

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Validación de protocolo para la identificación molecular de  
*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en banano**

**Angie Veronica García Cárdenas**

**Ingeniería en biotecnología**

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito  
para la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga

Quito, 17 de mayo de 2024

# **UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

## **HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Validación de protocolo para la identificación molecular de  
*Fusarium oxysporum* f. sp.  *cubense* en banano**

**Angie Veronica García Cárdenas**

**Nombre del profesor, Título académico**

**Antonio León, PhD**

Quito, 17 de mayo de 2024

## © DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Angie Veronica García Cárdenas

Código: 00216584

Cédula de identidad: 1723608954

Lugar y fecha: Quito, 17 de mayo de 2024

## **ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN**

**Nota:** El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

## **UNPUBLISHED DOCUMENT**

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

-

## RESUMEN

El marchitamiento del banano, causado por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza tropical 4 es una amenaza devastadora para la industria global del banano al incidir en el cultivar comercial Cavendish y otras variedades de banano. Ecuador, uno de los principales exportadores mundiales, está constantemente expuesto a esta amenaza debido a la presencia del patógeno en países vecinos. La detección temprana es crucial para contener la propagación y mitigar las pérdidas económicas. En este contexto, este trabajo se propuso validar un protocolo de identificación molecular mediante PCR, empleando primers específicos para Foc TR4. Primero se realizó la identificación por morfología del aislado y para confirmar la identidad de *F. oxysporum* mediante BLAST se usaron los primers ITS y TEF. La identificación molecular por PCR se hizo con los primers W106, los cuales asisten en la identificación de *F. oxysporum* entre otras especies de *Fusarium*. Para identificar a Foc TR4 se usaron los primers W2987 y FocTR4. La fiabilidad del protocolo se estableció al evaluar la especificidad de los primers con ADN de otros aislados de *Fusarium* provenientes de banano y otros hospederos. Se demostró que los primers W2987 y FocTR4 son altamente específicos, amplificando únicamente muestras de Foc Raza 4 tropical, lo que los convierte en herramientas eficaces para la detección temprana del patógeno.

**Palabras clave:** Foc TR4, marchitamiento del banano, PCR, protocolo, primers específicos.

## ABSTRACT

Banana wilt caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4 poses a devastating threat to the global banana industry, affecting the Cavendish cultivar and other banana varieties. Ecuador, one of the main global exporters, is continuously exposed to this threat due to the presence of the pathogen in neighboring countries. Early detection is crucial to contain the propagation and mitigate economic losses. In this context, this study aimed to validate a molecular identification protocol using PCR, employing specific primers for Foc TR4. Initially, morphological identification of the isolate was conducted and primers ITS and TEF were used to confirm the identity of *F. oxysporum* through BLAST. The identification through molecular PCR was performed using W106 primers, which identify *F. oxysporum* between other species of *Fusarium*. To identify Foc TR4 primers W2987 and FocTR4 were utilized. The reliability of the protocol was established by evaluating primer specificity with DNA from other *Fusarium* isolates. It was demonstrated that W2987 and FocTR4 primers are highly specific, amplifying only samples of tropical Foc Race 4, making them effective tools for early detection of the pathogen.

**Key words:** Foc TR4, wilt of banana, PCR, protocol, specific primers.

**TABLA DE CONTENIDO**

INTRODUCCIÓN .....	10
MÉTODOS .....	13
Recolección de muestras de plantas infectadas .....	13
Aislamiento del hongo patógeno <i>Fusarium</i> .....	13
Caracterización macroscópica y microscópica del patógeno .....	13
Identificación molecular .....	14
Estandarización de PCR con primers específicos .....	14
Validación de protocolo y primers específicos .....	15
RESULTADOS .....	16
Caracterización morfológica y microscópica del patógeno .....	16
Identificación molecular del patógeno .....	16
Estandarización de primers específicos.....	16
Validación de protocolo y primers específicos .....	17
DISCUSIÓN .....	19
CONCLUSIONES .....	23
TABLAS .....	24
FIGURAS.....	25
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	30

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla #1. Muestras de <i>Fusarium</i> en diferentes hospederos para la validación de primers .....	24
Tabla #2. Identificación molecular con primers ITS y TEF1a mediante BLAST .....	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura #1. Caracterización morfológica y microscópica de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	25
Figura #2. Optimización de primers W106.....	26
Figura #3. Identificación de <i>F. oxysporum</i> con primers ITS y W106 .....	26
Figura #4. Identificación de <i>F. oxysporum cubense</i> Raza 4 tropical con primers W2987, FocTR4 y Six1a .....	27
Figura #5. Validación de protocolo con distintas muestras de <i>Fusarium</i> .....	28

## INTRODUCCIÓN

El banano es una musácea comestible considerado un alimento esencial para más de 400 millones de personas en todo el mundo debido a su valor nutricional y económico (Martínez et al., 2023). Además, este alimento es uno de los más consumidos e importantes del mundo y se cultiva en más de 135 naciones de las regiones tropicales y subtropicales. Sin embargo, según Magdama et al., (2020) las enfermedades son una gran limitación en la producción de banana para la exportación y el mercado nacional. La enfermedad más amenazante para la industria, a nivel mundial, es el marchitamiento del banano por *Fusarium*, causada por el hongo del suelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). La infección empieza por las raíces y avanza hasta obstruir los conductos xilemáticos de la planta lo que eventualmente causa su muerte (Kai-li et al., 2019). Además, la diseminación del patógeno es acelerada en áreas infectadas y, se da por medio de tejidos, en el agua, el salpique de la lluvia, por herramientas contaminadas, partículas del suelo del calzado, entre otras vías. Hasta ahora, no existen métodos eficaces para controlar la propagación del patógeno en campos infectados (Kai-li et al., 2019). Martínez et al., (2023) describe que las clamidosporas de Foc tienen la capacidad de adaptarse a condiciones extremas y sobrevivir en el suelo durante más de veinte años en ausencia de hospederos, sin control efectivo, por lo que estas tierras infectadas no se pueden usar y cambia de manera drástica la producción, dejando consecuencias devastadoras.

