



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS - ESPE
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

**PROYECTO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

“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*)”

Elaborado por

Marco Alberto Córdova Pogo

Director del proyecto

Ph.D. Francisco Javier Flores Flor.

Sangolquí - 2022.

VERSIÓN: 1.0







Importancia nacional

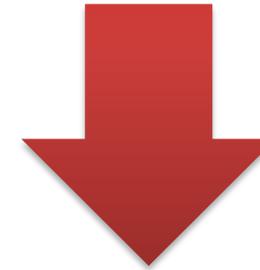
Importancia internacional

Exportaciones a USA

Productos	2021 (TM)	2021 (millones USD)	2022 (TM)	2022 (millones USD)
Aceites crudos de petróleo...	2 193 708	877	2 635 899	1 771
Fueloils	211 053	78	425 532	255
Partidas de camarón	27 662	184	38 862	340
Banano orgánico certificado	77 643	63	106 544	85



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



Estrategias de control y prevención



Vulnerabilidad de cultivos y proximidad del patógeno





- Sin diferencias entre razas
- Plasticidad fenotípica.

Identificación morfológica

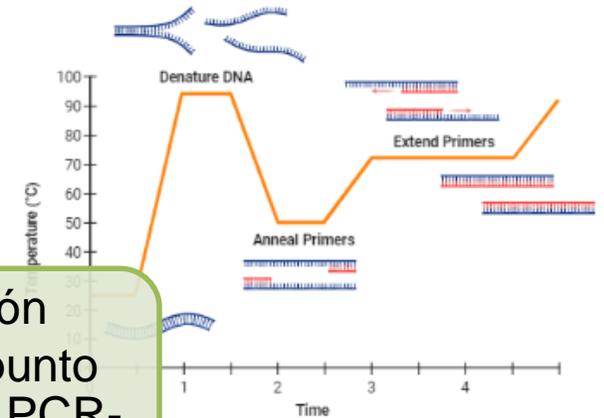
Determinación de grupos de compatibilidad vegetativa (VCG)

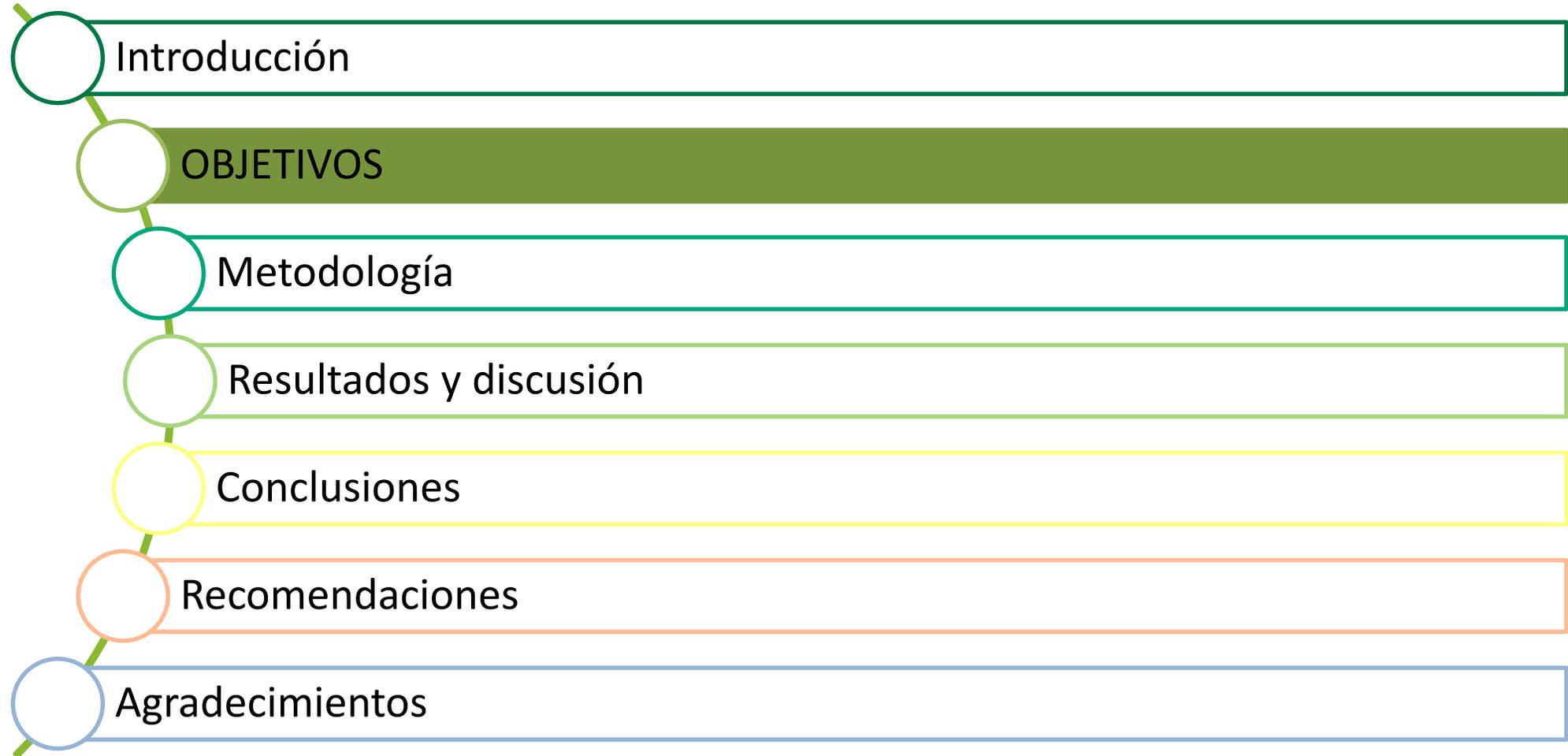
- Clasificación compleja.
- VCG 01213/16
- Resultados en mínimo 28 días.



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

Identificación molecular





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. *cupense* raza 4 tropical (*Foc* R4T).



Sintetizar nanopartículas de oro funcionalizadas con aptámeros específicos para *Foc* R4T.



