con los cebadores delanteros y

reversos FWB TR4 de Aguayo et al., 2017 observando que efectivamente las células contenían el plásmido con las regiones de complementarias a los cebadores (Figura 9A). Con la formación de colonias aisladas se tomó una de ellas y sembró nuevamente en un nuevo medio agar LB con 200 mg/L de ampicilina (Figura 9B) para realizar luego su criopreservación.

Figura 9

Obtención del control positivo sintético (CPS).



Nota: a) Electroforesis de PCR colony con cebadores delantero y reverso FWB TR4 de Aguayo et al., 2017. b) Cultivo de colonia transformada en agar LB con 200 mg/L de ampicilina. M: marcador. CPS: control positivo sintético. CN: control negativo

Identificación de microorganismos control negativo

Usando la herramienta BLAST de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se determinó que todas las muestras de control negativo eran *Foc R1*. Para la muestra *FocR1* de iGEM Ecuador, existió un 99.92% de identidad, para las muestras de la ESPOL: EC40 existió un porcentaje de 99.57% de identidad y para la muestra CAV0 99.78% de identidad (Tabla 5).

Para la muestra FE (*Fusarium equiseti*) no se realizó la secuenciación porque había sido identificada recientemente por IDgen como *F. equiseti* usando un amplicón con los mismos cebadores de la región EF1 α .

Tabla 6

Identificación de los microorganismos control negativo.

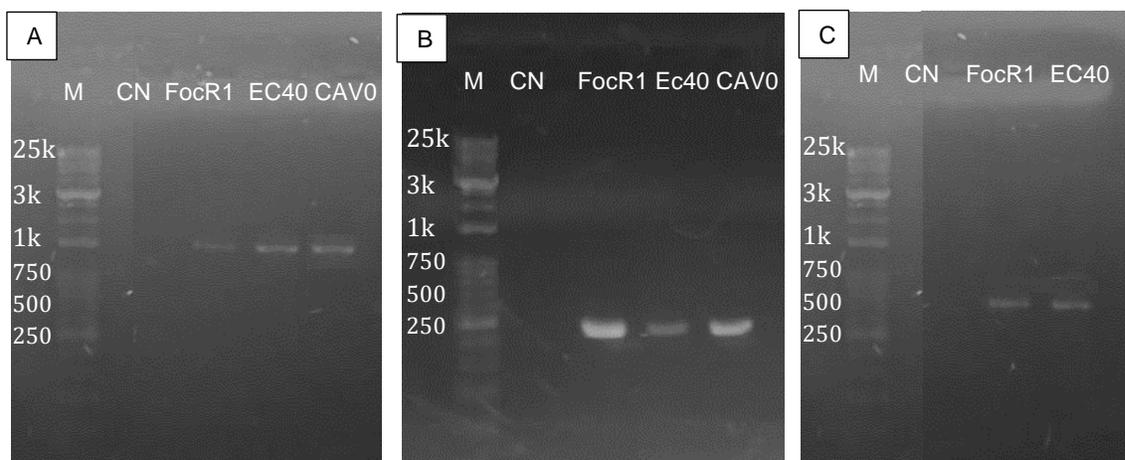
Muestra	Longitud del amplicón	Resultado	Accesión	Puntuación total	Cobertura de secuencia blanco	% identidad
FocR1 iGEM	923	<i>Foc R1</i>	JAEMVU 010000008.1	1754	100%	99.92%
EC40	936	<i>Foc R1</i>	JAEMVU 010000008.1	1707	100%	99.57%
CAV0	928	<i>Foc R1</i>	AMGP 01000659.1	1700	100%	99.78%

Usando los cebadores W1805 F/R de Wu et al., 2019; FocR1 F/R de Thangavelu, et al., 2022; y PAL/PAR de Yang et al., 2020 se obtuvo los resultados mostrados en la figura 10.

Todas las muestras amplificaron para cada primer específico.

Figura 10

Electroforesis de las PCR con los cebadores específicos para Foc R1.



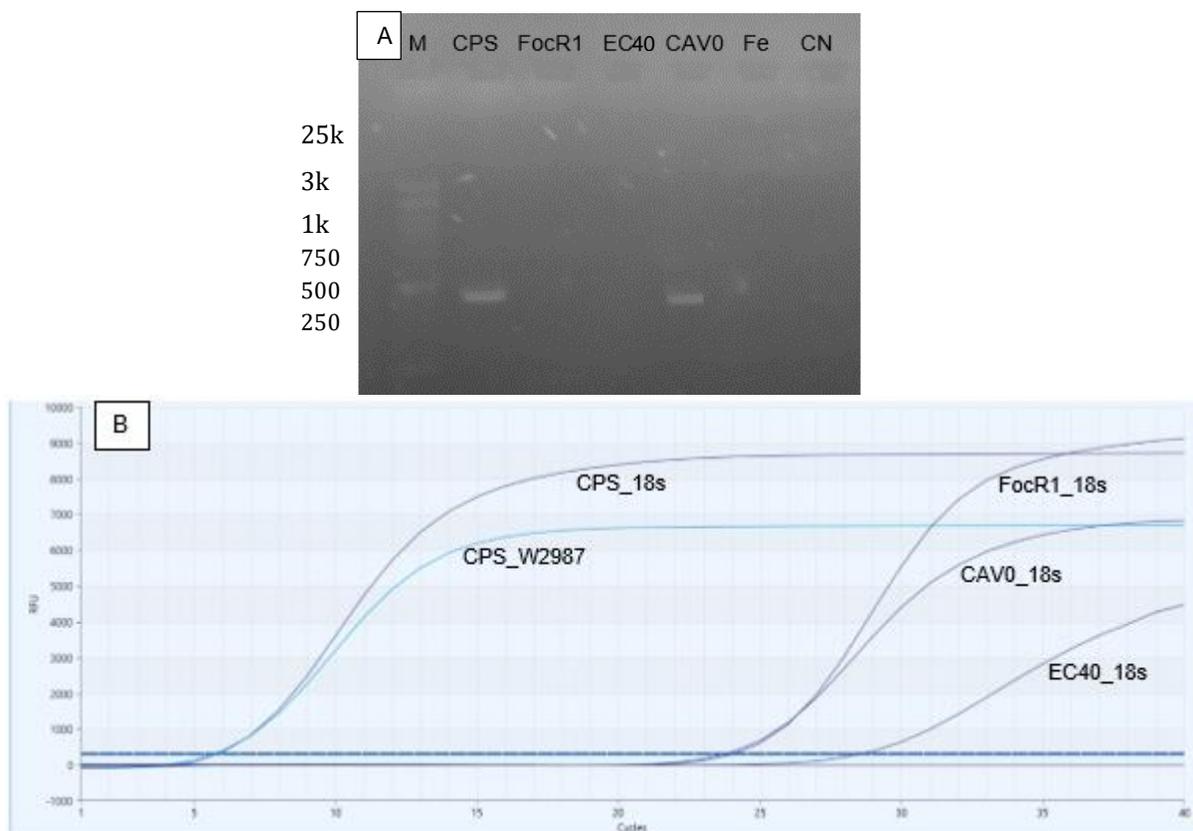
Nota: a) cebadores de Wu et al., 2019; b) cebadores de Thangavelu, et al., 2022; c) cebadores de Yang et al., 2020. M: Marcador; PS: control positivo sintético; FocR1: *Foc R1* de iGEM Ecuador; EC40: *Foc R1* endófito; CAV0: *Foc R1* patógeno; CN: Control negativo.