Como señala Kai-li et al., (2019), actualmente hay cuatro razas establecidas de Foc. Éstas son subdivisiones basadas en la capacidad del hongo para infectar a un grupo específico de las variedades de plantas de banano. **Foc Raza 1** es la variedad causante de la desaparición del banano "Gros Michel", que se usaba en la industria de exportación en América Central y del Sur

hasta finales de 1950. La marchitez vascular por este patógeno destruyó miles de hectáreas de plantaciones, lo que causó pérdidas millonarias y la desaparición de esta variedad. Fue remplazado por clones resistentes a Foc Raza 1, en su mayoría el banano de variedad Cavendish. Por otro lado, **Foc Raza 2** ataca a *Musa* "Bluggoe" y **Raza 3** ataca a *Heliconia* spp. Por último, **Foc Raza 4** está dividida en *tropical* y *subtropical*, pero la de mayor preocupación es Foc Raza 4 *tropical*; debido a que es altamente virulenta y es considerada la amenaza más letal para cultivares comerciales del sub-grupo Cavendish, que representan aproximadamente el 45% de la producción bananera global, además puede afectar a cultivares susceptibles a Raza 1 y Raza 2 (Ploetz, 2015).

Magdama et al., (2020) reporta una clasificación adicional comúnmente utilizada para los hongos que causan la marchitez por *Fusarium*, la cual se basa en la compatibilidad vegetativa. Las cepas se clasifican en un mismo grupo de compatibilidad vegetativa (VCG) cuando son capaces de anastomosarse y formar un heterocarion estable entre sí. Esto les permite a las cepas de hongos intercambiar material genético y contribuye a la variabilidad genética dentro de la población de hongos, por lo que varios VCGs pueden estar asociados con la misma raza.

La aparición de Foc TR4 se remonta en 1990 en el sudeste asiático y se ha extendido por todos los continentes, recientemente a América del Sur. En 2019 se reportó su aparición en Colombia, 2021 en Perú, donde se encontró ocho variedades diferentes de banano y plátano afectadas por marchitamiento por *Fusarium*, lo que indica la posible existencia de más de un grupo de compatibilidad vegetativa de Foc y, en 2023 se encontró en Venezuela (Martínez et al., 2023). Esto representa una amenaza constante para Ecuador, colocándolo en una situación de continua vulnerabilidad, debido a que, gran parte de la economía ecuatoriana depende de la

exportación de banana, siendo el primer exportador de banano a nivel mundial y representando el 26% de las exportaciones mundiales, además, la industria bananera, la producción y la exportación generan trabajo para más de un millón de familias ecuatorianas (Magdama et al., 2020).

Entre las estrategias para combatir este agente patógeno se encuentran la identificación temprana del patógeno para evitar su dispersión, así como el aislamiento de la finca y la eliminación mediante incineración de las plantas infectadas, también las que se encuentren en un radio de aproximadamente 10 centímetros alrededor (Senasica, 2023). Además, es fundamental implementar medidas preventivas como la vigilancia epidemiológica fitosanitaria en zonas de cultivo, evitar el traslado de plantas enfermas y no desecharlas en sistemas de riego y drenaje, utilizar herramientas exclusivas en cada finca, entre otras recomendaciones proporcionadas por Senasica (2023).

Entre los métodos de detección disponibles se encuentran las pruebas de patogenicidad, secuenciamiento, RFLP, LAMP, identificación morfológica y de estructuras reproductivas asexuales, sin embargo, estos métodos, por si solos, no son eficientes (Senasica, 2023). Por otra parte, existe otro método, la detección molecular por PCR, usando primers específicos, el cual es considerado el más eficiente en cuanto a diagnóstico de patógenos, y además es altamente específico y rápido (Kai-li et al., 2019). Por tal motivo, y considerando la importancia de la detección temprana de *Fusarium oxysporum* en banano, se planteó como objetivo de este trabajo la estandarización de un protocolo para la identificación molecular por PCR, que sea preciso y confiable, para detectar *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza tropical 4 (Foc TR4), usando primers específicos y validando dicho protocolo establecido con distintos aislados de *Fusarium* presentes en el laboratorio.

## MÉTODOS

### 1. Recolección de muestras de plantas infectadas

Se recolectaron muestras de plantas infectadas de la variedad Manzano (variedad susceptible a Raza 1 y Raza 4), que presentaban sintomatología de marchitez en sus hojas, de la finca Dole en la provincia del Guayas . Estas muestras fueron trasladadas al laboratorio de biotecnología agrícola y de alimentos de la USFQ, donde se realizó el aislamiento del hongo.

### 2. Aislamiento del hongo patógeno *Fusarium*

Para el aislamiento del hongo, se hizo la esterilización de las muestras en base al protocolo de Dhingra and Sinclair (1985). En primer lugar, se cortó tejido de las hojas que presentan sintomatología de tamaño 1 mm x 1 mm. A estos pedazos se los sumergió en solución de hipoclorito de sodio del 1.5% por 1 minuto, después se hizo un lavado por 1 minuto con alcohol al 70%. Finalmente se hizo 3 lavados consecutivos con agua destilada estéril. Los tejidos se secaron en papel toalla esterilizado para luego ser cultivados en medio PDA (Agar de Dextrosa de Patata – Difco) con el antibiótico gentamicina (0.05 g/l). Para preparar el medio PDA se siguió las instrucciones provistas por el fabricante. Se incubó por 7 días a 28 °C en la incubadora (Shell Lab). Después de 7 días, se hizo un pase de la cepa aislada a un nuevo medio de PDA con antibiótico, hasta que se obtuvo un cultivo puro.

### 3. Caracterización macroscópica y microscópica del patógeno

Primero se hizo la identificación morfológica del hongo en base a la forma y color del micelio y la caracterización morfológica de las macro y microconidias (Hlaiem et al., 2021). Para tomar una muestra del hongo, se usó cinta adhesiva transparente, luego se colocó junto con una gota de azul de metileno en un portaobjetos de vidrio. La muestra se observó en un microscopio

Leica DM750 en lente de 40X y 100X y se tomaron fotos para comparar con las características reportadas en el artículo de Hlaiem et al., (2021).

#### **4. Identificación molecular**

Para la extracción del material genético del hongo se empleó el kit de extracción Power Soil Kit DNA de Qiagen, y se siguió el protocolo establecido por el fabricante. La región ITS (Internal Transcribed Spacer) se amplificó usando los primers ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White et al., 1990). La región TEF1a (Elongation factor 1 alpha) se amplificó usando los primers EF -1 (5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3') y EF-2 (5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3') (O'Donnell et al, 1998). La PCR se realizó en el termociclador LABNET MULTIGENE. El programa utilizado para amplificar los primers ITS se realizó bajo los siguientes parámetros: desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, hibridación a 52°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 45 segundos y una extensión final a 72°C durante 15 minutos. Por otro lado, el programa de PCR amplificado de TEF1a fue: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 55°C durante 2 minutos, extensión a 72°C durante 2 minutos y una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 2% después de electroforesis a 100V por 30 minutos. Los amplicones obtenidos fueron secuenciados por MACROGEN en Corea utilizando el método de Sanger. Posteriormente, las secuencias obtenidas fueron comparadas mediante la herramienta NCBI BLAST (Búsqueda Local de Alineamientos y Secuencias de Proteínas) del Centro Nacional de Información Biotecnológica.