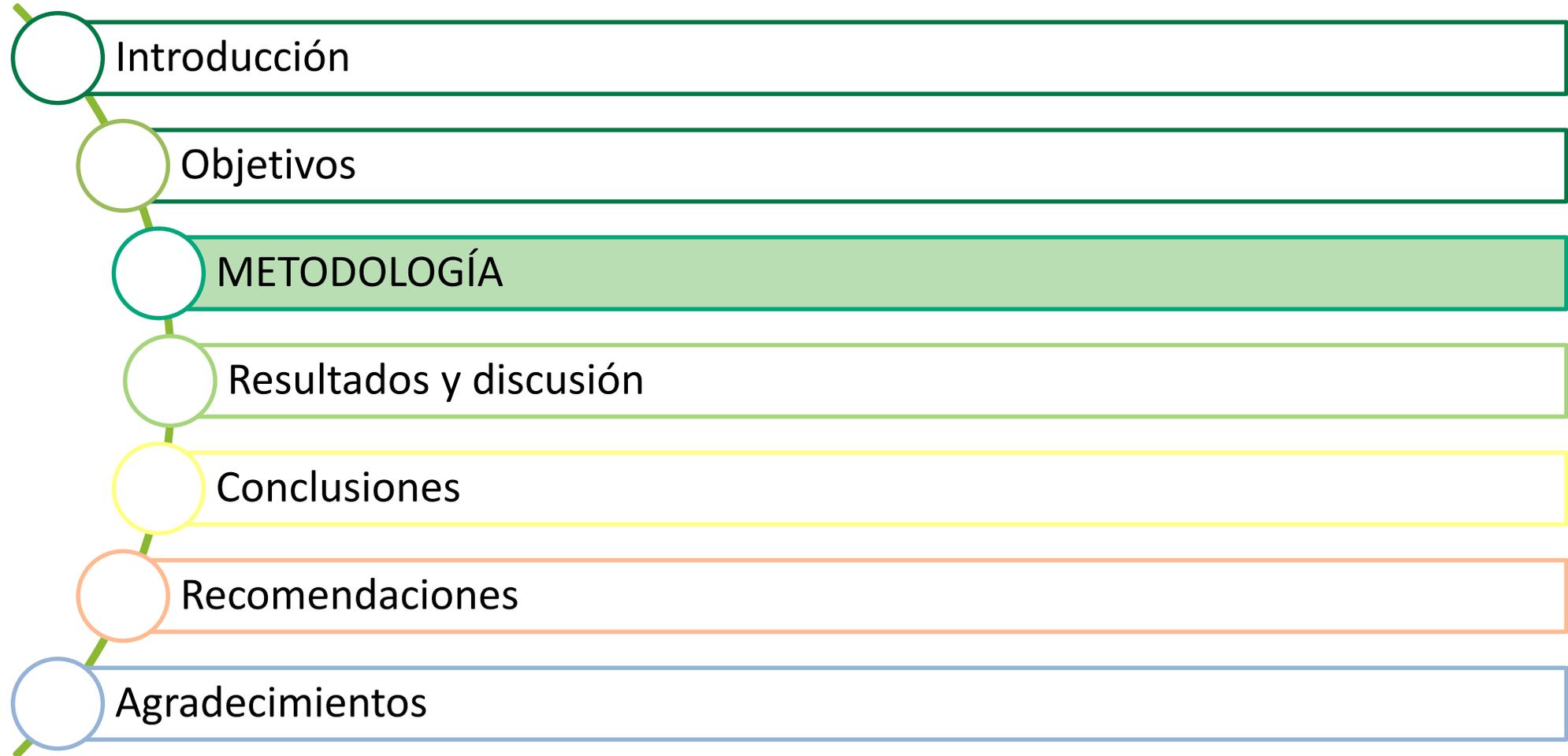
Estandarizar el método de detección de *Foc* R4T con nanopartículas funcionalizadas.



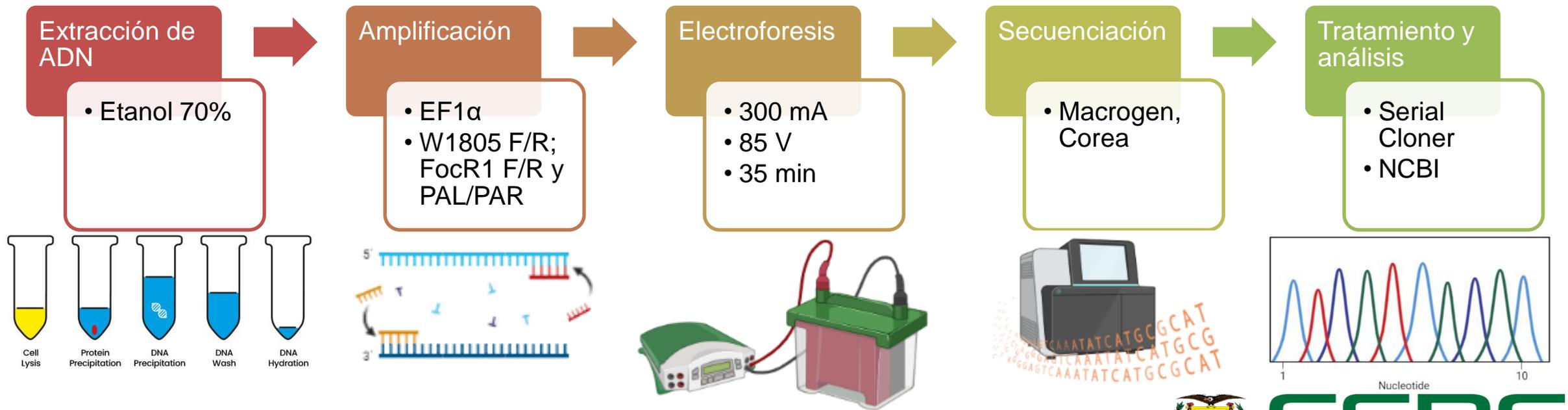
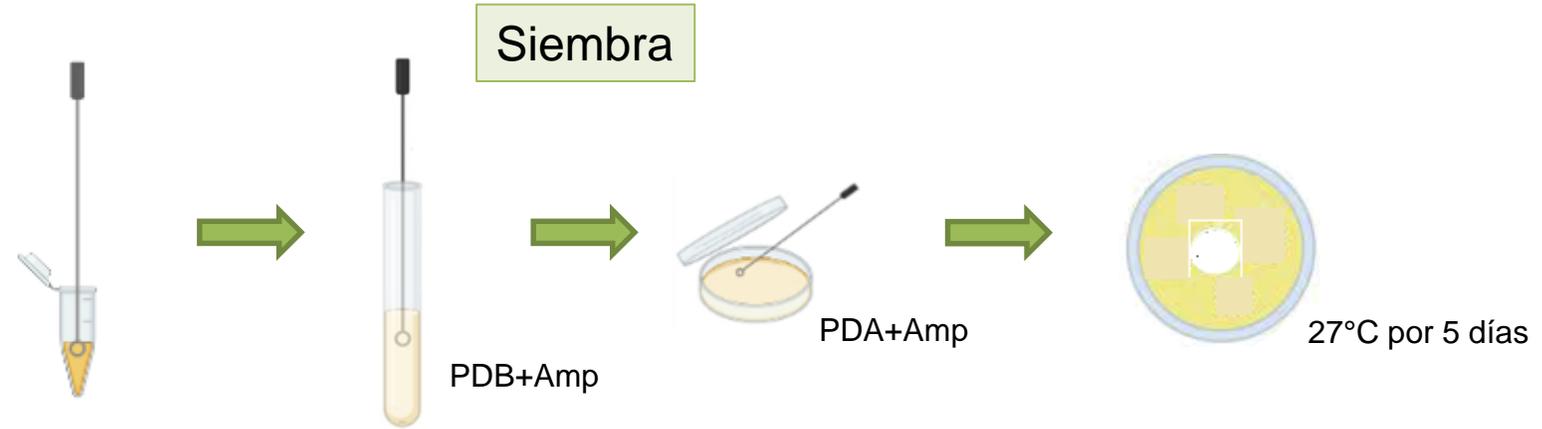