Selección de cebadores específicos a usar en el nanosensor

Para decidir cuál de los cebadores se usaría en las nanopartículas se realizó PCR punto final con los cebadores de Li et al., 2013 y una qPCR para los cebadores de Aguayo et al., 2017. Los resultados de la PCR se muestran en la figura 12A y los de la qPCR en la figura 11B.

Figura 11

Selección por PCR y qPCR de cebadores a utilizar en el nanosensor.



Nota: a) Electroforesis de PCR punto final con los cebadores de Li et al., 2013. b) qPCR con los cebadores de Aguayo et al., 2017. M: Marcador; CPS: control positivo sintético; FocR1: *Foc R1* de iGEM Ecuador; EC40: *Foc R1* endófito; CAV0: *Foc R1* patógeno; Fe: *Fusarium equiseti*; CN: Control negativo.

Como se observa en la figura 11B, la PCR de punto final que se hizo con los cebadores de Li et al. (2013) amplificaron también la muestra CAV0, que es una muestra de *Foc R1*, es decir, estos cebadores pueden tener una reacción cruzada con *Foc R1*, por lo que no son completamente específicos para *Foc R4T*. Los cebadores de Aguayo et al. (2017) solo amplificaron la muestra CPS por lo que éstos se utilizan para funcionalizar las nanopartículas.

Resultados del diseño experimental

En la primera réplica del experimento, se tomó en consideración tres factores: el microorganismo (*Foc R1* y CPS), el tiempo (10, 20 y 30 min) y la cantidad de ADN (12.5, 25, 50 y 100 ng). Este primer ensayo fue segado y tuvo dos objetivos: establecer la escala de colores a partir de la cual se considera un resultado como positivo o negativo (cutoff) y determinar el tiempo propicio para realizar las mediciones.

En primer lugar se debía establecer si los factores influyen significativamente en los resultados, para ello se hizo un ANOVA multifactorial, de donde se observa que el tipo de organismo influye significativamente (p value: <0.0001), al igual que el tiempo (p value: 0.0382), sin embargo la cantidad de ADN no demuestra ser significativa (p value: 0.9210), como se observa en la tabla 6.

Tabla 7

ANOVA de tres vías: Organismo, Tiempo y Cantidad de ADN.

Factor	F	p value
Tiempo	3.38	0.0382
Organismo	32.40	<0.0001
Cantidad de ADN	0.16	0.9210

Como el objetivo de esta primera repetición era determinar el tiempo propicio para realizar las medidas, se procedió a hacer ANOVAs en cada uno de los tiempos para observar en cuál de ellos existe mayor valor de significancia, observando que esto ocurre en el minuto 20 (p value: 0.0001) como se puede observar en la tabla 7. Adicionalmente, se verifica que la cantidad de ADN no es significativa. Conociendo que los resultados obtenidos son discretos se hizo el análisis no paramétrico de Kruskal Wallis y se verificó que el organismo y el tiempo tienen diferencias significativas (p value: <0.0001), como se ve en la figura 12.

Tabla 8

ANOVAs en los tiempos: 10, 20 y 30 min.

Tiempo	Factor	F	p value
10 min	Organismo	7.54	0.0098
	Cantidad de ADN	0.15	0.9264
20 min	Organismo	18.62	0.0001
	Cantidad de ADN	0.56	0.6426
30 min	Organismo	8.53	0.0064
	Cantidad de ADN	0.11	0.9564

Figura 12

Prueba Kruskal Wallis para los resultados de la primera repetición.

Variable	Organismo	Tiempo	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Resultado CPS		10	20	0,95	0,22	1,00	22,44	<0,0001
Resultado CPS		20	20	0,95	0,22	1,00		
Resultado CPS		30	20	0,75	0,44	1,00		
Resultado Foc R1		10	20	0,60	0,50	1,00		
Resultado Foc R1		20	20	0,40	0,50	0,00		
Resultado Foc R1		30	20	0,30	0,47	0,00		

Nota: Análisis de la influencia del tiempo y organismo. Obtenido de Infostat.

Aplicando la prueba de Duncan para determinar la distribución por grupos de los resultados en el minuto 20, se observa que el nivel de 50 ng del CPS se encuentra estrechamente relacionado (sin diferencias significativas), con los resultados de *Foc R1* (Figura 13). Algo similar ocurre con el nivel de 12.5 ng para *Foc R1*, que se ubica en el grupo del CPS.

Figura 13

Prueba de Duncan para los resultados a 20 min.

Organismo	Concentración de ADN (ng)	Medias	n	E.E.	
Foc R1	25,00	0,20	5	0,18	A
Foc R1	50,00	0,40	5	0,18	A B
Foc R1	100,00	0,40	5	0,18	A B
Foc R1	12,50	0,60	5	0,18	A B C
CPS	50,00	0,80	5	0,18	B C
CPS	12,50	1,00	5	0,18	C
CPS	25,00	1,00	5	0,18	C
CPS	100,00	1,00	5	0,18	C

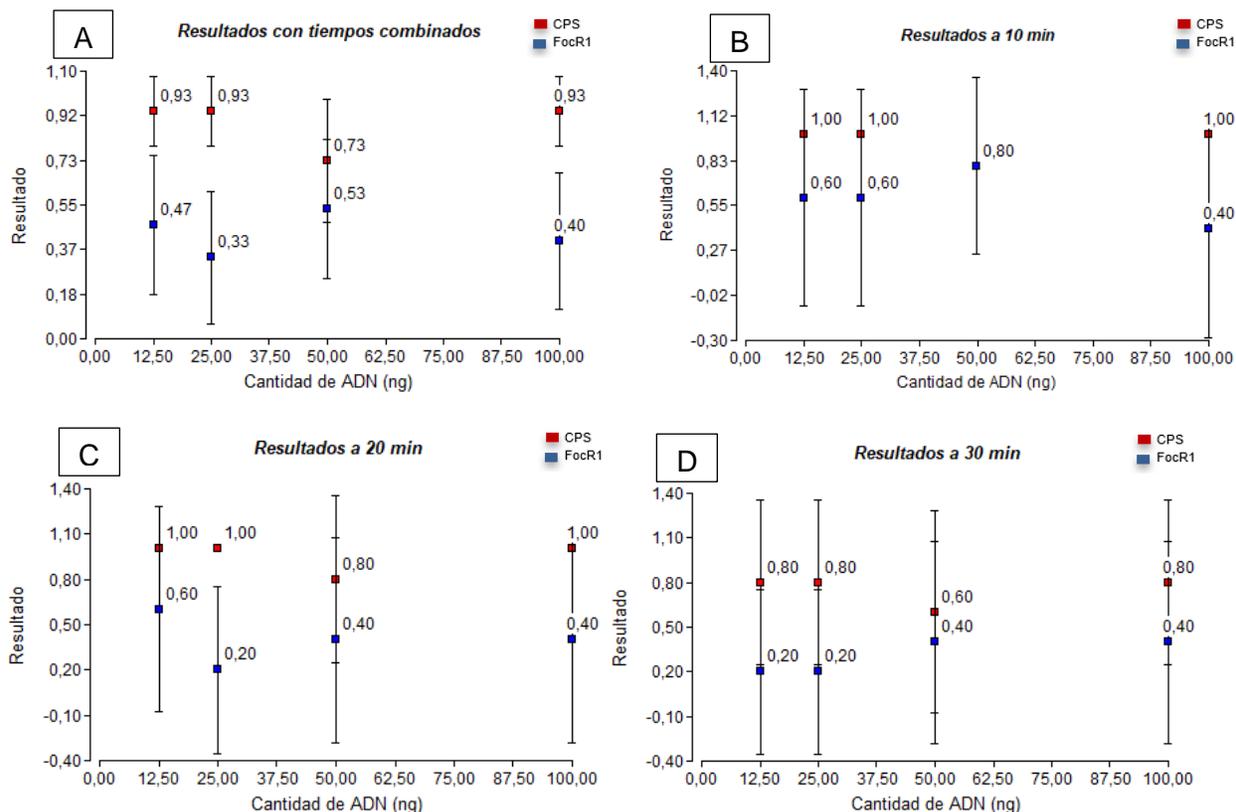
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Nota: Factores considerados en el análisis: Organismo y cantidad de ADN. Obtenido de Infostat.