#### **5. Estandarización de PCR con primers específicos**

Primero, para identificar a *Fusarium oxysporum* se usó los primers W106F (5'-GCAGTCGTACGTCATCGACC-3') y W106R (5'-CCATGGCAGATGGCGAGTCA-3') reportados en Kai-li, et al., (2019). El programa de amplificación se estandarizó mediante gradiente de temperatura y se realizó bajo los siguientes parámetros: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, hibridación a 58°C durante 40 segundos, extensión a 72°C durante 1 minuto y una extensión final a 72°C durante 5 minutos. Luego, para determinar si la muestra es *Fusarium oxysporum* Raza 4 tropical (Foc TR4) se probó 3 pares de primers los cuales fueron: los primers SIX1a\_266\_F (5'-GTGACCAGAACTTGCCCACA-3') y SIX1a\_266\_R (5'-CTTTGATAAGCACCATCAA-3') (Carvalhais et al., 2019), los primers W2987F (5'-TGCCGAGAACCACTGACAA-3') y W2987R (5'-GCCGATGTCTTCGTCAGGTA-3') (Li et al., 2012), y los primers FocTR4F (5'-CACGTTTAAGGTGCCATGAGAG-3') y FocTR4R (5'-GCCAGGACTGCCTCGTGA-3') (Dita et al., 2010). Los tres 3 pares de primers fueron amplificados utilizando los siguientes parámetros: desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, hibridación a 55°C durante 15 segundos, extensión a 72°C durante 10 segundos y extensión final a 72°C durante 5 minutos. Para ambos productos de PCR, la electroforesis se corrió a 100V durante 40 minutos en un gel de agarosa al 2%.

## 6. Validación de protocolo y primers específicos

La validación del protocolo consiste en probar los primers estandarizados con otros aislados de *Fusarium* para confirmar su especificidad. En la **Tabla 1** se describen los aislados utilizados para dicha validación, donde se muestra, el hospedero del aislado, la identificación microscópica y molecular de cada uno, y la especie, en caso de conocerla.

## RESULTADOS

### Caracterización morfológica y microscópica del patógeno

La identificación se hizo en base a la morfología de las colonias y observación microscópica de conidias después de 7 días de incubación. El aislamiento fue a partir de hojas que presentaban sintomatología y se obtuvo un solo aislado. En medio PDA, el micelio es de apariencia algodonosa y abundante, color blanquecino con tonos violeta pálido (**Figura 1a y 1b**). En la identificación morfológica se encontró que las macroconidias tienen forma de hoz o casi rectas, con paredes delgadas, presentan entre 3 a 5 septos que miden entre 27 a 55  $\mu\text{m}$  de largo y 3.3 a 5.5  $\mu\text{m}$  de ancho (**Figura 1c**). Por otro lado, las microconidias no tienen septos, miden entre 6 a 16  $\mu\text{m}$  de largo y entre 2.4 a 3.5  $\mu\text{m}$  de ancho y pueden ser ovalados, elípticos o reniformes (**Figura 1d**) (Hlaiem et al., 2021).

### Identificación molecular del patógeno

Ya aislada la cepa, se etiquetó como F1, y se confirmó la identidad de la especie mediante el análisis de secuencias de ADN de las regiones ITS y TEF. En la base de datos BLAST, se determinó que el aislado es *Fusarium oxysporum* con un porcentaje de identidad del 99 al 100% como se muestra en la **Tabla 2**.

### Estandarización de primers específicos

Una vez ya caracterizada la cepa, sigue la estandarización de primers mediante PCR. Se estandarizó el protocolo de amplificación para los primers W106 ya que el reportado en Kai-li, et al., (2019) no dio resultados óptimos, presentando inespecificidad en los fragmentos. La modificación se realizó con gradientes de temperatura en la temperatura de hibridación y se varió

el número de ciclos, obteniendo como óptimo la temperatura de hibridación de 58°C durante 40 segundos y 40 ciclos. En la **Figura 2** se ve la optimización del primer W106, la cual no presenta inespecificidad y se ve un fragmento claro a 58°C. Ya estandarizado el protocolo, se realizó la amplificación de la región ITS, utilizando como control un hongo distinto al género *Fusarium*, el cual fue previamente identificado molecularmente como *Clonostachys rosea*. El pocillo etiquetado como B (Blanco) corresponde a una muestra sin ADN. Posteriormente, con estas mismas muestras se hizo la PCR con los primers W106 para determinar si es *Fusarium oxysporum*. un fragmento de 729 pb indica un resultado positivo para la muestra F1 como se observa en la **Figura 3**.

Para determinar si la muestra es Foc TR4 se evaluaron los primers. SIX1, W2987 y FocTR4. Se obtuvo ADN de Foc TR4 (etiquetado como TR4) como un control provisto por el CIBE (Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador). En la **Figura 4a** se observa que los primers W2987 y FocTR4 solo amplifican la muestra TR4 que es el ADN de raza 4 tropical y discrimina la muestra F1 que es Foc Raza 1. Para los primers W2987 se observa un fragmento de 452 pb mientras que los primers FocTR4 presentan un fragmento de 463pb. En la **Figura 4b** se observa que los primers Six1a no amplificó la muestra correspondiente, por lo tanto, se descartaron del ensayo.

### **Validación de protocolo y primers específicos**

Para la validación de primers se usaron diversas muestras de ADN de *Fusarium* descritas en la **Tabla 1**. Siguiendo el protocolo, se realizó la amplificación con primers ITS4 y 5 para todas las muestras (**Figura 5a**), con la finalidad de confirmar que todas las muestras contengan ADN de hongo y que este ADN esté en óptimas condiciones para las PCRs. Todas las muestras amplificaron un fragmento de 522 pb. Luego se identificó si las muestras son *F. oxysporum* con

los primer W106, donde se obtiene un fragmento de 729 pb para todas las muestras a excepción de la muestra 4.2b (**Figura 5b**) que fue previamente identificada molecularmente como *Fusarium concentricum* (Barriga, 2020). Por último, en los protocolos para identificar Foc raza 4 tropical se observó que, tanto con los primers W2987, y con los primers FocTR4, no hubo amplificación en ninguna de las muestras, a excepción del control TR4 (**Figura 5c y 5d**).