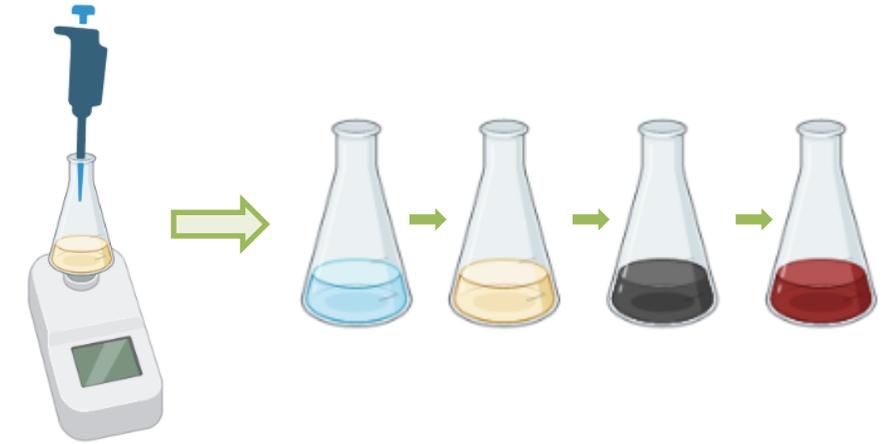
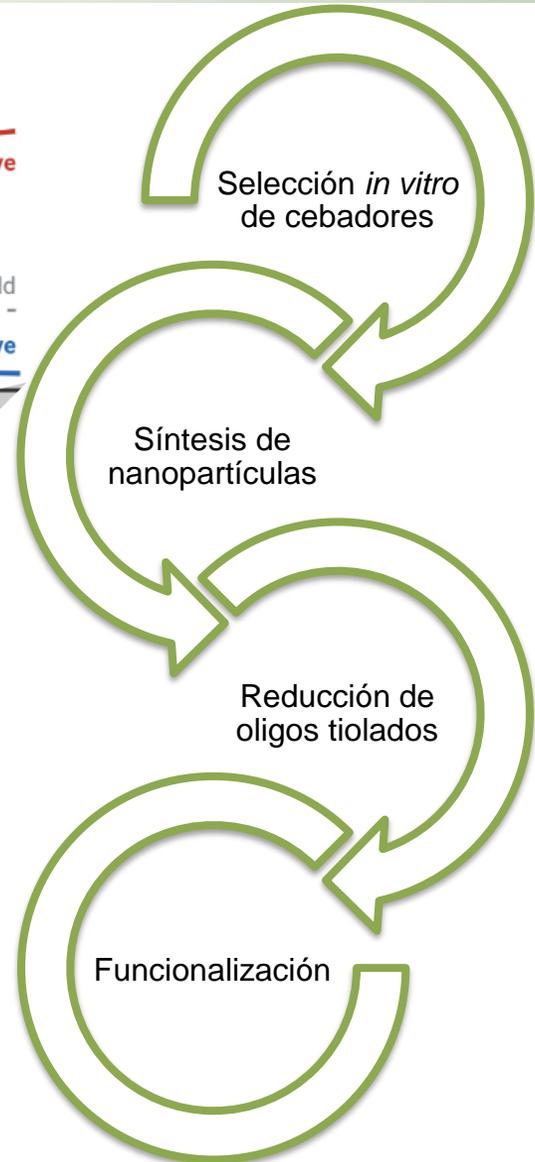
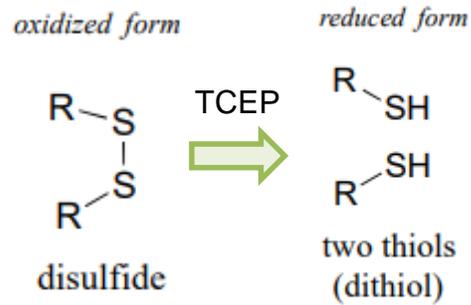
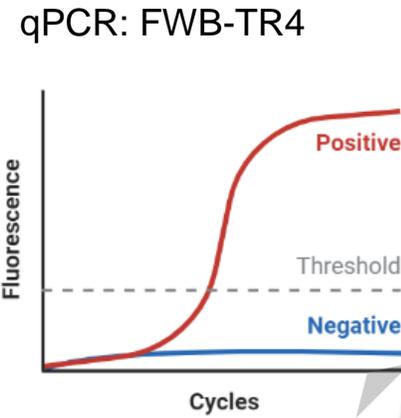
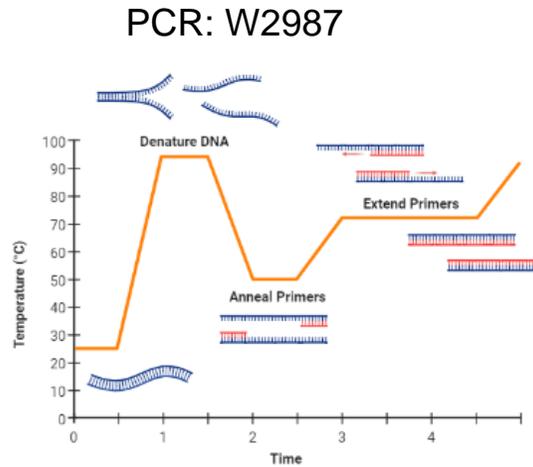
El desarrollo del nanosensor funcionalizado con un oligonucleótico específico detecta en forma estadísticamente significativa a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* raza 4 tropical.