En general, en la primera observación se evidencia que el tipo de organismo y el tiempo de medición influyen directamente en los resultados, como se aprecia en la figura 14A. Donde se ve que en la gráfica general, sin distinción del tiempo, existe diferencias significativas entre organismo, y en la figura 15B-D el tiempo donde existe mayores diferencias significativas es a los 20 min.

Figura 14

Gráficas de dispersión de puntos para resultados de la primera repetición.



Nota: Intervalos de confianza de 95%. a) Resultados con todos los tiempos combinados. b) Resultados a 10 min. c) Resultados a 20 min. d) Resultados a 30 min.

Con la primera repetición se calculó valores de sensibilidad y especificidad (tabla 8) Observando que en el minuto 20 existe mejores valores de sensibilidad, porque en los niveles de 100, 25 y 12,5 ng de ADN, las pruebas son 100% sensibles. Aunque a los 30 min los valores de especificidad mejoran, la sensibilidad se reduce. Se concluye que debido a los resultados del ANOVA, además de los valores de sensibilidad y por motivos logísticos (un tiempo de espera reducido para observar los resultados) se concluye que el mejor tiempo es 20 min.

Tabla 9

Resultados de sensibilidad y especificidad de la prueba en la primera repetición.

Organismo	Valor	Cantidad de ADN (ng)	Tiempo		
			10 min	20 min	30 min
Control positivo sintético	Sensibilidad	12,5	100%	100%	80%
		25	100%	100%	80%
		50	80%	80%	60%
		100	100%	100%	80%
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense raza 1	Especificidad	12,5	40%	40%	80%
		25	40%	80%	80%
		50	20%	60%	60%
		100	60%	60%	60%

Para determinar el cutoff se hizo pruebas con nanopartículas que no contenían ADN (blanco) y se midió la absorbancia a 525nm exactamente en el umbral cualitativo hasta el cual se considera positivo un resultado (Figura 16), obteniendo valores cuyo valor promedio es de 0.100, considerando la desviación estándar se terminó fijando el valor cutoff en el promedio más dos desviaciones estándar, alcanzando un valor de 0.115 (tabla 9).

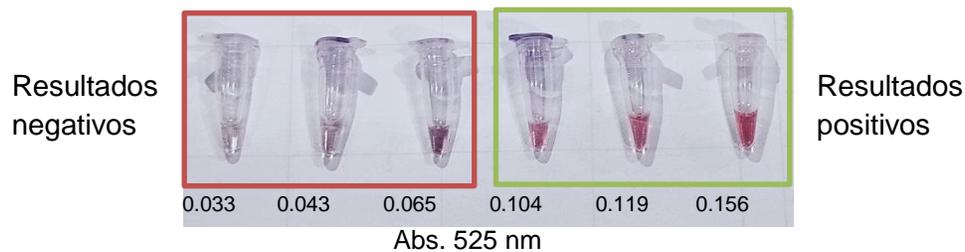
Tabla 10.

Cálculo del cutoff de absorbancia

Muestra	Abs
Blanco	0,111
	0,092
	0,095
	0,104
	0,098
Promedio	0,100
Desviación estándar	0,007
Cutoff	0,115

Figura 15

Escala de color de los ensayos cualitativos.



Con el análisis de la primera repetición, se estableció los criterios para determinar los resultados en la segunda repetición. Se midió la absorbancia en Nanodrop a los 20 minutos de haber colocado el ácido y todo resultado con un valor de absorbancia mayor o igual a 0.115 se considera positivo (cutoff). Con los resultados de absorbancia se hizo un ANOVA, encontrando que existe diferencia significativa entre los organismos (p value: 0.0028), pero no entre las cantidades de ADN (p value: 0.0672); sin embargo, si se fija una significancia de 10%, se puede asumir que las cantidades de ADN realmente son significativas (tabla 11). Visualmente se observa que las diferencias en las longitudes de onda son significativas a excepción del nivel de 50 ng de ADN (Figura 17).

Figura 16.

Resultados de la segunda repetición, primera replica.

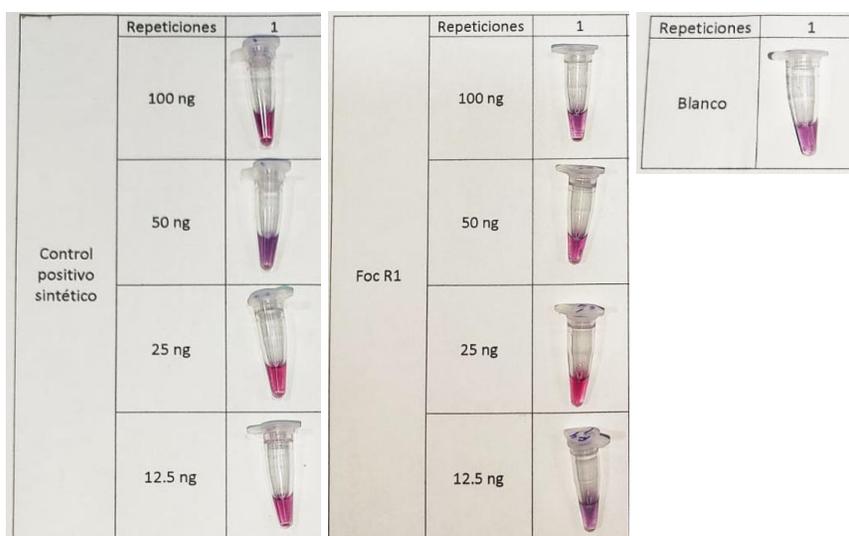


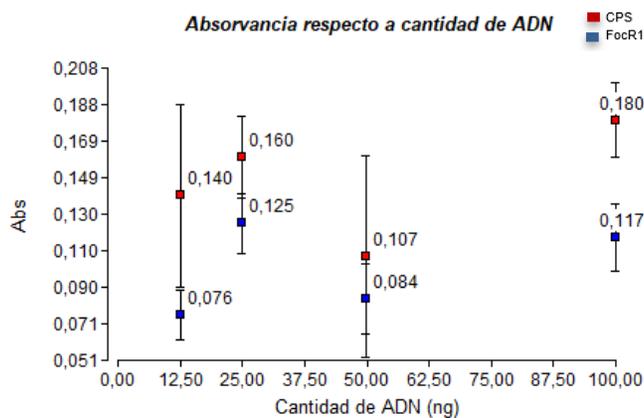
Tabla 11

ANOVA de dos vías: Organismo y Cantidad de ADN, para la variable absorbancia.

Factor	F	p value
Organismo	10.49	0.0028
Cantidad de ADN	0.16	0.0672

Figura 17

Gráfico de dispersión de puntos para la absorbancia



Nota: Absorbancia respecto a la cantidad de ADN considerando un intervalo de confianza de 95%.