## DISCUSIÓN

El hongo de suelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* fue aislado a partir de hojas de planta de banano variedad Manzano que presentaban sintomatología de marchitez. En base a los criterios morfológicos macroscópicos y microscópicos que se observa en la **Figura 1**, el aislado F1 se identificó como *Fusarium* sp., al tener resultados consistentes con las características que se reportan en Hlaiem et al., (2021). Además, la amplificación de la región conservada ITS con los primers ITS4 y 5 y la región TEF1a usando los primers EF -1 y EF-2, permitió distinguir la especie aislada. De acuerdo con Nailis et al., (2006) estos genes se usan como genes de referencia para la identificación de hongos porque están involucrados en las funciones celulares básicas y se expresan de manera constitutiva en diferentes fases del ciclo de vida fúngico. Es importante recalcar que los genes utilizados dependen de cada organismo en estudio (Bohle et al., 2007). Las secuencias obtenidas fueron comparadas utilizando la herramienta BLAST del NCBI donde se confirmó que la muestra F1 es *Fusarium oxysporum* con un porcentaje de identidad del 99 al 100%, lo cual nos da una buena referencia de qué especie se tiene.

Para identificar a *F. oxysporum* mediante PCR se usó los primers W106, reportados por Kai-li et al. (2019), para amplificar la región genética asociada con la biosíntesis de fumonisinas. Según Mionetto (2017) estas son un grupo de micotoxinas producidas únicamente por hongos del género *Fusarium*, lo que las convierte en una herramienta poderosa para la identificación de *F. oxysporum*. El programa de amplificación de este par de primers se encuentra reportado en Kai-li et al., (2019), sin embargo, no se obtuvo resultados adecuados por lo que se modificó la temperatura de hibridación original (52°C) y el número de ciclos del protocolo (30 ciclos). Se ajustó la temperatura de hibridación teniendo en cuenta la investigación de Obradovic et al. (2013), quienes señalan que este parámetro es crucial para optimizar la PCR. Por lo general,

estas temperaturas se sitúan entre 50-60°C. Incluso pequeñas desviaciones de 1-2°C pueden influir en la especificidad de la reacción, haciendo que temperaturas demasiado bajas pueden propiciar amplificaciones no específicas y temperaturas más altas pueden evitar la hibridación de manera efectiva. Por lo tanto, se exploraron diferentes gradientes de temperatura, que variaron desde los 50°C hasta las 63°C. En la **Figura 2** se muestra el gradiente de temperatura donde se identificó la temperatura óptima de hibridación, establecida en 58°C, en esta temperatura no se observaron fragmentos inespecíficos y se obtuvo un amplicón del tamaño esperado de 729 pb. Además, se evaluó el número de ciclos desde 30 a 40 ciclos y se encontró el número óptimo de ciclos (40 ciclos), mientras que el resto del protocolo mantuvo las condiciones reportadas.

Una vez estandarizado el protocolo de amplificación, se realizó una PCR con la muestra F1 y se añadió un ADN control que no pertenezca al género de *Fusarium*, con el objetivo de demostrar la especificidad de los primers para distinguir *F. oxysporum* de otros hongos. Este ADN pertenece a un hongo del suelo conocido como *Clonostachys rosea*, el cual fue previamente identificado (Barriga, 2020). Se empleó BLAST verificar que no ocurra hibridación de los primers con *C. rosea*. Se observó que los primers no presentan complementariedad con la secuencia genómica de *C. rosea*, lo que sugiere que no habría interacción específica entre los primers y este organismo fúngico. Como se observa en la **Figura 3**, tanto el ADN del *Fusarium* F1, como el ADN control de *C. rosea*, amplifican con los primers ITS obteniendo un fragmento de 522 pb, ya que ambos tienen la región conservada ITS, que se encuentra en todos los hongos (White et al., 1990). La observación de esta amplificación nos indica que el ADN esté íntegro y que todos los reactivos de la PCR funcionan correctamente. Por otro lado, con los primers W106 se obtiene solo un fragmento de 729 pb para la muestra F1 y se puede determinar que la muestra sí es *F. oxysporum*. Estos primers funcionan adecuadamente porque no amplifican otros hongos

como *C. rosea*. Por esta razón, los análisis morfológicos y moleculares determinaron que la marchitez de las plantas de banano recolectadas es causada por *F. oxysporum*.

Para la identificación de Foc Raza 4 tropical se evaluaron los primers W2987 (Li et al., 2012), FocTR4 (Dita et al., 2010) y Six1a (Carvalhais et al., 2019). En la **Figura 4 a)** se observa la PCR para los primers W2987 y FocTR4 donde solo amplifican la muestra TR4 y no amplifica la muestra F1. La muestra F1 fue identificada en el laboratorio de biotecnología agrícola y de alimentos de la USFQ mediante ensayos de patogenicidad como Foc Raza 1, por ende, ambos primers son precisos para discriminar entre Raza 1 y Raza 4. En la **Figura 5 b)** se observa la PCR con los primers Six1, donde no hubo amplificación, por lo que se descartan del protocolo. Los primers Six1 se reportaron en el estudio de Carvalhais et al., (2019) donde se describen como proteínas efectoras del xilema secretado (SIX), porque promueven la colonización del patógeno y contribuyen al avance de la enfermedad. En Carvalhais et al., (2019) se emplearon para detectar VCGs y razas relevantes de Foc en banano, evaluando la variación de secuencias en los genes SIX. Sin embargo, Magdama et al., (2020) reporta varias limitaciones en el uso de los VCGs para respaldar las clasificaciones de razas debido a que varios VCGs pueden estar asociados con la misma raza, lo que sugiere una complejidad en las relaciones evolutivas que no puede ser completamente considerada mediante esta metodología. En este contexto, una explicación plausible de por qué los primers SIX1a no amplificaron con la muestra TR4 podría ser la diversidad genética significativa del patógeno.

En la **Figura 5** se observa las PCRs para la validación de primers con aislados de *Fusarium* descritos en la **Tabla 1**, los cuales fueron obtenidos de diferentes huéspedes y diferentes tejidos. El fin de esta sección es validar que los primers puedan discriminar entre especies y Razas de *Fusarium*, de otros aislados. Siguiendo el protocolo, la **Figura 5 a)** muestra la amplificación de

todos los aislados con primers ITS, obteniendo un fragmento de 522 pb. Estos resultados son los esperados ya que la región ITS es conservada en hongos (White et al., 1990). En la **Figura 5 b)** se usan los primers W106 para distinguir a *F. oxysporum*. Todas las muestras tienen un resultado positivo con un fragmento de 729 pb a excepción de la muestra 4.2b. Esta muestra ya ha sido identificada molecularmente como *F. concentricum*, como se reporta en la **Tabla 1**. Además, se tiene un control positivo que es la muestra H2 que fue identificada molecularmente como *F. oxysporum*. En base a esta evidencia, los primers W106 son específicos y confiables para distinguir a *F. oxysporum*.