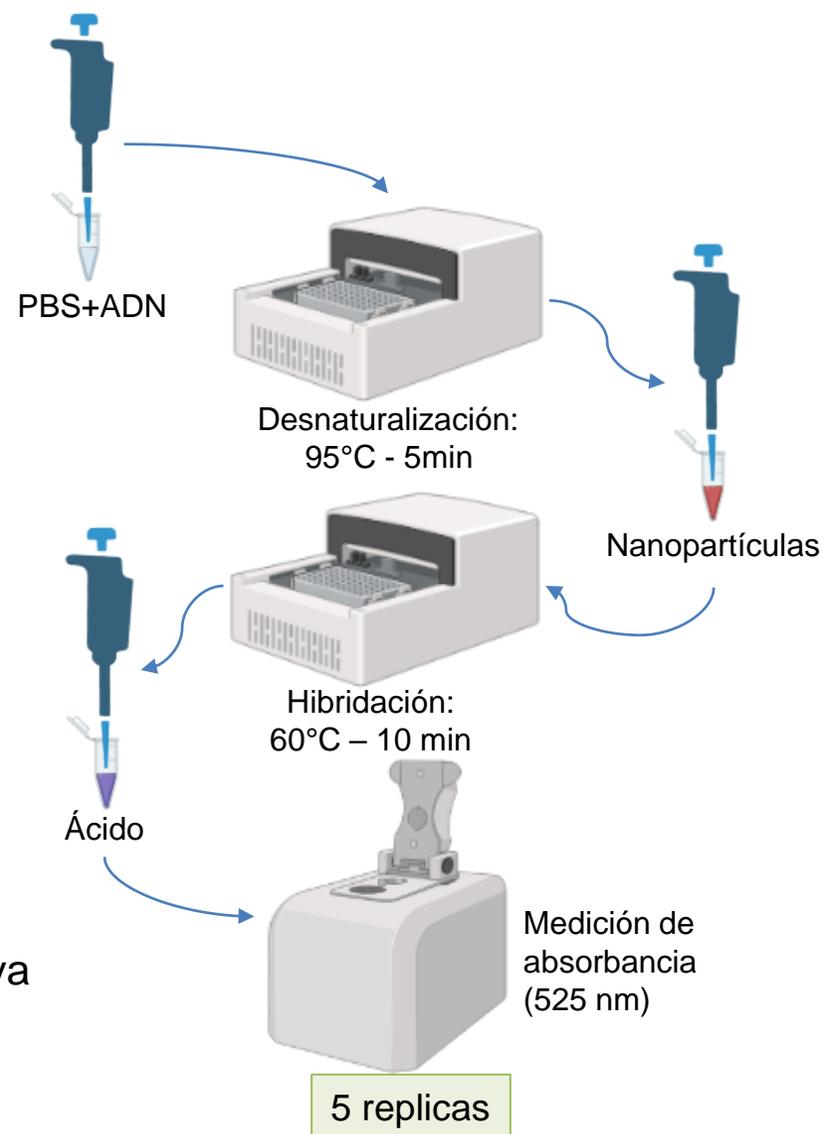




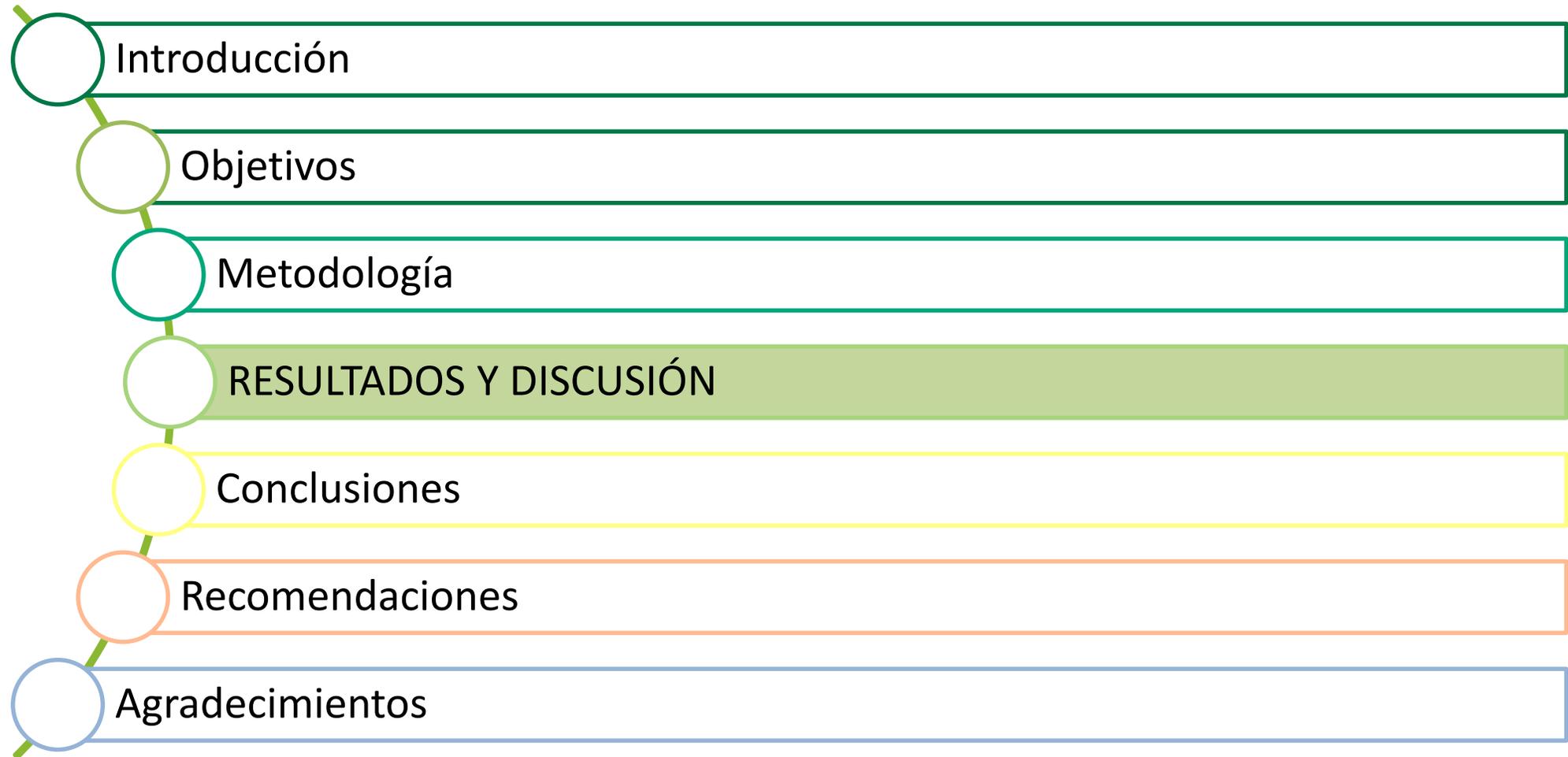


13 Diseño experimental y ensayos de hibridación

Volumen de PBS (μL)	9
Volumen de DNA (μL)	1
Volumen de NP (μL)	25
Volumen de HCl 0,1 N (μL)	15
Niveles de DNA (aproximados) (ng)	12.5
	25
	50
Niveles de Tiempo (min)	10
	20
	30
Organismos	Foc R1
	CPS



Primera repetición: cualitativa y cegada
 ↘ Segunda repetición cuantitativa
 Sensibilidad y especificidad ↙

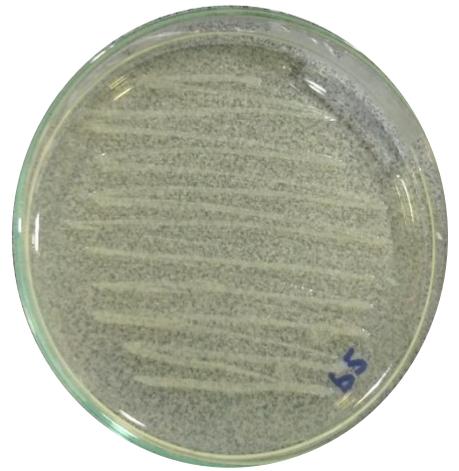


15 Diseño y obtención del Control Positivo Sintético RESULTADOS Y DISCUSIÓN

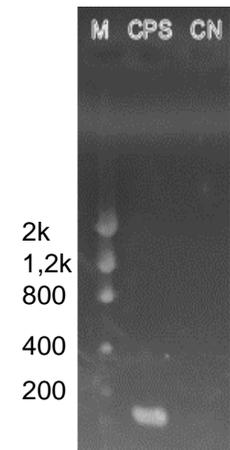
Resultados del análisis *in silico*

Cebadores	Organismos	Amplicones
Foc TR4 (Dita et al., 2010)	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium solani</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	1 (433 pb) 1 (66 pb) 1 (1968 pb)
W2987 (Li et al., 2013)	<i>Fusarium odoratissimum</i>	2 (491 – 105 pb)
FWB-TR4 (Aguayo et al., 2017)	<i>Fusarium odoratissimum</i>	1 (175 pb)

Transformación

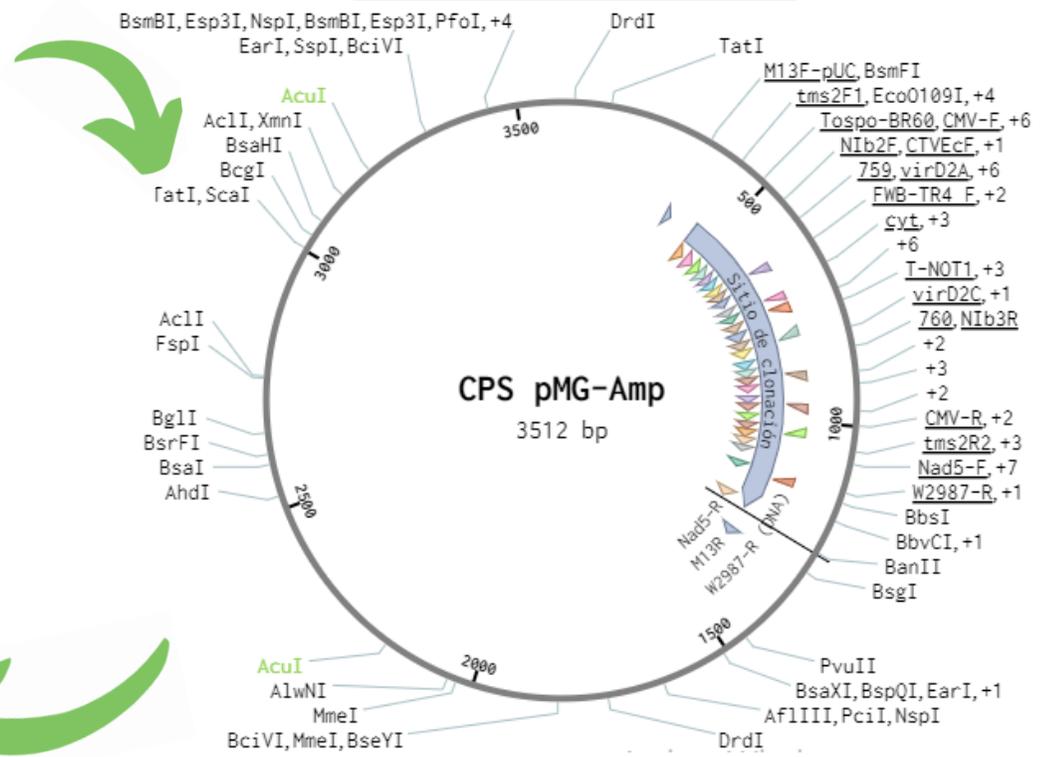


Cultivo puro



PCR colony

Mapa del plásmido



PCR *in silico*
 Porcentaje de GC: 50,1%
 T de fusión: 80,3°C

(Smith et al., 2006; Testa et al., 2016)