Realizando una prueba de Duncan con los resultados de absorbancia se aprecia que el nivel de 50 ng de ADN es el que se diferencia más de los demás niveles, porque está solo en el grupo A, mientras que el nivel 12.5 está en dos grupos, el A y B (Figura 18).

Figura 18

Prueba de Duncan de la absorbancia en la segunda repetición

Concentración de ADN	Medias	n	E.E.	
50,00	0,10	10	0,02	A
12,50	0,12	10	0,02	A B
100,00	0,15	10	0,02	B
25,00	0,15	10	0,02	B

Con el fin de determinar la significancia de la cantidad de ADN aislando cada organismo: CPS o *Foc R1* se hicieron dos nuevos ANOVAs separando cada organismo y considerando como único factor la cantidad de ADN obteniendo los resultados de la Tabla 12, donde se evidencia que realmente no existe diferencias significativas.

Tabla 12

ANOVAs del factor: cantidad de ADN, separando los organismos: CPS y Foc R1.

Organismo	Factor	F	p value
CPS	Cantidad de ADN	1.67	0.2133
Foc R1	Cantidad de ADN	1.49	0.2548

A continuación, se hizo un nuevo análisis ANOVA de los resultados discretos de la segunda repetición que se sumaron con los obtenidos en la primera repetición, encontrando que no existe diferencia significativa entre repeticiones ni entre concentraciones de ADN, pero si existe diferencia significativa entre los organismos (p value: <0.0001) (tabla 13, Figura 19A). Estos resultados se verificaron no paramétricamente usando Kruskal Wallis y se obtuvo que realmente la diferencia entre organismos es significativa con un p value de 0.0380 (Figura 19B).

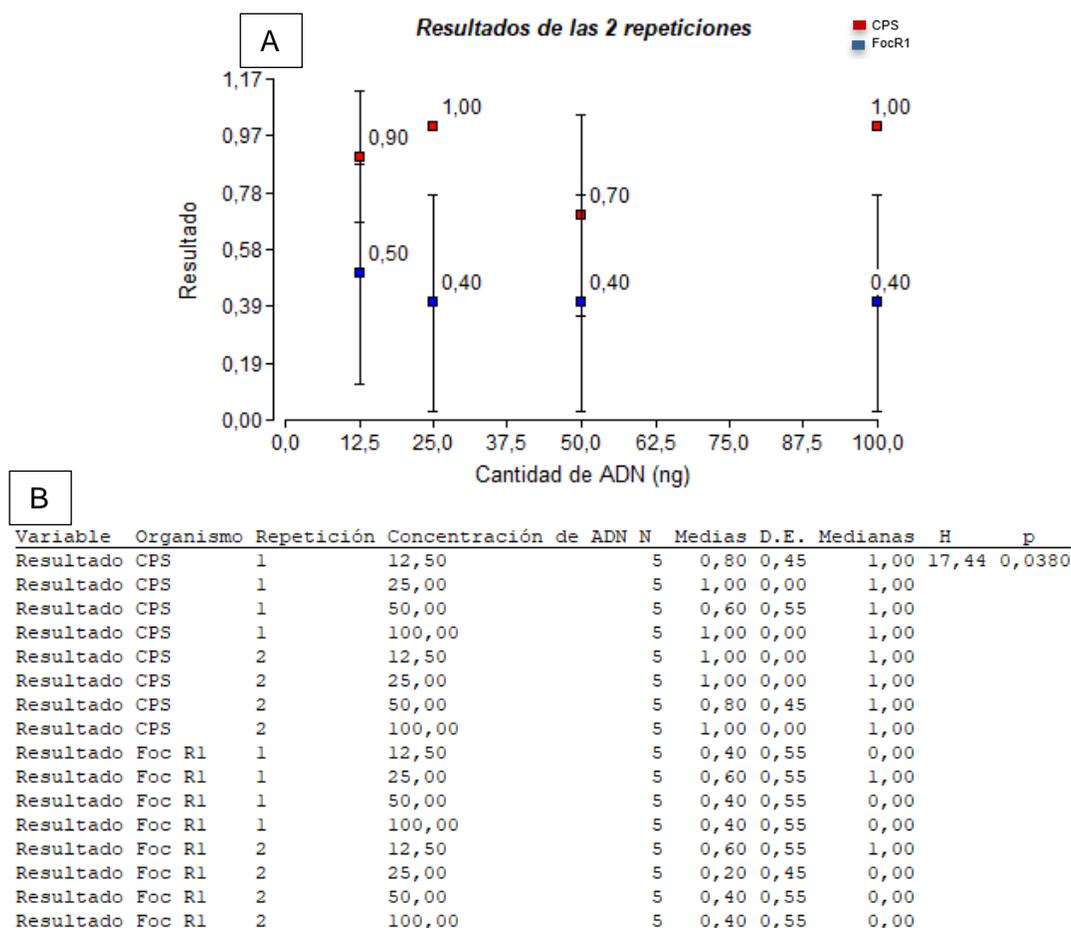
Tabla 13

ANOVA de tres vías: Repetición, Organismo y Cantidad de ADN.

Factor	F	p value
Repetición	0.07	0.7971
Organismo	24.07	<0.0001
Cantidad de ADN	0.60	0.6174

Figura 19

Resultados del análisis de las dos repeticiones.



Nota: a) Gráfico de dispersión de puntos para los resultados de las dos repeticiones con un intervalo de confianza de 95%. b) Prueba Kruskal Wallis para los resultados de las dos repeticiones.

Finalmente, tomando en consideración las dos repeticiones se determinó nuevamente la sensibilidad y especificidad de la prueba, lo que se muestra en la tabla 14. El nivel de ADN de 100ng es el que muestra valores más altos de sensibilidad y especificidad, de 100% y 70%, respectivamente. Dado que se demostró que en general, la cantidad de ADN no influye en los

resultados, se establece un intervalo de confianza de 95% para la sensibilidad y especificidad, obteniendo valores de: $90.00 \pm 13.86\%$ y $65.00 \pm 5.66\%$, respectivamente.

Tabla 14

Sensibilidad y especificidad de la prueba para las 2 repeticiones.

Organismo	Característica	Cantidad de ADN (ng)	Valor
Control positivo sintético	Sensibilidad	12,5	90.00%
		25	100.00%
		50	70.00%
		100	100.00%
		Intervalo de conf. (95%)	$90.00 \pm 13.86\%$
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 1	Especificidad	12,5	60.00%
		25	60.00%
		50	70.00%
		100	70.00%
		Intervalo de conf. (95%)	$65.00 \pm 5.66\%$

Capítulo 5: Discusión

En la primera etapa de este trabajo, se utilizó la herramienta primer- BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para seleccionar dos pares de cebadores con los que continuar trabajando. Primer- BLAST del NCBI es ampliamente utilizada en el diseño y análisis *in silico* de cebadores preexistentes, porque cuenta con acceso a 6 bases de datos bastante robustas: Refseq mRNA, Refseq representative genomes, Genomes for selected organisms, nr, Refseq RNA, y Custom. Esta herramienta funciona combinando BLAST con un algoritmo de alineación global para garantizar un alineamiento completo entre el cebador y el objetivo, además de que es altamente sensible porque puede detectar objetivos que tienen un número significativo de diferencias con respecto a los cebadores (Ye et al., 2012). Por lo tanto, los resultados del análisis realizado con esta herramienta se ven justificados por la robustez de las bases de datos y su continua actualización de información.