Finalmente, la **Figura 5 c)** indica la PCR con los primers W2987, donde podemos observar que solo la muestra TR4 amplifica el fragmento esperado de 452 pb. Estos primers fueron descritos en Li et al., (2012) y Agrocalidad (2020) los usa en su protocolo de detección por PCR. La región blanco de estos primers es un gen para proteínas hipotéticas, que es una región presumiblemente relacionada con la virulencia (Magdama et al., 2020). La fiabilidad de estos primers se validó al emplear diversas muestras de ADN de Fusarium, donde únicamente la muestra TR4 exhibió un resultado positivo al amplificar el fragmento esperado. En la **Figura 5 d)** se observa los resultados de amplificación con los primers Foc TR4, primers que fueron descritos en Dita et al., (2012) y Agrocalidad (2020) también los implementa en su protocolo de detección. La región blanco es Inter-genic Spacer (IGS) del operón ribosomal. La especificidad de los primers es validada al no amplificar ninguna muestra solo la TR4 dando un fragmento claro de 463 pb. Por todo lo expuesto, se determinó que ambos primers son útiles para un protocolo de detección temprana de Foc TR4 al proporcionar resultados rápidos y confiables en cuanto a su especificidad.

## CONCLUSIONES

*Fusarium oxysporum cubense* Raza 4 tropical es un patógeno del suelo que al infectar plantas de banano y dispersarse deja consecuencias devastadoras. Dada su importancia y reciente dispersión en los países vecinos, es crucial para Ecuador contar con un método de identificación rápido, preciso y confiable, como la detección molecular por PCR, para el confinamiento de las tierras afectadas y evitar la dispersión del patógeno.

En este proyecto se logró identificar las características morfológicas y microscópicas de *F. oxysporum*. Se estandarizó un protocolo efectivo para poder distinguir *Fusarium oxysporum* de otros aislados de *Fusarium*, mediante la técnica de PCR, utilizando los primers W106, donde se alcanzó mejores resultados modificando la temperatura de hibridación a 58°C y subiendo a 40 ciclos, obteniendo un fragmento de 729 pb.

Finalmente, para identificar la variante Foc TR4 se ha validado la especificidad de los primers W2987 y FocTR4, evidenciando que estos primers son capaces de distinguir exclusivamente esta Raza al ser probados con ADN de otras especies de *Fusarium*.

## TABLAS

**Tabla #1.**

### Muestras de *Fusarium* en diferentes hospederos para la validación de primers

Muestra	Huésped vegetal	Tejido	Identificación	Especie fúngica
<b>F1</b>	<i>Musa acuminata</i>	Hoja	Microscópica y molecular	<i>Fusarium oxysporum</i>
<b>4.2b</b>	<i>Rubus niveus</i>	Hoja	Microscópica y molecular	<i>Fusarium concentricum</i>
<b>21.1b</b>	<i>Rubus niveus</i>	Hoja	Microscópica	<i>Fusarium</i>
<b>4.3b</b>	<i>Rubus niveus</i>	Hoja	Microscópica	<i>Fusarium</i>
<b>H2</b>	<i>Hylocereus monacanthus</i>	Fruto	Microscópica y molecular	<i>Fusarium oxysporum</i>
<b>M5H1.2</b>	<i>Selenicereus triangularis</i>	Fruto	Microscópica	<i>Fusarium</i>
<b>3.1V</b>	<i>Gypsophila xlence</i>	Tallo	Microscópica	<i>Fusarium</i>
<b>J</b>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Tallo	Microscópica	<i>Fusarium</i>
<b>TR4</b>	<i>Musa acuminata</i>	Hoja	Microscópica y molecular. Control provisto por el CIBE	<i>Fusarium oxysporum</i> Raza 4 tropical