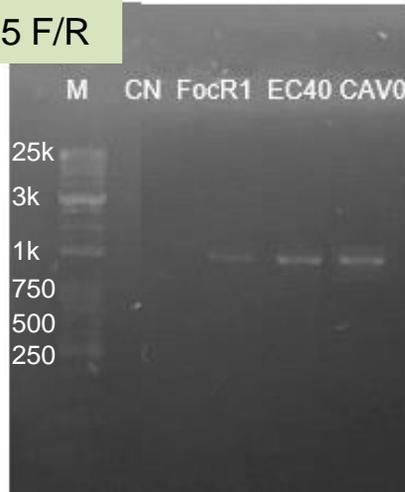


Resultados de secuenciación

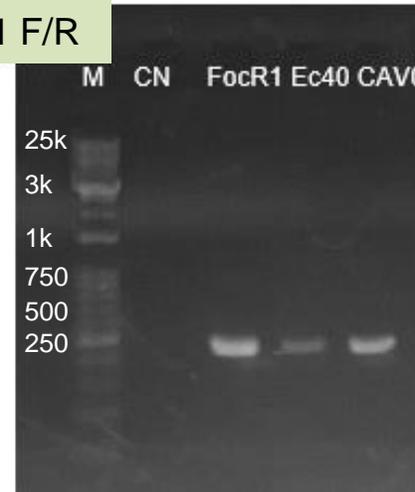
Muestra	Longitud del amplicón	Resultado	Accesión	Puntuación total	Cobertura de secuencia blanco	% identidad
FocR1 iGEM	923	Foc R1	JAEMVU 010000008.1	1754	100%	99.92%
EC40	936	Foc R1	JAEMVU 010000008.1	1707	100%	99.57%
CAVO	908	Foc R1	AMGP 01000659.1	1700	100%	99.78%

Resultados con cebadores específicos para *Foc R1*

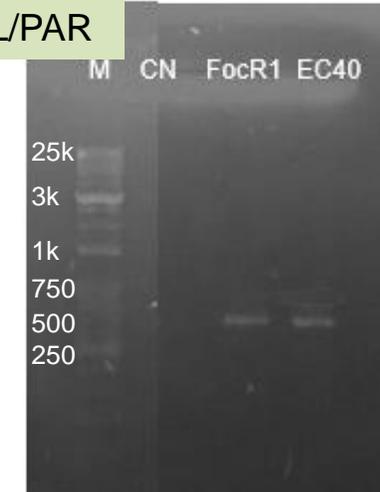
W1805 F/R



FocR1 F/R

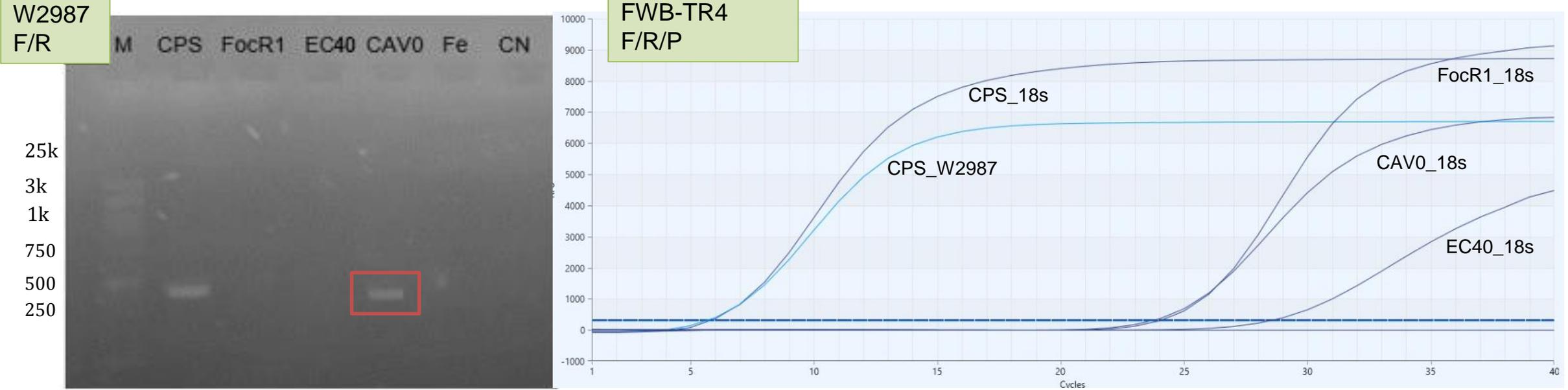


PAL/PAR



17 Selección de cebadores específicos a usar en el nanosensor

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Mayor especificidad de los cebadores de Aguayo et al., 2017

ANOVAs

Resultados de la primera repetición

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

Resultados para cada tiempo

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

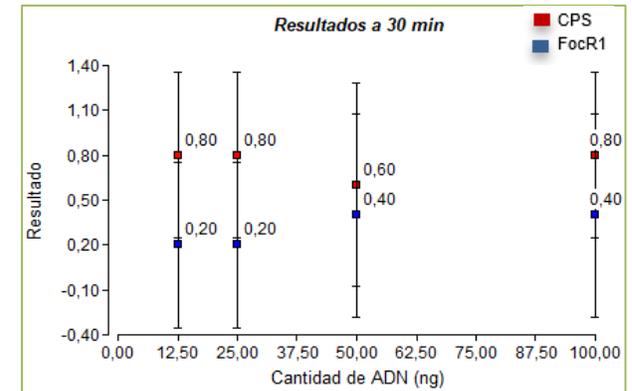
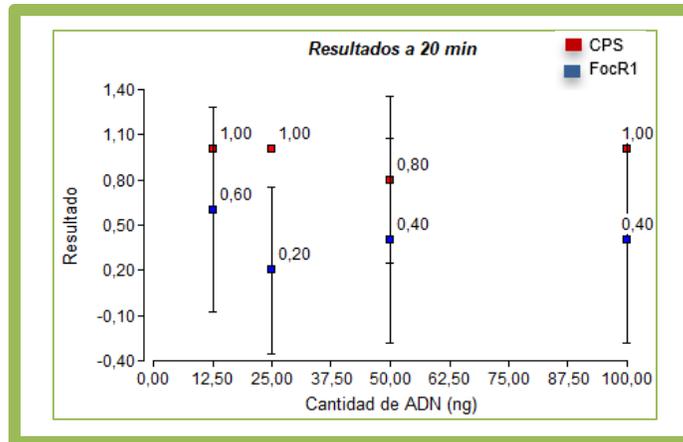
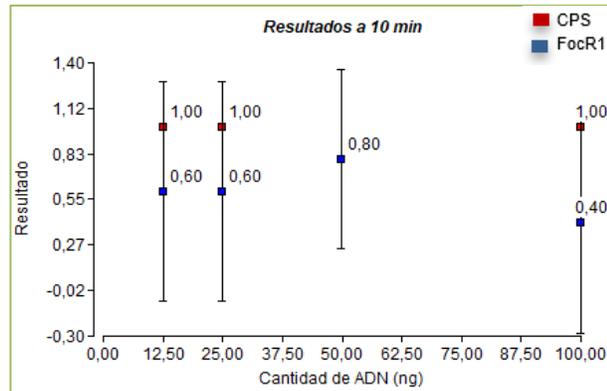
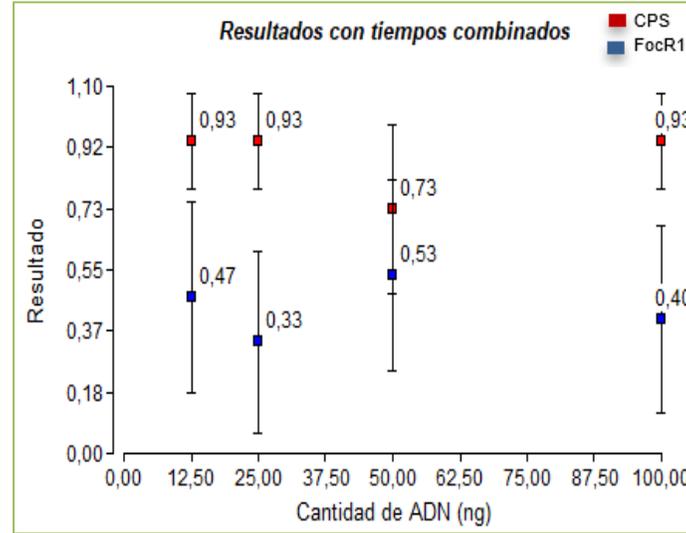
Prueba Kruskal Wallis