Foc R4T es un patógeno altamente peligroso para la seguridad alimentaria y económica del Ecuador, pero aún no está presente en el país, por lo que no se puede disponer de este microorganismo como control positivo. Los controles positivos son de gran importancia para aportar confiabilidad a las PCR, sin embargo, tener un microorganismo como control positivo puede resultar peligroso en caso de representar un riesgo de bioseguridad (Caasi et al., 2013). Actualmente, los laboratorios de diagnóstico molecular necesitan de este tipo de controles para dar confiabilidad a los diagnósticos, sin embargo, existe temor general por su posible uso en bioterrorismo, por lo que se toman medidas que endurecen los controles de importación y exportación (Smith et al., 2006). Es en este punto donde cobra importancia el diseño y uso de controles positivos sintéticos o artificiales porque precisamente ayudan a evitar el riesgo de bioseguridad (Caasi et al., 2013). El material de control puede ser ADN o ARN sintético que se

utiliza para PCR convencionales o qPCR con sondas TaqMan (Smith et al., 2006) como en este caso.

En la presente tesis se diseñó el plásmido CPS pMG-Amp que usa como backbone el plásmido pMG-Amp de MacroGen, que en su estructura cuenta con tres regiones fundamentales: el Origen de replicación, un gen de resistencia a ampicilina y el gen *lacZ α* (<https://dna.macrogen.com/ces/order/geneVectorAmpMapPopup.do>) que se usa para discriminar visualmente las células que han sido transformadas, porque cuando se expresa por completo este gen se genera la β -galactosidasa capaz de escindir el X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -d-galactopiranosido) y las colonias toman una coloración azul (Green & Sambrook, 2019); en las células transformadas y que tienen el gen de interés, en este caso las regiones de reconocimiento para los cebadores, se espera que la enzima β -galactosidasa no se exprese porque entre el gen *lacZ α* se encuentra la región de clonación del ADN de interés. En este trabajo, como el fabricante MacroGen es el encargado de introducir el gen de interés en la región de clonación, se seleccionó las colonias transformadas usando únicamente ampicilina como marcador de resistencia y para verificar la presencia de la región de reconocimiento para los cebadores se usó la PCR colony.

El cálculo del porcentaje de GC y temperatura de fusión del plásmido CPS pMG-Amp se realizó con el fin de verificar que, en el caso del porcentaje de GC se encuentre en el rango natural de los hongos que, de acuerdo con Testa et al., 2016, está entre 63 a 38%, en este caso el porcentaje de GC se encontró en 50.1% por lo que se cumple con este requisito. La temperatura de fusión del plásmido se verificó para poder asegurar que se encuentra bajo los 95°C, que es la temperatura de desnaturalización del DNA, un paso primordial para que todas las pruebas: PCR y nanosensores, funcionen correctamente.

Para clonar el plásmido CPS pMG-Amp y con el fin de salvaguardar la integridad de las personas, se usó la cepa no patogénica TOP10 de *E. coli*, la cual presenta una alta eficiencia de transformación y es resistente a estreptomicina, por lo que se utiliza ampliamente para hacer la clonación y propagación de plásmidos, porque permite una replicación estable de este material genético (Invitrogen, 2015). Las células TOP10 se encuentran patentadas por Invitrogen, sin embargo, se sabe que el genotipo de estas células es similar a la cepa DH10B de *E. coli* y que ambas se encuentran emparentadas con la cepa no patogénica K-12 (Invitrogen, 2015). La cepa DH10B posee un mayor número de mutaciones que la cepa MC1061 que se sabe que es la más cercada a TOP10. A pesar de su parentesco, con K-12, la cepa DH10B tiene 226 genes mutados (Durfee, et al., 2008). Las cepas MC1061 y TOP10 tienen en común varios genes entre los que se encuentran: galE, galU y galK (Durfee, et al., 2008), que dan lugar a enzimas implicadas en el metabolismo de la galactosa y la formación de glucógeno (Boels et al., 2001).

En el plásmido CPS pMG-Amp se incluyó regiones de reconocimiento para los cebadores diseñados y probados por Aguayo et al., 2017 y Li et al., 2013. Los cebadores de Li et al., 2013 se diseñaron para el gen de la proteína hipotética W2987, la cual se acuerdo con las observaciones que los mismos investigadores realizaron, está implicada en el proceso de infección y la patogenicidad, pues según los autores, al mutar este gen, los mutantes demostraron tener un crecimiento reducido y menor patogenicidad. Los cebadores de Aguayo et al., 2017 tomaron el mismo gen hipotético: W2987, secuenciado por Li et al., 2013 y a partir de ello diseñaron nuevos cebadores (FWB-TR4 F/R/P) que por los estudios realizados por estos investigadores es capaz de detectar la VCG 0121 que los cebadores W2987 F/R de Li et al., 2013 no detectan. Adicionalmente, Magdama et al., 2019 estudiaron la especificidad de los

cebadores de Aguayo et al., 2017 y Li et al., 2013 en cepas de *Foc R1* en Ecuador, encontrando que los cebadores W2987 F/R mostraron reacción cruzada con *Foc R1*, tal como ocurrió en esta investigación. Lo cual respalda la elección de los cebadores FWB-TR4 F/R/P de Aguayo et al., 2017, que en la actualidad se considera el referente internacional para la detección de *Foc R4T*.

Para la identificación de los microorganismos control negativo se secuenció amplicones de la región *TEF-1 α* , una práctica recurrente para identificar las razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, sin embargo, para identificar claramente entre razas de acuerdo con bibliografía ocupan más de un marcador molecular, como en el caso de Magdama et al., 2020 que secuencian también la región IGS (región espaciadora intergénica) y Maryani et al., 2019 secuencian además de *TEF-1 α* , los genes *rpb1* (subunidad más grande de la ARN polimerasa II) y *rpb2* (segunda subunidad más grande de la ARN polimerasa II). Aunque en este trabajo no se secuenció otros genes, se usó los cebadores específicos para *Foc R1*: PAR-PAL de Yang et al., 2020; W1805F-W1805R de Wu et al., 2019; y *FocR1 F/R* de Thangavelu, et al., 2022, los cuales demostraron amplificar las 3 muestras de control negativo, con lo cual queda comprobado que, efectivamente, estos microorganismos son *Foc R1*.

En las pruebas con nanosensores, durante la primera repetición se realizó un enmascaramiento con el objetivo de evitar sesgo, pues este es el fin de este tipo de prácticas (Manterola & Otzen, 2015). Por lo tanto, se reportaba de forma más objetiva los resultados cualitativos obtenidos en esta repetición, que tenía por objetivo establecer la tonalidad hasta la cual se considera un resultado como positivo o negativo (cutoff) y cuantificar usando Nanodrop la absorbancia a 525 nm que corresponde este umbral cualitativo hasta el que se considera positivo. De acuerdo con Mirsalari & Elhami (2020), es crucial determinar de forma cuantitativa

el valor de absorbancia hasta el que se considera positiva este tipo de pruebas que se consideran usualmente como cualitativas, porque de esta forma se consigue una mayor objetividad y a su vez, en función de la absorbancia que se obtiene, se puede llegar a determinar la cantidad de analito en la muestra analizada, como lo hicieron estos autores para detectar la cantidad de insulina y se buscó realizar algo similar en la segunda repetición de estos experimentos, para determinar la relación entre la absorbancia y la cantidad de ADN positivo en la muestra.