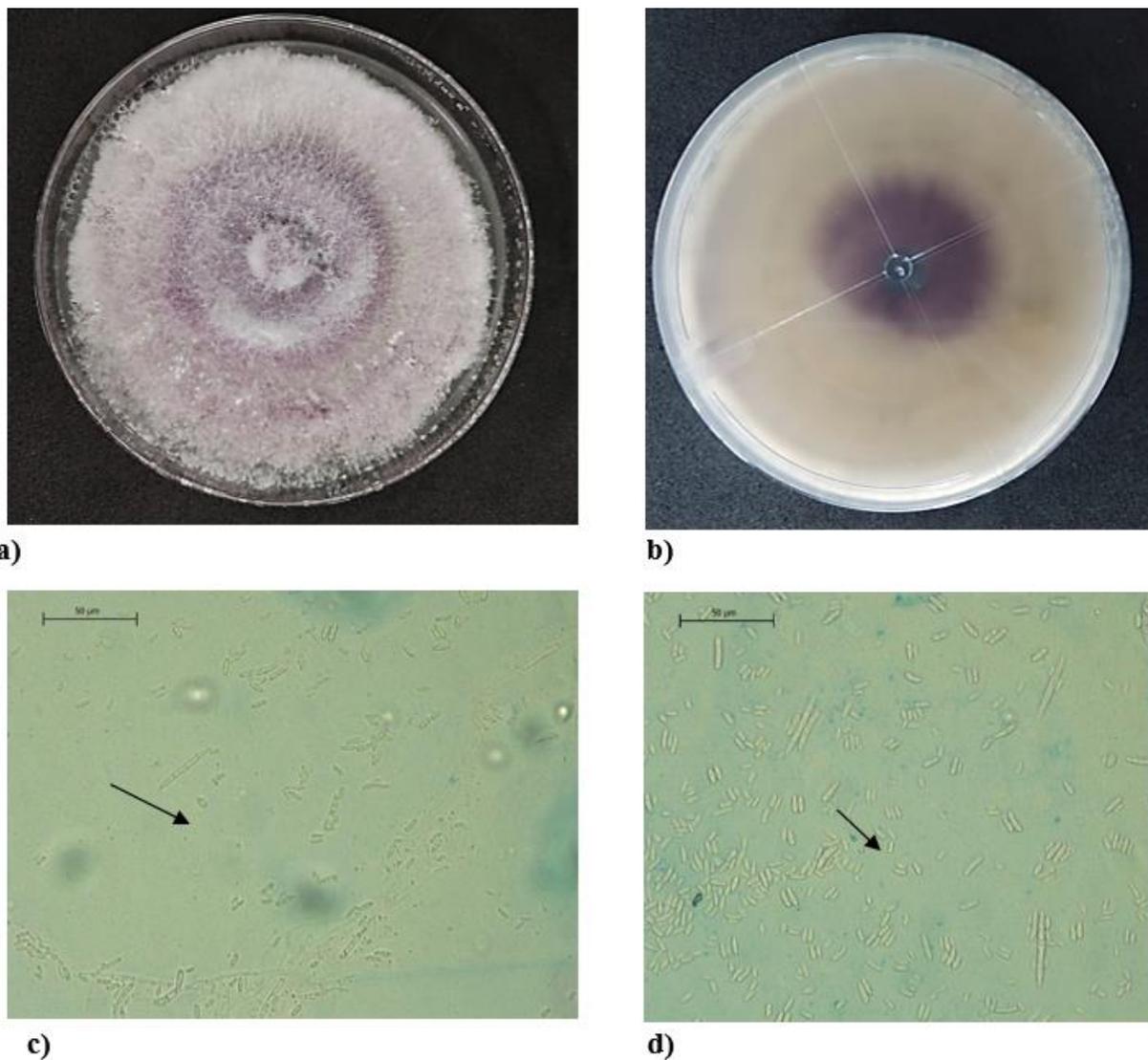
**Tabla #2.**

### Identificación molecular con primers ITS y TEF1a mediante BLAST

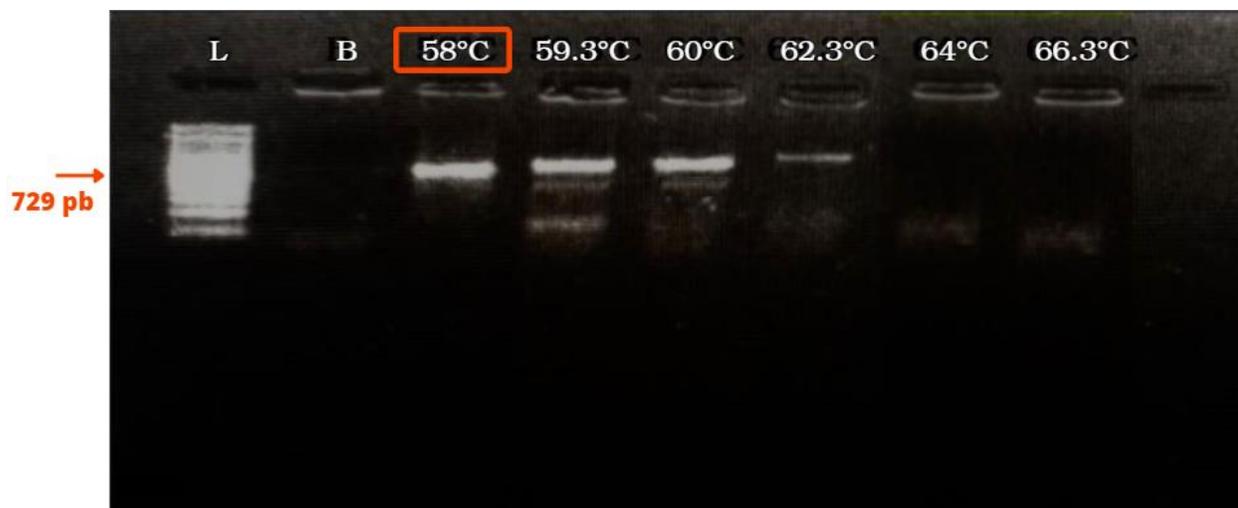
Muestra	Nombre científico	Región	Tamaño	Query cover	Valor E	% Identidad	Genbank
<b>F1</b>	<i>Fusarium oxysporum</i>	ITS	522 pb	100%	0.0	100%	KU729045.1
		TEF	275 pb	99%	1e-136	99.63%	MN386739.1

Fuente: Nucleotide BLAST, 2024

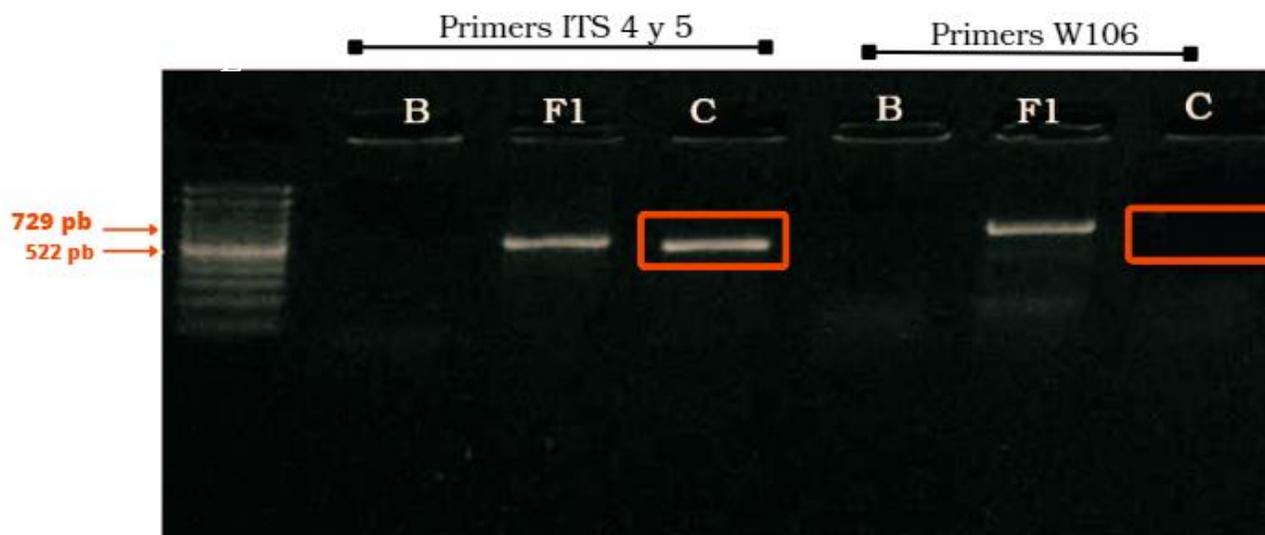
## FIGURAS



**Figura #1.** Caracterización morfológica y microscópica de *Fusarium oxysporum*. En la figura a) se observa la parte frontal del micelio, en b) se observa la parte posterior del micelio. En la figura c) la flecha señala las macroconidias y d) se señala a las microconidias. Ambas se observaron bajo el lente de 40X.