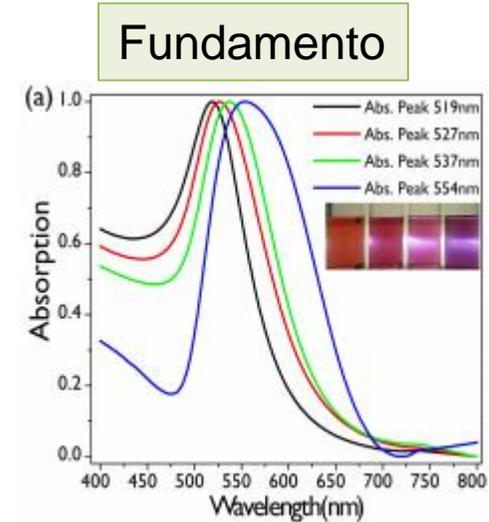
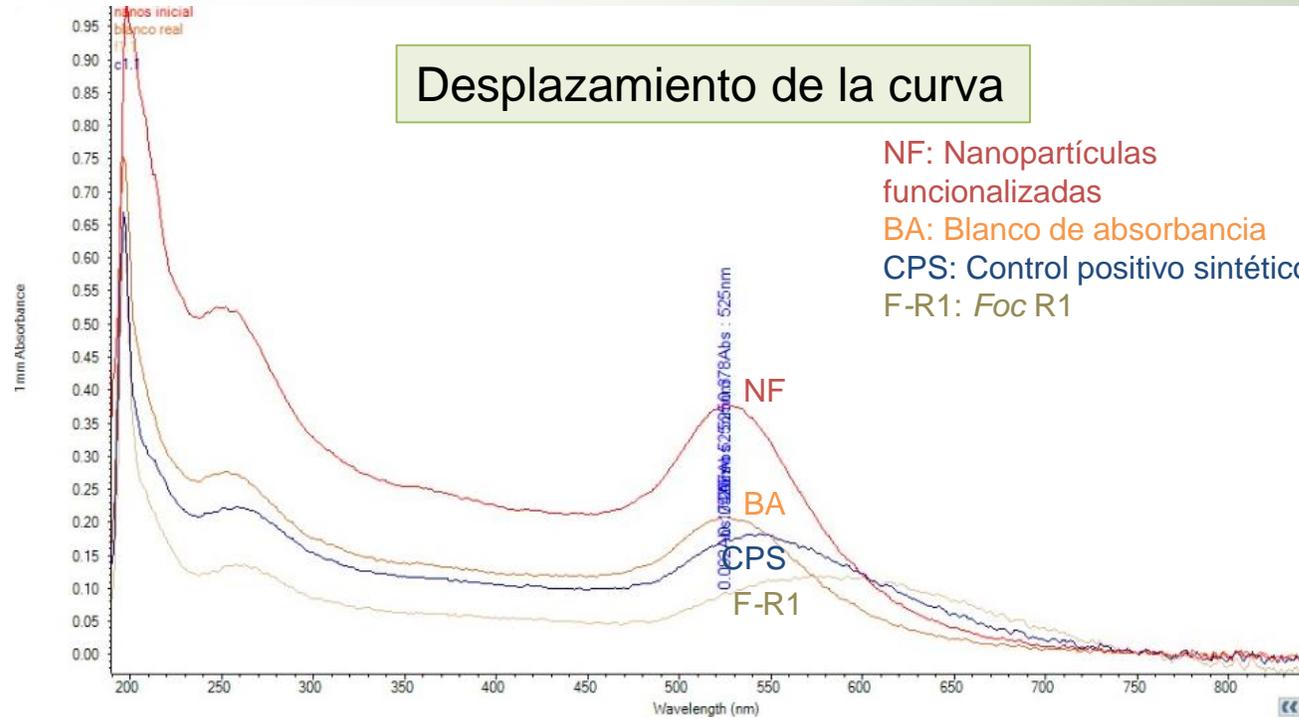
Variable	Organismo	Tiempo	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Resultado CPS	10	20	20	0,95	0,22	1,00	22,44	<0,0001
Resultado CPS	20	20	20	0,95	0,22	1,00		
Resultado CPS	30	20	20	0,75	0,44	1,00		
Resultado Foc R1	10	20	20	0,60	0,50	1,00		
Resultado Foc R1	20	20	20	0,40	0,50	0,00		
Resultado Foc R1	30	20	20	0,30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

Prueba Duncan

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 ($p > 0,05$)



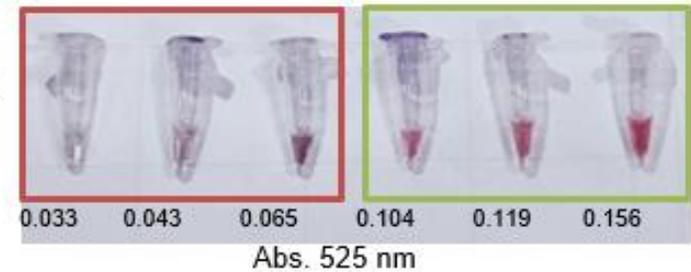


Muestra	Abs
Blanco	0,111
	0,092
	0,095
	0,104
	0,098
Promedio	0,100
Desviación estándar	0,007
Cutoff	0,115

Determinación del Cutoff

Escala de coloración

Resultados negativos

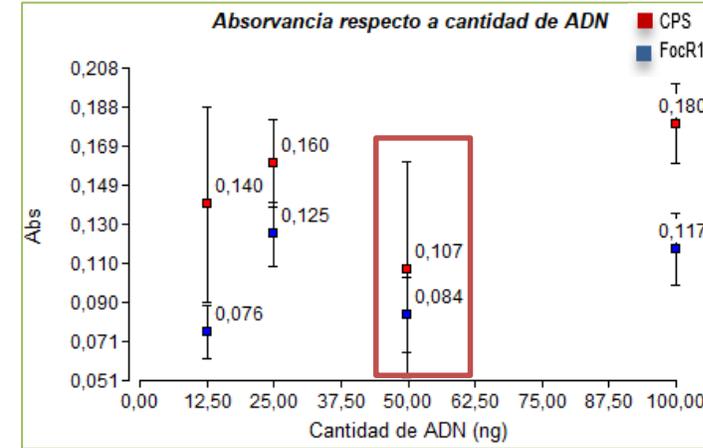


Resultados positivos

Resultados y absorbancia

Primera réplica

		1	Repeticiones		1	Repeticiones		1
Control positivo sintético	100 ng		100 ng		Blanco			
	50 ng		50 ng					
	25 ng		25 ng					
	12.5 ng		12.5 ng					