Para el análisis de los resultados catalogados como positivos o negativos en la primera y segunda repetición se realizó ANOVAs, los cuales se utilizan solo para datos continuos, no discretos como en este caso, sin embargo, aplicando la aproximación de la distribución binomial (que es este caso) por la normal (para realizar el ANOVA), se verificó que el tamaño muestral sea el necesario, como lo establece el teorema de De Moivre (Anexo 3), observando que se cumple con creces. Es por ello que se considera completamente válidos los resultados de los ANOVAS realizados, adicionalmente, se aplicó la prueba de Kruskal Wallis para verificar que efectivamente los factores de tiempo (en la primera repetición) y organismo (en primera y segunda repetición) eran significativos, sin embargo, ni con ANOVA ni con prueba de Kruskal Wallis existió significancia del factor: cantidad de ADN en ninguna de las repeticiones. La prueba Kruskal Wallis era esencial en este trabajo porque se trata de datos discretos, que no obedecen estrictamente a una distribución normal, y Kruskal Wallis al ser una prueba no paramétrica, es el tipo de análisis más acertado (Ghoodjani, 2016).

Analizando mediante ANOVA los factores: organismo y cantidad de ADN de los datos de absorbancia (datos continuos), se evidenció que la cantidad de ADN puede llegar a ser significativa si se considera un nivel de significancia de 10% (p value: 0.0672), por lo que hace

falta más datos experimentales para descartar o aceptar que la cantidad de ADN es significativa. Como el análisis de las repeticiones se observa que los resultados cualitativos son equiparables con los cuantitativos, como lo demuestra el hecho de que no existieron diferencias significativas entre la primera y segunda repetición.

De entre los 4 niveles de cantidad de ADN que se evaluaron, el nivel de 50 ng presenta resultados que se diferencian significativamente de los otros niveles, incluso entre los organismos, como lo evidencian las pruebas de Duncan que se hicieron (Figura 14 y 18). Por lo tanto, el nivel de 50 ng debe ser evaluado a mayor profundidad.

Los resultados finales de sensibilidad y especificidad de la prueba a un nivel de ADN de 100 ng son: 100% y 70%, respectivamente, que se pueden considerar valores alejados de lo que valdría esperar considerando que esta prueba se basa en gran medida en el estándar de detección actual de *Foc R4T*: la qPCR con los cebadores FWB-TR4; las diferencias se pueden atribuir principalmente a que se usa solo uno de los 3 cebadores que ocupa la qPCR. Los nanosensores ofrecen dos grandes ventajas con relación a otras pruebas moleculares como las PCR: su precio es considerablemente menor y los resultados se obtienen en un menor tiempo (Kaur et al., 2019). Por citar un ejemplo, en la actualidad, se continúa considerando la PCR como una de las pruebas más confiables para el diagnóstico de COVID-19, sin embargo se plantea el uso de nanosensores debido a su menor precio y tiempo necesario, lo que las vuelve una herramienta propicia para realizar el monitoreo de la enfermedad en una población (Farzin et al., 2022). Por lo tanto, en un escenario en el cual *Foc R4T*, ingrese al Ecuador y se verifique su presencia, las pruebas rápidas como los nanosensores, serán cruciales para realizar un monitoreo de cultivos cercanos, es en este punto donde radica la importancia del proyecto realizado.

Capítulo 6: Conclusiones

- El plásmido CPS pMG-Amp diseñado es estable por tener un porcentaje de GC de 50,1% y temperatura de fusión de 80,3°C, además de que funcionó adecuadamente como control positivo sintético debido al éxito de los ensayos con los cebadores específicos para *Foc R4T*.
- El nanosensor desarrollado se funcionalizó con el cebador reverso de Aguayo et al., 2017, porque los cebadores FWB-TR4 demostraron tener una mayor especificidad para *Foc R4T* que los desarrollados por Li et al., 2013 que amplificaron inespecíficamente la muestra CAV0 (*Foc R1*).
- La prueba de nanosensor para detectar *Foc R4T* se estandarizó con un volumen total de reacción de 50 μL de los cuales: 1 μL corresponde al ADN de la muestra, 9 μL de PBS (pH 5), 25 μL de nanopartículas funcionalizadas y 15 μL de ácido HCl 0,1 N; los resultados se observan a los 20 min de haber colocado el ácido, y se puede hacer de forma cualitativa o cuantitativa (sin diferencias significativas) midiendo la absorbancia a 525 nm con un cutoff de absorbancia de 0,115.
- El nanosensor desarrollado detecta de forma estadísticamente significativa al agente causal de la marchitez del banano (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical), alcanzando un valor de sensibilidad de 100% y especificidad de 70% usando una cantidad de ADN de 100 ng, y un intervalo de confianza de 95% para la sensibilidad y especificidad, tiene valores de: $90.00 \pm 13.86\%$ y $65.00 \pm 5.66\%$, respectivamente.
- En base a los datos obtenidos en este estudio no se puede rechazar la hipótesis de investigación.

Capítulo 7: Recomendaciones

- Se recomienda determinar el tiempo de vida útil del nanosensor antes de que empiecen a precipitar las nanopartículas.
- Se recomienda evaluar a mayor profundidad los resultados del nanosensor en el nivel de ADN de 50 ng, porque este nivel ha demostrado tener resultados atípicos.
- Se recomienda realizar ensayos recreando las condiciones de campo, es decir, en ADN de plantas de banano introducir ADN del CPS y *Foc R1* y evaluar la sensibilidad y especificidad de la prueba en estas condiciones.

Referencias

- Abdel-Aziz, H. M., & Heikal, Y. M. (2021). Nanosensors for the Detection of Fertilizers and Other Agricultural Applications. *Nanosensors for Environment, Food and Agriculture*, 1(5), 157–168. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-63245-8_7
- Agrocalidad. (20 de Mayo de 2020). *Recommendations To Prevent The Entry Of Fusarium oxysporum f.sp. cubense Race 4 Tropical*. Agrocalidad: <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/foc12.pdf>
- Aguayo, J., Mostert, D., Fourrier-Jeandel, C., Cerf-Wendling, I., Hostachy, B., Viljoen, A., & loos, R. (2017). Development of a hydrolysis probe-based real-time assay for the detection of tropical strains of *Fusarium oxysporum f. sp. cubense race 4*. *PLOS ONE*, 12(2), e0171767. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171767>
- Aurore, G., Parfait, B., & Fahrasmane, L. (2009). Bananas, raw materials for making processed food products. *Trends in Food Science & Technology*, 20(2), 78–91. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.10.003>
- Banco Mundial. (Enero de 2021). *Employment in agriculture (% of total employment) (modeled ILO estimate) – Ecuador*. Banco Mundial: <https://data.worldbank.org/indicator/SL.AGR.EMPL.ZS?locations=EC>
- Boels, I. C., Ramos, A., Kleerebezem, M., & de Vos, W. M. (2001). Functional Analysis of the *Lactococcus lactis galU* and *galE* Genes and Their Impact on Sugar Nucleotide and Exopolysaccharide Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 3033-3040. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/aem.67.7.3033-3040.2001>
- Bogue, R. (2008). Nanosensors: a review of recent progress . *Sensor Review*, 28(1), 12–17. <https://doi.org/https://doi.org/10.1108/02602280810849965>