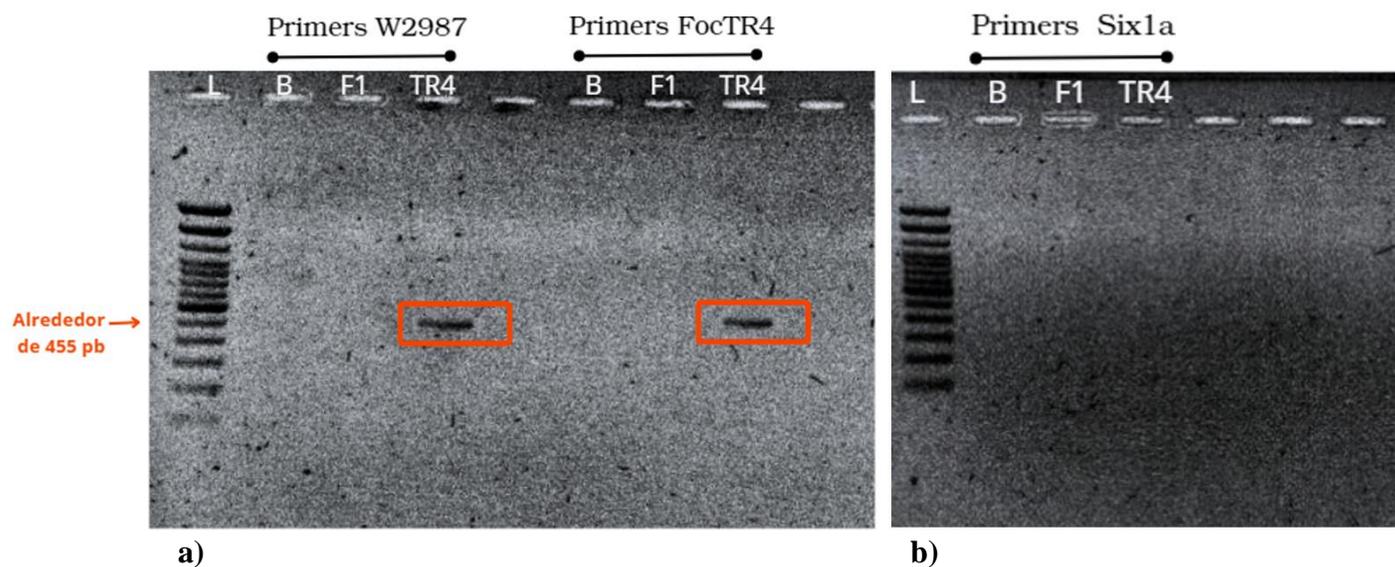


**Figura #2. Optimización de primers W106.** En el primer pocillo se observa el Ladder (L), le sigue el Blanco (B) que no posee ADN. Después se encuentra la gradiente de temperatura que va desde los 58°C hasta los 66.3°C. La muestra utilizada es la aislada, caracterizada y etiquetada como F1. La temperatura óptima se señala en el cuadro rojo que es 58°C donde se ve un fragmento claro de 729 pb

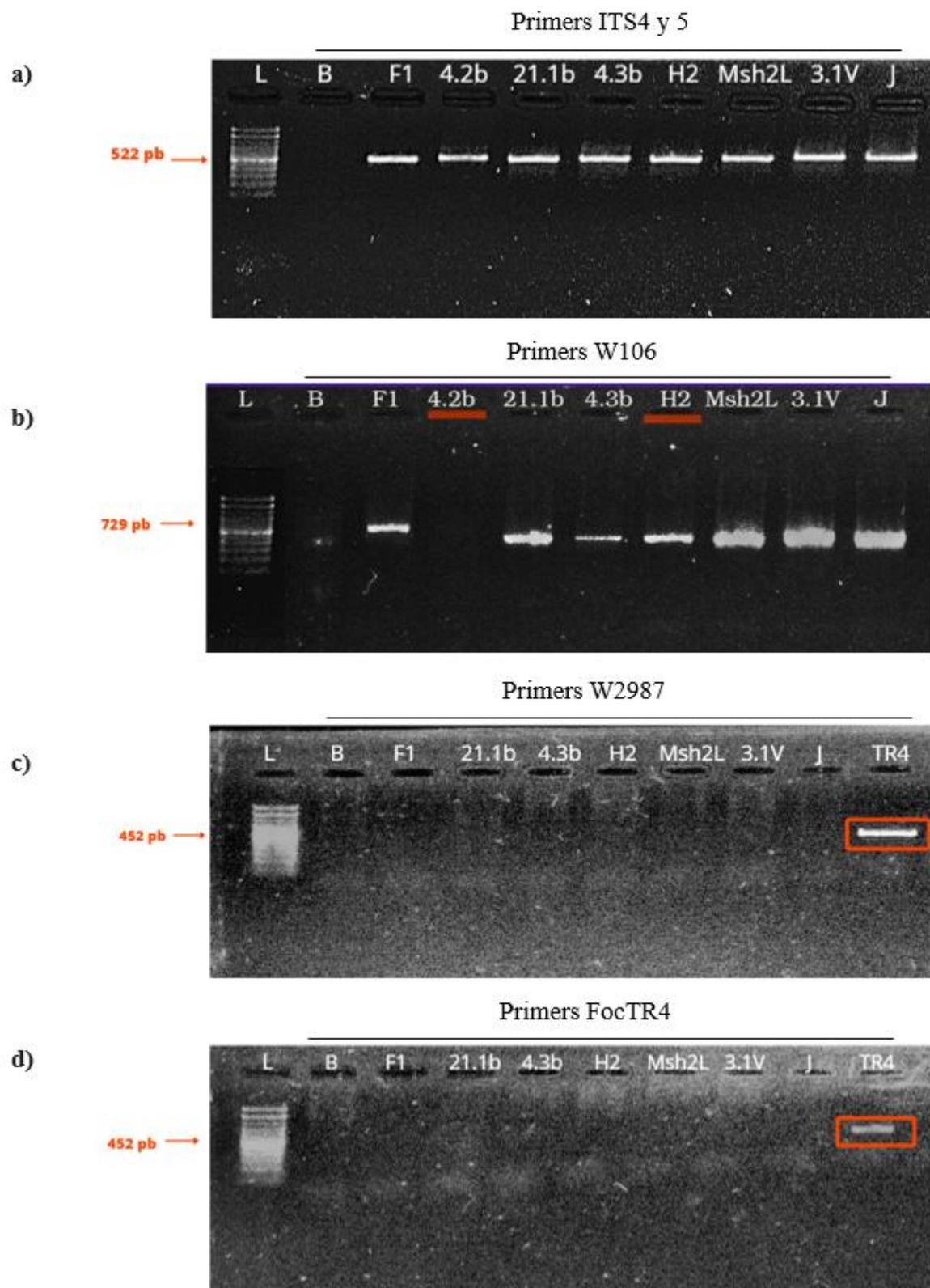


**Figura #3. Identificación de *F. oxysporum* con primers ITS y W106.** De izquierda a derecha, primero se observa el Ladder (L) en el primer pocillo, seguido por los primers ITS4 y 5 en el cual amplifican la muestras F1 y C (*Clonostachys rosea*) dando un fragmento claro de 522 pb .

Le sigue la amplificación con los primers W106 donde solo amplifica la muestra F1 dando un fragmento específico de 729 pb. La muestra *Clonostachys* no amplifica con estos primers.



**Figura #4. Identificación de *F. oxysporum cubense* Raza 4 tropical con primers W2987, FocTR4 y Six1a.** a) de izquierda a derecha, en el primer pocillo se encuentra el Ladder (L), seguido por las muestras amplificadas con los primers W2987 y primers FocTR4, donde: blanco (B), F1 (aislado de *Fusarium oxysporum* Raza 1), TR4 (ADN de Foc TR4) dando un fragmento de 452 pb para W2987 y con un fragmento de 463 pb para FocTR4. b) para los primers Six1a no hay amplificación por ende no se ven fragmentos



**Figura #5. Validación de protocolo con distintas muestras de *Fusarium*.** Todas las muestras usadas se describen en la Tabla 1. En la figura a) los primers ITS4 y 5 amplifican para todas las

muestras y se obtiene un fragmento 522 pb. b) Con los primers W106 todas las muestras tienen un fragmento de 729 pb a excepción de la 4.2b. c) y d) Para los primers W2987 y Foc TR4 no hay fragmento en ninguna muestra solo en la muestra TR4 (ADN de Foc TR4).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agencia de regulación y control fito y zoosanitario (Agrocalidad). (2020). Plan nacional de contingencia para la prevención, detección y control de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Raza 4 Tropical (Foc R4T). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00547>
- Barriga, N. (2020). Exploring fungal pathogens to control invasive raspberry (*Rubus niveus*) in Galapagos Islands.
- Bohle, K., Jungebloud, A., Gocke, Y., Dalpiaz, A., Cordes, C., Horn, H. & Hempel, DC. (2007). Selection of reference genes for normalization of specific gene quantification data of *Aspergillus niger*. *J. Biotechnol.*
- Carvalhais, L., Henderson, J., Rincon-Florez, V., O'Dwyer, C., Cziślowski, E., Aitken, E. & Drenth, A. (2019). Molecular Diagnostics of Banana *Fusarium* Wilt Targeting Secreted-in-Xylem Genes. *Frontiers in plant science*, 10, 547. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00547>
- Dhingra, O., & Sinclair, J. (1995). *Basic Plants Pathology Methods*. CRC Lewis Publishers. Boca
- Dita, M., Waalwijk, C., Buddenhagen, I., Souza Jr, M. and Kema, G. (2010), A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen. *Plant Pathology*, 59: 348-357. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02221.x>
- Hlaiem, S., Della, G., Barberini, S., Danti, R. & Ben, M. (2021). Morphological and molecular identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with *Olea europaea* var

sylvestris decline phenomenon in Tunisia. *Plant Pathology & Quarantine* 11(1), 15-22.

Doi 10.5943/ppq/11/1/3

Kai-li W, Wei-zhong CHEN, Shuai YANG, Ya WEN, Yu-ru ZHENG, Wilfred Mabeche Anjago, Ying-zi YUN, Zong-hua WANG. (2019). Isolation and identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in Fujian Province, China. *Journal of Integrative Agriculture*, Volume 18, Issue 8. 1905-1913. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)62149-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62149-5)

Li, M., Yu, X., Wang, H., Zhou, J., Xi, P. & Jiang, Z. (2012). Rapid detection and identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race 1 and Race 4. *Sci. Agric. Sin.* 45, 3971–3979

Magdama, F., Monserrate-Maggi, L., Serrano, L., García Onofre, J., & Jiménez-Gasco, M. (2020). Diversidad Genética de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, el patógeno del marchitamiento por *Fusarium* del banano, en Ecuador. *Plantas* , 9 (9), 1133. MDPI AG. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.3390/plants9091133>

Martínez G, Olivares BO, Rey JC, Rojas J, Cardenas J, Muentes C, Dawson C. El avance del marchitamiento por *Fusarium* Tropical Race 4 en musáceas de América Latina y el ¿Caribe: situación actual. *Patógenos* . 2023; 12(2):277.

<https://doi.org/10.3390/pathogens12020277>

Mionetto, A. (2017). Hongos toxicogénicos y producción de micotoxinas en silos de sorgo húmedo. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/10220/1/uy24-18501.pdf>

Nailis, H., Coenye, T., Nieuwerburgh, F., Deforcr, D. & Nelis, H. (2006). Development and evaluation of different normalization strategies for gene expression studies in *Candida albicans* biofilms by real-time PCR. *BMC Mol. Biol.* 7: 25–33. 10.1186/1471-2199-7-25

- Obradovic, J., Jurisic, V., Tomic, N., Mrdjanovic, J., Perin, B., Pavlovic, S., & Djordjevic, N. (2013). Optimization of PCR conditions for amplification of GC-Rich EGFR promoter sequence. *Journal of clinical laboratory analysis*, 27(6), 487–493.  
<https://doi.org/10.1002/jcla.21632>
- O'Donnell, K., Kistler, H., Cigelnik, E. & Ploetz, R. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2044–2049.  
doi:10.1073/pnas.95.5.2044.
- Ploetz, R. (2015). Marchitez por *Fusarium* del plátano. *Fitopatología*, 105 , 1512-1521.  
Raton, Florida. 6 DIOPT
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (Senasica). (2023). *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Raza 4 Tropical. Marchitez por *Fusarium*.  
<https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF/ContenidoPublico/Fichas%20tecnicas/Ficha%20T%C3%A9cnica%20Fusariosis%20de%20las%20mus%20ceas.pdf>
- White, T., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innes MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press. p 315–322.