Análisis estadístico

ANOVA 2 factores

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

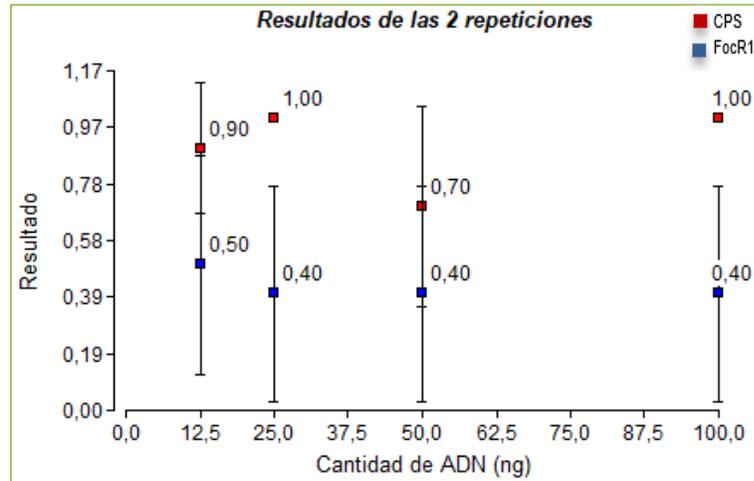
ANOVA por organismo

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

Prueba Duncan

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

Resultados conjuntos de las dos repeticiones



Análisis estadístico

ANOVA

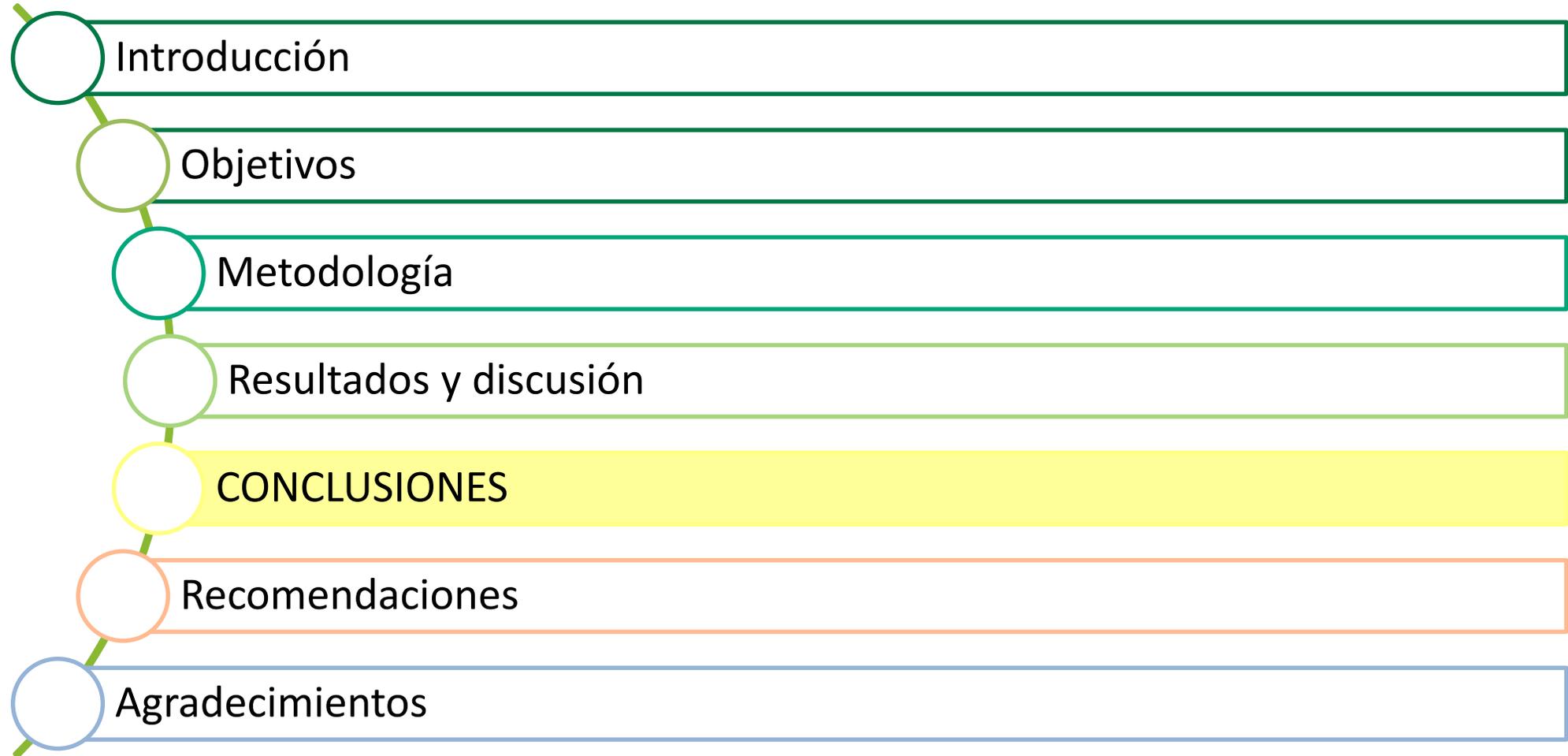
Factor	F	p value
Repeticion	0.07	0.7971
Organismo	24.07	<0.0001
Cantidad de ADN	0.60	0.6174

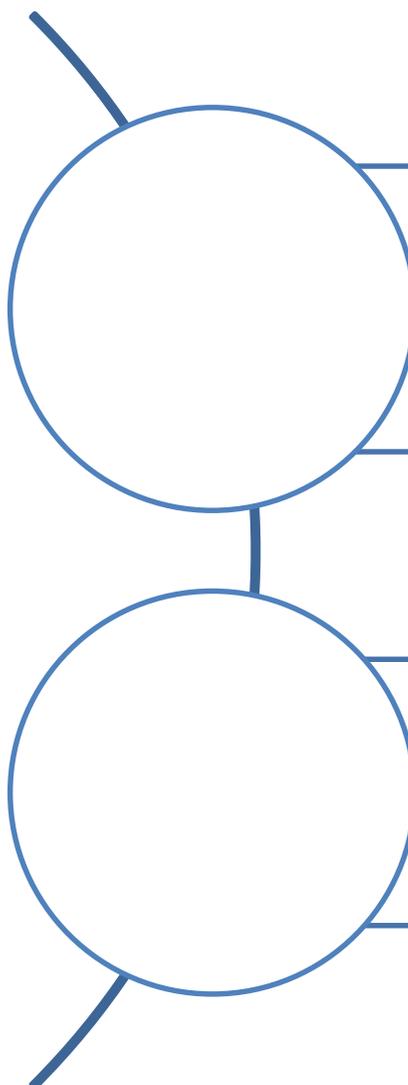
Prueba Kruskal Wallis

Variable	Organismo	Repeticion	Concentraci3n de ADN	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Resultado CPS	1	1	12,50	5	0,80	0,45	1,00	17,44	0,0380
Resultado CPS	1	1	25,00	5	1,00	0,00	1,00		
Resultado CPS	1	1	50,00	5	0,60	0,55	1,00		
Resultado CPS	1	1	100,00	5	1,00	0,00	1,00		
Resultado CPS	2	1	12,50	5	1,00	0,00	1,00		
Resultado CPS	2	1	25,00	5	1,00	0,00	1,00		
Resultado CPS	2	1	50,00	5	0,80	0,45	1,00		
Resultado CPS	2	1	100,00	5	1,00	0,00	1,00		
Resultado Foc R1	1	1	12,50	5	0,40	0,55	0,00		
Resultado Foc R1	1	1	25,00	5	0,60	0,55	1,00		
Resultado Foc R1	1	1	50,00	5	0,40	0,55	0,00		
Resultado Foc R1	1	1	100,00	5	0,40	0,55	0,00		
Resultado Foc R1	2	1	12,50	5	0,60	0,55	1,00		
Resultado Foc R1	2	1	25,00	5	0,20	0,45	0,00		
Resultado Foc R1	2	1	50,00	5	0,40	0,55	0,00		
Resultado Foc R1	2	1	100,00	5	0,40	0,55	0,00		

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 ± 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 ± 5.66%







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** que los desarrollados por Li et al. (2013) que amplificaron inespecíficamente la muestra CAV0 (*Foc R1*).