- Brown, A., Tumuhimbise, R., Amah, D., Uwimana, B., Nyine, M., Mduma, H., Talengera, D., Karamura, D., Kuriba, J., & Swennen, R. (2017). Bananas and Plantains (*Musa* spp.). *Genetic Improvement of Tropical Crops*, 1, 219–240.
https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-59819-2_7
- Caasi, D. R., Arif, M., Payton, M., Melcher, U., Winder, L., & Ochoa-Corona, F. M. (2013). A multi-target, non-infectious and clonable artificial positive control for routine PCR-based assays. *Journal of Microbiological Methods*, 95(2), 229–234.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.08.017>
- CABI. (Enero de 2021). *Fusarium oxysporum f.sp. cubense (Panama disease of banana)*. CABI:
<https://www.cabi.org/isc/datasheet/24621>
- Carvalhais, L. C., Henderson, J., Rincon-Florez, V. A., O'Dwyer, C., Czişlowski, E., Aitken, E. A., & Drenth, A. (2019). Molecular Diagnostics of Banana Fusarium Wilt Targeting Secreted-in-Xylem Genes. *Frontiers in Plant Science*, 10(547), 1-17.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00547>
- Chhipa, H., & Joshi, P. (2016). Nanofertilisers, Nanopesticides and Nanosensors in Agriculture. *Nanoscience in Food and Agriculture*, 1(11), 247–282.
https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-39303-2_9
- Damborský, P., Švitel, J., & Katrlík, J. (2016). Optical biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 91–100. <https://doi.org/https://doi.org/10.1042/ebc20150010>
- Dita, M. A., Waalwijk, C., Buddenhagen, I. W., Souza Jr, M. T., & Kema, G. H. (2010). A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen. *Plant Pathology*, 59(2), 348–357. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02221.x>

- Dita, M., Barquero, M., Heck, D., Mizubuti, E. S., & Staver, C. P. (2018). Fusarium Wilt of Banana: Current Knowledge on Epidemiology and Research Needs Toward Sustainable Disease Management. *Frontiers in Plant Science*, 9.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01468>
- Dita, M., Echegoyén, P., & Pérez, M. (2013). *Plan de contingencia ante un brote de la raza 4 tropical de Fusarium oxysporum f.sp. cubense*. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria.
- Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Petrosino, J. F., Qin, X., Muzny, D. M., Ayele, M., Gibbs, R. A., CsöRgő, B., PóSfai, G., Weinstock, G. M., & Blattner, F. R. (2008). The Complete Genome Sequence of Escherichia coli DH10B: Insights into the Biology of a Laboratory Workhorse. *Journal of Bacteriology*, 190(7), 2597–2606. <https://doi.org/10.1128/jb.01695-07>
- Eiras, M., Resende, R. O., Missiaggia, A. A., & ÁVILA, A. C. (2001). RT-PCR and dot blot hybridization methods for a universal detection of tospoviruses. *Fitopatologia Brasileira*, 26(2), 170-175.
- Exportación de banano (12 de abril de 2021) *Perú confirma infestación con hongo Foc R4T*.
<https://bananaexport.com/2021/04/12/peru-confirma-infestación-con-hongo-foc-r4t/>
- FAOSTAT (s.f.) *Crops and livestock products*. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- FAO (s.f.) *Banana Facts and Figures*. <https://www.fao.org/economic/est/est-commodities/bananas/bananafacts/en/#.Xe6UOPZFyM8>
- Farzin, M. A., Abdoos, H., & Saber, R. (2022). AuNP-based biosensors for the diagnosis of pathogenic human coronaviruses: COVID-19 pandemic developments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04193-2>

- Fourie, G., Steenkamp, E. T., Gordon, T. R., & Viljoen, A. (2009). Evolutionary Relationships among the *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Vegetative Compatibility Groups. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(14), 4770–4781. <https://doi.org/10.1128/aem.00370-09>
- Ghoodjani, A. (2016) Why should I use a Kruskal Wallis Test? Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/305911256_Why_should_I_use_a_Kruskal_Wallis_Test/citations
- Gordon, T. R. (2017). *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* Wilt Syndrome. *Annual Review of Phytopathology*, 55(1), 23–39. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-095919>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Screening Bacterial Colonies Using X-Gal and IPTG: α -Complementation. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(12), pdb.prot101329. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot101329>
- Grijalva Mañay, R. L. (2021). Caracterización molecular y filogenética del virus fitopatógeno Citrus tristeza virus (CTV) aislado de cultivos de limón Meyer (*Citrus x meyeri*) en la parroquia de Tumbaco–Ecuador.
- Groenewald, S., van den Berg, N., Marasas, W. F., & Viljoen, A. (2006). The application of high-throughput AFLP's in assessing genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. *Mycological Research*, 110(3), 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2005.10.004>
- Haas, J. H., Moore, L. W., Ream, W., & Manulis, S. (1995). Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and environmental microbiology*, 61(8), 2879–2884. <https://doi.org/10.1128/aem.61.8.2879-2884.1995>

- Hill, H. D., & Mirkin, C. A. (2006). The bio-barcode assay for the detection of protein and nucleic acid targets using DTT-induced ligand exchange. *Nature Protocols*, 1(1), 324–336.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.51>
- Invitrogen (30 de octubre de 2015) *One Shot™ TOP10 Chemically Competent E. coli*.
https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/oneshot10_chemcomp_man.pdf
- Janick, J. (Ed.). (2003). *Horticultural Reviews, Volume 30* (Vol. 30). John Wiley & Sons.
- Jones, D. R. (2018). *Handbook of Diseases of Banana, Abaca and Enset*. CABI.
- Kaur, R., Sharma, S. K., & Tripathy, S. (2019). Advantages and Limitations of Environmental Nanosensors. *Advances in Nanosensors for Biological and Environmental Analysis*, 119–132. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817456-2.00007-3>
- Kumar, A. (2018) Nanosensors: Applications and Challenges. *International Journal of Science and Research*, 8(7), 1472-1474. <https://www.ijsr.net/archive/v8i7/ART20199881.pdf>
- Kung'u, J. N., & Jeffries, P. (2001). Races and virulence of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* on local banana cultivars in Kenya. *Annals of Applied Biology*, 139(3), 343–349.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2001.tb00148.x>
- Li, M., Shi, J., Xie, X., Leng, Y., Wang, H., Xi, P., Zhou, J., Zhong, S., & Jiang, Z. (2013). Identification and application of a unique genetic locus in diagnosis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35(4), 482–493. <https://doi.org/10.1080/07060661.2013.828321>
- Magdama, F., Monserrate-Maggi, L., Serrano, L., García Onofre, J., & Jiménez-Gasco, M. D. M. (2020). Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, the *Fusarium Wilt*

- Pathogen of Banana, in Ecuador. *Plants*, 9(9), 1133.
<https://doi.org/10.3390/plants9091133>
- Magdama, F., Monserrate-Maggi, L., Serrano, L., Sosa, D., Geiser, D. M., & Jiménez-Gasco, M. D. M. (2019). Comparative analysis uncovers the limitations of current molecular detection methods for *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 strains. *PLOS ONE*, 14(9), e0222727. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222727>
- Manterola, C. & Otzen, T. Los sesgos en investigación clínica. *Int. J. Morphol.*, 33(3):1156-1164, 2015.
- Martínez-Solórzano, G. E., Rey-Brina, J. C., Pargas-Pichardo, R. E., & Manzanilla, E. E. (2019). Marchitez por *Fusarium* raza tropical 4: Estado actual y presencia en el continente americano. *Agronomía Mesoamericana*, 259–276.
<https://doi.org/10.15517/am.v31i1.37925>
- Maryani, N., Lombard, L., Poerba, Y., Subandiyah, S., Crous, P., & Kema, G. (2019). Phylogeny and genetic diversity of the banana *Fusarium* wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin. *Studies in Mycology*, 92, 155–194.
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.06.003>
- Matthews, M. C., Mostert, D., Ndayihanzamaso, P., Rose, L. J. & Viljoen, A. (2020). Quantitative detection of economically important *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* strains in Africa in plants, soil and water. *PLOS ONE*, 15(7), e0236110.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236110>
- Menzel, W., Jelkmann, W., & Maiss, E. (2002). Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, 99(1-2), 81-92.

Ministerio de Comercio Exterior (Diciembre de 2017) Informe sector Bananero Ecuatoriano.

<https://www.produccion.gob.ec/wp-content/uploads/2019/06/Informe-sector-bananero-espa%C3%B1ol-04dic17.pdf>

Mirsalari, M., & Elhami, S. (2020). Colorimetric detection of insulin in human serum using

GO/AuNPs/TX-100 nanocomposite. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and*

Biomolecular Spectroscopy, 240, 118617. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118617>

Moirangthem, R. S., Yaseen, M. T., Wei, P. K., Cheng, J. Y., & Chang, Y. C. (2012). Enhanced

localized plasmonic detections using partially-embedded gold nanoparticles and

ellipsometric measurements. *Biomedical Optics Express*, 3(5), 899.

<https://doi.org/10.1364/boe.3.000899>

Mostert, D., Molina, A. B., Daniells, J., Fourie, G., Hermanto, C., Chao, C. P., Fabregar, E.,

Sinohin, V. G., Masdek, N., Thangavelu, R., Li, C., Yi, G., Mostert, L., & Viljoen, A.

(2017). The distribution and host range of the banana Fusarium wilt fungus, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, in Asia. *PLOS ONE*, 12(7), e0181630.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181630>

O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., & Ploetz, R. C. (1998). Multiple evolutionary origins of

the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and

mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,

95(5), 2044–2049. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2044>

Omanović-Miklićanin, E. & Maksimović, M. (2016) Nanosensors applications in agriculture and

food industry. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina*.

47, 59-70 <http://hemija.pmf.unsa.ba/glasnik/files/Issue%2047/5-59-70-Omanovic.pdf>

- Opina, M., Tavner, F., Hollway, G., Wang, JF., Li, TH., Maghirang, R., Fegan, M., Hayward, AC, Krishnapillai, V., Hong, WF., Holloway, BW y Timmis, JN (1997). Un método novedoso para el desarrollo de sondas de ADN específicas de especies y cepas y cebadores de PCR para identificar *Burkholderia solanacearum* (anteriormente *Pseudomonas solanacearum*). *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 19 - 30.
- Ordóñez, N., Seidl, M. F., Waalwijk, C., Drenth, A., Kilian, A., Thomma, B. P. H. J., Ploetz, R. C., & Kema, G. H. J. (2015). Worse Comes to Worst: Bananas and Panama Disease—When Plant and Pathogen Clones Meet. *PLOS Pathogens*, 11(11), e1005197. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005197>
- Ordóñez, N., Salacinas, M., Mendes, O., Seidl, M. F., Meijer, H. J. G., Schoen, C. D. & Kema, G. H. J. (2019). A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay based on unique markers derived from genotyping by sequencing data for rapid in planta diagnosis of Panama disease caused by Tropical Race 4 in banana. *Plant Pathology*, 68(9), 1682-1693. <https://doi.org/10.1111/ppa.13093>
- Peng, J., Zhang, H., Chen, F., Zhang, X., Xie, Y., Hou, X., Li, G. & Pu, J. (2014). Rapid and quantitative detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4 in soil by real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Applied Microbiology*, 117(6), 1740-1749. <https://doi.org/10.1111/jam.12645>
- Ploetz, R. C. (2015). Fusarium Wilt of Banana. *Phytopathology*®, 105(12), 1512–1521. <https://doi.org/10.1094/phyto-04-15-0101-rww>
- Ploetz, R. C., Kema, G. H., & Ma, L. J. (2015b). Impact of Diseases on Export and Smallholder Production of Banana. *Annual Review of Phytopathology*, 53(1), 269–288. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120305>

- Ploetz, R., Freeman, S., Konkol, J., Al-Abed, A., Naser, Z., Shalan, K., Barakat, R., & Israeli, Y. (2015a). Tropical race 4 of Panama disease in the Middle East. *Phytoparasitica*, *43*(3), 283–293. <https://doi.org/10.1007/s12600-015-0470-5>
- Puhalla, J. E. (1985). Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany*, *63*(2), 179–183. <https://doi.org/10.1139/b85-020>
- Puławska, J., & Sobiczewski, P. (2005). Development of a semi-nested PCR based method for sensitive detection of tumorigenic *Agrobacterium* in soil. *Journal of applied microbiology*, *98*(3), 710–721. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02503.x>
- Sharma, P., Pandey, V., Sharma, M. M. M., Patra, A., Singh, B., Mehta, S., & Husen, A. (2021). A Review on Biosensors and Nanosensors Application in Agroecosystems. *Nanoscale Research Letters*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s11671-021-03593-0>
- Smith, G., Smith, I., Harrower, B., Warrilow, D., & Bletchly, C. (2006). A simple method for preparing synthetic controls for conventional and real-time PCR for the identification of endemic and exotic disease agents. *Journal of Virological Methods*, *135*(2), 229–234. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.03.007>
- Spence, N. J., Mills, P. R., & Barbara, D. J. (2000). A survey of viruses of *Alstroemeria* in the UK and the characterisation of carlaviruses infecting *Alstroemeria*. *European journal of plant pathology*, *106*(9), 843-847.
- Testa, A. C., Oliver, R. P., & Hane, J. K. (2016). OcculterCut: A Comprehensive Survey of AT-Rich Regions in Fungal Genomes. *Genome Biology and Evolution*, *8*(6), 2044–2064. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw121>

- Wang, W., Hu, Y., Sun, D., Staehelin, C., Xin, D., & Xie, J. (2011). Identification and evaluation of two diagnostic markers linked to Fusarium wilt resistance (race 4) in banana (*Musa* spp.). *Molecular Biology Reports*, 39(1), 451–459. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0758-6>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). [art%3A10.1186%2F1471-2105-13-134](https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134). *BMC Bioinformatics*, 13(134).
- Yeturu, S., Mendez, K., Garrido, P., Serrano, S., & Garrido, A. (2016). Serological and molecular identification of cucumber mosaic virus (CMV) infecting banana crops in Ecuador. *ECUADOR ES CALIDAD-Revista Científica Ecuatoriana*, 3(1).
- Zhang, X., Zhang, H., Pu, J., Qi, Y., Yu, Q., Xie, Y. & Peng, J. (2013). Development of a Real-Time Fluorescence Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid and Quantitative Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Tropical Race 4 In Soil. *PLoS ONE*, 8(12), e82841. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082841>
- Zheng, L., Rodoni, B.C., Gibbs, M.J. and Gibbs, A.J. (2010), A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. *Plant Pathology*, 59, 211-220. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02201.x>
- Zheng, S. J., García-Bastidas, F. A., Li, X., Zeng, L., Bai, T., Xu, S., Yin, K., Li, H., Fu, G., Yu, Y., Yang, L., Nguyen, H. C., Douangboupha, B., Khaing, A. A., Drenth, A., Seidl, M. F., Meijer, H. J. G., & Kema, G. H. J. (2018). New Geographical Insights of the Latest Expansion of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* Tropical Race 4 Into the Greater Mekong Subregion. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00457>

Apéndices