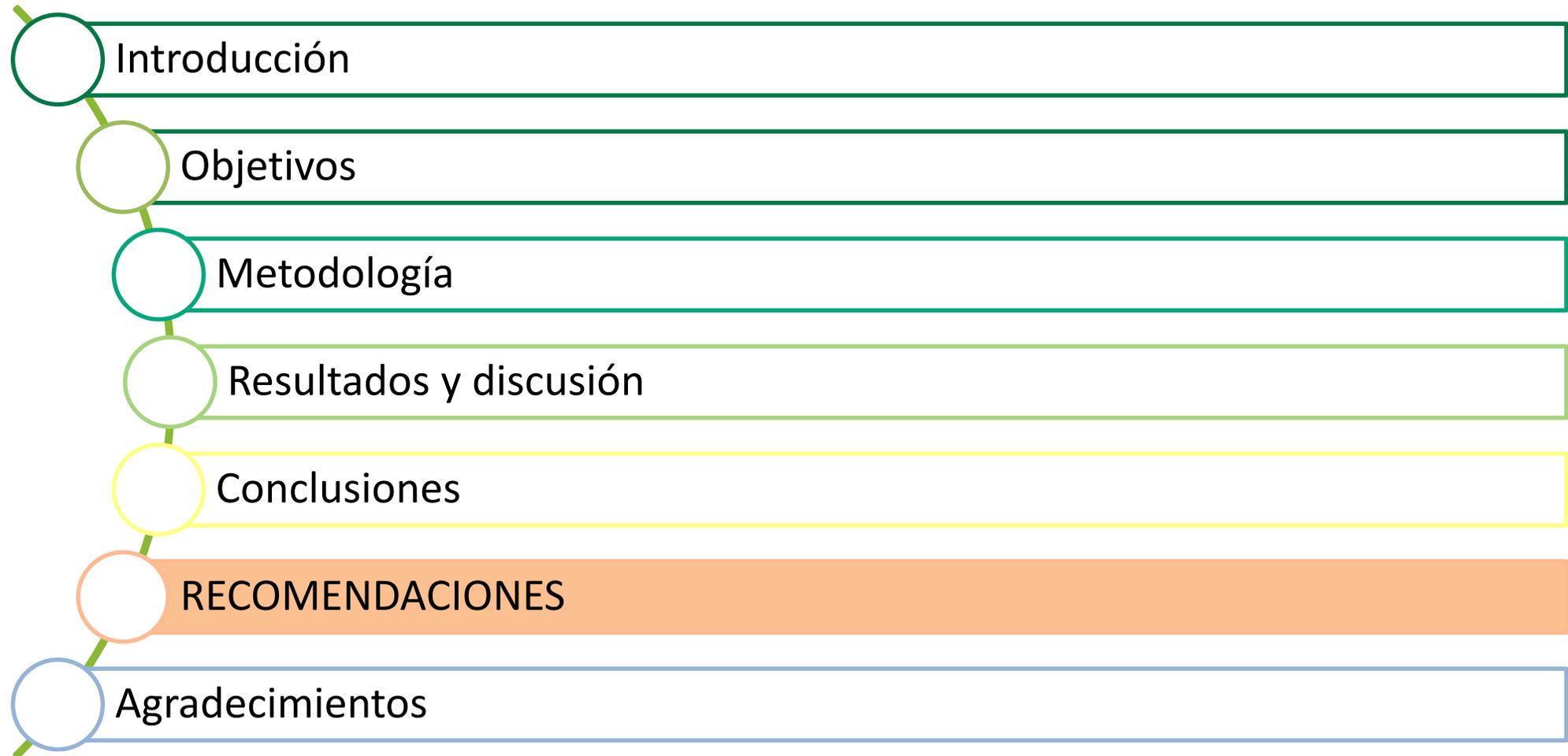


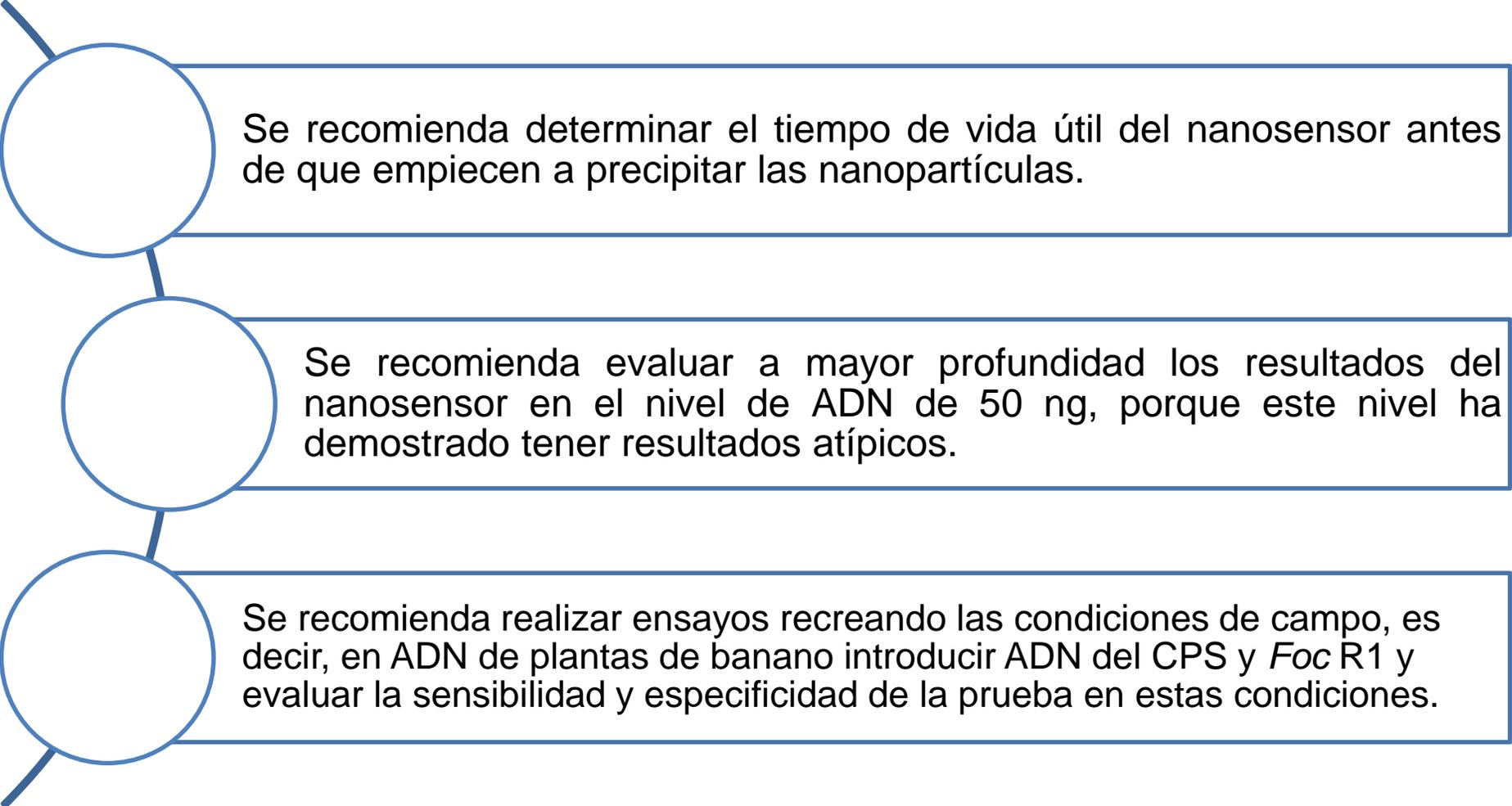
La prueba de nanosensor para detectar *Foc* R4T **se estandarizó con un volumen total de reacción de 50 μ L** de los cuales: 1 μ L corresponde al ADN de la muestra, 9 μ L de PBS (pH 5), 25 μ L de nanopartículas funcionalizadas y 15 μ L de ácido HCl 0,1 N; los resultados se observan a los **20 min** de 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. *ubense* 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.







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.



Francisco Flores, PhD

Tutor del proyecto

Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE – Ecuador



Freddy Magdama, PhD

ESPOL

Equipo iGEM Ecuador 2021

Francisco Garrido, Ing.

IDgen – Quito, Ecuador

Vanessa Gaona, Ing.

IDgen – Quito, Ecuador

FAMILIA Y AMIGOS



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA